



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**INTERACCIONES CELULARES AL INICIO DE LA FOLICULOGÉNESIS EN EL
OVARIO DEL CONEJO.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ADRIANA CASTRO DOMÍNGUEZ**

**TUTOR:
DR. HORACIO MERCHAN LARIOS
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO
Instituto Nacional de Pediatría.**

**DRA. HILDA MORAYMA GUERRERO NETRO
Facultad de Medicina Veterinario y Zootecnia UNAM.**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., DICIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Interacciones celulares al inicio de la foliculogénesis en el ovario del conejo

que presenté para obtener el grado de -----Maestría--- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Adriana Castro Domínguez

403011719

(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

INTERACCIONES CELULARES AL INICIO DE LA FOLICULOGÉNESIS EN EL OVARIO DEL CONEJO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ADRIANA CASTRO DOMINGUEZ

TUTOR:

HORACIO MERCHANT LARIOS

COMITÉ TUTOR:

FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO

HILDA MORAYMA GUERRERO NETRO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., 2023

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM por permitirme continuar con mi formación académica.

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en este proyecto. Brindándome en todo momento su apoyo, tiempo y dedicación en el desarrollo en cada etapa de este.

Al M.C. Alejandro Marmolejo Valencia por todo el apoyo técnico y asesoría en cada una de las técnicas empleadas en este proyecto.

Al M.C. Pedro Collazo Saldaña, y a la Bióloga Alexis Paulina Ortega García por su asesoría en la técnica de Inmunofluorescencia. Así como al apoyo brindado en la obtención de muestras biológicas para las técnicas empleadas.

Al M.C. Luis Javier Chino Palomo por la asesoría en la redacción de tesis y apoyo técnico en la técnica de Inmunofluorescencia.

A la Dra. Elisa Gutiérrez Hernández encargada del módulo de cunicultura del Centro de Enseñanza Agropecuaria, FES Cuautitlán Campo 4, UNAM por su ayuda y brindar gran parte de los animales requeridos en este proyecto.

A la Dra. Hilda Morayma Guerrero Netro y al Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo por su disposición a ser parte de mi formación académica.

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del proyecto:

CONACYT Efecto del Bisfenol A sobre la programación del desarrollo gonadal del conejo: Estudio *in vivo e in vitro* (No. 166012) a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios.

A CONACYT por la beca otorgada para alumnos de Maestría con número de CVU: 647227

RESUMEN

Durante el desarrollo del ovario, las células germinales (CGs) y las células pregranulosas (CPs) forman los cordones ovígeros (CoVs). Las CGs primero se dividen por mitosis y después, inician una etapa en que se dividen de manera incompleta formando sincicios. Las CGs quedan interconectadas por puentes intercitoplásmicos (PIs) en los que, grupos de ovogonias integran sincicios denominados “cysts” (en inglés). En ellos, las ovogonias inician el proceso de meiosis en forma sincronizada diferenciándose como ovocitos. Sin embargo, la mayoría de los ovocitos mueren por apoptosis y los sobrevivientes, junto con las células pregranulosas forman la reserva folicular del ovario adulto. Aunque existen estudios recientes en el ratón sobre los mecanismos celulares y moleculares involucrados en dichos procesos, su extensión a otras especies de mamíferos es escasa y queda por ser confirmada. Por ejemplo, el desarrollo sincronizado de los cistos en el ovario que ocurre en el ratón, en el conejo, la diferenciación de los cistos es asincrónica, es decir, coexisten cistos con ovogonias proliferando y ovocitos que inician la meiosis. Con base en esto el objetivo principal de nuestro trabajo fue describir la morfología y ultraestructura de las CGs en los cordones ovígeros desde la etapa proliferativa hasta la formación de la reserva folicular, empleando como unidad experimental al conejo. Para ello, empleamos muestras de ovarios de 31 días poscoito, 7,14 y 21 días posparto. Fijados por perfusión y procesadas para Microscopía Electrónica de Transmisión e Inmunofluorescencia con microscopía confocal. Describimos la relación entre la etapa proliferativa de las ovogonias y la formación de los PIs. Además, correlacionamos el inicio de la meiosis y la interacción de las CGs y CPs con la apoptosis durante la remodelación de los cistos. Los resultados sugieren que, el proceso de remodelación de los cordones ovígeros y la interacción entre las CGs y las células somáticas *in situ*, provee datos relevantes para la interpretación de los recientes estudios referentes a la diferenciación de las CGs *in vitro*. Se concluye que, la distribución espacial de las CGs en los CoV del conejo difiere a la descrita en el ratón. En el ratón no hay una regionalización histológica de corteza y medula, por lo tanto, la distribución de las CGs y folículos se percibe homogénea. Por el contrario, en el ovario temprano en el conejo, los folículos primarios se forman en la región medular, en tanto que, los folículos primordiales que permanecen como reserva folicular, derivan de la región cortical.

Palabras claves: cistos, puentes intercitoplasmáticos, ovogonias, ovocitos, meiosis, foliculogénesis, reserva folicular.

ABSTRACT

During ovarian development, germ cells (GCs) and prefollicular cells (PCs) form the ovigerous cords (CoV). GCs first divide by mitosis and then initiate a stage in which they divide incompletely, forming syncytia. GCs They are interconnected by intercytoplasmic bridges (PIs) in which groups of oogonia integrate syncytia called "cysts". In them, the oogonia initiate the process of meiosis in a synchronized manner, differentiating as oocytes. However, most of the oocytes die by apoptosis and the survivors, together with the prefollicular cells, form the follicular reserve of the adult ovary. Although there are recent studies in the mouse on the cellular and molecular mechanisms involved in these processes, their extension to other mammalian species is scarce and remains to be confirmed. The main objective of our work was to describe the morphology and ultrastructure of GCs in ovigerous cords from the proliferative stage to the formation of the follicular reserve using the rabbit as a model. In contrast to the synchronized development of cysts in the mouse ovary, differentiation of cysts in the rabbit is asynchronous; that is, cysts coexist with proliferating oogonia and oocytes that initiate meiosis. We used samples of ovaries of different perinatal ages fixed by perfusion and processed for Transmission Electron Microscopy and immunofluorescence with confocal microscopy. We describe the relationship between the proliferative stage of oogonia and the formation of PIs. We correlated the initiation of meiosis and the interaction of GCs and CPs with apoptosis during cyst remodeling. Our results suggest that the ovigerous cord remodeling process and the interaction between GCs and somatic cells in situ provide relevant data for the interpretation of recent studies regarding GC differentiation in vitro. We conclude that the spatial distribution of GCs in rabbit CoVs differs from that described in mice. Thus, in the early ovary the primary follicles are formed in the medullary region, while the primordial follicles that remain as the follicular reserve derive from the cortical region.

Keywords: cysts, intracytoplasmic bridges, oocytes, meiosis, oogenesis, folliculogenesis

INDICE	
RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
Establecimiento de la gónada bipotencial.....	1
Determinación del sexo gonadal.....	3
Diferenciación del Ovario.....	4
Diferenciación sexual de las células germinales.....	5
Formación de cistos de células germinales.....	6
Inicio de la Foliculogénesis	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
Objetivos Particulares	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
Animales	14
Tratamiento con BrdU	14
Obtención de muestras.....	14
Procesamiento del Material Biológico para MET.....	15
Procesamiento de muestras para inmunofluorescencia.....	15
Inmunofluorescencia para BrdU	16
RESULTADOS.....	18
Relación histológica y ultraestructural de células germinales y somáticas en ovarios de gazapos prenatales.	18
CGs en proliferación en gazapos recién nacidos.....	20
Formación y distribución de los PIs en prenatales y neonatos.....	20
Inicio de la meiosis	25
Formación de folículos primordiales	29
Muerte celular durante el desarrollo ovárico	30
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	39

ABREVIATURAS Y SIGLAS 41
REFERENCIAS 43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gónada indiferenciada de conejo.
- Figura 2. Diferenciación ovárica en el conejo.
- Figura 3. Línea del tiempo del desarrollo de CGs en ratón.
- Figura 4. Conformación histológica en ovarios prenatales de 30 dpc.
- Figura 5. Ultraestructura de CGs en ovario de 30 dpc.
- Figura 6. Inmunofluorescencia para BrdU (rojo) y LIN 28 (verde) en ovario de conejo recién nacido (31 dpc).
- Figura 7. Proliferación de CGs y somáticas en ovario de conejo recién nacido (40X).
- Figura 8. Formación de puentes intercitoplasmáticos en células germinales durante la citocinesis en ovarios prenatales (30 dpc) y recién nacidos (31 dpc).
- Figura 9. Puentes intercitoplasmáticos en células germinales a los 30 y 31 dpc.
- Figura 10. Ovocitos en meiosis a los 5 dpp.
- Figura 11. Proliferación de CGs por mitosis y meiosis (7 dpp).
- Figura 12. Localización de dos mitocondrias en un puente intercitoplásmico a los 5dpp.
- Figura 13. Distribución de los PIs en ovarios a los 7 dpp.
- Figura 14. Diferenciación celular de la corteza externa hacia la corteza interna a los 14dpp.
- Figura 15. Sincicios de ovocitos con cuerpos de Balbiani y folículos primordiales a los 15dpp.
- Figura 16. Inmunofluorescencia para TEX 14 (verde) y DAPI (azul) en ovario de 18 dpp.
- Figura 17. Distribución de cistos y folículos en la corteza a los 21 dpp.
- Figura 18. Cisto ubicado en la corteza externa en ovario de 21 dpp.
- Figura 19. Ultraestructura de cistos en ovarios de 21 dpp.
- Figura 20. Ultraestructura de folículos primordiales en ovario de 21dpp.
- Figura 21. Muerte celular durante el desarrollo ovárico.
- Figura 22. Línea del tiempo durante el desarrollo folicular en ovario del conejo.

INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual implica la combinación de material genético resultado de la fusión de dos gametos: femenino y masculino. En mamíferos, las gónadas masculinas y femeninas (testículos y ovarios) son órganos sexuales del aparato reproductor, encargados de producir los gametos y hormonas sexuales.

Los ovarios están altamente organizados para llevar a cabo dos funciones primarias: 1). Forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-gónada como glándulas endocrinas y 2). Como órganos reproductores generan ovocitos mediante el proceso de foliculogénesis. Durante el desarrollo fetal, los ovarios están formados por varios tipos celulares: células germinales (ovogonias y ovocitos) y células somáticas (células de la granulosa, células de la teca y células del estroma ovárico) (Peralta y Nicolás, 2013). Durante el desarrollo embrionario, el ovario se diferencia a partir de la cresta genital. Diversos procesos celulares y morfogenéticos ocurren durante su diferenciación histológica, a saber: La migración de células germinales primordiales (CGPs), la proliferación y diferenciación de ovogonias y el desarrollo consecutivo de cordones ovígeros, cistos y folículos (Baillet y Mandon-Pepin, 2012). Es durante el periodo perinatal en el ratón, cuando se establece la reserva folicular del ovario adulto constituido por una numerosa población de folículos primordiales (Pepling y Spradling., 2001). El desarrollo folicular ocurre de manera cíclica, durante el cual un grupo de folículos primordiales se diferencian en folículos primarios, secundarios y antrales que culminan con la ovulación del ovocito maduro para ser fertilizado y desarrollar a un nuevo individuo. Sin embargo, sólo una pequeña cantidad de los folículos primordiales llegará a la ovulación ya que la mayoría sufren el proceso de atresia, degenerando durante la vida de la hembra (Peralta y Nicolás, 2013).

Establecimiento de la gónada bipotencial

La cresta gonadal se establece a partir del mesodermo intermedio en la región ventromedial del mesonefros (Merchant-Larios y Díaz-Hernandez, 2011). Con la llegada de las primeras CGPs de origen extraembrionario, se establece la extensión donde se situará la cresta genital. En el ratón, se vuelven visibles alrededor de los 10 días post coito (dpc) (Byskoy, 1986). El

engrosamiento del epitelio celómico y la migración de células del mesonefros a la cresta gonadal dan lugar a las células somáticas primitivas (Brambell y Parkes 1974; Upadhyay y Zamboni 1981). La gónada temprana indiferenciada es bipotencial, es decir, posee los elementos celulares para formar un ovario o un testículo.

Al inicio del desarrollo embrionario, las CGPs se diferencian en la región del epiblasto del blastocisto (Kelly, 1977). Después migran a través del intestino posterior y se establecen en la región urogenital asociándose con células somáticas de la cresta gonadal. Con el uso del microscopio óptico se distinguen de las células somáticas debido a su mayor tamaño (con un diámetro cuatro veces mayor) y su aspecto ameboide. A nivel ultraestructural, las CGPs poseen un núcleo grande y redondeado, abundantes polirribosomas, numerosas cisternas del retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi prominente, gránulos de glucógeno, gotas lipídicas, lisosomas y grandes mitocondrias con crestas laminares o tubulares (Merchant-Larios, 1975). En la gónada bipotencial se distinguen dos compartimentos histológicamente diferentes y separados por una membrana basal: El epitelial y el estromático. El compartimento epitelial está constituido por células somáticas de tipo epitelial y por CGPs. Su proliferación en la médula forma un epitelio pseudoestratificado que dará lugar a cordones sexuales. De acuerdo con el sexo cromosómico del embrión (XY o XX), los cordones sexuales se diferenciarán como cordones seminíferos en machos o como cordones ovígeros en las hembras. Por otro lado, el compartimento estromal se compone de vasos sanguíneos, células mesenquimales, fibroblastos y una matriz extracelular que incluye fibras de colágeno y fibronectina (Diaz-Hernández y Merchant-Larios 2017; Fig. 1).

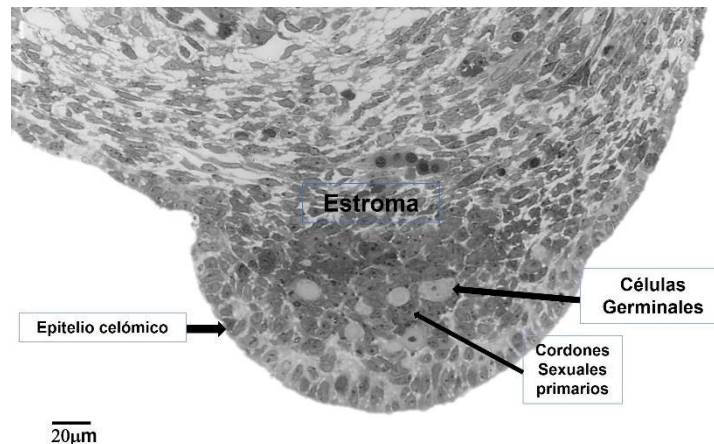


Figura 1. Gónada indiferenciada de conejo. La gónada indiferenciada morfológicamente está integrada por el epitelio celómico, los cordones sexuales primarios, CGs y el estroma. Este último, incluye vasos sanguíneos, fibroblastos y matriz extracelular. (Imagen no publicada).

