



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MORFOGÉNESIS OVÁRICA Y CARACTERIZACIÓN
DE CÉLULAS PROGENITORAS DE LA LÍNEA
GERMINAL EN TRES ESPECIES DE MURCIÉLAGOS
FILOSTÓMIDOS (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga
soricina* y *Sturnira lilum*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I O L O G A)

P R E S E N T A:

TANIA JANETH PORRAS GÓMEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
(2010)



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.

La Ciencia, a pesar de sus increíbles progresos no puede explicarlo todo, pero con investigación responde fenómenos que parecían inexplicables.



*Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es un océano.*

(Isaac Newton)

AGRADECIMIENTOS

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

A los revisores:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dra. Maricela Villagrán Santacruz
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón
M. en C. Gilberto Federico García Ruiz

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

AGRADECIMIENTOS

Hay cosas que prefiero expresarlas por escrito, porque de alguna forma siento que dejo plasmados mis más profundos sentimientos, sin embargo no encuentro las palabras indicadas que reflejen fielmente lo que siento, lo más cercano que encuentro es un profundo GRACIAS, ya que de esta forma ofrezco el más sincero agradecimiento a todos por su apoyo y consejos que han hecho posible que yo culminara con éxito esta etapa de mi vida.

Un agradecimiento especial a la Dra. Norma Moreno Mendoza, por las facilidades brindadas en el desarrollo de este estudio.

A mi madre Graciela Gómez Franco por su apoyo, cariño y comprensión pero aun más por haber guiado mi camino. A mis hermanos Brayan Porras Gómez y Karen Porras Gómez por todo su apoyo pero sobretodo por aguantar mi mal genio, también a mi abuelita Piedad Hernández Ramírez y a toda mi familia que siempre confió en mí en especial a mi tío Raúl Hernández.

También gracias a todos mis profesores de la Facultad de Ciencias que abrieron el maravilloso camino del conocimiento, que me guiaron a lo largo de 4 años en aquellas aulas brindado los conocimientos para ser un buen BIÓLOGO, que con su ejemplo me han enseñaron cosas que valoro profundamente. Un agradecimiento especial al profesor Ángel Jiménez por su tiempo y dirección en la parte estadística del trabajo.

Por último gracias a mis compañeros de laboratorio por haberme apoyado y guiado en el desarrollo de este trabajo pero sobre todo por su amistad.

DEDICATORIA

Gracias Dios por haberme puesto en manos de un ser tan maravilloso al que llame PAPA, pero al buscar "Papa" en el diccionario su definición no describe, en lo más mínimo lo que tu significas para mí. Sin embargo PAPA es la forma más linda de llamar a la persona que te dio la vida.

Por ello y muchas otras cosas este trabajo está dedicado a una sola persona, a la persona que más amo en la vida, a mi PAPA, Francisco Jaime Porras Hernández, gracias por enseñarme que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante.

GRACIAS papi por haber sido una excelente persona, por guiarme de la mano en este duro camino, por compartir mis alegrías y tristezas siempre con una sonrisa, porque en silencio me acompañaste sin pedir nada a cambio, por haberme amado a pesar de mis defectos, pero sobre todo gracias, porque en todo momento tuviste una palabra oportuna que me hizo levantarme y continuar, una vez me dijiste "cuando la vida te presente razones para llorar demostrarle que hay miles de razones para reír", y desde que tú te fuiste y tu corazón se durmió la pongo en práctica cada día, porque te extraño y aunque me quedan los recuerdos, sin ti la vida no es igual.

Hoy es el día que espere cuatro largos años, hoy termina una larga jornada de sacrificios y desvelos, hoy quiero que sepas que fuiste mi principal motivación a lo largo de todo este tiempo gracias por confiar y alentarme a seguir adelante, pero sobre todo muchas gracias por haber sido el mejor PAPA del mundo, y aunque no estás físicamente conmigo se que compartes mi felicidad.

TE AMO PAPA!!!!

INDICE

	AGRADECIMIENTOS	5
	DEDICATORIA	7
I	RESUMEN	8
II	ABSTRACT	9
III	INTRODUCCIÓN	10
	3.1 Determinación del sexo en mamíferos	10
	3.2 Células germinales primordiales de mamíferos	12
	3.3 Diferenciación gonadal	17
	3.31 Establecimiento de la gónada indiferenciada	17
	3.32 Diferenciación testicular	19
	3.33 Diferenciación ovárica	20
	3.4 Ovogénesis en mamíferos	21
	3.5 Foliculogénesis	22
	3.51 Células de la Granulosa	23
	3.52 Células de la Teca Interna	23
	3.53 Células de la Teca Externa	24
	3.54 Folículos Primordiales	24
	3.55 Folículos Primarios	25
	3.56 Folículos Secundarios	25
	3.57 Folículos Pre-Antrales	26
	3.58 Folículos Antrales	26
	3.6 Genes involucrados en el desarrollo folicular	26

3.7	Ciclo reproductor y maduración del ovocito en mamíferos.....	27
3.71	Ciclo Menstrual.....	28
3.72	Ciclo Estral.....	29
3.8	Neo-ovogénesis.....	30
3.9	El murciélago como modelo para el estudio de células.....	33
	progenitoras de la línea germinal en ovario	
3.10	Generalidades de los murciélagos.....	35
3.101	<i>Artibeus jamaicensis</i>	35
3.102	<i>Glossophaga soricina</i>	39
3.103	<i>Sturnira lilium</i>	43
IV	JUSTIFICACIÓN	47
V	HIPÓTESIS	48
VI	OBJETIVOS	48
6.1	Objetivo General.....	48
6.2	Objetivos Particulares.....	48
VII	METODOLOGÍA	49
7.1	Colecta.....	49
7.2	Sacrificio y obtención de muestras.....	52
7.3	Inclusiones en Epón.....	52
7.4	Inclusiones en Parafina.....	54
7.5	Inmunofluorescencias.....	55
7.6	Conteo folicular.....	58
7.7	Análisis estadístico.....	59
VIII	RESULTADOS	62

8.1	Peso de los ovarios	62
8.2	Morfología del ovario en las tres especies de murciélagos- filostómidos	65
8.21	Morfología del ovario en <i>Artibeus jamaicensis</i>	66
8.22	Morfología del ovario en <i>Glossophaga soricina</i>	66
8.23	Morfología del ovario en <i>Sturnira lilium</i>	67
8.3	Cuantificación de folículos en el ovario derecho e izquierdo de las tres especies de murciélagos (<i>A. jamaicensis</i> , <i>G. soricina</i> y <i>S. Lilium</i>)	71
8.4	Prueba de reserva ovárica	75
8.5	Caracterización de las Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) localizadas en la región cortical del ovario adulto	76
8.51	Caracterización de las CGCA en <i>Artibeus jamaicensis</i>	77
8.52	Caracterización de las CGCA en <i>Glossophaga</i>	77
	<i>soricina</i>	
8.53	Caracterización de las CGCA en <i>Sturnira lilium</i>	78
IX	DISCUSIÓN	85
9.1	Reserva ovarica	85
9.2	Morfología del ovario adulto	86
9.3	Caracterización de las células corticales	88
X	CONCLUSIONES	94
XI	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	95

RESUMEN

El ovario es el órgano principal en el funcionamiento del sistema reproductor femenino, y desempeña dos funciones fisiológicas importantes. En primer lugar, es el responsable de la diferenciación y la liberación de un ovocito maduro para su fertilización. En segundo lugar, es responsable de la síntesis y secreción de hormonas que son esenciales para el desarrollo de folículos, la ciclicidad menstrual o estral (dependiendo del patrón reproductor de la hembra) y del mantenimiento del aparato reproductor y su función. Hasta el momento la información disponible sobre los procesos que involucran a la línea germinal en ovarios de 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 que se conocen patrones reproductores 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 son poco conocidos. La funcionalidad de los ovarios es variable en murciélagos y 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. De acuerdo con esto, es factible pensar que en los ovarios de los quirópteros se está llevando a cabo un mecanismo de auto-renovación de la línea germinal. El objetivo del presente estudio fue determinar la morfogénesis ovárica y caracterizar células progenitoras de la línea germinal en tres especies de murciélagos filostómidos (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium*). Realizamos un hallazgo interesante en la región cortical de ambos ovarios: un grupo de células, las cuales no presentan características morfológicas para ser incluidas en algunos de los tipos foliculares; sin embargo, son afines a marcadores de la línea germinal, por lo que en este estudio se denominaron células germinales corticales adultas (CGCA). En las CGCA se detectó la expresión de la proteína de los genes *Vasa*, *Oct-4*, *fragilis*, *stella* y *c-kit*, en ambos ovarios de las tres especies de murciélagos. Algunas presentaban actividad proliferativa evidenciada por la expresión H3. Se sabe, que las células que expresan *fragilis* pueden formar CGP y algunas células somáticas, mientras que la expresión de *stella* está restringida a aquellas células cuyo destino celular es germinal. De la misma manera, la expresión de *Oct-4* se detecta en los núcleos de las blastómeras de segmentación temprana, lo que hace que esté restringida a las células de la masa celular interna. De acuerdo con nuestros hallazgos y el papel que estos genes están jugando durante la diferenciación de la línea germinal en otros mamíferos, se puede sugerir que en estas especies de murciélagos, pudiera presentarse un mecanismo de auto-renovación de la línea germinal.

ABSTRACT

The ovary is the main organ in the female reproductive system, and has two important physiological functions. First, the ovary is responsible for the differentiation and release of a mature oocyte for fertilization. Second, it is responsible for the synthesis and secretion of hormones that are essential for follicle development and the menstrual cycle or estrous (depending on the pattern of the female) and maintenance of the reproductive system and function. So far the available information on the processes involving the germ line in ovaries of mammals is mainly derived from experimental models such as mice and rats, but for bats, knowledge on this subject is scarce. Although breeding patterns are known in several species of phyllostomid bats, the processes of determination and gonadal sex differentiation and the establishment of the germ line and development of ovaries in adult life are poorly understood.

The functionality of the ovaries is variable and although most bats present ovarian activity in both ovaries, some species may ovulate consistently from one, so that the ovary is often larger. Accordingly, we expect that a self-renewal of germ line mechanism is taking place in the ovaries of the bats. The aim of the present study was to determine the ovarian morphogenesis and characterize progenitor cells in the germ line phyllostomid three species of bats (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*).

One interesting finding was that in the cortical region of both ovaries, a group of cells which do not show morphological characteristics to be included in some of the follicular type, but which are related to germ-line markers, in this study they are called adult stem germ cells (ASGC). ASGC was detected in the expression of genes Vasa protein, Oct-4, fragilis, stella and c-kit, in both ovaries of the three bat species. Some showed proliferative activity evidenced by the expression H3. It is known that cells expressing fragilis can form CGP and some somatic cells, whereas the expression of stella is restricted those cells which are germ cell fate. Similarly, the expression of Oct-4 is detected in the nuclei of blastomeres of early segmentation, which makes this restricted to cells of the inner cell mass. According to our findings and the role that these genes play during the differentiation of the germ line in other mammals, it is suggested that a mechanism of self-renewal of germ line could be taking place in these species of bats.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre diferenciación sexual realizados en mamíferos han llevado al reconocimiento de tres procesos secuenciales: la determinación del sexo cromosómico en el momento de la fertilización, el desarrollo de la gónada indiferenciada hacia un ovario o un testículo, y la subsecuente diferenciación de los genitales internos y externos como resultado de la función endocrina asociada con el tipo de gónada presente (Gilbert, 2005). El desarrollo del fenotipo sexual es el resultado de una serie de interacciones entre las señales genéticas, celulares y hormonales, las cuales participan en la cascada de eventos necesarios para generar el fenotipo macho o hembra (Wilhelm *et al.*, 2006). Las diferencias fenotípicas entre machos y hembras son el resultado de la correcta manifestación de todos los procesos involucrados durante la diferenciación sexual gonadal.

Determinación del sexo en mamíferos

Existen dos tipos de determinación sexual para mamíferos: determinación sexual primaria y determinación sexual secundaria. La determinación sexual primaria se refiere a los procesos que llevan al establecimiento de una gónada indiferenciada, y su posterior diferenciación a un ovario o un testículo dependiendo del sexo genético del individuo. Por lo tanto, en mamíferos la determinación sexual primaria es cromosómica y en general no está influenciada por el ambiente (Gilbert, 2005).

En la mayoría de los casos la hembra posee una constitución cromosómica XX y el macho XY, donde cada individuo debe tener al menos un cromosoma X. El macho al ser XY puede generar dos tipos de espermatozoide: la mitad acarreará un solo cromosoma X y la otra mitad un Y. Si el gameto femenino recibe un cromosoma X del espermatozoide, el individuo resultante es XX, formando ovarios y desarrollándose como hembra; si el gameto femenino recibe un cromosoma Y del espermatozoide el individuo es XY formando testículos y fenotipo masculino. La formación de ovarios y testículos son procesos activos dirigidos por genes. No hay un estado por defecto en la determinación sexual primaria de mamíferos y ambos sexos divergen de una gónada bipotencial.

La determinación sexual secundaria afecta el fenotipo fuera de las gónadas, esto incluye el sistema de conductos masculinos y femeninos y los genitales externos. Si está ausente el cromosoma Y, el primordio de la gónada se desarrolla hacia ovario. Los ovarios producen estrógenos que son hormonas que permiten el desarrollo de los conductos de Müller hacia útero, trompas de Falopio (oviductos) y el extremo superior de la vagina. Por el contrario si el cromosoma Y está presente se forman testículos y estos secretan dos hormonas principales: la primera es la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH, por sus siglas en inglés) que como su nombre lo indica, inhibe el desarrollo de los conductos de Müller. La segunda es la testosterona, que masculiniza al feto, y estimula la formación de pene, el escroto y el sistema de conductos masculinos e inhibe el desarrollo de primordios de las glándulas mamarias.

Por todo lo anterior, se puede definir la determinación sexual en los mamíferos como la formación de un ovario o un testículo a partir de una gónada bipotencial. Desde el momento en que un gameto masculino con un cromosoma X o Y llega a fertilizar al óvulo, surgen una serie de eventos genéticos, hormonales y celulares que culminarán con la formación de organismos fisiológica y morfológicamente diferentes: un macho y una hembra (Ottolenghi *et al.*, 2006).

Un esquema general de la determinación sexual de los mamíferos nos muestra que la diferenciación de la cresta genital hacia una gónada bipotencial requiere de los genes *LHX9*, *SF1* y *WT1*; debido a que se ha demostrado en ratones que la ausencia de cualquiera de estos tres genes ocasiona la interrupción del desarrollo gonadal (Nef *et al.*, 2005). Si el desarrollo de la gónada bipotencial es dirigido hacia el sentido femenino desarrolla ovarios por acción de los genes *Wnt4* y *Dax1* y si se dirige al sentido masculino desarrolla testículos por la expresión del gen *Sry* (Bullejos y Koopman, 2001) presente sobre el cromosoma Y conjuntamente con genes autonómicos como *Sox9* (Hacker *et al.*, 1995; Graves, 1998). En el ovario se diferencian las células de la teca y las células de la granulosa o foliculares que juntas son capaces de sintetizar estrógenos. En ausencia de la hormona anti-mülleriana el conducto de Müller se diferencia hacia el tracto reproductor femenino. En el caso de los testículos se diferencian dos tipos celulares importantes, las células de Sertoli y las células de Leydig. Las células de Sertoli secretan el factor inhibidor de los conductos müllerianos (AMH) llevando a cabo la regresión de los conductos de Müller. Con respecto a Leydig, éstas secretan testosterona, que provoca la diferenciación de conducto de Wolff hacia genitales masculinos internos, en la región urogenital, la testosterona es convertida hacia dihidrotestosterona (DHT), esta hormona causa la morfogénesis del pene y de la glándula prostática (fig. 1).

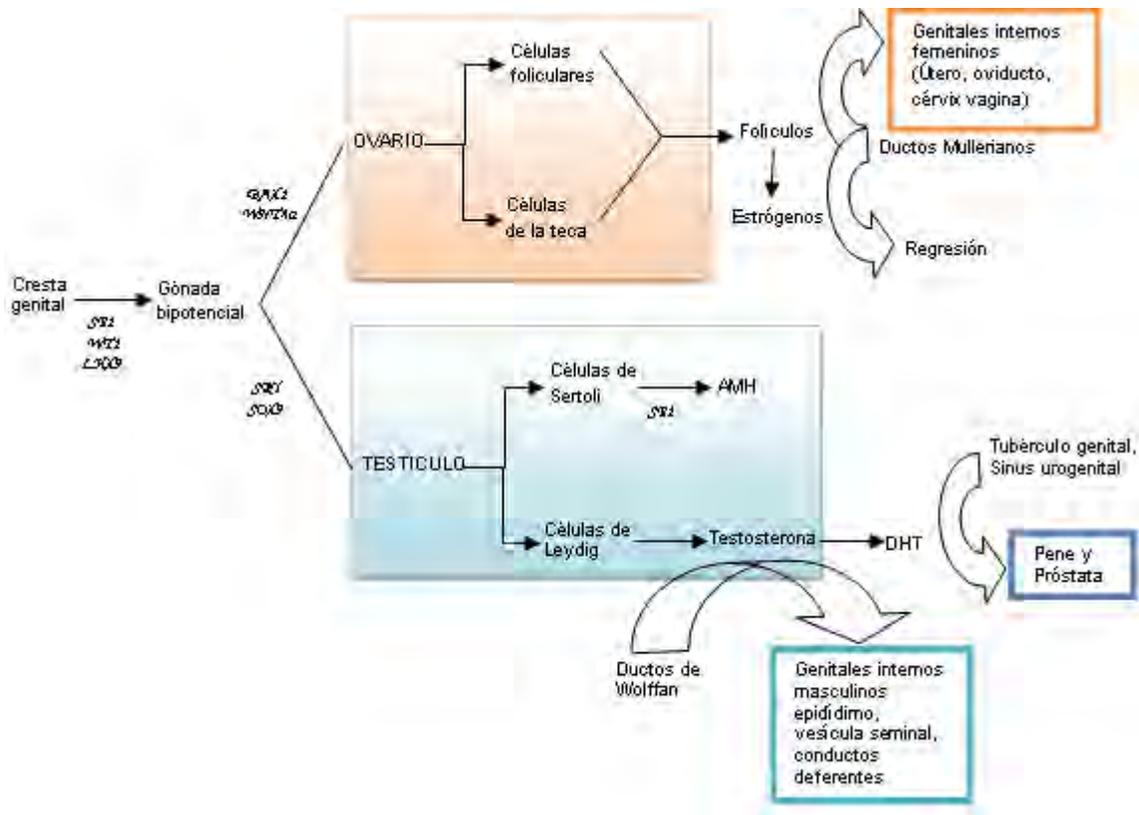


Figura 1. Esquema general de la determinación sexual en mamíferos. (Imagen tomada de Gilbert 2005).