Determinación del sexo gonadal

En los mamíferos, la presencia de un cromosoma X o Y en el pronúcleo del gameto masculino durante la fertilización, dará origen a individuos XX o XY que desarrollarán un fenotipo femenino o masculino, respectivamente. Por tanto, es el sexo cromosómico quien define el desarrollo de la gónada bipotencial hacia testículo u ovario. El factor principal que regula la diferenciación testicular es el gen *Sry* (Sex-determining Region of the Y chromosome) ubicado en el cromosoma Y (Sinclair y col., 1990; Gubbay y col., 1990). *Sry* induce la expresión del gen autosómico *Sox9* (Sex Determining Region Y-box 9) en las células preSertoli (Sekido y col., 2004). La expresión de estos genes es necesaria para el establecimiento de testículos funcionales en embriones XY. La ausencia del gen *Sry* en individuos XX desencadena cascadas genéticas alternativas que mantienen silenciado el gen *Sox9* y participan en el proceso de determinación y diferenciación del ovario. A diferencia de la determinación del testículo, en el ovario no se ha identificado un gen análogo al *Sry*. Algunos estudios revelan que los genes, *Wnt4* (Wingless-integration factor 4), *RSPO1* (Respondina-1) y *FoxL2* (Forkhead Box L2), están involucrados en el inicio del desarrollo ovárico (Parma y col. 2006; Bernard y col. 2007; Uhlenhaut y col., 2009). Sin embargo, no

está claro si estos genes dirigen la vía molecular que inhibe el desarrollo de gónadas masculinas o conducen a la determinación ovárica.

La diferenciación del ovario inicia tardíamente con respecto a la del testículo. En el ratón, a los 12.5dpc, se observa la formación de los cordones seminíferos. Mientras que, en ovarios no se observan diferencias morfológicas respecto a una gónada indiferenciada. Únicamente se presenta crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y CG (Merchant-Larios y Diaz-Hernández 2011). Las CG desempeñan un papel determinante en la diferenciación de los ovarios. En su ausencia no hay formación de folículos, al contrario de las gónadas masculinas, donde se lleva a cabo la formación del testículo sin la presencia de células germinales (Merchant-Larios, 1975). Por otro lado, las células somáticas muestran un comportamiento dimórfico. En machos, dan lugar a las células de Sertoli y en hembras a células granulosas.

Diferenciación del Ovario

En las gónadas femeninas los cordones primarios degeneran formando la *rete ovarii*. Las células somáticas precursoras de las células de la granulosa en contacto con las CGs forman los cordones ovígeros que, delimitados por una lámina basal se agrupan en la corteza. En la región medular del ovario se encuentran cordones ovígeros individualizados separados por abundante tejido estromático (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2017) (Figura 2). La mayor parte del volumen de los cordones ovígeros es ocupado por ovogonias, que se mantienen proliferando y diferencian hacia ovocitos una vez que comienza el proceso de meiosis. En especies con meiosis inmediata, es decir, que se inicia un poco después de la diferenciación sexual de la gónada (ratón y rata), no se produce la organización distintiva corteza-médula a diferencia de especies con meiosis tardía como el humano y el conejo (Byskov, 1986).

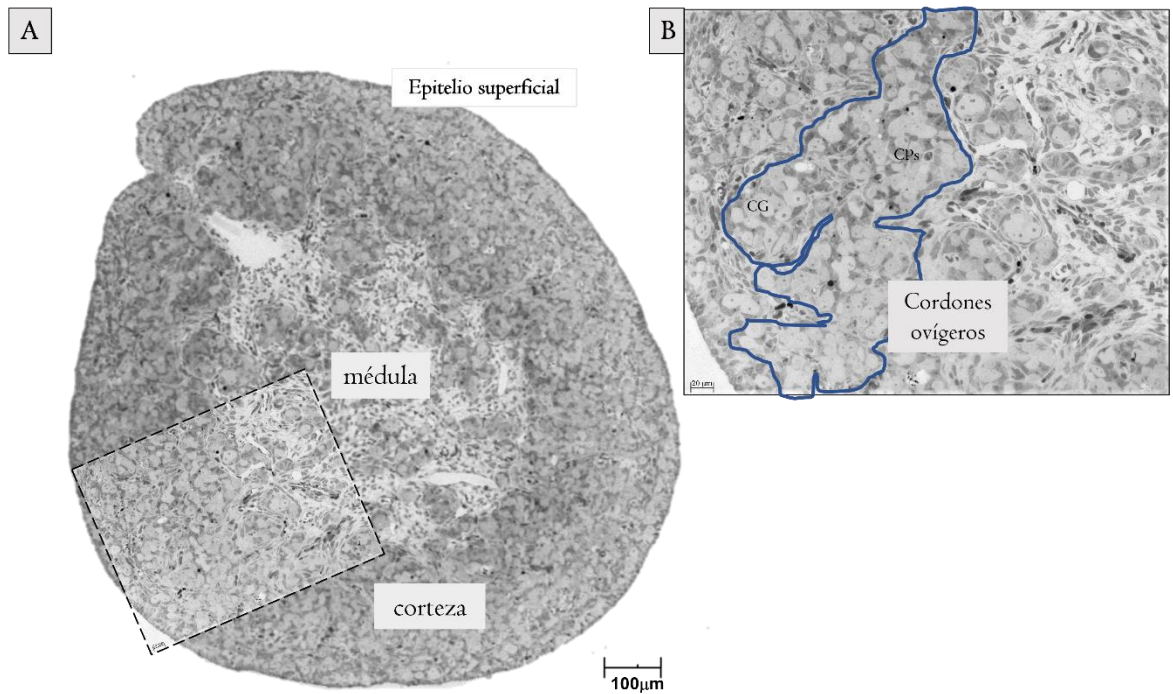


Figura 2. Diferenciación ovárica en el conejo. **A.** Corte transversal de ovario de conejo a los 30dpc. A la periferia se encuentra el epitelio superficial. En la gónada se distinguen dos regiones: la corteza ovárica y la región medular. **B.** Correspondiente a la zona punteada de la imagen A. Se observa una zona de la corteza ovárica, donde se encuentran los cordones ovígeros (línea azul), formados por células germinales (CG) y células pregranulosas (CPS). (Imagen no publicada).

Diferenciación sexual de las células germinales.

Las CGPs proliferan mitóticamente desde el inicio de la migración y durante su establecimiento en la gónada bipotencial. En gónadas XY, las CG entran en arresto mitótico durante la vida fetal o perinatal hasta la pubertad, donde inicia la meiosis (Hilscher y col., 1974). En las gónadas XX, las ovogonias se diferencian en ovocitos una vez iniciada la meiosis durante la vida fetal o perinatal. Sin embargo, se detiene en diploteno de la profase I durante el desarrollo ovárico, hasta el reinicio de la meiosis I. En el ratón la fase de diploteno inicia a los 17.5 dpc (Borum, 1961). En el conejo, la ovogénesis inicia un día después del nacimiento (Peters y col., 1965). Antes de la ovulación se reinicia y completa la meiosis I e inicia la meiosis II, deteniéndose en metafase II. La meiosis II se reanuda sólo si el ovocito es fecundado.

En el ratón, el mesonefros produce la mayor parte de ácido retinoico (AR) que ingresa a la gónada (Menke y Page 2002). El AR a partir de los 13.5dpc (Koubova y *col.*, 2006) induce a las CGs a expresar el gen *Stra8* (Stimulated by retinoic acid) propiciando el inicio de la meiosis en el ovario (Bowles y *col.*, 2006; Koubova y *col.*, 2006; Anderson y *col.*, 2008). En contraste en el testículo fetal, la degradación del AR por la enzima CYP26B1 previene el inicio de la meiosis (Zamboni y Upadhyay 1983; Bowles y *col.*, 2006). En otros mamíferos con un periodo más largo de gestación, el mesonefros sufre un proceso de regresión antes del inicio de la meiosis. Por ejemplo, en humanos y el conejo el AR se produce dentro de la propia gónada fetal (Le Bouffant y *col.*, 2010; Díaz-Hernández y *col.*, 2019). En el conejo se observó la expresión de ALDH1A2, (principal enzima involucrada en la síntesis de AR) en las células de soporte de los cordones seminíferos y ovígeros de machos y hembras, respectivamente (Díaz-Hernández y *col.*, 2019). Iniciada la meiosis, la remodelación de los cordones ovígeros da lugar a la formación de folículos primordiales, los cuales están constituidos por ovocitos rodeados de células de la granulosa.

Formación de cistos de células germinales

Después de la anafase, la citocinesis es el paso final de la división celular que conduce a la partición del citoplasma y culmina con la separación física de las células hijas. Durante la citocinesis se especifica el plano de división en la célula madre, seguido de la construcción de un anillo contráctil integrado por actina-miosina. La separación de las células hijas (abscisión) se completa con la constricción final del anillo contráctil que forma un puente intercelular (Eggert 2006; Bar y Gruneberg 2007). Los puentes intercelulares que preceden a la abscisión son estructuras transitorias en las células somáticas. Sin embargo, la detención de los surcos de incisión en las CGs e interacción con ciertas proteínas transforman estas uniones en puentes intercitoplásmicos (PIs) estables (Fawcett y *col.*, 1954; Fawcett, 1961; Robinson y Cooley, 1996; Greenbaum y *col.*, 2011), originando agrupaciones de células comunicadas por el citoplasma a manera de sincicio.

Las CGs interconectadas forman un sincicio denominado “germ cell cyst” o “cyst” del inglés (Gondos, 1973; Spradling, 1993; de Cuevas y *col.*, 1997; Pepling y *col.*, 1999). En

el idioma español, ha sido traducido como “quiste germinal” (Scott F. Gilbert, 2005), “nidios de ovogonias” o “cúmulos de células germinales” (Peralta y Nicolas, 2013). Sin embargo, en este trabajo lo referiremos usando la palabra “cisto” por su brevedad y similitud con el término en el idioma inglés. No está claro cuál podría ser el papel de los cistos al inicio de la ovogénesis y la foliculogénesis. El intercambio de nutrientes, moléculas reguladoras y organelos entre las células hermanas sincronizadas es evidente. (Robinson y Cooley 1996). En las hembras, los cistos permiten que una célula se especialice como el ovocito putativo y reciba grandes cantidades de componentes de las células nodrizas. La formación de cistos implica una alteración en el ciclo celular y esto de alguna manera podría facilitar el inicio de la meiosis. Otra posibilidad es que la formación de cistos facilite la biogénesis de organelos (Pepling y *col.*, 1999). Sin embargo, en los testículos los PIs aparecen en una etapa del desarrollo más tardía y su papel es sincronizar el proceso de espermatogénesis cíclica en los tubos seminíferos. (Fawcett y *col.*, 1959).

La formación de los cistos ováricos se ha descrito ampliamente en *Drosophila melanogaster*. A partir de una célula germinal fundadora (cistoblasto) inicia una serie de cuatro divisiones sincrónicas para producir 16 células (cistocitos) interconectadas por PIs denominados canales anulares. Sólo una de las 16 células se diferencia como ovocito. Las 15 células restantes, funcionan como “nodrizas” (Brown y King 1964; Koch y King 1966; Pepling y *col.*, 1999). Las células nodrizas transfieren parte de sus organelos y su citoplasma y, posteriormente mueren apoptosis (Pepling y *col.*, 1999). Los organelos recibidos por el ovocito forman el denominado cuerpo de Balbiani, (formado por: (mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico)). (Cox y Spradling 2003).

Los residuos del huso mitótico durante las cuatro divisiones de los cistocitos en *Drosophila* forman el “fusoma” un organelo citoplasmático específico de la línea germinal. La formación del fusoma fue descrita por primera vez en el escarabajo buceador (*Dytiscus*) y se desarrolla a partir de un remanente del huso mitótico por lo que se denominó residuo del huso o fusoma (revisado en Lin y *col.*, 1994; de Cuevas y *col.*, 1997). Después de completar la mitosis en los cistocitos, el residuo o desagregado del huso mitótico entran en contacto

fusionándose con residuos de divisiones anteriores. Lo anterior forma una estructura citoplasmática que corre por los canales anulares con un patrón de interconexión entre los cistocitos. El "fusoma" resultante adquiere una apariencia ramificada con brazos que se extienden a través de cada PI en el cisto (revisado en Lin y col., 1994). Al microscopio electrónico el fusoma se observa como una región distintiva del citoplasma rica en fibrillas y pequeñas vesículas (Telfer, 1975).

El fusoma se desintegra poco después de completada la formación del cisto cuando las células nodrizas mueren por apoptosis (de Cuevas y col., 1997). En *Drosophila* el fusoma es necesario para la formación de cistos y las proteínas esqueléticas de la membrana espectrina y proteína hts (*hu-li tai shao*) regulan las divisiones de los cistocitos (Lin y Spradling, 1994). El proceso de formación, composición y requerimientos de los PIs en las CGs difiere entre especies (Robinson y Cooley, 1996; Greenbaum y col., 2007; Haglund y col., 2011). En el ratón la proteína TEX 14 (**T**estis- **e**xpressed gene 14) es un componente esencial de los PIs durante la espermatogénesis y la ovogénesis. Sin esta proteína los PIs no se forman durante la gametogénesis (Greenbaum y col., 2006; Greenbaum y col., 2009). La proteína TEX 14 es necesaria para convertir los cuerpos medios (anillo de actina-miosina y microtúbulos constreñidos) en PIs estables (Greenbaum y col., 2007). Otras proteínas que participan en la formación de los PIs son la proteína mitótica similar a la quinesina 1 (MKLP1/ KIF 23) y la proteína activadora de GTPasa Rac de células germinales masculinas (MgcRacGAP) que componen el cuerpo medio durante la telofase (Kuriyama y col., 2002; Mishima y col., 2002).

Los ovocitos de mamíferos también se desarrollan en cistos y poseen algunas similitudes con los cistos en *Drosophila*. En el ratón, los cistos se forman después de la migración de las CGPs a la cresta genital entre el 10.5 y 13.5 dpc (Pepling y Spradling, 1998). El número de CGs que conforman los cistos es muy variable y puede alcanzar hasta 30 células (Lei y Spradling 2013). La formación de cistos con células en múltiplos de dos y la ausencia de fusoma sugiere que las divisiones de CGs en ovarios de ratón se sincronizan mediante un proceso diferente al de *Drosophila* (Pepling y Spradling, 1998). Evidenciando que las CGs

mitóticas del cisto en ratón no permanecen interconectadas y sincronizadas durante todo el período de proliferación mitótica. Los cistos recién formados pueden fragmentarse en cistos más pequeños. La apoptosis de las CGs ocurre en el momento en que entran en meiosis e inicia la foliculogénesis. A los 13.5 dpc existen aproximadamente 6000 CGs por ovario. Entre el 20.5 y 22.5 dpc los cistos se desintegran, el número total de CGs disminuye bruscamente por apoptosis a 2000 y los ovocitos sobrevivientes (aproximadamente el 33%) inician la formación de folículos primordiales (Pepling y Spradling, 2001) (Figura 3).

Lei y Spradling (2016) observaron que, en el ratón, los ovocitos del cisto que mueren después de transferir parte de sus organelos al ovocito dominante son equivalentes a las CGs nodrizas de *Drosophila*. Este hallazgo demuestra la asombrosa conservación evolutiva del proceso de enriquecimiento de organelos del ovocito definitivo, a partir de una contribución pluricelular. Mediante microscopía electrónica, se observaron mitocondrias en los puentes intercitoplasmáticos (PIs) y rupturas de las membranas de los ovocitos adyacentes del cisto, sugiriendo que los organelos se transportan entre las células. Los ovocitos que contienen cuerpos de Balbiani cuadruplican su tamaño para el día 4 posnatal, diferenciándose como ovocitos primarios. Por otro lado, los ovocitos sin cuerpos de Balbiani permanecen pequeños y sufren apoptosis similar a las células nodrizas de *Drosophila* (Lei y Spradling 2016).