Células germinales primordiales de mamíferos

Todos los organismos que se reproducen sexualmente se originan a partir de la fusión de gametos: espermatozoide y óvulo. Los gametos se originan a partir de células germinales primordiales (CGP). En muchos casos (incluidos *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Xenopus leavis*), las células germinales primordiales son especificadas autónomamente por determinantes citoplasmáticos localizados en el gameto femenino y luego durante la segmentación son distribuidos a células específicas. En otros casos como las salamandras y mamíferos las células germinales son especificadas mediante interacciones entre las células vecinas. En aquellas especies en las que la determinación de las células germinales primordiales se lleva a cabo por la localización autónoma de proteínas y mRNA específicos, estos componentes citoplasmáticos son referidos colectivamente como el plasma germinal (Gilbert, 2005).

Al no existir un plasma germinal en mamíferos, las células germinales no son morfológicamente distintas durante el desarrollo temprano, por ello la línea germinal es inducida durante el desarrollo embrionario. En ratones, las CGP se forman en la región posterior del epiblasto en la unión del ectodermo extraembrionario, el epiblasto, la línea primitiva y la alantoides. En el día 6.5 del desarrollo embrionario la expresión de los genes *BMP4* y *BMP8b* en el ectodermo extraembrionario le dan a ciertas células en esta área la capacidad para especificarse como CGP (Lawson *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2000). Este grupo de células capaces de generar CGP expresan el gen *fragilis*, el cual codifica para una proteína transmembranal. Sin embargo; estas células que expresan *fragilis* pueden formar CGP y algunas células somáticas. En el centro de este grupo de células está un pequeño grupo celular que también expresan el gen *stella*, estas células están restringidas exclusivamente al destino celular germinal (Saitou *et al.*, 2002).

Hasta hace algunos años se pensaba que los precursores de las CGP en el ratón migraban desde el epiblasto hacia el mesodermo extraembrionario y luego regresaban nuevamente hacia el embrión por el camino de la alantoides. Sin embargo, la capacidad para marcar células germinales primordiales empleando la proteína verde fluorescente y la observación de células vivas migrando han permitido reevaluar estos conceptos en mamíferos (Anderson *et al.*, 2000; Molyneaux *et al.* 2001).

En primer lugar, se sugiere que las CGP de mamíferos migran directamente hacia el endodermo desde la región posterior de la línea primitiva (se cree que las células que ingresan en la alantoides mueren). Estas células, las cuales están expresando *stella* se posicionan en el mesenterio del intestino posterior. Aunque las CGP tienen la capacidad de moverse activamente no pueden ir fuera del intestino hasta cerca del día 9 *postcoitum* (*dpc*). En este momento, las CGP salen del intestino pero todavía no migran a las crestas genitales. Sin embargo, al día siguiente se observa a las CGP migrando hacia las crestas genitales. Hacia los 11.5 *dpc*, las CGP ingresan en las gónadas en desarrollo. Durante esta migración han proliferado desde una población inicial de 10-100 células a una de 2500-5000 CGP presentes en a gónada hacia el día 12 del desarrollo embrionario.

La migración de las CGP se lleva a cabo por movimientos pasivos y activos. La migración pasiva se presenta aproximadamente hacia la cuarta semana del desarrollo en humanos, las CGP inician un proceso de traslocación que las lleva desde el endodermo del saco vitelino a través de la matriz extracelular del mesénquima del mesenterio dorsal hasta su localización

definitiva en los pliegues o primordios gonadales (Byskov, 1982; Byskov, 1986). Este proceso ocurre simultáneamente con una metamorfosis en la conformación del embrión que cambia de un aspecto inicial discoide a una configuración tubular. La nueva forma permite que el endodermo del saco vitelino sea incorporado al intestino posterior y que las CGP por tanto ocupen una posición intraembrionaria (Motta *et al.*, 1997a; Fujimoto *et al.*, 1985). Una vez dentro del embrión las CGP abandonan el epitelio del intestino posterior a través de brechas en la lámina basal epitelial (Fujimoto *et al.*, 1985; Motta *et al.*, 1997a) y se desplazan a hacia el mesénquima subyacente. Hasta este momento (quinta semana de desarrollo) el proceso de traslocación de las CGP es de tipo pasivo como se puede comprobar por sus características ultraestructurales y por su aspecto metabólico quiescente (Motta *et al.*, 1997b).

La migración activa usualmente está asociada a la motilidad de las células embrionarias y la acompañan modificaciones en sus características ultra estructurales. Así, el patrón cinético de una célula se puede alterar, cuando sobre ella actúan factores de crecimiento (Schiling *et al.*, 1997), capaces de inducir la expresión de ciertos tipos de moléculas reguladoras de la motilidad como las proteínas del citoesqueleto y las proteínas de adhesión (Copper, 2002; Kuwana y Fujimoto, 1983) que determinan la aparición de un nuevo patrón estructural.

Durante el proceso migratorio, no solo intervienen factores endógenos propios de las células, sino también la matriz extracelular gracias a interacciones de diferente índole entre sus componentes y las células migratorias (Motta *et al.*, 1997; Kuwana y Fujimoto, 1983). Una vez que las CGP alcanzan el mesénquima del mesenterio dorsal, adquieren un nuevo patrón ultra estructural que las capacita para desplazarse activamente hacia los pliegues gonadales mediante movimientos de tipo ameboide (Motta *et al.*, 1997; Byskov, 1982; Fujimoto *et al.*, 1977). De esta manera, las CGP al iniciar la fase activa en su trayecto migratorio, modifican sus características pues adquieren una forma alargada (Fukuda, 1976), aumentan de modo marcado la actividad de la fosfatasa alcalina (Fujimoto *et al.*, 1977), también aumentan el número de membranas del retículo endoplasmico rugoso, la envoltura nuclear se torna irregular (Motta *et al.*, 1997) y comienzan a aparecer protrusiones de tipo lamelipodio (Jeon, 1973; Fujimoto *et al.*, 1977; Schiling *et al.*, 1997). Estos cambios indican que las CGP una vez que alcanzan una *posición* intraembrionaria adquieren capacidad de invasión tisular que les permite dirigirse por sí mismas de forma activa hacia los primordios gonadales (Schiling *et al.*, 1997; Fukuda, 1976; Motta *et al.*, 1997b).

Si bien, la ruta migratoria descrita por las CGP desde el endodermo del saco vitelino hasta los pliegues gonadales se ha identificado plenamente mediante métodos histoquímicos convencionales (Witschi, 1948; Chiquoine, 1954; Fujimoto, 1977; Fujimoto *et al.*, 1985), los procesos a través de los cuales las células migratorias generan las fuerzas necesarias para desplazarse han sido objeto de debate. Sin embargo, se acepta que el principal mecanismo generador de fuerzas para la locomoción corresponden al ensamblaje de los haces y retículos de actina en el borde director seguido por la interacción entre la miosina y la actina tanto en dicho borde como en la parte posterior (Lodish *et al.*, 2002).

Las células germinales primordiales de mamíferos parecen estar estrechamente asociadas con las células sobre las que ellas migran, ya que éstas se mueven mediante la extensión de prolongaciones citoplasmáticas (Furukawa *et al.*, 1997). Las CGP también son capaces de penetrar las monocapas celulares y de migrar a través de las láminas celulares. Los mecanismos por los cuales las CGP migran de manera activa aún se desconocen. La fibronectina parece ser un sustrato importante para la migración de las CGP, ya que las células germinales que carecen del receptor de integrina para tales proteínas de la matriz extracelular no pueden migrar hacia las gónadas (Anderson *et al.*, 2000). También se ha propuesto que la direccionalidad puede ser proporcionada por un gradiente de proteína soluble. La evidencia *in vitro* sugiere que las crestas genitales de los embriones de ratón de 10.5 *dpc* secretan una proteína difusible tipo *TGFβ1* que es capaz de atraer a las CGP de ratón (Godin *et al.*, 1990). Sin embargo, si la cresta genital es capaz de proporcionar tales señales aún no ha sido demostrado experimentalmente (Gilbert, 2005).

Aunque la presencia de un plasma germinal en mamíferos no ha sido establecida, la retención de la totipotencialidad de la línea germinal ha sido correlacionada con la expresión de un factor de transcripción nuclear, *Oct4*. Este factor es expresado en todos los núcleos de las blastómeros de segmentación temprana pero su expresión llega a ser restringida a las células de la masa celular interna. Durante la gastrulación éste llega a ser expresado únicamente en aquellas células epiblasticas posteriores que se piensa dan origen a las CGP. Posteriormente en el desarrollo, la proteína de *OCT4* se observa solamente en las CGP y tardíamente en los ovocitos. *OCT4* no se observa en los espermatozoides en desarrollo, es decir después de que las células germinales alcanzan los testículos y se comprometen a la producción de espermatozoides (Gilbert, 2005).