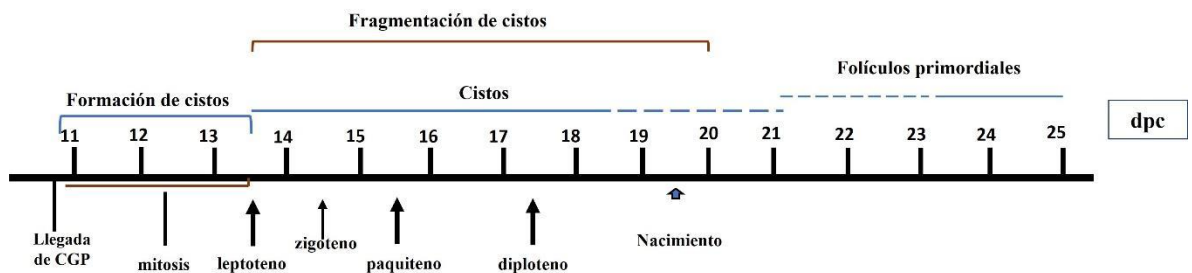


Figura 3. Línea del tiempo del desarrollo de CGs en ratón. Los cistos se forman entre el 10,5 y 13,5 dpc. La meiosis y progresión a sus diferentes etapas comienzan aproximadamente en los días indicados. Los folículos primordiales comienzan a formarse poco después del nacimiento., Modificada de Pepling y Spradling (2001)

Inicio de la Foliculogénesis

El inicio de la foliculogénesis está caracterizado por la formación de folículos primordiales que dan lugar a la reserva folicular del ovario adulto. El folículo terciario que puede llegar a ovular se conforma de células de la teca externa, células de la teca interna, células granulosas y el ovocito primario. Los ovocitos maduran dentro del folículo para la formación de óvulos que, al llegar a la madurez reproductiva tendrán capacidad de ser fertilizados después de la ovulación, en un proceso paralelo a la maduración del folículo. La formación de folículos primordiales es dependiente de la presencia de ovocitos. En un trabajo publicado por Merchant-Larios (1975) se administró busulfán a embriones de rata a los 11 dpc, evidenciando que, en ausencia de CGp en ovarios tempranos, no hay formación de folículos y los cordones ovígeros permanecen indiferenciados en el ovario adulto estéril.

La foliculogénesis se inicia durante el desarrollo fetal (en humanos, ovejas, vacas, cerdos y cabras) o después del nacimiento (roedores y conejos). En el conejo, los primeros folículos se forman a los 14 dpp, en la zona intermedia entre la corteza y la médula (Díaz-Hernández y *col.*, 2019). Previamente a la formación del folículo primordial, una gran proporción de CGs mueren por apoptosis, sin embargo, las razones de esto siguen sin estar claras. Los ovocitos se agrupan en nidos al interior de los cordones ovígeros, posteriormente, son separados dentro de los cordones por las células somáticas y mesenquimatosas del estroma, que les proveen soporte físico (Pepling y Spradling., 2001). Estos tipos celulares hacen del folículo una unidad funcional (Merchant-Larios y Chimal, 1989).

Muchos folículos primordiales formados durante la etapa infantil se pierden por atresia antes de llegar a su estadio preovulatorio. La mayoría de los folículos primordiales permanecen latentes y constituyen la reserva folicular. Dependiendo de la especie, uno o varios folículos crecen y se diferencian cíclicamente durante la vida reproductiva de la hembra. Durante el desarrollo posnatal, los ovarios contienen una población de folículos en diversas etapas de diferenciación; así: 1) folículos primordiales que forman la reserva folicular. 2) folículos preantrales primarios y secundarios. 3) folículos preantrales. 4) folículos antrales y, 5) folículos preovulatorios. Los procesos de crecimiento, diferenciación

y maduración ocurren de manera cíclica y son regulados por factores intraováricos y por el eje Hipotálamo-hipófisis-gónada. El número de folículos que inicia el proceso de diferenciación depende de la edad y la especie; sin embargo, la mayoría sufren el proceso de atresia, la cual, con excepción de los folículos primordiales, ocurre en cualquiera de las etapas de su desarrollo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento actual sobre el desarrollo gonadal de los mamíferos se basa principalmente en la extrapolación de los resultados obtenidos en el ratón como unidad experimental. Aunque ha sido evidente su aportación para conocer los mecanismos que regulan el desarrollo de la gónada a nivel molecular, la relativa brevedad del periodo de gestación, el reducido tamaño de las gónadas y la rapidez con la que ocurre la morfogénesis gonadal, hace del ratón un caso abreviado, comparado con el proceso más complejo que ocurre en mamíferos de mayor talla. Lo anterior indica la necesidad de estudiar especies con un patrón de desarrollo gonadal diferente.

En gónadas de especies de mayor talla, los cordones ovígeros del ovario contienen poblaciones germinales en diferentes estadios de diferenciación, ofreciendo la oportunidad de analizar el microambiente local somático que regula la actividad proliferativa y la diferenciación de la línea germinal. Este hecho es de gran importancia para elucidar las interacciones entre las células somáticas y germinales posteriores a la determinación sexual de la gónada bipotencial. En el primordio gonadal del conejo hay un claro establecimiento territorial de corteza y médula como ocurre en la mayoría de los mamíferos.

HIPÓTESIS

Los cordones ovígeros están separados del tejido estromático por una membrana basal que delimita dos compartimentos tisulares, a partir de los cuales ocurre un proceso de remodelación que culmina con el establecimiento de la reserva folicular y el tejido glandular esteroideogénico del ovario adulto.

OBJETIVO GENERAL

Describir la ultraestructura de las células somáticas pregranulosas (CPs) y de las células germinales (CGs) en los cordones ovígeros (CoVs) al inicio de la foliculogénesis en el conejo.

Objetivos Particulares

- Conocer la relación histológica y ultraestructural de células germinales y somáticas en los cordones ovígeros de gazapos en la etapa perinatal.
- Conocer la duración del periodo proliferativo de las ovogonias en gazapos recién nacidos.
- Describir la formación y distribución de los puentes intercitoplásmicos de las CGs en los cordones ovígeros.
- Establecer la distribución espacio-temporal de los folículos primordiales y primarios y su correlación con el establecimiento de la reserva folicular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron gazapos Chinchilla de diferentes edades proporcionados por el Módulo de Cunicultura del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Izcalli, UNAM. Subcomité Institucional para el cuidado y uso de animales experimentales SICUAE.MC-2019/3-1.

Tratamiento con BrdU

Para determinar el perfil proliferativo de las CGs se realizó la técnica de inmunofluorescencia. Se utilizó un anticuerpo BrdU policlonal, para detectar células en fase S del ciclo celular y el anticuerpo Lin 28 para discriminar entre células somáticas y CGs.

Se utilizaron 3 gazapos de 31 dpc que recibieron dos horas previo al sacrificio, una dosis por vía intraperitoneal de 50 mg/kg de Bromodesoxiuridina (BrdU) (SIGMA: B5002-5G) diluido en solución salina al 0.9%.

Obtención de muestras

Los ovarios de dos animales de 30dpc, dos animales de 31dpc, un animal de 7dpp, dos animales de 14dpp, un animal de 15dpp y dos animales de 21 dpp se obtuvieron tranquilizándolos con xilacina 5mg/Kg (PISA) por vía intramuscular y después se anestesiaron con pentobarbital a la dosis de 20mg/kg (PISA) que se administró por vía intraperitoneal. Una vez anestesiado el animal se realizó una incisión desde línea media del abdomen hasta el tórax, exponiendo el corazón para su perfusión. Se utilizó solución salina al 0.9 % para lavar y eliminar la sangre. Posteriormente se perfundieron con una mezcla de Glutaraldehído 2.5%, Paraformaldehído (PFA) 1%, en buffer de Cacodilato de Sodio 0.1M (Karnovsky, M.J. 1965) para su procesamiento y observación al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

Tres gazapos de 31dpc, uno de 7dpp y uno de 18dpp previamente tranquilizados y anestesiados (como se mencionó anteriormente), fueron perfundidos con PFA 4% para el

procesamiento y observación de proteínas mediante inmunofluorescencia con el uso del Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM.

Procesamiento del Material Biológico para MET.

Una vez obtenidas las gónadas se cortaron en pequeños trocitos. Se realizaron lavados con solución buffer de Cacodilato de sodio al 0.1M. Posteriormente, se realizó una nueva fijación con Tetraóxido de Osmio al 2% durante una hora y media. Al concluir este tiempo se continuó con lavados en agua bidestilada para quitar residuos del Tetraóxido de Osmio. Al término, se inició la deshidratación de la muestra con alcoholes a diferentes concentraciones (50%, 70%, 80% y 90%) con cambios cada, 15 minutos por alcohol, y al término se realizaron dos cambios de alcohol puro de 20 minutos. Como agente intermediario se usó acetonitrilo con dos tiempos de 20 minutos cada uno. Una vez concluido el proceso de deshidratación se continuó con la impregnación usando resina epóxica (Epon 812). Para ello, se usó una mezcla de Epon 1:1 (Epon: Acetonitrilo) durante 1 hora, Epon 2:1 (1 hora) y Epon puro por 24 horas. Al término de este paso se incluyeron en Epon las muestras y se dejaron polimerizar en una estufa a 60°C por 24 horas. Finalmente se realizaron cortes de dos ovarios de diferentes animales de 31dpc, cortes de un ovario de 7dpp, cortes de dos ovarios de 14dpp de diferentes animales, cortes de un ovario de 15dpp y cortes de dos ovarios de diferentes animales de una micra usando el ultramicrotomo PowerTome XL. Los cortes recuperados se tiñeron con azul de toluidina para su observación al microscopio óptico e identificar la conservación del material y la ubicación de la zona de interés. Una vez localizada la zona de interés, se realizaron cortes de 60 nm, se contrastaron con acetato de uranilo acuoso 4% (20 min.) y citrato de plomo 2.6% (10 min) y por último se observaron al MET (Jeol 1010) para estudiar la ultraestructura del tejido ovárico.

Procesamiento de muestras para inmunofluorescencia

Las muestras de dos ovarios de dos gazapos de 31dpc, un ovario de 7dpp y un ovario de 18dpp, se fijaron en PFA 4% se lavaron con PBS, posteriormente se deshidrataron en sacarosa a concentraciones crecientes (10, 20 y 30%) y permanecieron en sacarosa al 30% con medio de congelación (Tissue-Tek,Sakura) 1:1 durante toda la noche. Por último, las

gónadas se incluyeron en cápsulas Beem con medio de congelación y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Mediante el criostato KEDEE KD-2850 se obtuvieron criosecciones de 20 micras de los diferentes grupos de estudio. Los cortes histológicos de cada ovario se colocaron de forma seriada en 5 portaobjetos previamente tratados con sulfato de cromo y grenetina. Cada laminilla, se lavó con PBS pH 7.4 y después se realizó la exposición al antígeno mediante incubación en Buffer de Tris (10mM)-EDTA(1mM) Twin 20 (0.05%) pH 9 en baño María a 85 °C durante 30 minutos. Los cortes presentes en cada laminilla se permeabilizaron con 0.5% tritón/PBS por 10 min y se realizó un bloqueo de la muestra por dos horas con PBS que contenía suero de caballo al 10% y albúmina sérica bovina al 2% (BSA). Al término los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios (tabla 1) correspondientes durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS y agregaron los anticuerpos secundarios (Tabla 1). Los núcleos se tiñeron usando DAPI en dilución 1:500. Como medio de montaje se utilizó Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, S3023).

Inmunofluorescencia para BrdU

Para el análisis de las laminillas de BrdU, previamente se desecaron por 30 min, se expusieron al antígeno con Citrato de sodio (10mM) pH 6 en baño María a 85 °C por 30 min, se dejó enfriar, se continuó con tres lavados en PBS y se permeabilizó con 0.3% triton/PBS por 30 min. Para desnaturalizar el ADN las laminillas se colocaron en 2N HCl a 37°C por 30min. Después se restauró el pH con borato de sodio 0.1 M pH 8.5 por 15 min. Finalmente se lavaron y se bloquearon con 3% de suero de caballo en 0.3% triton/PBS durante una hora. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario Anti-BrdU durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (Tabla 1). Los núcleos se tiñeron usando DAPI en dilución 1:500. Como medio de montaje fluorescente se utilizó el Dako S3023.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo primario	Marcaje	Catálogo	Concentración	Anticuerpo secundario	Catálogo	Concentración
Mouse TEX 14	Marcador de PIs	sc-517070	1:200	Alexa Fluor 488 donkey vs mouse	A -21202	1:200
Mouse LIN 28	Marcador citoplasmático de CGs	sc-374460	1:200	Alexa Fluor 488 donkey vs mouse	A -21202	1:200
Rat BrdU	Marcador de proliferación	ab-6326	1:200	Alexa Fluor 594 goat vs rat	A-11007	1:200

RESULTADOS

Relación histológica y ultraestructural de células germinales y somáticas en ovarios de gazapos prenatales.

En gazapos prenatales de 30dpc, se observó que la gónada está integrada por tejido epitelial y tejido estromático. El tejido epitelial lo forman los cordones ovígeros conformados a su vez por cúmulos de CGs y células pregranulosas. El tejido estromático por su parte se integró de fibras de colágeno, fibroblastos, matriz extracelular y vasos sanguíneos (Fig. 4B). Por otra parte, los tejidos epitelial y estromático se reorganizan y distribuyen en dos regiones del ovario: la corteza y la médula. En la corteza se aglutinan los CoVs y el tejido estromático. Mientras que en la médula prevalece el tejido estromático (Fig. 4A). Al microscopio de luz las CGs se distinguen de las somáticas por su tamaño y forma redondeada (Fig. 4B). Ultraestructuralmente las CGs presentan un núcleo redondeado y grande en relación con su citoplasma, un nucleolo muy electrodense, abundantes gotas lipídicas, vacuolas, mitocondrias de mayor tamaño, algunas con crestas laminares y otras tubulares (Fig. 5B y 5C). Las células pregranulosas de menor tamaño y núcleos pleomorficos rodean a las CGs modelando los CoVs (Fig. 5A). A los 30 y 31 dpc las diferentes poblaciones celulares proliferan aumentando el tamaño de la gónada. Adicionalmente en cortes histológicos se pueden identificar fases de la mitosis evidenciando este proceso (Fig. 4B; Fig. 6).