La proliferación de las CGP parece ser estimulada por el factor de célula madre, el mismo factor de crecimiento involucrado en la proliferación de melanoblastos derivados de la cresta neural y de células madre hematopoyéticas. Este factor se une y activa al receptor *Kit* de tirosina cinasa codificado por *White* y es producido por las células que revisten el camino de migración de las CGP y mantiene unidas las membranas celulares. Parece que la presentación de esta proteína sobre las membranas celulares es importante para su actividad. Ratones homocigotos para las mutaciones en los genes que regulan el factor de célula madre o su receptor *c-Kit* son deficientes en el número de células germinales, así como también en la cantidad de melanocitos y células sanguíneas (Dolci *et al.*, 1991; Matsui *et al.* 1991). El agregado de factor de célula madre a las CGP tomadas de embriones de ratón de 11 *dpc* estimula su proliferación por cerca de 24 horas y parece impedir la muerte celular programada (Godin *et al.*, 1990; Pesce *et al.*, 1993).

Las CGP son fácilmente identificables al microscopio de luz cuando se encuentran en el endodermo del saco vitelino pues no solo son más grandes y más claras que las células somáticas vecinas (Byskov, 1982; Motta *et al.*, 1997), sino que además son basofílicas (Zamboni y Merchant, 1973) y exhiben actividad de la enzima fosfatasa alcalina en su citoplasma periférico. La observación de las CGP al microscopio electrónico de transmisión y al microscopio electrónico de barrido, permiten apreciar su forma redonda y un diámetro que oscila entre 15 y 20 μm . El núcleo esférico ocupa una posición excéntrica y contiene una cromatina granular muy fina y un número variado de nucléolos (Byskov, 1982). El retículo endoplasmático rugoso es abundante al igual que los polirribosomas libres. Cerca del núcleo se observan mitocondrias esféricas con crestas lamelares, así como un complejo de Golgi pequeño (Motta *et al.*, 1997; Jeon y Kennedy, 1973). Asociadas con el núcleo y con las mitocondrias, se encuentra una inclusión citoplasmática muy particular propia de las CGP tanto femeninas como masculinas llamada *nuage* (del francés nube). La *nuage* está constituida por una masa electrodensa formada por material fibroso o granular muy semejante a los gránulos polares ricos en ARN, característicos del plasma de las CGP en invertebrados no mamíferos (Eddy, 1974). El significado funcional de esta inclusión se relaciona con aumento en la actividad mitótica de las CGP y con determinación de la línea celular germinal a partir de las células somáticas del epiblasto. Las reservas energéticas de las CGP están representadas por depósito de glucógeno y gotas lipídicas necesarias para la migración hacia los pliegues gonadales (Byskov, 1982; Fukuda, 1976). También se encuentran unos pocos microfilamentos,

centriolos y microtúbulos así como aéreas focales de contacto estrecho con las células vecinas (Pereda y Motta, 1991).

La llegada de las CGP a la gónada y la pérdida de sus características migratorias marcan el inicio de otra fase de su desarrollo. Las CGP junto con varios tipos de células somáticas presentes en la cresta genital inician la formación de la gónada indiferenciada.

Diferenciación gonadal

Establecimiento de la gónada indiferenciada

La gónada presenta una situación embriológica única, ya que presenta dos opciones cuando se diferencia: puede desarrollarse hacia un ovario o un testículo. Esta decisión binaria depende del sexo genético del individuo y de la adecuada manifestación de eventos tanto morfológicos como fisiológicos que establecerán el futuro desarrollo sexual del organismo (Gilbert, 2005). De acuerdo con esto, la gónada de mamíferos se desarrolla a través de un estadio bipotencial (indiferente) durante el cual no presenta características morfológicas femeninas ni masculinas (Wilhelm *et al.*, 2006). Las células somáticas que conforman la gónada son de tres tipos: mesenquimáticas (laxamente distribuidas), mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (provenientes de los vasos que invaden la zona).

Las células mesenquimáticas y mesoteliales inician una gran actividad al llegar las CGP. Se observa entonces una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático fundamentalmente, de manera que forman un agregado compacto que se denomina "blastema gonadal". A partir de este primordio embrionario, se diferencian dos tejidos gonadales importantes: los cordones sexuales y el estroma. Los cordones sexuales son arreglos epiteliales que se encuentran delimitados por una lámina basal y dentro de ellos encontramos a las CGP. Por otro lado, en el estroma se encuentran células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada. Cabe mencionar la presencia de algunos túbulos del mesonefros vecino, que desde esta etapa inicial mantienen estrecha relación con la gónada (Wilhelm *et al.*, 2006).

La gónada indiferenciada surge del mesodermo intermedio, formando una estructura que se encuentra a ambos lados del embrión llenando gran parte de la cavidad celómica durante la

primera mitad del desarrollo. Esta región, comprende tres segmentos de la cresta urogenital donde se distinguen de delante hacia atrás: 1) el pronefros, que incluye los primordios adrenales cerca de su extremo caudal, 2) el mesonefros, la región central desde el cual surge la gónada, y 3) la metanefros, la región más posterior de la cual las formas de riñón. Las gónadas surgen en la superficie ventromedial del mesonefros en 10.5 *dpc*. Las células del epitelio celómico parecen proporcionar una fuente de células para el crecimiento de la cresta genital, mientras que el reclutamiento de células subyacentes de la población del mesonefros también aumenta la población de células en el primordio gonadal en machos. Desde las primeras etapas de desarrollo gonadal, los túbulos mesonéfricos pueden formar puentes continuos a las células epiteliales de la gónada en las crestas genitales masculinas y femeninas (Karl y Capel, 1995). Estas estructuras, que han sido descritas previamente en estudios de microscopía electrónica (Upadhyay *et al.*, 1981), son evidentes por proyección de imagen confocal de las gónadas toda positivas a laminina y E-cadherina, aun no se ha definido la función de estas conexiones.

La gónada de mamíferos temprana es un primordio indiferenciado compuesto por células precursoras bipotencial que puede seguir uno de dos posibles destinos. Precursores de células de soporte (llamado así por su papel en el mantenimiento y alimentar las células germinales en ambos sexos) y las células secretoras de esteroides que se cree están presentes en la gónada temprana (Merchant-Larios *et al.*, 1993). En apoyo los precursores de células siguen despegando del epitelio celómico hasta 11,5 *dpc* (Karl y Capel, 1998).

En humanos, los esbozos de la gónada aparecen en el mesodermo intermedio durante la cuarta semana de desarrollo y se mantienen sexualmente indiferentes hasta la séptima semana. Estos esbozos gonadales son regiones pares del mesodermo intermedio que se forman adyacentes a los riñones en desarrollo. Las porciones ventrales de los esbozos gonadales están compuestas del epitelio de la cresta genital. Durante el estadio indiferenciado, el epitelio de la cresta genital prolifera y se extiende hacia el tejido conectivo laxo mesenquimático y por arriba de éste se encuentran las capas epiteliales que forman los cordones sexuales. Las células germinales migran hacia la gónada durante la sexta semana en humanos y son rodeadas por los cordones sexuales. En ambas gónadas XY y XX, los cordones sexuales se mantienen conectados al epitelio superficial (Gilbert, 2005). Por lo tanto, el estado indiferenciado de la gónada corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las CGP y a la proliferación de células somáticas de la región urogenital, que darán origen tanto al tejido epitelial, como al tejido estromático, que constituyen a su vez los

elementos histológicos precursores del ovario o del testículo en hembras o machos respectivamente.

Diferenciación testicular

Si el feto es XY, los cordones sexuales continúan proliferando, extendiéndose profundamente hacia el tejido conectivo. Estos cordones forman una red de cordones sexuales internos (medulares), y en el extremo más distal, la delgada *rete testis*. Por último, los cordones sexuales ahora denominados cordones testiculares pierden su contacto con el epitelio superficial y se separan de este por una gruesa matriz extracelular, la túnica albugínea. Por lo tanto, cuando las células germinales que ingresan a las gónadas masculinas son rodeadas por células somáticas, precursoras de las células de Sertoli, formando los cordones testiculares (Albrecht y Eicher, 2001) un inhibidor de la meiosis parece ser producido por los cordones sexuales masculinos y las células germinales no iniciarían la meiosis hasta la pubertad (McLaren y Southee, 1997).

La diferenciación del testículo es inducida por la expresión de *Sry* en un subgrupo de células somáticas que son inducidas a diferenciarse en células de Sertoli, que se cree que actúa como el centro de organización de la gónada masculina y orquestan la diferenciación de todos los otros tipos celulares (Berta *et al.*, 1990). Las células precursoras de Sertoli expresan el gen *Sry* (Albrecht y Eicher, 2001), considerado el factor determinante de la diferenciación testicular (Koopman *et al.*, 1990). El tiempo y localización de la expresión de *MIS* correlacionado con la expresión del *Sry*, sugiere que el *Sry* podría expresarse en las células de Sertoli para llevar a cabo su diferenciación y, posteriormente, todos los demás eventos del desarrollo del testículo. Con base en esto, el gen *Sry* podría estar regulando el inicio de la expresión de *MIS*. En gónadas fetales, se ha encontrado que el producto del *Sry* interactúa con los promotores de *MIS* y de aromatasa P450 y se ha propuesto que la regulación de estos dos genes directamente controla la diferenciación de la gónada hacia testículo.