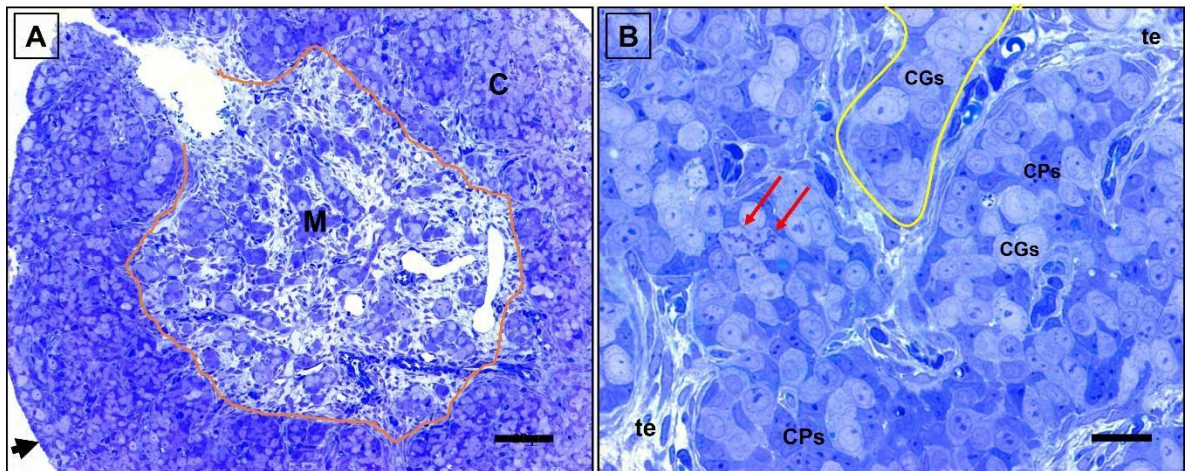


Figura 4. Conformación histológica en ovarios prenatales de 30 dpc. **A)** Fotomicrografía de un corte semifino que muestra la región de la corteza (C) y la médula (M). La línea naranja delimita estas dos zonas. Epitelio superficial (flecha negra). Barra, 80 μm . **B)** Fotomicrografía de la corteza, donde se muestra un cordón ovífero (línea amarilla) formado por células germinales (CGs) y células pregranulosas (CPs). Rodeando al CoV se encuentra el tejido estromático (te). Las flechas rojas señalan dos células germinales en metafase de la mitosis. Barra, 20 μm .

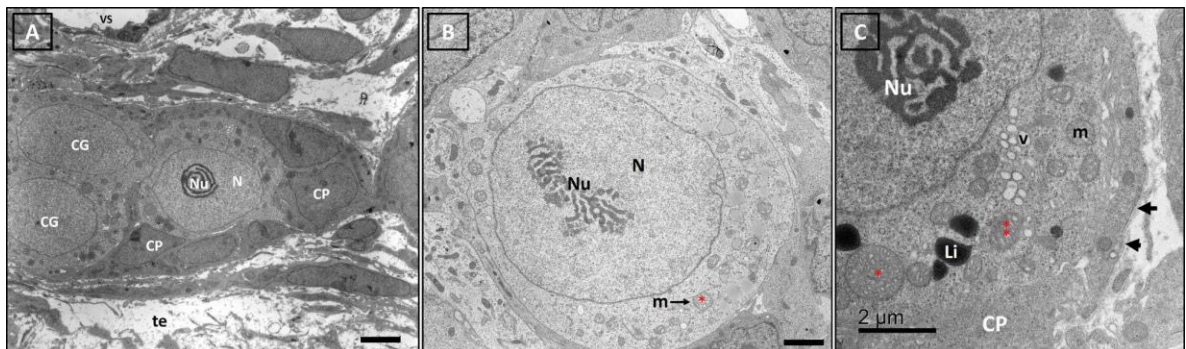


Figura 5. Ultraestructura de CGs en ovario de 30 dpc. **A)** Cordón ovífero, formado por células Germinales (CG) y células pregranulosas (CPs). Vaso sanguíneo (vs), Núcleo (N), Nucleolo (Nu). Barra, 4 μm . **B)** Micrografía de una CG con su núcleo (N) redondeado, nucleolo (Nu). En su citoplasma se observa una mitocondria (m) con crestas tubulares (*). Barra, 2 μm . **C)** Micrografía a mayor resolución de una célula germinal y una célula pregranulosa (CP) rodeándola. Se observan mitocondrias con crestas tubulares (*) y laminares (**). Nucleolo (Nu), Mitocondrias (m), Lípidos (Li), vacuolas (v). Lámina basal (flechas).

CGs en proliferación en gazapos recién nacidos.

El perfil proliferativo de las CGs lo observamos usando la técnica de inmunofluorescencia. Las imágenes que obtuvimos en el microscopio confocal evidenciaron: CGs proliferando marcadas con LIN28 y BrdU (Fig 6D y 7D); CGs no proliferativas marcadas con LIN28 (Fig. 7); y células somáticas proliferando marcadas con BrdU y DAPI (Fig. 6 y 7).

Formación y distribución de los PIs en prenatales y neonatos

En diferentes cortes de 60 nm pudimos observar y analizar cómo se está llevando a cabo la formación de PIs durante la división celular. En la figura 8B se muestra (flecha roja) un surco de incisión que da lugar a la formación de dos células hijas marcadas que podemos distinguir por la presencia de cromatina. Además, en la figura 8C al tener una mayor resolución de la micrografía podemos ver un anillo contráctil (flechas amarillas) que como sabemos está formado por filamentos de actina y miosina que, al estabilizarse, forma los PIs. En cortes finos los PIs se observan como dos líneas electrodensas de mayor grosor en comparación con la membrana citoplasmática (Fig. 8D y 9A). La colocalización de TEX 14 (verde), para localizar PIs, y células proliferando mediante BrdU (Rojo) muestra CGs interconectadas.

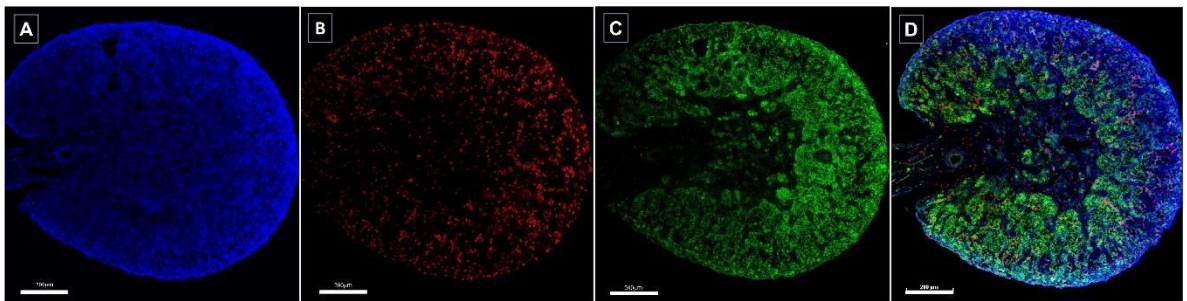


Figura 6. Inmunofluorescencia para BrdU (rojo) y LIN 28 (verde) en ovario de conejo recién nacido (31 dpc). A) En azul se observan todos los núcleos teñidos por DAPI. **B)** En rojo se marcan células en proliferación contra BrdU y **C)** en verde las CGs están inmunolocalizadas contra Lin 28. **D)** Colocalización de BrdU, LIN 28 y DAPI. Barra, 200 µm.

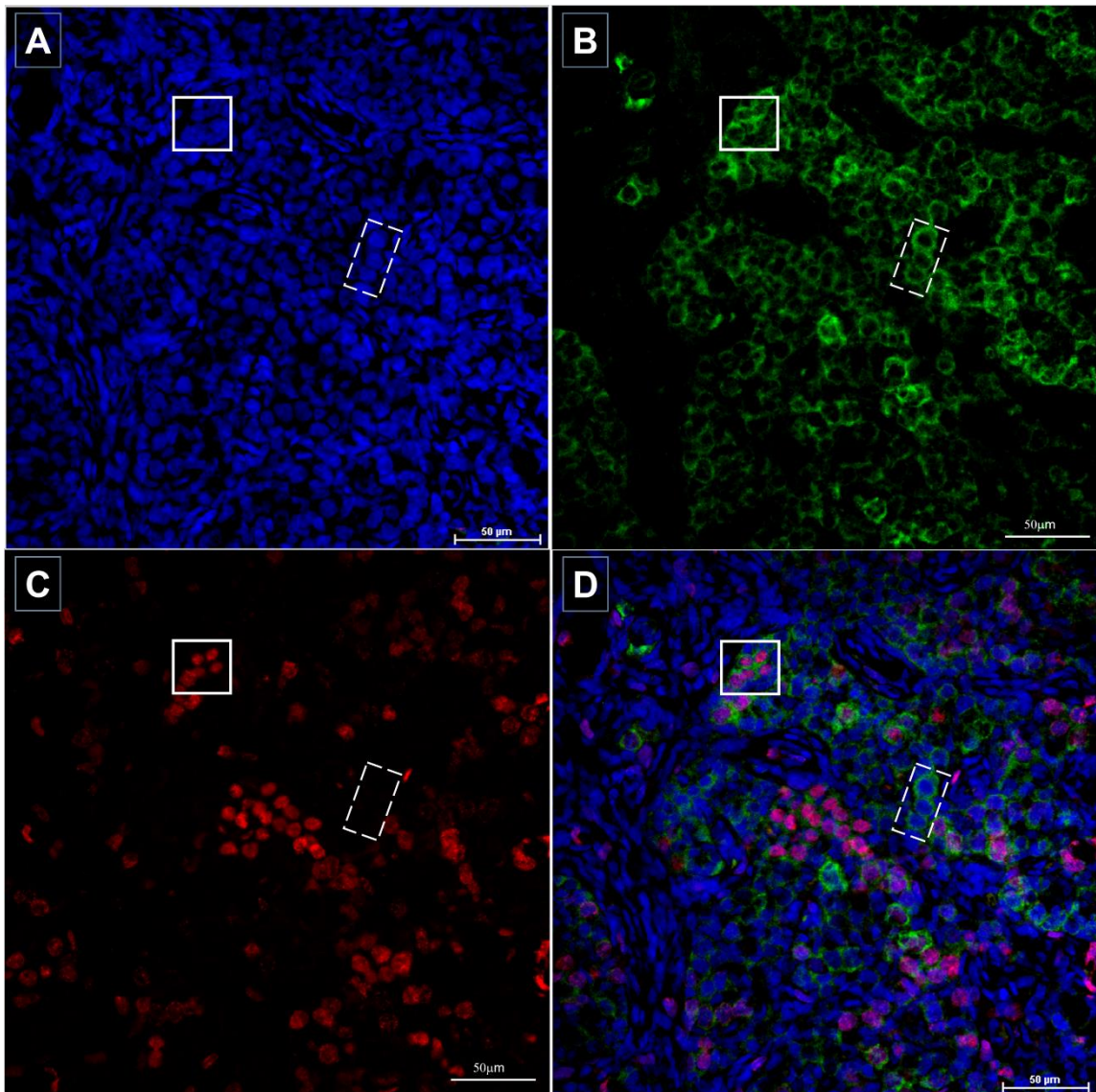


Figura 7. Proliferación de CGs y somáticas en ovario de conejo recién nacido (40X). **A)** En azul se observan todos los núcleos de toda la población celular teñidos por DAPI. Recuadros pequeños superior e inferior punteado delimitan un grupo de 5 y 3 células respectivamente. **B)** En verde las CGs están inmunolocalizadas contra Lin 28. Recuadros pequeños superior e inferior punteado delimitan un grupo de 5 y 3 CGs respectivamente. **C)** En rojo se marcan células en proliferación contra BrdU. En el recuadro pequeño superior izquierdo se observan estas 5 células con la marca a diferencia del recuadro inferior punteado donde no hay marcaje. **D)** Colocalización de BrdU, LIN 28 y DAPI. El recuadro pequeño superior izquierdo delimita CGs en etapa proliferativa a diferencia del recuadro inferior punteado donde se observan CGs sin evidencia de proliferación celular.

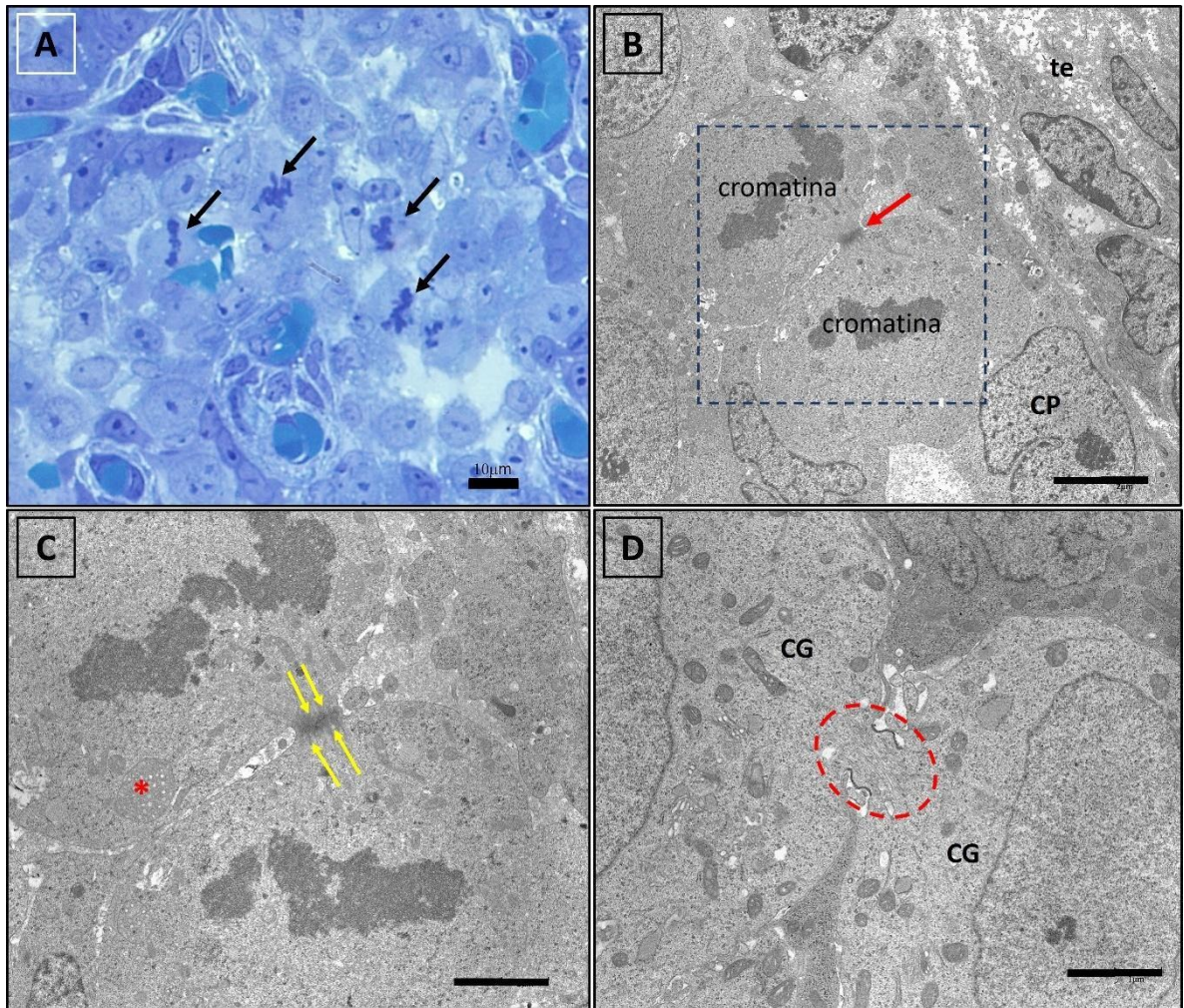


Figura 8. Formación de puentes intercitoplasmáticos en células germinales durante la citocinesis en ovarios prenatales (30 dpc) y recién nacidos (31 dpc). **A)** Fotomicrografía de un corte semifino. Donde se muestra parte de un CoV con células germinales proliferando (flechas). **B)** Micrografía electrónica donde se observa división del citoplasma durante la mitosis. Célula germinal (CG), célula prefolicular (CP), tejido estromático (te). La flecha roja indica el surco de incisión durante la citocinesis. Cromatina condensada en polos opuestos. Barra, 4 μ m. **C)** Micrografía a mayor resolución donde se muestra el anillo contráctil formado por filamentos de actina y miosina (flechas amarillas). Se muestra una mitocondria con crestas tubulares (*). Barra, 2 μ m. **D)** Micrografía electrónica donde se muestran células germinales (30dpc) con citocinesis incompleta interconectadas por un puente intercitoplasmático (círculo rojo punteado). Núcleo (N). Barra, 2 μ m.