Las células del estroma que rodean a los cordones testiculares se diferencian para formar varios tipos celulares: células miodes, fibroblastos, endotelios y células de Leydig, estas últimas son importantes por su actividad endocrina (Wilhelm *et al.*, 2006).

Diferenciación ovárica

En hembras, las células germinales se localizan cerca de la superficie externa de la gónada. Estas células germinales son requeridas por las células somáticas gonadales para completar su diferenciación a tejido ovárico (McLaren, 1991).

A diferencia de los machos, en una rápida ráfaga de diferenciación testicular se desencadena por la expresión de *Sry*, en las hembras, la gónada fetal parece inerte durante varios días en el ratón. Sin embargo, la expresión de genes específicos en la hembra se han informado a los 11,5 dpc (Bowles *et al.*, 2000; Bullejos *et al.*, 2000; Jorgensen y Gao, 2005; Nef *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2004). Además, el análisis histológico detallado reveló que entre 13,5 a 15,5 dpc, sufre una remodelación pobremente diferenciada. Los presuntos ovocitos desarrollan quistes interconectados unidos por puentes citoplasmáticos (Pepling y Spradling, 1998). También hay un alto grado de vascularización, con una densa red de pequeños vasos que se hacen visibles sólo por el uso de marcadores moleculares (Bullejos *et al.*, 2002). Estos vasos delimitar cadenas de células germinales, también conocidos como cuerdas ovígeras (Odor y Blandau, 1969; Konishi *et al.*, 1986). La función de esta vascularización no se conoce. Para la vasculatura macho-específico plantea una hipótesis, la cual dice, que es más prominente en comparación con la hembra, ya que podría ser necesario para el transporte de las hormonas esteroideas producidas en los testículos, pero no en el ovario en esta etapa de desarrollo. Un examen más detallado reveló que esta vasculatura macho-específicos se compone de arterias en lugar de las venas (Brennan *et al.*, 2002). Esto podría sugerir que los vasos en los varones y las hembras pueden desempeñar la misma función, es decir, para ofrecer los factores exógenos de crecimiento a los somáticos y / o las células germinales, y que las diferencias en los patrones son los efectos secundarios debido a la diferente organización morfológica (testículo cordones vs cordones ovígeros).

El ratón presenta lo que se denomina meiosis inmediata, es decir, que se inicia un poco después de la diferenciación sexual de la gónada. Entre los 13 y 14 dpc se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. Entre los 15 y 16 dpc, la mayoría de los ovocitos se encuentran en etapas de cigoteno y paquiteno, esta última representada por la presencia de complejos sinaptinémicos. Es durante estas dos etapas que ocurre un proceso de degeneración de algunos ovocitos. Iniciada la meiosis, principia a su vez el proceso de foliculogénesis, que se define como la formación de folículos primordiales en el ovario de los

mamíferos. Los ovocitos se individualizan al ser rodeados por células foliculares y una lámina basal. A diferencia de los cordones sexuales del macho, que continúan su proliferación, los cordones sexuales iniciales de las gónadas XX degeneran. Sin embargo, el epitelio rápidamente produce un nuevo grupo de cordones sexuales que no penetran profundamente hacia el mesénquima, pero se localizan cerca de la superficie externa (corteza) del órgano. Por lo tanto, estos se denominan cordones sexuales corticales. Estos cordones se separan en grupos, en los que cada uno de los grupos rodea a una célula germinal. Las células germinales llegarán a ser los gametos femeninos maduros y los cordones sexuales corticales que las rodean se diferenciarán hacia células de la granulosa. Las células mesenquimáticas del ovario se diferenciarán hacia células tecaes. Juntas las células tecaes y las de la granulosa formarán los folículos que envuelven a las células germinales y secretan hormonas esteroides. La formación de folículos primordiales es dependiente de la presencia de ovocitos. Su ausencia impide que se formen los folículos (Merchant, 1976). La mayoría de los folículos sufren el proceso de atresia folicular, que parece jugar un papel importante en la diferenciación del tejido intersticial esteroideogénico del ovario conocido con el nombre de glándula intersticial. La atresia folicular ocurre en cualquier momento de la vida del organismo y parece ser que algunas células de la teca interna que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman pequeños cúmulos de células esteroideogénicas localizadas en el estroma (Merchant y Centeno, 1981).

Ovogénesis en mamíferos

Cuando las células germinales primordiales han alcanzado la gónada femenina, estas se diferencian hacia ovogonios, para ello las células germinales primordiales experimentan sucesivas divisiones mitóticas para posteriormente iniciar la división meiótica quedando detenidas en la primera profase I de la primera división meiótica y reanudar la meiosis una vez que se dan las señales hormonales correctas, este proceso se denomina ovogénesis (Borum, 1961).

La ovogénesis es el proceso por el cual los ovarios producen gametos femeninos. Los mecanismos de la ovogénesis es diferente entre las especies, ya que los patrones de reproducción varían enormemente, tales como en el erizo de mar y las ranas donde la hembra produce rutinariamente cientos o miles de huevos en un momento mientras que en otras especies, como los humanos y la mayoría de los mamíferos solo producen unos pocos gametos femeninos durante el tiempo de vida del individuo (Gilbert, 2005).

En las especies que producen miles de gametos femeninos las células germinales, denominadas ovogonias son células que se autorenewan y perduran por toda la vida del organismo. En los mamíferos, la ovogonia se divide para formar un limitado número de células precursoras de gametos femeninos. En el embrión humano mil o más ovogonias se dividen rápidamente desde el segundo hasta el séptimo mes de gestación para formar 7 millones de células germinales. Sin embargo, después del séptimo mes de desarrollo embrionario, el número de células germinales decae precipitadamente.

La mayor parte de la ovogonias mueren durante este periodo, mientras que las ovogonias restantes entran en la primera división meiótica (Pinkerton *et al.* 1961). Estas últimas células denominadas ovocitos primarios progresan a través de la primera fase meiótica hasta el estadio de diploteno, punto en el que serán mantenidas hasta que la hembra madura, con el comienzo de la pubertad grupos de ovocitos reinician periódicamente la meiosis, por lo tanto en los humanos las primeras fases de la meiosis comienzan en el embrión y posteriormente se reiniciara alrededor de los 12 años.

En la pubertad un grupo de folículos es establecido y mantenido continuamente a través de los folículos primordiales, estos folículos comienzan a madurar y alcanzan cuatro estadios: folículo primario, secundario o pre-antral, antral, y de Graaf, el proceso de maduración de los folículos es denominado foliculogénesis.

Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso de maduración del folículo ovárico, una estructura compuesta por células de la granulosa que rodea el ovocito y dentro de la cual se desarrolla la ovogénesis o división meiótica del ovocito (Pedersen, 1972) . Este proceso de foliculogénesis se ha dividido en tres etapas: i) Los ovocitos se encuentran agrupados, haciendo contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales. ii) Los ovocitos son separados dentro de los cordones por las células epiteliales. iii) Los ovocitos y las células pre-foliculares rodeadas por una lámina basal son separados por células del estroma. De esta manera se forma la unidad folicular compuesta de dos tipos de células: la granulosa y células de la teca externa e interna (Merchant y Chimal, 1989).

Células de la granulosa

Este tipo celular presenta la capacidad de sintetizar las tres clases de esteroides sexuales, pero es mayor la producción de estrógenos. La actividad de la aromatasa (P450arom) se encarga de la conversión de andrógenos a estrógenos y parece ser un factor limitante en la producción ovárica de estrógenos. La aromatización es inducida por la acción de la FSH. En las células de la granulosa se encuentran receptores para FSH y su número también es un factor limitante en la producción hormonal. Una de las principales acciones de la FSH en esta etapa del ciclo es aumentar el número de sus propios receptores en el folículo. Además, en conjunto con los estrógenos, ejerce un efecto mitogénico sobre las células de la granulosa (Junqueira, 1988).

La FSH no solo interviene en iniciar la síntesis de estrógenos; también estimula el crecimiento de las células de la granulosa. Esta acción es mediada por el sistema de la adenil-ciclasa en conjunto con factores de crecimiento, prostaglandinas y péptidos. A medida que las células proliferan, hay un grado de diferenciación entre ellas, posiblemente relacionado con su cercanía al ovocito. Las células de la granulosa tienen también receptores específicos para andrógenos, los cuales no solo sirven como substrato para la aromatización inducida por FSH, sino que en concentraciones bajas pueden estimular la acción de la P450arom. Cuando el folículo preantral es expuesto a un medio rico en andrógenos se favorece la conversión de androstendiona a compuestos 5- α reducidos, que no pueden ser transformados a estrógenos e inhiben la acción de la P450arom. En el mismo sentido, también se inhibe la inducción de receptores para LH por FSH lo cual conduce a la atresia del folículo.

Teca interna

Está formada por células conjuntivas, fusiformes u ovales, que se disponen en varias hileras que rodean la capa de granulosa. Las células que componen esta capa, al igual que las células de granulosa, son hormonalmente activas y sus citoplasmas contienen grasas y un pigmento amarillo, constituyen cerca del 25 del cuerpo celular lúteo. Esta capa contiene abundantes vasos, que se disponen formando un rico plexo vascular (Junqueira, 1988).

Teca externa

Constituida por células conjuntivas que se dispone fuera de la teca interna. La conforman células fusiformes u ovals semejantes a las células que componen el estroma ovárico. Tras la ovulación, el folículo roto se colapsa y queda ocupado por un coágulo hemorrágico, formándose el cuerpo lúteo (Junqueira, 1988). Por efecto de la hormona luteinizante (LH) secretada por la hipófisis, las células de la teca externa adquieren las características de células secretoras de esteroides y secretan progesterona. Estas células reciben el nombre de células luteínicas de la granulosa. La producción de niveles altos de progesterona inhibe la producción de LH.

Folículos primordiales

Dentro de los primeros 3 días después del nacimiento, una rápida reorganización de la morfología ovárica se hace evidente. Los puentes intercelulares entre los ovocitos en los cordones ovígeros se descomponen, y los ovocitos son estrechamente rodeados por una monocapa de epitelio aplanado, y células escamosas denominadas pre-granulosa. Estos folículos primordiales definitivos son separados por una membrana basal que rodea las células pre-granulosa. Al mismo tiempo, hay una reorganización morfológica del ovario en compartimentos, la corteza, donde residen los folículos primordiales, y el bulbo raquídeo. Durante la formación de los folículos primordiales, los altos niveles de apoptosis se producen ovocitos (Borum, 1961; Beaumont y Mandl, 1963). Las señales de esta muerte celular programada no se conocen, pero es probable que sea una combinación de señales intercelulares (cada ovocito deben estar rodeados por un número suficiente de células pregranulosa) y las señales intracelulares (el ovocito tiene que ser suficientemente en forma para el progreso más adelante). Esta muerte celular masiva limita el número de folículos primordiales. Proliferación de las células germinales femeninas sólo tiene lugar durante la embriogénesis, en contraste con la proliferación continua de células germinales masculinas, pero se ha pensado durante mucho tiempo que la hembra tiene un número finito de folículos primordiales, que, junto con la tasa de agotamiento de este grupo, determina la duración de la vida reproductiva femenina. Este dogma ha sido cuestionado por los informes recientes de la línea de células madre germinales (GCS) de residir en la médula ósea. Este conjunto de células troncales del ovario puede reponer con nuevos ovocitos (Johnson *et al.*, 2005, 2004), una posibilidad emocionante que aún no se ha justificado.

El comienzo de la foliculogénesis está marcado por el crecimiento inicial de un folículo primordial, el cual consiste de un ovocito detenido en estado de diploteno de la profase meiótica y una capa única de células de la granulosa, rodeados por una lámina basal. El número de folículos que crece en cada ciclo parece ser dependiente del tamaño del "pool" residual de folículos inactivos. El folículo destinado a crecer se cree que es seleccionado desde los primeros días del ciclo. El ovocito junto con las células epiteliales planas que lo rodean se denomina folículo primordial. Estos folículos primordiales se encuentran incluidos en la corteza ovárica por debajo de la túnica albugínea, tienen un citoplasma eosinófilo, y un núcleo excéntrico con un único nucléolo prominente.

Folículos primarios

A medida que el ovocito primario comienza a crecer las células foliculares que lo rodean cambian de forma plana a cubica y proliferan para formar un epitelio estratificado de células de la granulosa, la unidad se denomina ahora folículo primario (Pedersen y Peters, 1968). Las células de la granulosa se apoyan sobre una membrana basal que las separa de las células del estroma circundante que forman la teca folicular. Se organizan en una capa interna de células secretoras, la teca interna y una capsula fibrosa externa la teca externa. Así mismo pequeñas prolongaciones digitiformes de las células foliculares atraviesan la zona pelúcida y se interdigitan en las microvellosidades de la membrana plasmática del ovocito. Estas prolongaciones son importantes para el transporte de sustancias desde las células foliculares del ovocito.

Folículos secundarios

Las células granulosas empiezan a sintetizar el líquido folicular, por lo que se pueden observar cavidades llenas de líquido folicular entre estas. Se diferencia la teca interna y la teca externa donde las células empiezan a sintetizar estrógenos, y entre ellas hay numerosos capilares. La teca externa contiene fibroblastos, fibrocitos y fibras de colágeno (Pedersen y Peters, 1968; Richards, 2001).

Folículos Pre-antrales

A medida que continúa el desarrollo aparecen espacios ocupados por líquido entre las células de la granulosa. El ovocito queda sostenido por una columna de células foliculares (*cumulus oophorus*) y rodeado por varias capas de células foliculares (corona radiada). El líquido folicular rodea a la corona radiada y éste queda rodeado por las células de la granulosa (Johan et al., 2002). El ovocito alcanza su mayor crecimiento y madurez por influencia hormonal de la adenohipófisis (FSH y LH). Sólo un folículo tiene aptitud gametogénica y por ser dominante posee mayor cantidad de receptores para FSH y LH, los demás folículos degeneran y se tornan atrésicos (Pedersen y Peters, 1968).

Folículos Antrales o de De Graaf

El folículo continúa su crecimiento después de ser seleccionado como dominante y entra en el estado pre-ovulatorio, conocido también como folículo de De Graaf. Las células de la granulosa aumentan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que la teca se vuelve vacuolada y altamente vascularizada (Pedersen y Peters, 1968; Richards, 2001). A medida que llega a su madurez, aumenta la secreción de estrógenos, llegando a producir un pico 24 a 36 horas antes de la ovulación. Este pico estrogénico induce la aparición del pico de LH. A través de la acción sobre sus propios receptores, la LH induce la luteinización de la granulosa, aumentando la producción de progesterona. La progesterona afecta la retroalimentación positiva a los estrógenos, actuando directamente sobre la hipófisis y ayudando a la aparición del pico de LH. El ovocito reanuda la meiosis. Llegando a la madurez es mayor la cantidad de estrógenos producida. Al iniciarse el pico de LH, los demás folículos son conducidos a la atresia por su menor contenido de estrógenos y FSH, por lo cual se vuelven androgénicos.

Genes involucrados en el desarrollo folicular

El desarrollo del folículo ovárico es un proceso complejo que comienza con el establecimiento de un pool finito de folículos primordiales y culmina con la degradación de los folículos atrésicos o la liberación del ovocito maduro para su fertilización. El uso de ratones transgénicos ha proporcionado información relevante sobre los mecanismos de desarrollo y crecimiento del folículo ovárico, principalmente sobre genes que controlan los procesos de desarrollo de los folículos (Fig. 2). Algunos de estos genes afectan al ovario a través de mecanismos directos,

mientras que otros lo hacen a través de mecanismos indirectos. Los modelos transgénicos permiten describir los fenotipos de mutaciones genéticas que afectan directamente el desarrollo ovárico, específicamente la formación de folículos primordiales, el crecimiento folicular, y la producción de hormonas o factores de crecimiento que regulan la foliculogénesis (Barnett et al., 2006).

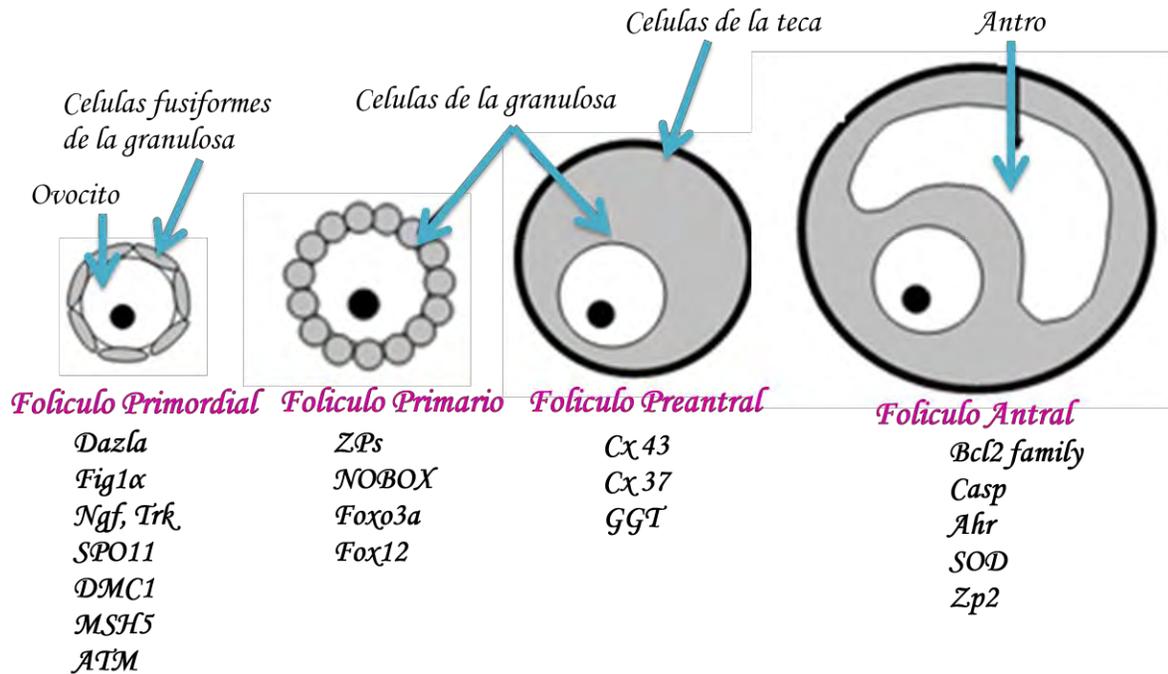


Figura 2. Genes expresados en el desarrollo de los folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales. (Imagen modificada de Barnett *et al.*, 2006).