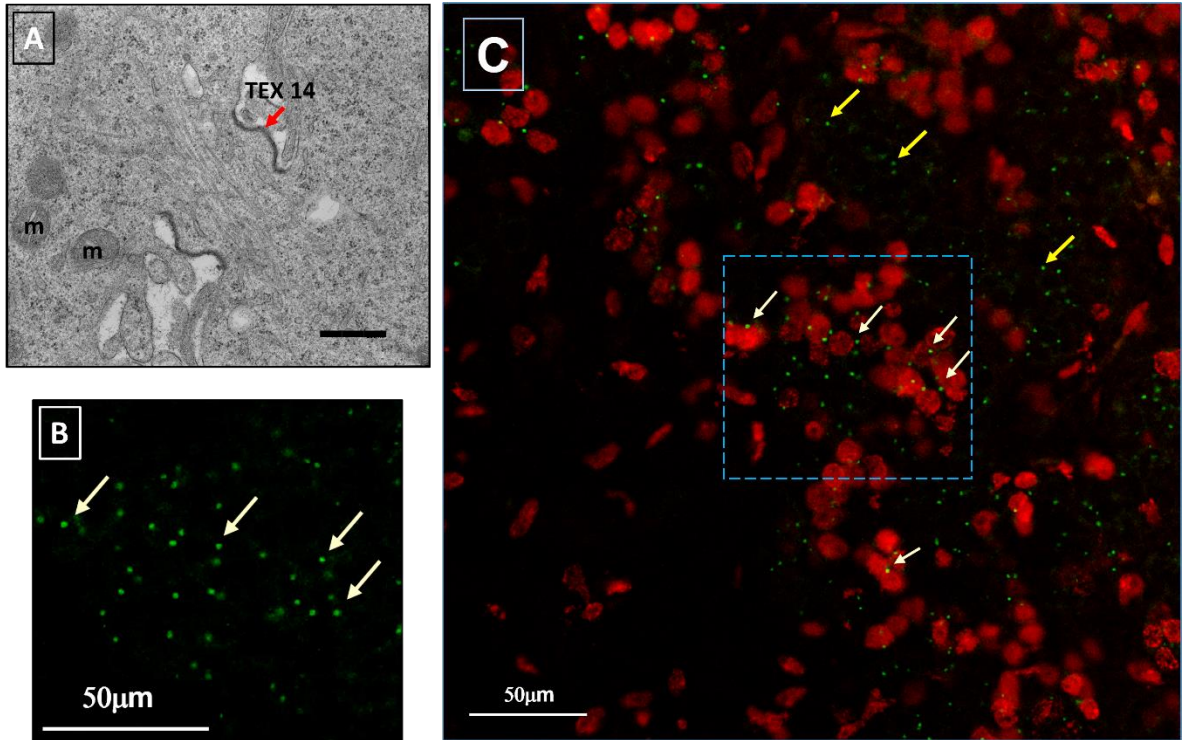


Figura 9. Puentes intercitoplasmáticos en células germinales a los 30 y 31 dpc. A) Micrografía de un puente intercitoplasmático (30dpc). Se distinguen de la membrana plasmática por presentar mayor grosor y electrodensidad. Barra, 600 nm B) En verde, puentes intercitoplasmáticos inmunolocalizados contra TEX 14 a los 31 dpc (flechas). C) Colocalización donde se muestran CGs proliferando marcadas con BrdU (rojo) interconectadas con puentes intercitoplasmáticos (flechas blancas). Puentes intercitoplasmáticos en células CGs sin marca de BrdU (Flechas amarillas).

Inicio de la meiosis

En ovarios de 5 dpp se observaron CGs con núcleos meióticos diferenciados en ovocitos. En algunos núcleos de ovocitos se observan filamentos delgados que corresponden a cromosomas. Evidenciando la subfase de leptoteno de la profase (Fig. 10A). En otra población de ovocitos se observan filamentos gruesos electrodensos en el núcleo. Evidencia de la subfase zigoteno donde los cromosomas homólogos se encuentran emparejados para la recombinación genética (Fig. 10B). Al MET se observa una estructura similar a una escalera correspondiente al complejo sinaptonémico (CS), los peldaños corresponden a proteínas transversales (Fig. 11C). Sin embargo, aún hay poblaciones de ovogonias que se encuentran proliferando por mitosis. (Fig. 11A).

Por otro lado, se observan numerosas mitocondrias agrupadas en cúmulos en el citoplasma de ovocitos interconectados (Fig. 11B). Esto da evidencia del transporte de mitocondrias a través de los PIs entre ovocitos (Fig.12). Al evidenciar los PIs con inmunofluorescencia se observan mayormente distribuidos en la zona de la corteza que coincide con la distribución de los CoVs (Fig. 13).

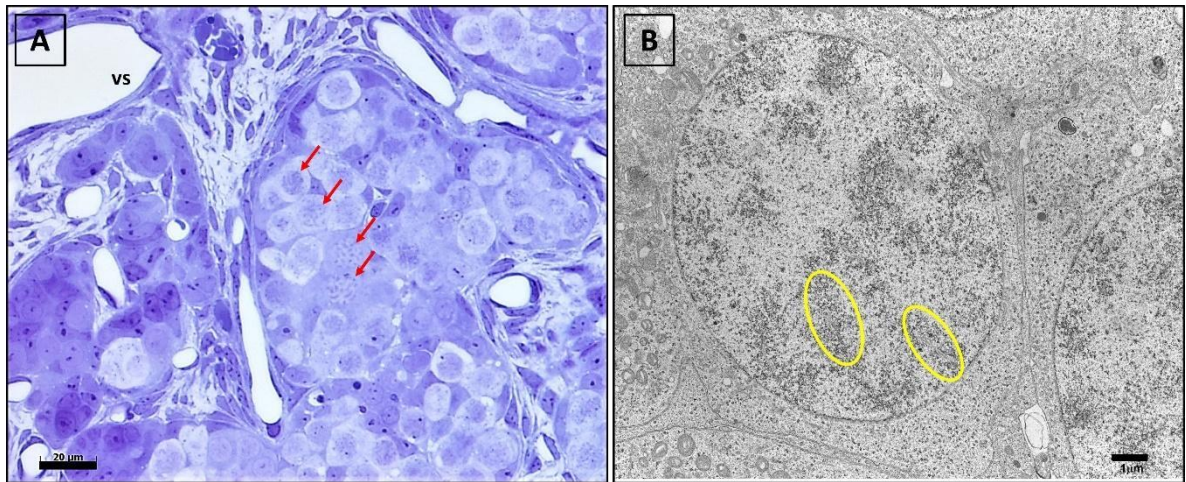


Figura 10. Ovocitos en meiosis a los 5 dpp. A) Fotomicrografía mostrando un cordón ovífero con algunos ovocitos en leptoteno (flechas rojas) evidentes mediante cromosomas visibles al microscopio de luz. Barra, 20 μm . B) Micrografía de un ovocito en zigoteno. Cromosomas homólogos emparejados en complejos sinaptonémicos (óvalos amarillos). Barra, 1 μm .

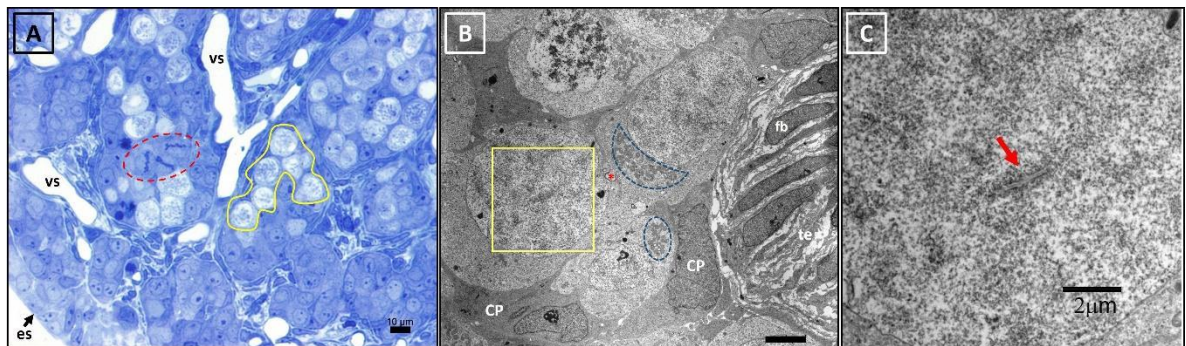


Figura 11. Proliferación de CGs por mitosis y meiosis (7 dpp). A) Cordones con CGs en mitosis (óvalo punteado rojo). Ovocitos con núcleos meióticos en profase I (delimitados con línea amarilla). Vasos sanguíneos (vs). Epitelio superficial (es). Barra, 10 μm . B) Grupo de ovocitos en la profase I. El asterisco rojo señala la presencia de un PI. En el citoplasma de los ovocitos se observan agrupaciones de mitocondrias (luna y óvalo punteados). Células pregranulosas (CP). Fibroblasto (fb). Barra, 4 μm . C) Micrografía a mayor resolución correspondiente al recuadro amarillo de la imagen B. Se muestra un complejo sinaptonémico característico del zigoteno y paquiteno (flecha roja).

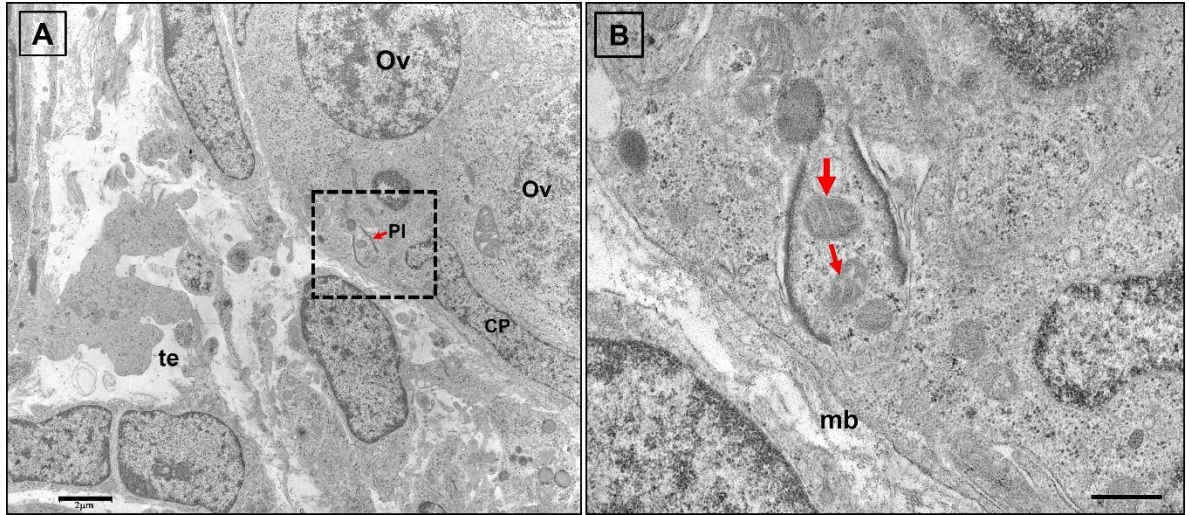


Figura 12. Localización de dos mitocondrias en un puente intercitoplásmico a los 5dpp. (A) Micrografía electrónica mostrando células del tejido estromático (te) y parte de un cordón ovígeno (CoV). Barra, 2 µm. (B) Mayor ampliación del área marcada en la figura A. Se muestra un puente intercitoplásmico (PI) cortado tangencialmente con dos mitocondrias (flechas rojas). La membrana basal (mb) que separa al cordón ovígeno de las células del tejido estromático es evidente. Las células germinales (CGs) y pregranulosas (CPs) pueden distinguirse por los núcleos redondeados de las primeras y los núcleos pleomórficos de las segundas. Barra, 500nm.

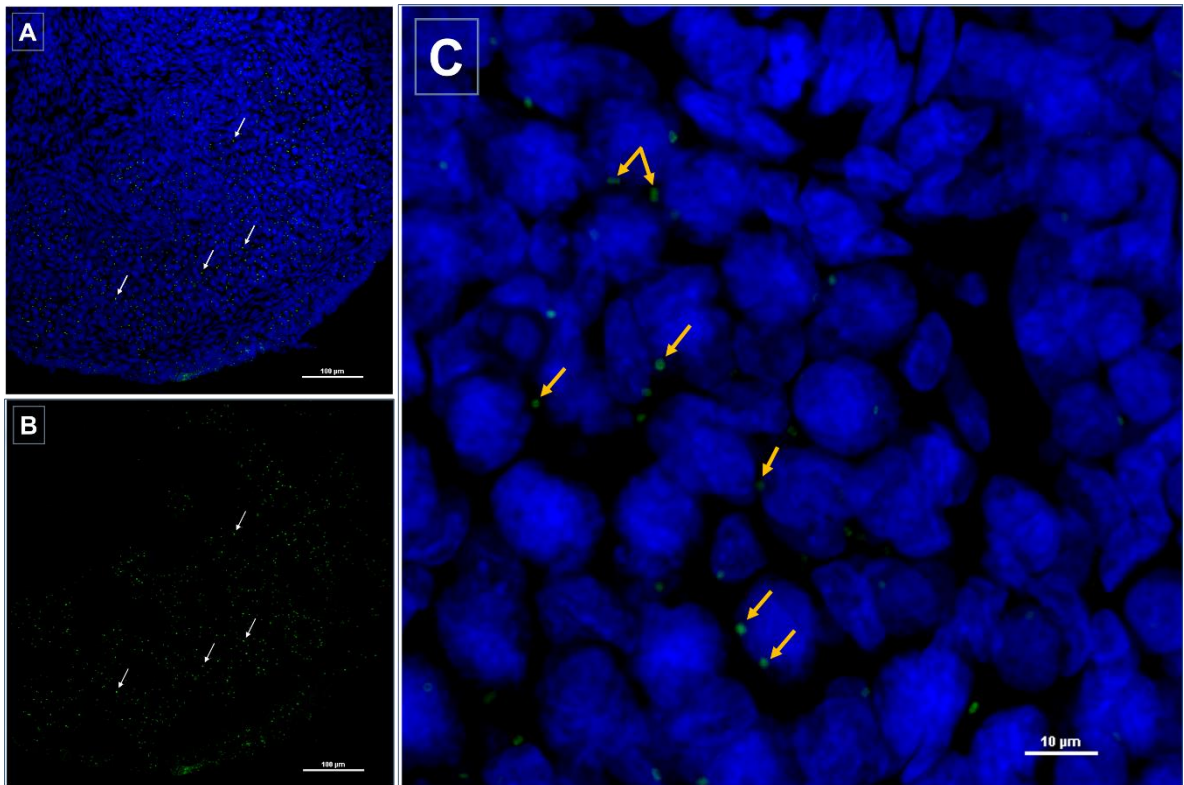


Figura 13. Distribución de los PIs en ovarios a los 7dpp. A) Inmunofluorescencia para TEX 14(verde) y DAPI (azul). B) Ovario de 7dpp. En verde se marca TEX14 evidenciando PIs distribuidos en la corteza (flechas). C) Fotografía a mayor resolución de la marca de TEX14 (flechas amarillas).