Ciclo reproductor y maduración del ovocito en mamíferos

Un ciclo reproductivo es el conjunto de acontecimientos fisiológicos que se producen en el ovario, a intervalos de tiempo cíclicos, como consecuencia de las variaciones en los niveles hormonales. Existen dos tipos de ciclos: el menstrual y el estral.

Ciclo menstrual

Se pensaba que era típico de primates, sin embargo; ahora se conoce que se encuentra en otros mamíferos como los murciélagos, este ciclo se denomina menstrual por la periodicidad característica en la maduración y liberación de gametos femeninos debido a que este supone el desprendimiento periódico de sangre y tejido endotelial desde el útero a intervalos mensuales en la mayoría de los casos. La característica externa es la salida espontánea de flujo sanguinolento producido por la necrosis del endometrio uterino (del latín *menstruus*: mensual).

En la primera parte del ciclo menstrual denominada fase proliferativa o folicular, la hipófisis comienza a secretar cantidades cada vez mayores de FSH, esta hormona induce la formación de receptores LH sobre las células de la granulosa. Poco tiempo después de este periodo de crecimiento folicular inicial, la hipófisis comienza a secretar LH que rompe el bloqueo meiótico dictado de las células germinales para que experimenten la primera división meiótica.

Aunque el mecanismo detallado de la ovulación todavía no se conoce, la expulsión física del ovocito desde el folículo parece ser el resultado de un aumento de colagenasa, activadora del plasminógeno y de prostaglandinas, inducida por la LH (Leimaire *et al.* 1973).

Luego de la ovulación comienza la fase lútea del ciclo menstrual. Las células remanentes del folículo después de la ovulación y bajo la influencia continua de la LH, se convierten en el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo secreta progesterona, que prepara el tejido uterino para la implantación del blastocisto, estimulando el crecimiento de la pared uterina y de sus vasos sanguíneos. Si el ovocito no es fecundado, el cuerpo lúteo degenera y cesa la secreción de progesterona y se desprende la pared uterina. Con la disminución de progesterona la hipófisis secreta FSH y el ciclo se repite. Sin embargo si se produce la fecundación, el trofoblasto secreta una nueva hormona luteotrofina, que hace que el cuerpo lúteo se mantenga activo y que se mantengan elevados los niveles séricos de progesterona.

La menstruación en los murciélagos filostomidos es diferente de la de los primates en varios aspectos. Uno de ellos es el tiempo, ya que considerando que la menstruación en el mono *rhesus* y en los humanos normalmente comienza alrededor de los 14 días después de la ovulación, sin embargo en los murciélagos el proceso es generalmente periovulatorio.

Glossophaga soricina tiene un ciclo que va desde aproximadamente 22-26 días de duración (Rasweiler, 2000).

En los seres humanos y los monos *rhesus*, la mayor parte de la actividad mitótica endometrial se produce durante la fase folicular o pre-ovulatoria del ciclo menstrual y disminuye relativamente poco después de la ovulación. En *G. soricina*, debido al momento particular de su menstruación, los cambios regenerativos en el endometrio son limitados antes de la ovulación. Los bajos niveles de actividad mitótica son evidentes en las glándulas y el estroma alrededor de los días 20-22 del ciclo, pero no de forma abundante en los componentes del útero alrededor de los días 23 y 24 (inmediatamente antes de la ovulación). En *G. soricina*, sin embargo, una importante actividad mitótica sigue en las glándula del endometrio hasta aproximadamente el día 13 del ciclo y en el estroma endometrial hasta aproximadamente el día 15 (Rasweiler, 1970, 1979). La implantación en esta especie se inicia en los días 12-14, a diferencia de los primates superiores (Noyes *et al.*, 1950; Bartlemez *et al.*, 1951; Bensley, 1951; Ferenczy *et al.*, 1979; Tabibzadeh, 1990), y el mayor crecimiento del endometrio en este murciélago es en la etapa post-ovulatoria. Esto se asocia con la retención prolongada de los embriones en el oviducto y el desarrollo de una fase extraordinariamente larga del blastocisto libre en la zona pelúcida (Rasweiler 1972, 1974). En los murciélagos filostómidos la menstruación es claramente resultado de un proceso degenerativo que culmina en la degradación del endometrio sustancial, y es generalmente asociados en estos murciélagos con la regresión del cuerpo lúteo (Rasweiler, 1970; Rasweiler y Bonilla, 1992).

Ciclo estral

En este se presenta un patrón de ovulación periódica, en el que la hembra ovula solamente en momentos específicos de año. Lo más característico de este tipo de ciclo, es la manifestación de receptividad sexual, por periodos limitados, por parte de las hembras (esto viene del griego, significa "frenesí o pasión"). En estos animales las señales ambientales, principalmente la cantidad y tipo de luz durante el día estimulan al hipotálamo a secretar la hormona liberadora de gonadotrofina. Este factor estimula a la hipófisis a liberar gonadotrofinas (hormona folículo estimulante [FSH] y hormona Luteinizante [LH]) que inducen la secreción de estrógeno por parte de las células del folículo ovárico. El estrógeno ingresa en ciertas neuronas y provoca el patrón de conducta del apareamiento característico de la especie. Las gonadotrofinas también

estimulan el crecimiento folicular e inician la ovulación (Gilbert, 2005). Las fases del ciclo estral son cuatro:

1. Estro: periodo de receptividad sexual, al final del cual se produce la ovulación. (hormona: LH)
2. Metaestro: periodo de desarrollo inicial del cuerpo lúteo que comienza al final del estro. (hormonas: progesterona)
3. Diestro: período de actividad del cuerpo lúteo maduro que comienza después de la ovulación y finaliza con la lúteolisis. (Hormonas: progesterona y estrógeno)
4. Proestro: periodo de crecimiento folicular que se inicia con la regresión del cuerpo lúteo y culmina con la aparición del estro. (hormona: FSH).

En cuanto ciclo estral en murciélagos las hembras se inicia desde el desarrollo de un óvulo, hasta su culminación, presenta cinco fases (Ruiz-Gutiérrez, 2005).

1. Proestro: se inicia el desarrollo folicular y el endometrio comienza a desarrollarse.
2. Estro: en esta fase ocurre la ovulación, y es cuando las hembras son receptivas, por lo tanto en esta fase ocurren los apareamientos.
3. Metaestro: aquí el óvulo es fertilizado y viaja a través del oviducto y se desarrolla el cuerpo lúteo.
4. Diestro: aquí es cuando ocurre la preñez, por lo tanto el cuerpo lúteo madura y el endometrio completa su diferenciación, ocurre la implantación, y se inicia el desarrollo de la placenta. Esta fase termina con el nacimiento de las crías, o cuando el endometrio es reabsorbido si la preñez no ocurre.
5. Anestro: durante esta fase la hembra es reproductivamente inactiva (Guerrero Enríquez, 1994).

Neo-ovogénesis

El dogma de la biología reproductora (Zuckerman, 1951) establece que la ovogénesis después del parto no tiene lugar en mamíferos, es decir que la formación de ovocitos a partir de células germinales (CG) solo se lleva a cabo durante la etapa fetal, por lo que en la vida postnatal se establece un número fijo de células germinales (CG), y su número se ve reducido conforme avanza la edad. En resumen, en un organismo adulto la regeneración de ovocitos no se lleva a cabo (Borum, 1967; Peters y Crone, 1967). Sin embargo, este dogma de la biología

reproductiva ha sido impugnado por diferentes estudios que evidencian la presencia de mitosis activa en células germinales de ovarios de ratones jóvenes y adultos, así como una discordancia matemática en el número de folículos en un ovario adulto. Por lo que, el origen de los ovocitos (y folículos primordiales) en los ovarios de hembras adultas de mamíferos sigue siendo motivo de controversia.

Waldeyer en 1870 propuso que las células germinales surgen de la proliferación del epitelio celómico de la gónada, mientras que la teoría de Weissmann (1885) sobre la continuidad del plasma germinal, asume que en las primeras etapas del desarrollo embrionario, un conjunto de células germinales se reserva, las cuales están destinadas a formar gametos. Con el desarrollo de nuevas técnicas se ha demostrado que la teoría de Weissmann puede encajar en invertebrados *C. Elegans* y *D. melanogaster* y algunos vertebrados inferiores como en *D. reiro* (pez cebra) y *X. leavis* (ranas), pero no es aplicable en mamíferos.