Formación de folículos primordiales

A los 14 dpp hay un cambio gradual en la distribución e interacción de los ovocitos dentro de los CoVs. En la corteza externa (zona próxima al epitelio superficial), los CoVs están repletos de ovocitos formando nidos (Fig. 14A y 14B). En la corteza interna (zona próxima a la médula) se observan ovocitos de mayor tamaño, individualizados y rodeados por células pregranulosas formando folículos primordiales y primarios (Fig. 14A y 14C). Existe un gradiente de diferenciación celular que avanza desde la corteza interna hacia la externa y da lugar a la primera generación de folículos. La observación de cortes finos al MET muestran estos cúmulos o nidos de ovocitos sincronizados en diferentes subfases de la profase I (Fig. 15A). Como se muestra en las Figuras 15A y 15B, hay todo un grupo de ovocitos en paquiteno y los PIs persisten para mantener comunicadas a las células. Conglomerados de organelos como las mitocondrias y aparato de Golgi son evidentes al interior del citoplasma de todos estos ovocitos (Fig. 15C).

En resumen, a los 14 dpp hay dos poblaciones de ovocitos: Los primeros, se mantienen en zigoteno y paquiteno de la profase I, interconectados por PIs y con cuerpos de Balbiani en su citoplasma. Estos ovocitos forman cistos que a su vez se agrupan en nidos dentro de los CoVs. Y segundo, ovocitos de mayor tamaño, individualizados y en diploteno formando folículos. Los resultados de inmunofluorescencia de TEX 14, a diferencia de lo que observamos a edades más tempranas donde los PI eran abundantes en toda la corteza, muestran que conforme avanza el desarrollo ovárico los PIs disminuyen en la corteza interna y pocos persisten en la corteza externa donde aún hay cistos (Fig. 16). Finalmente, a los 21 dpp el ovario parece estar poblado de folículos en desarrollo (primordiales y primarios) específicamente entre la corteza y la médula es decir en la zona intermedia. Mientras que, los cistos persisten en la corteza externa. A diferencia de 7 y 14 dpp los ovocitos no se observan en grandes conglomerados (nidos) dentro de los CoVs. Los CoVs se reorganizan y las células pregranulosas rodean solo a grupos pequeños de ovocitos (Fig. 17).

Al continuar con la ovogénesis de los cistos observamos ovocitos sincronizados en la subfase de paquiteno como se muestra en la figura 18 y poblaciones de cistos donde hay una progresión meiótica a diploteno (Fig. 19). En esta fase los cromosomas no son distinguibles,

no es posible observar complejos sinaptonémicos y se distingue la estructura y organización del nucleolo. Otra estructura importante que es perfectamente distinguible a los 21 dpp es la membrana basal delimitando el compartimento epitelial del tejido estromático (Fig. 19C). No hay muchas diferencias ultraestructurales de los ovocitos en diploteno dentro de los cistos y de los ovocitos en los folículos primordiales. En los folículos primordiales, los ovocitos presentan un núcleo de mayor tamaño en relación con su citoplasma. El núcleo se observa homogéneo, sin rastros del CS y cromosomas. Los nucleolos están definidos. Y los ovocitos se encuentran rodeados por células planas granulosas, manteniendo comunicación a través de uniones estrechas (Fig. 20).

Muerte celular durante el desarrollo ovárico

En las diferentes edades estudiadas se observaron vesículas redondeadas y delimitadas por membrana celular, con material amorfo en su interior, sin estructura y electrodensas; correspondientes a restos celulares o cuerpos apoptóticos de ovogonias y ovocitos.

En ovarios fetales de 30 dpc observamos muerte celular en los cordones ovígeros. Como se puede ver en la figura 21A, una célula pregranulosa engulle un cuerpo apoptótico formando un fagosoma en su citoplasma. A los 15dpp, varios cuerpos apoptóticos se observan al interior de una célula pregranulosa. Los ovocitos adyacentes confirman que la fagocitosis ocurre en los cordones ovígeros (Fig. 21B). A los 21dpp observamos ovocitos detenidos en diploteno. Similar a las edades anteriores, se observan cuerpos apoptóticos de ovocitos nodrizas en el interior del citoplasma de las células pregranulosas (Fig. 21 C).

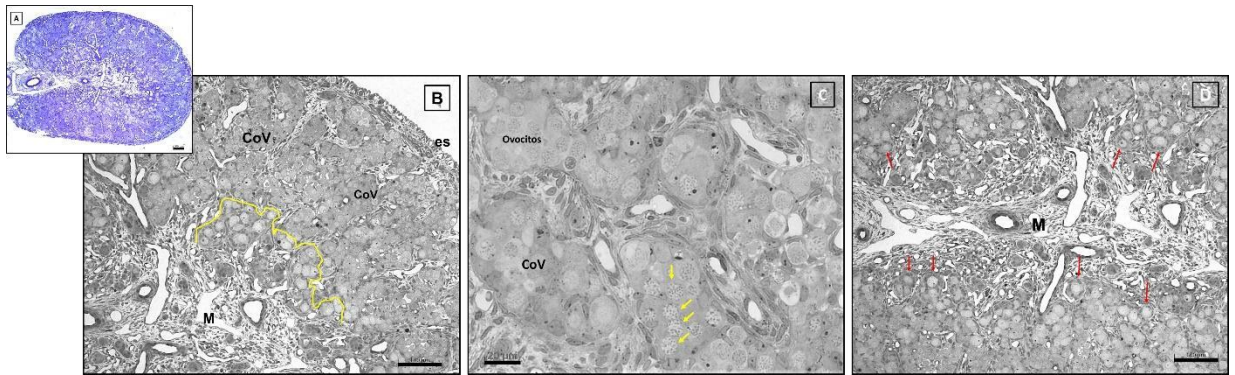


Figura 14. Diferenciación celular de la corteza externa hacia la corteza interna a los 14 dpp. **A)** Fotomicrografía de un ovario de 14 dpp. Barra, 100 μm . **B)** Fotomicrografía a mayor resolución donde se muestra un cambio gradual de la corteza externa hacia la corteza interna (flecha punteada roja). Los CO se muestran repletos de nidos o cúmulos de ovocitos en la corteza externa y en la corteza interna (línea amarilla) empiezan a observarse ovocitos individualizados rodeados de células de la granulosa. Barra, 100 μm . **C)** Fotomicrografía de la corteza externa. CO repletos de ovocitos en diferentes subfases de la profase I. Ovocitos en paquiteno (flechas amarillas). Barra, 20 μm . **D)** Fotomicrografía a mayor resolución de la corteza interna. Donde predominan ovocitos individualizados formando folículos primordiales y primarios. Barra, 100 μm .

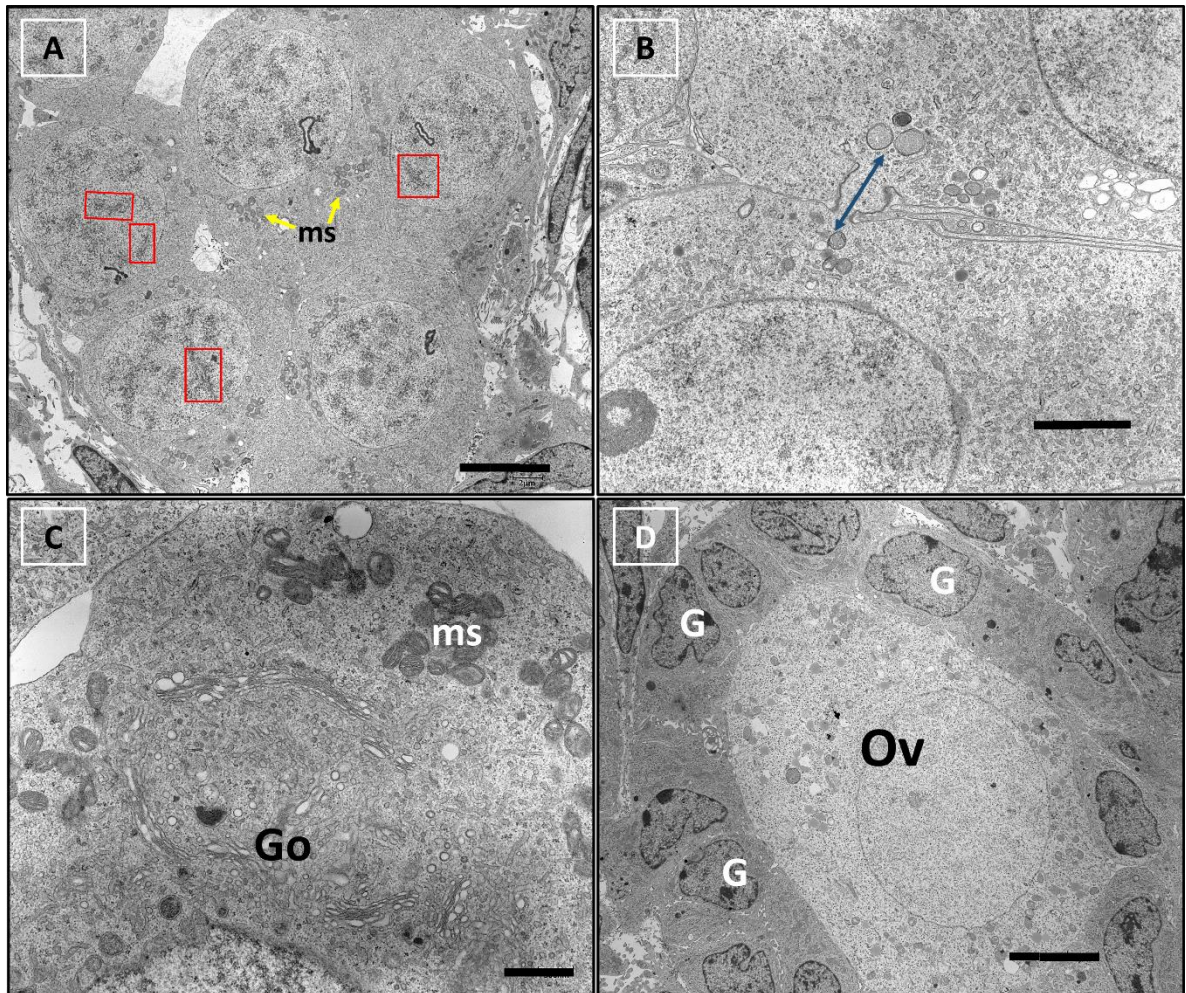


Figura 15. Sincicios de ovocitos con cuerpos de Balbiani y folículos primordiales a los 15 dpp. **A)** Micrografía donde se observa un grupo de ovocitos sincronizados en paquiteno. Barra, 6 μm . Recuadros punteados rojos señalan complejos sinaptonémico. **B)** Micrografía donde se muestran dos ovocitos intercomunicados por un PI. Las flechas señalan la dirección bidireccional en que pueden comunicarse. Barra, 2 μm . **C)** Micrografía a mayor resolución del citoplasma de un ovocito. Se observa un conglomerado de organelos mitocondrias (M) y Aparato de Golgi (Go) característico de los cuerpos de Balbiani. Barra, 1 μm . **D)** Micrografía de un ovocito individualizado rodeado de células granulosa cúbicas (folículo primario) Células de la granulosa (G). Barra, 6 μm .

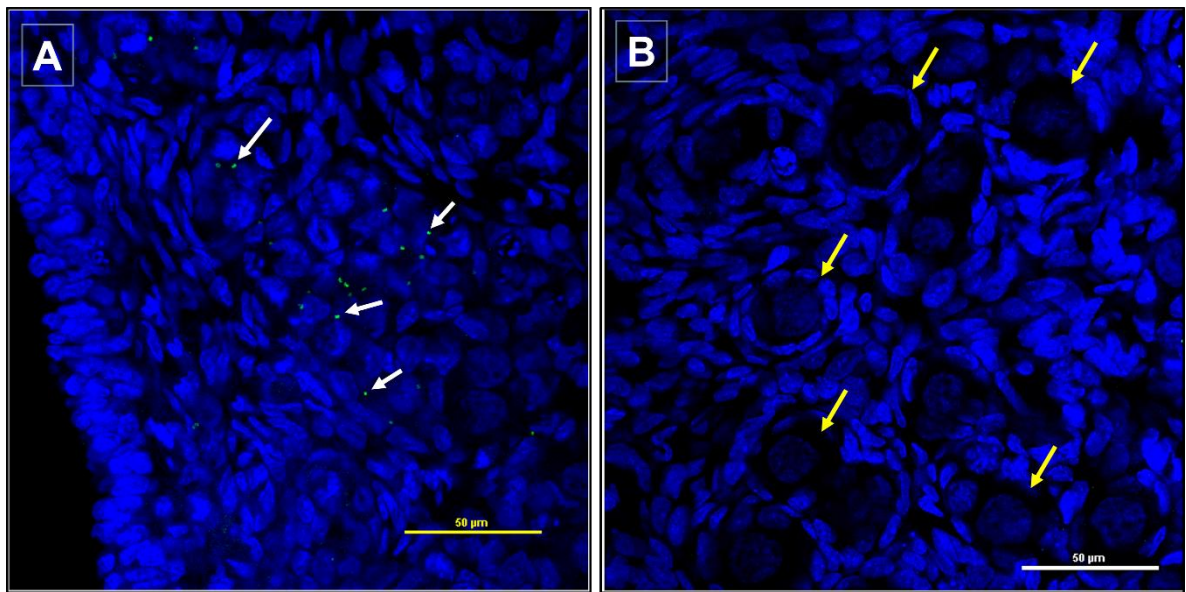


Figura 16. Inmunofluorescencia para TEX 14 (verde) y DAPI (azul) en ovario de 18 dpp. A) Corteza externa en el ovario donde aún son evidentes PI (flechas blancas). **B)** Corteza interna del ovario sin evidencia de PIs. Las flechas amarillas muestran ovocitos individualizados.

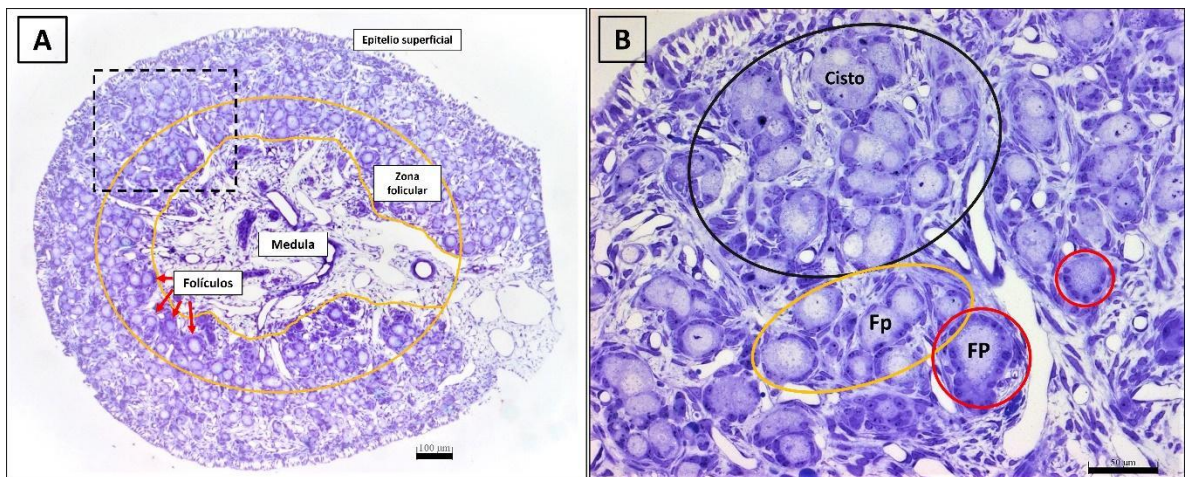


Figura 17. Distribución de cistos y folículos en la corteza a los 21 dpp. A) Fotomicrografía de un ovario 21 dpp. El ovalo amarillo delimita toda la zona folicular de la corteza externa y de la médula al centro. En esta zona es donde se observan folículos primordiales y primarios (flechas rojas). Barra, 100 µm. **B)** Fotomicrografía a mayor resolución del recuadro punteado del recuadro A. Se observa en la parte de la corteza externa las poblaciones de cistos (ovalo negro), en la corteza interior se observa folículos primordiales (ovalo amarillo) y la zona más cercana a la médula folículos primarios (círculos rojos) con células granulosas cúbicas. Folículos primordiales (Fp). Folículos primarios (FP). Barra, 50 µm.

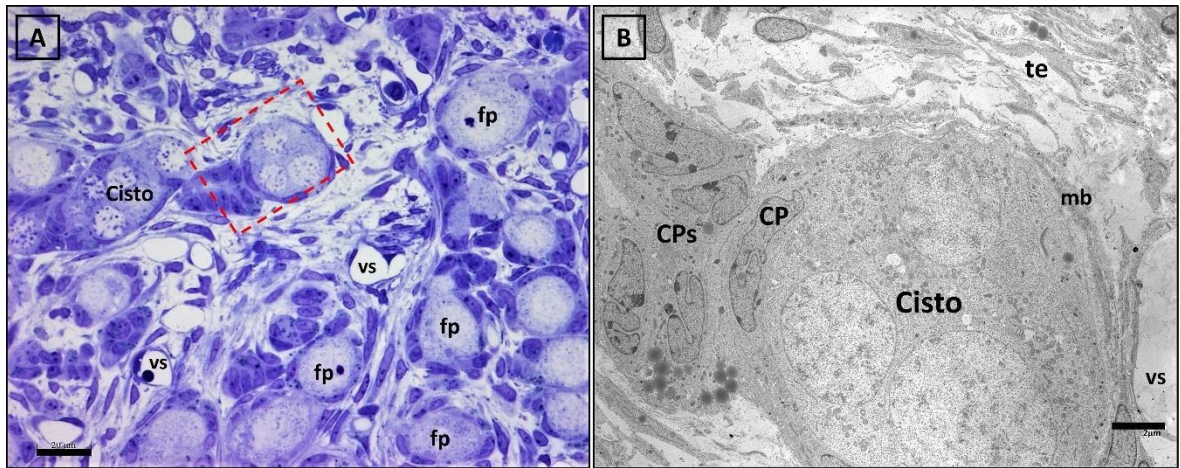


Figura 18. Cisto ubicado en la corteza externa de ovario de 21 dpp. A) Fotomicrografía de corte semifino, donde se muestra en la parte más superficial de la corteza cistos y hacia la derecha correspondiente a la zona intermedia folículos primordiales (fp) y primarios (FP). Barra, 20 μ m. **B)** Micrografía a mayor resolución del recuadro rojo punteado de la figura A, por el plano del corte se observan tres ovocitos sincronizados en paquiteno rodeados por células de la pre granulosa. Barra, 4 μ m.

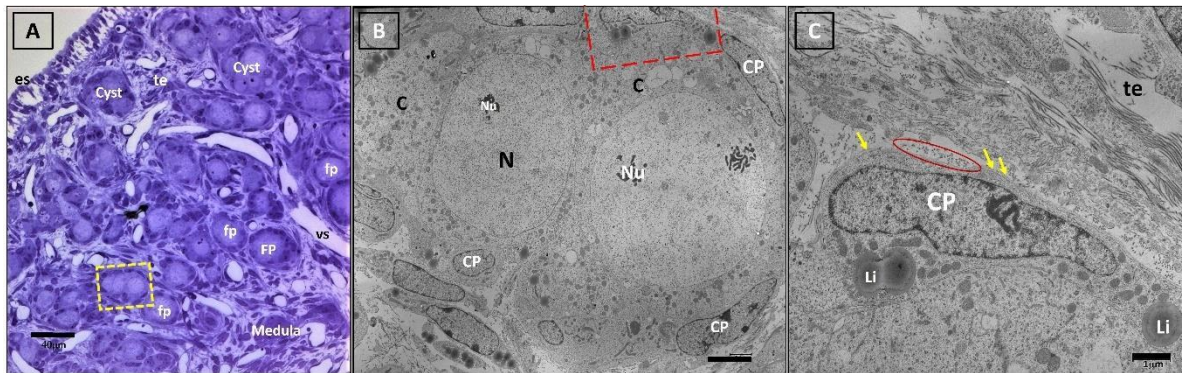


Figura 19. Ultraestructura de cistos en ovarios de 21 dpp. A) Fotomicrografía de corte semifino, donde se pueden observar cistos y hacia la zona intermedia folículos primordiales (fp) y primarios (FP). Tejido estromático (te). Epitelio superficial (es). Barra, 40 μ m. **B)** Micrografía a mayor resolución del recuadro amarillo punteado de la figura A. Por el plano del corte se observan tres ovocitos que han progresado a la etapa de diploteno ya no son distinguibles los cromosomas en el núcleo. Barra, 4 μ m. **C)** Micrografía a mayor resolución del recuadro amarillo de la figura B, donde mostramos los componentes de la membrana basal: laminina (flechas amarillas) y fibras de colágena (ovalito rojo). Barra, 1 μ m.

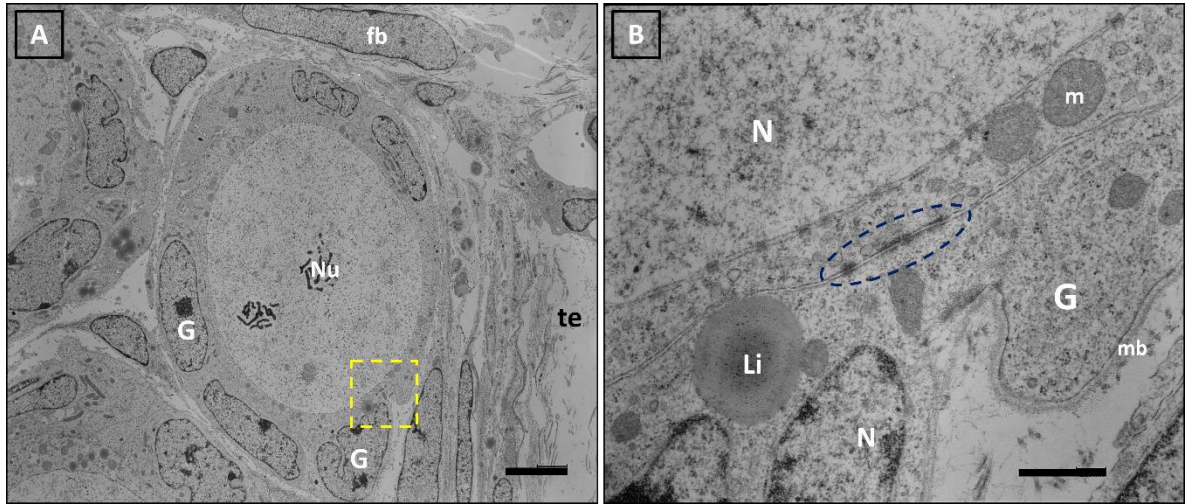


Figura 20. Ultraestructura de folículos primordiales en ovario de 21dpp. A) Micrografía de un folículo primordial donde se observa el ovocito al centro con dos nucleolos (Nu) y núcleo muy grande en relación con su citoplasma y rodeándolo células granulosas planas. Fibroblastos (fb), tejido estromático (te). Barra, 4 μ m. B) Micrografía a mayor resolución que muestra el recuadro amarillo punteado de la figura 17A. Se puede ver el citoplasma del ovocito en estrecha relación con las células de la granulosa (G), zonas más electrodensas señaladas con el óvalo azul punteado. Lípido (Li), Mitocondria (M). Barra, 600nm.

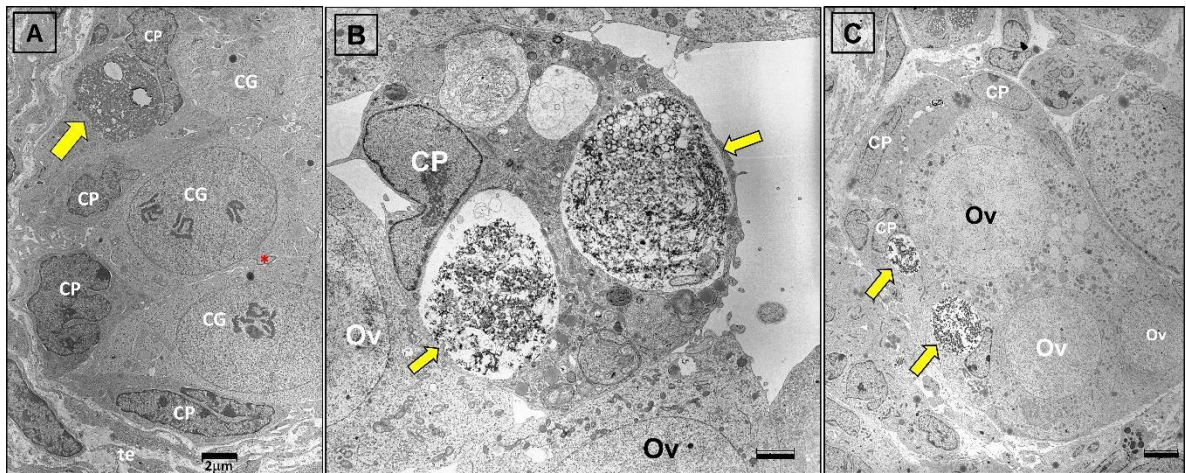


Figura 21. Muerte celular durante el desarrollo ovárico. A) Micrografía de ovario de 30 dpc, donde se muestra una célula germinal (CG) en apoptosis (flecha amarilla) engullida por una célula pregranulosa (CP) dentro de un cordón ovífero. PI (asterisco rojo). Barra, 2 μ m. B) Micrografía de ovario de 15dpp, se muestran cuerpos apoptóticos (flechas amarillas) en el citoplasma de una CP. Ovocito (Ov). Barra, 2 μ m. C) Micrografía de un cisto de 21dpp, se observan ovocitos en diploteno (Ov). Adyacentes a ellos, se distinguen dos cuerpos apoptóticos (flechas amarillas) engullidos por CP formando fagosomas. Barra, 7 μ m.

DISCUSIÓN

En la figura 22 resumimos nuestros resultados durante el desarrollo del ovario en el conejo. La formación de cistos inicia antes del nacimiento cuando las CGs proliferan por mitosis. Sin embargo, su distribución cambia a medida que avanza el desarrollo gonadal. En edades tempranas (3 dpc, 5 y 7 dpp), los cistos se ubican en toda la corteza del ovario y conforme avanza el desarrollo su distribución queda limitada hacia la corteza externa. En edades avanzadas (21 dpp), los cistos se remodelan y quedan conformados por unos pocos ovocitos. A los 5 dpp se observaron CGs en meiosis y, en los días siguientes, fue evidente las diferentes subfases de la profase I. A los 21 dpp se encontraron ovocitos individualizados y cistos detenidos en diploteno. Esto indica que los ovocitos en diploteno, etapa que corresponde a la detención meiótica, aún pueden permanecer unidos formando cistos o pueden estar individualizados formando folículos. Coexisten cistos en profase I (paquitenio y diploteno), folículos primordiales y folículos primarios. Los folículos primordiales y primarios se encontraron inicialmente en la corteza interna a partir de los 14 dpp y a los 21 dpp la distribución folicular abarcaba gran parte de la corteza del ovario. Deducimos que el desarrollo folicular inicia en la corteza interna y progresa hacia la corteza externa del ovario.

Al igual que en otras especies de mamíferos, en el conejo observamos una sincronización en las diferentes fases de la mitosis y la meiosis de las CGs que forman los cistos (Pepling y Spradling 1998; Lei y Spradling 2013). La sincronización en estos procesos está asociada a la presencia de puentes intercelulares que conectan los citoplasmas de las células germinales adyacentes, resultantes de la citocinesis incompleta (Zamboni, 1968). Sin embargo, aún falta conocer el número de ovocitos que integran los “cistos” del conejo e identificar marcadores ultraestructurales que permitan distinguir al ovocito que formará el folículo primordial de los que mueren por apoptosis en los cordones ovígeros. Lei y Spradling (2013) estudiaron el comportamiento de las células del ratón *in situ* y observaron que, inicialmente, las CGs se agrupan en cistos y posteriormente, se fragmentan y forman cistos más pequeños antes de entrar a meiosis. En contraste, nuestras observaciones en el conejo muestran que, *in situ*, los cistos contienen tanto ovogonias proliferando como ovocitos iniciando la meiosis y ambos estadios de las CGs permanecen unidos por puentes

intercitoplásmicos dentro de los cordones ovígeros. Es importante enfatizar la estrecha asociación que existe in situ entre las células germinales y las somáticas dentro de los cordones ovígeros.

Estudios previos sugirieron que la función de los puentes intercelulares de las células germinales de los mamíferos era sincronizar las fases mitóticas y meióticas. Sin embargo, Lei y Spradling (2016) demostraron que, en el ratón, la mayoría de las células germinales de cada cisto experimentan apoptosis después de ceder parte de sus organelos al ovocito sobreviviente. Es decir, actúan como precursoras necesarias para el crecimiento del ovocito que, unido a las células pregranulosas, formarán los folículos primordiales de la reserva folicular. Este hallazgo mostró la asombrosa conservación filogenética, ya que fue descrito primero en la mosca de la fruta; *Drosophila* (Brown y King 1964; Koch y King 1966). Es probable que en otras especies ocurra de forma similar.

En nuestras observaciones, encontramos mitocondrias en el citoplasma que conecta a los ovocitos a través de puentes intercitoplásmicos. Este hallazgo es interesante en los cistos del conejo, ya que difiere de las estructuras reportadas en el ratón donde solamente se ha reportado la presencia de organelos pequeños, como microtúbulos y ribosomas. En los cistos del ratón, se asume que los puentes intercelulares no juegan un papel importante en la formación del cuerpo de Balbiani. Nuestros resultados sugieren que, en el conejo, el desplazamiento de mitocondrias de las “células germinales nodrizas” hacia el ovocito folicular precede a la fusión de las membranas plasmáticas de los ovocitos adyacentes observados en el ratón.

En el ratón, los ovocitos proveedores de organelos al cuerpo de Balbiani del ovocito folicular sufren apoptosis (Lei y Spradling 2016). Sin embargo, como la presencia de los cordones ovígeros en el ratón es incipiente y de muy corta duración, el papel de las células pregranulosas en el reciclaje de la muerte masiva de las células nodrizas no fue considerada. Es probable que las células pregranulosas desempeñen una función importante en el proceso del desarrollo ovárico, fagocitando y reciclando los “detritus celulares” de los “ovocitos nodrizas” dentro de los cordones ovígeros. Sera necesario realizar más estudios que muestren

evidencia de esta idea. Además de las diferencias morfogénicas entre especies, los resultados *in vitro* del ratón fueron obtenidos con células germinales en ausencia de células somáticas. Lo cual puede explicar la diferencia en el comportamiento de la línea germinal observada en nuestros actuales resultados.

En este estudio observamos la asociación de ovogonias y ovocitos con las células de la pregranulosa. Estas células mantienen relación mediante uniones estrechas a lo largo del desarrollo gonadal que les provee de soporte. En cuanto a la distribución y formación folicular durante el desarrollo ovárico, se ha corroborado lo reportado por Díaz-Hernández y *col.* (2019). En la descripción histológica de ovarios perinatales de conejo, los ovocitos inmaduros se ubican en la corteza externa. Mientras que, los ovocitos avanzados en la meiosis y los primeros folículos se encuentran más cercanos a la región de la médula. Aunque existe un gradiente en el que los ovocitos que forman los primeros folículos se diferencian en la parte próxima a la médula, todavía es necesario realizar un estudio estadístico para conocer con precisión la extensión del periodo de remodelación de los cordones ovígeros, desde el inicio de la meiosis en los cistos hasta la individualización de los folículos.

La formación de folículos primordiales y la progresión meiótica son eventos independientes en el ovario del ratón. (Dutta y *col.*, 2016). Debido a que los cordones ovígeros en el ratón son efímeros, el papel de las células pregranulosas en el inicio de la foliculogénesis ha sido poco estudiado. Sin embargo, durante el proceso de formación folicular en el conejo, no solo observamos ovocitos en diploteno en folículos primordiales, sino que también encontramos ovocitos que progresaron a diploteno en cistos de los cordones ovígeros. Además, encontramos que, el establecimiento de la reserva folicular en el conejo requiere la remodelación de los cordones ovígeros, que comienza en la región medular del ovario con la “fragmentación” de los cordones para formar folículos primordiales que incluyen a las células pregranulosas y a los ovocitos.

Durante las etapas estudiadas del desarrollo ovárico en nuestro modelo, coexiste la proliferación y muerte celular. La formación de cistos por CGs conectadas mediante puentes

intercitoplasmáticos es evidente desde los 30 dpc. Conforme avanza el desarrollo gonadal la distribución de los puentes intercitoplásmicos disminuye en la corteza interna y permanece en la corteza externa. Histológicamente, las etapas de la profase I de la meiosis son evidentes desde el día 5 posparto. Los primeros folículos primordiales se observaron en el día 14 post parto en la zona intermedia del ovario. A partir de aquí, las poblaciones de cistos en la corteza externa y los folículos en la corteza interna coexisten hasta completar el proceso de remodelación de los cordones ovígeros e iniciar el proceso de foliculogénesis.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran la importancia del conejo como un modelo animal para comprender los cambios ultraestructurales involucrados en el desarrollo del ovario en mamíferos, incluyendo humanos, con periodos de desarrollo más largos que el ratón, cuyas gónadas bipotenciales no forman corteza y médula. Nuestras observaciones sugieren que el establecimiento de la reserva folicular del ovario adulto es un proceso que depende de la interacción de las células germinales y somáticas en diferentes regiones del ovario temprano. Aunque esta etapa del trabajo es descriptiva, nuestros resultados son originales e ilustran la diferenciación ultraestructural de los cordones ovígeros antes, durante y después del establecimiento de la reserva folicular en el ovario del conejo. Nuestros resultados son una aproximación para correlacionar la base ultraestructural de los mecanismos moleculares involucrados en la morfogénesis del ovario en mamíferos.

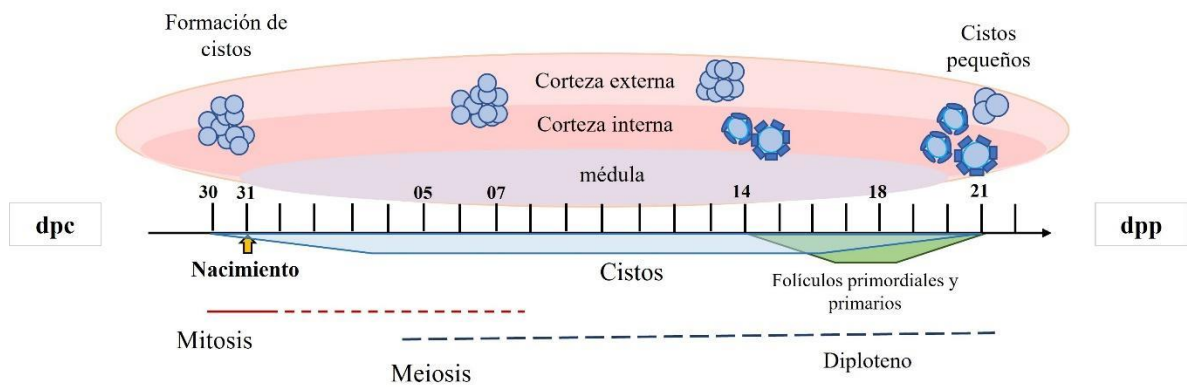


Figura 22. Línea del tiempo durante el desarrollo folicular en ovario del conejo. Se muestra el desarrollo y distribución de los cistos y folículos en las regiones histológicas del ovario.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- CGPs: Células Germinales Primordiales
- CG/CGs: Células Germinales
- CP/CPs: Células pregranulosas
- G: Células granulosas
- AMH: Hormona antimulleriana
- AR: Ácido Retinoico
- Sry: Del inglés Sex-determining Región of the Y chromosome
- Sox9: Del inglés Sex Determining Region Y-box 9
- Wnt4: Wingless-integration factor 4
- RSPO1: Respondina-1
- FoxL2: Forkhead Box L2
- Stra8: Del inglés Stimulated by retinoic acid
- E: día embrionario
- dpc: Días post coito
- dpp: Días post parto
- PI/PIs: Puentes intercitoplasmáticos
- BrdU: Bromodesoxiuridina
- DAPI (4',6-Diamidina-2-fenilindol)
- PBS: Phosphate buffered saline
- PFA: Paraformaldehído
- BSA: Albúmina sérica Bovina
- MET: Microscopio Electrónico de Transmisión
- TEX 14: Testis- expressed gene 14
- Ov: Ovocitos
- Fp: Folículos primordiales
- FP: Folículos primarios
- es: epitelio superficial
- CoV/CoVs: Cordones ovíferos
- C: Corteza

- M: médula
- te: tejido estromático
- vs: Vaso sanguíneo
- N: Núcleo
- Nu: Nucleolo
- m/ms: mitocondrias
- Li: Lípido
- mb: membrana basal
- CS: Complejo Sinaptonémico
- Go: Aparato de Golgi
- fb: Fibroblasto

REFERENCIAS

- Anderson, E.L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M., y Page, D. C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 14976–14980.
- Baillet, A., y Mandon-Pepin, B. (2012). Mammalian ovary differentiation - a focus on female meiosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 356(1-2), 13–23.
- Barr, F. A., y Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell*, 131(5), 847–860.
- Bernard, P., y Harley, V. R. (2007). Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 39(1), 31–43.
- Borum, K. (1961). Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental cell research*, 24, 495–507.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., y Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 312(5773), 596–600.
- Brambell, F.W. y Parkes, S.A. (1974). Changes in the ovary of the mouse following exposure to X-rays: 3. Irradiation of nonparous adult. *Proceedings of the Royal Society B*, 101, 36.
- Byskov, A. G. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological reviews*, 66(1), 71–117.
- Cox, R. T., y Spradling, A. C. (2003). A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 130(8), 1579–1590.
- Challoner, S. (1974). Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster 1. A quantitative study of meiotic prophase in vivo. *Journal of anatomy*, 117(Pt 2), 373–383.

- Daniel-Carlier, N., Harscoët, E., Thépot, D., Auguste, A., Pailhoux, E., y Jolivet, G. (2013). Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PLoS one*, 8(4), e60451.
- de Cuevas, M., Lilly, M. A., y Spradling, A. C. (1997). Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annual review of genetics*, 31, 405–428.
- Díaz-Hernández, V., León del Río, A., Zamora, M., y Merchant-Larios, H. (2008). Expression profiles of SRY and SOX9 in rabbit gonads: the classical model of mammalian sex differentiation. *Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 2(3), 152–166.
- Díaz-Hernandez, V., y Merchant-Larios, H. (2017). Consideraciones Generales en el Establecimiento del Sexo en Mamíferos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(1), 27-39.
- Díaz-Hernández, V., Caldelas, I., y Merchant-Larios, H. (2019). Gene Expression in the Supporting Cells at the Onset of Meiosis in Rabbit Gonads. *Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 13(3), 125–136.
- Dutta, S., Burks, D. M., y Pepling, M. E. (2016). Arrest at the diplotene stage of meiotic prophase I is delayed by progesterone but is not required for primordial follicle formation in mice. *Reproductive biology and endocrinology*, 14(1), 82.
- Eggert, U. S., Mitchison, T. J., y Field, C. M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annual review of biochemistry*, 75, 543–566.
- Fawcett, D. W. Ito, S., y Slautterback, D. (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 5(3), 453–460.
- Fawcett, D. W. (1961). Intercellular bridges. *Experimental cell research*, Suppl 8, 174–187.
- Gondos, B. (1973). Intercellular bridges and mammalian germ cell differentiation. *Differentiation* 1, 177-182.

- Greenbaum MP., Yan W., Wu MH., Lin YN., Agno JE., Sharma M., Braun RE., Rajkovic A y Matzuk MM. (2006). TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 103, 4982–7.
- Greenbaum MP, Ma L y Matzuk MM (2007). Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. *Developmental Biology*, 305: 389–396.
- Greenbaum, M. P., Iwamori, N., Agno, J. E., & Matzuk, M. M. (2009). Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell intercellular bridges but not female fertility. *Biology of reproduction*, 80(3), 449–457.
- Greenbaum, M. P., Iwamori, T., Buchold, G. M., y Matzuk, M. M. (2011). Germ cell intercellular bridges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a005850.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., y 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.
- Haglund, K., Nezis, I. P., y Stenmark, H. (2011). Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Communicative and integrative biology*, 4(1), 1–9.
- Hilscher, B., Hilscher, W., Bühlhoff-Ohnolz, B., Krämer, U., Birke, A., Pelzer, H., y Gauss, G. (1974). Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell and tissue research*, 154(4), 443–470.
- Kelly, S.J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8- cell stage mouse blastomeres. *Journal of Experimental Zoology*, 200, 365-376.
- Koch, E. A., y King, R. C. (1966). The origin and early differentiation of the egg chamber of *Drosophila melanogaster*. *Journal of morphology*, 119(3), 283–303.
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., y Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2474–2479.

- Kuriyama R, Gustus C, Terada Y, Uetake Y, Matuliene J. (2002). CHO1 a mammalian kinesin-like protein, interacts with F-actin and is involved in the terminal phase of cytokinesis. *J Cell Biology*,156:783–90
- Le Bouffant, R., Guerquin, M. J., Duquenne, C., Frydman, N., Coffigny, H., Rouiller-Fabre, V., Frydman, R., Habert, R., y Livera, G. (2010). Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. *Human reproduction*, 25(10), 2579–2590.
- Lei, L., y Spradling, A. C. (2013). Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. *Development*, 140(10), 2075–2081.
- Lei, L., y Spradling, A. C. (2016). Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells. *Science*, 352(6281), 95–99.
- Lin, H., Yue, L., y Spradling, A. C. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development*, 120(4), 947–956.
- Menke, D. B., y Page, D. C. (2002). Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene expression patterns*, 2(3-4), 359–367.
- Merchant-Larios, H., y Chimal-Monroy, J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Progress in clinical and biological research*, 296, 55–63.
- Merchant H. (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Developmental biology*, 44(1), 1–21.
- Merchant-Larios H. y Diaz Hernández V. (2011). In: Chimal-Monroy J (ed). *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis*. Transworld Research Network, 75-91.
- Mishima M, Kaitna S, y Glotzer M (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Developmental Cell*,2:41–54.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M. C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., y Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature genetics*, 38(11), 1304–1309.

- Pepling, M. E., de Cuevas, M., y Spradling, A. C. (1999). Germline cysts: a conserved phase of germ cell development.? *Trends in cell biology*, 9(7), 257–262.
- Pepling, M. E., y Spradling, A. C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, 125(17), 3323–3328.
- Pepling, M. E., y Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biol.*, 234(2), 339–351.
- Peralta D.I., y Nicolás V.P. (2013). Foliculogénesis: Camino hacia la sobrevivencia o la muerte celular. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(4):128-136.
- Peters, H., Levy, E., y Crone, M. (1965). Oogenesis in rabbits. *The journal of experimental zoology*, 158, 169-179.
- Robinson, D. N., y Cooley, L. (1996). Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel. *Trends in cell biology*, 6(12), 474–479.
- Scott, F. G. (2005). *Biología del Desarrollo*. Ed. Médica Panamericana
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., y Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is upregulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental biology*, 274(2), 271–279.
- 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., y 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
- Spradling A. C. (1993). Germline cysts: communes that work. *Cell*, 72(5), 649–651.
- Telfer, W. H. (1975). Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. *Advances in Insect Physiology*. 11, 223–319.
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A. C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I., Riethmacher, D., Schütz, G., Cooney, A. J., Lovell-Badge, R., y Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139(6), 1130–1142.
- Upadhyay, S. y Zamboni, L., (1981). The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways, en *Development and function of*

reproductive organs. V workshop on development and function of reproductive organs, Copenhagen, Byskov, A. y Peters, H., eds., Excerpta Medica, 18-27.

- Zamboni, L., y Gonndos, B. (1968). Intercellular bridges and synchronization of germ cell differentiation during oogenesis in the rabbit. *The Journal of cell biology*, 36(1), 276–282.
- Zamboni, L., y Upadhyay, S. (1983). Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. *The Journal of experimental zoology*, 228(2), 173–193.