Generalmente se acepta que en algunos organismos invertebrados, como *D. melanogaster*, células progenitoras de la línea germinal mantienen la producción de ovocitos en ovarios adultos. Johnson y colaboradores (2004; 2005) han demostrado que en la superficie del ovario de ratones adultos se encuentran células troncales de la línea germinal que sostienen la renovación de ovocitos postnatal. Kerr y colaboradores (2006) basando su estudio también en ratones, demostraron el mantenimiento del número de folículos primordiales desde la vida postnatal temprana a media. Recientemente se han publicado estudios que indican la presencia de células germinales con actividad mitótica en la superficie del epitelio en ovarios de ratón juveniles y adultos evidenciada por la expresión de un marcador específico de células germinales (*Vasa*) y por la incorporación de BrdU, que muestra los cambios en la cromatina ubicando a las células principalmente en metafase y prometafase. En otros estudios realizados en dos especies de prosimios *Loris tardigradus* y *Nycticebus coucang*, también se evidencia actividad mitótica en células germinales de ovarios adultos (Duke, 1967; David *et al.*, 1974).

Otros autores, han encontrado otra línea de investigación que involucra la existencia de células troncales de línea germinal, las cuales pueden generar nuevos ovocitos en el ovario de ratón adulto, ya que estas células derivadas de la médula ósea o la sangre periférica, pueden servir para reponer continuamente el suministro de ovocitos en el ovario después del nacimiento (Zhang *et al.* 2008). También se ha demostrado la ovogénesis en cultivos de

células troncales embrionarias de ratón, donde las ovogonias entran en meiosis, reclutando células adyacentes para formar folículos (Hübner *et al.*, 2003; Geijsen *et al.* 1992).

Células germinales pueden ser purificadas de ovarios de ratones recién nacidos o de adultos y mantenidas *in vitro* durante meses, los estudios demostraron que el trasplante de estas células genera ovocitos en ovarios depletados de células germinales por quimioterapia. Si bien estos resultados no demuestran que la ovogénesis se produce en mujeres adultas en condiciones fisiológicas, apoya firmemente la existencia de células progenitoras de la línea germinal en ovarios de ratón adulto (Tilly y Telfer, 2009a).

Un estudio realizado por Bukovsky y col. (2004), indica que los ovocitos de ratón *in vitro*, pueden ser derivados de líneas somáticas como las células mesenquimales en la túnica albugínea, donde estas células son progenitores bipotenciales que presentan un compromiso a ser células de la granulosa o células germinales primitivas, este mecanismo representa una sofisticada adaptación en la reproducción femenina. El mecanismo que estos autores proponen es: citoqueratinas más células mesenquimales en la túnica albugínea del ovario, se diferencian en epitelio superficial formando células mesenquimoepiteliales, segmentos del epitelio superficial quedan directamente relacionado con la corteza del ovario formando cordones epiteliales, y es en esta zona donde se originan las células germinales. También Bukovsky (2004, 2005) ha sugerido que una generación cíclica de ovocitos ocurre en el ovario humano. Contrario a estos hallazgos, Liu y col. (2007) estudiando el ovario adulto en humanos no encontraron evidencia de la formación de nuevos ovocitos a partir de células progenitoras de la línea germinal en el epitelio del ovario o adyacentes a este.

Un argumento más que va en contra del dogma establecido por Zuckerman (1951), está basado en una discordancia matemática en el número folículos, ya que si esta teoría es verdadera, los folículos deberían disminuir con la edad; sin embargo, en ovarios de hembras adultas se encuentra la presencia de nuevos folículos que se añaden a la reserva ovárica después del parto en ratones (Johnson *et al.*, 2004). Otra discordancia matemática esta evidenciada por el trabajo de Vermande-Van Eck (1956) donde empleó como modelo experimental al mono *rhesus* y cuyas hembras alcanzan la pubertad a los 3-4 años de edad y son fértiles por 20 años o más. Vermande-Van calculó el tiempo que los ovarios deben funcionar con base en la reserva de folículos en la pubertad (aproximadamente 58 000 folículos por ovario) y la incidencia de atresia (4,5%). Sus resultados mostraron una curva de

decaimiento exponencial, la cual predice que el 90% de la reserva actual de folículos en la pubertad se pierde alrededor de los dos años. Sin embargo, dado que los ovarios de los monos *rhesus* siguen funcionando por lo menos 20 años después de la pubertad, es lógico concluir que esta discordancia matemática se explica por una neo-ovogénesis y renovación de folículos.

En otra investigación realizada por Jonhson y col. (2005b) donde evaluaron ratones hembras adultas expuestas a BrdU *in vivo*, observaron una reducción del 80% en la reserva de folículos primordiales en 24 horas. Sin embargo, reporta que después se produjo una reposición espontánea de folículos primordiales durante las próximas 12-24 horas. Aunque la magnitud de respuesta regenerativa concuerda perfectamente con la reposición en la reserva de folículos primordiales a través de neo-ovogénesis, los estudios adicionales muestran una entrada sincronizada de las células germinales en meiosis 24-48 h después de la exposición a BrdU. Por otra parte Tilly y colaboradores (2009) reportan un incremento dramático en la expresión del gen de meiosis, estimulado por el ácido retinoico β (*Stra8*) en los ovarios durante este período después del tratamiento con BrdU. Dada la importancia central y la especificidad de *Stra8* a la síntesis de ADN premeiótica y el compromiso las células germinales a meiosis (Baltus *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008), estos resultados respaldan la conclusión que el marcado aumento en el número de ovocitos visto en los ovarios de ratones tratados con BrdU se debe a una inducción de la ovogénesis de *novo*.

En conjunto, estos estudios indican que existe un mecanismo de renovación de ovocitos y folículos primarios en los ovarios de hembras adultas, pero aun sigue siendo un paradigma el o los mecanismos específicos por los cuales este fenómeno se lleva a cabo, donde seguramente esta involucrados cascadas de genes y un ambiente específico.

El murciélago como modelo para el estudio de células progenitoras de la línea germinal en el ovario adulto

Se puede señalar que la información disponible sobre los procesos que involucran a la línea germinal en ovarios de mamíferos derivan principalmente de modelos experimentales tales como el ratón y la rata, si se compara con la escasa o nula información que se tiene de otras especies de vertebrados. Para el caso de los murciélagos, el conocimiento sobre esto es prácticamente nulo. En la actualidad se está incrementando la utilización de los murciélagos como animales de experimentación en los estudios sobre diversos aspectos de la reproducción.

Muestra especial interés las especies de las familias Phyllostomatidae, quienes presentan características de la reproducción, semejantes en muchos aspectos a la mayoría de los primates (Ishiyama, 1981).

Dentro de las estrategias reproductoras 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 reproductoras (Rasweiler, 1993).

Algunas especies de murciélagos pueden generar descendencia durante todo el año, mientras que otras solo dos veces por año. Por lo general, solo nace una cría y ocasionalmente dos. De acuerdo con Orr (1970), el conocimiento que se tiene sobre algunas especies de filostómidos permite señalar que las crías de estos murciélagos cuentan con un avanzado estado de desarrollo al momento de nacer, los recién nacidos cuentan con pelaje en el cuerpo, tienen los ojos abiertos y las orejas erectas. Las crías son grandes y pesan al nacer alrededor del 30% del peso de la madre e incluso más (Tamsitt y Valdivieso, 1963).

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 murciélagos y 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. Una vez que se da el desprendimiento del óvulo desde un ovario y dependiendo de la especie, puede o no presentarse una estimulación diferencial dentro de los cuernos uterinos cuya finalidad es transportar al óvulo a través de los mismos (Raswailer, 2000).

Generalidades de los murciélagos

Artibeus jamaicensis



Orden: Chiroptera

Suborden: Microchiroptera

Superfamilia: Phyllostomoidea

Familia: Phyllostomidae

Subfamilia: Stenodermatinae

Género: Artibeus

Subgénero: Artibeus

Especie: ***Artibeus jamaicensis***

(Leach, 1821)

Murciélago zapotero

🌟 Descripción:

Presenta un arco cigomático completo, ausencia de una cola y una membrana interfemoral estrecha en forma de U (Jones y Carter, 1976). Se trata de una especie frugívora con una longitud del antebrazo de 52.0-67.4 mm, las alas son anchas y de color gris oscuro.

La diferencia más notable de *A. jamaicensis* es poseer dos líneas faciales blancas y tenues, el dorso es de color moreno grisáceo y el vientre pálido marrón (Jones 1978). En general, las orejas son anchas, triangulares en la punta. La hoja nasal está bien desarrollada con un grupo de glándulas sebáceas (Dalquest *et al.*, 1952). El labio inferior tiene una verruga central con pequeñas verrugas alrededor.

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

☀ Medidas somáticas:

Los rangos de medidas (en mm) son: longitud total 78-89; longitud de pata trasera 16-18; longitud de la oreja, 20-27; longitud del antebrazo, de herradura, 8.7-9.0; longitud del cráneo 26,2-31,6; longitud cóndilobasal 27.8-30.0; ancho cigomático 16.2-20.6, constricción postorbital, 6.7-7.3; amplitud de la caja craneana 12.0-12.9; profundidad de cráneo 9.1-10.3; anchura mastoidea 13.9-14.7, extensión de los maxilares postpalatal longitud 7.7-8.7, longitud del paladar 8.8-11.0; longitud por anchura postpalatal 7.7-8.7, longitud del paladar 8.8-11.0 (Handley 1966; Jones, 1978; Swanepoel; Genoways 1979 y Hall, 1981;).

☀ Hábitad y Distribución:

Vive en bosques lluviosos, bosque decido y bosques arbustivos. Este se refugia en troncos huecos, cuevas, en el follaje de los árboles pero también se ha encontrado en carpas construidas en hojas de *Araceae* y palmas.

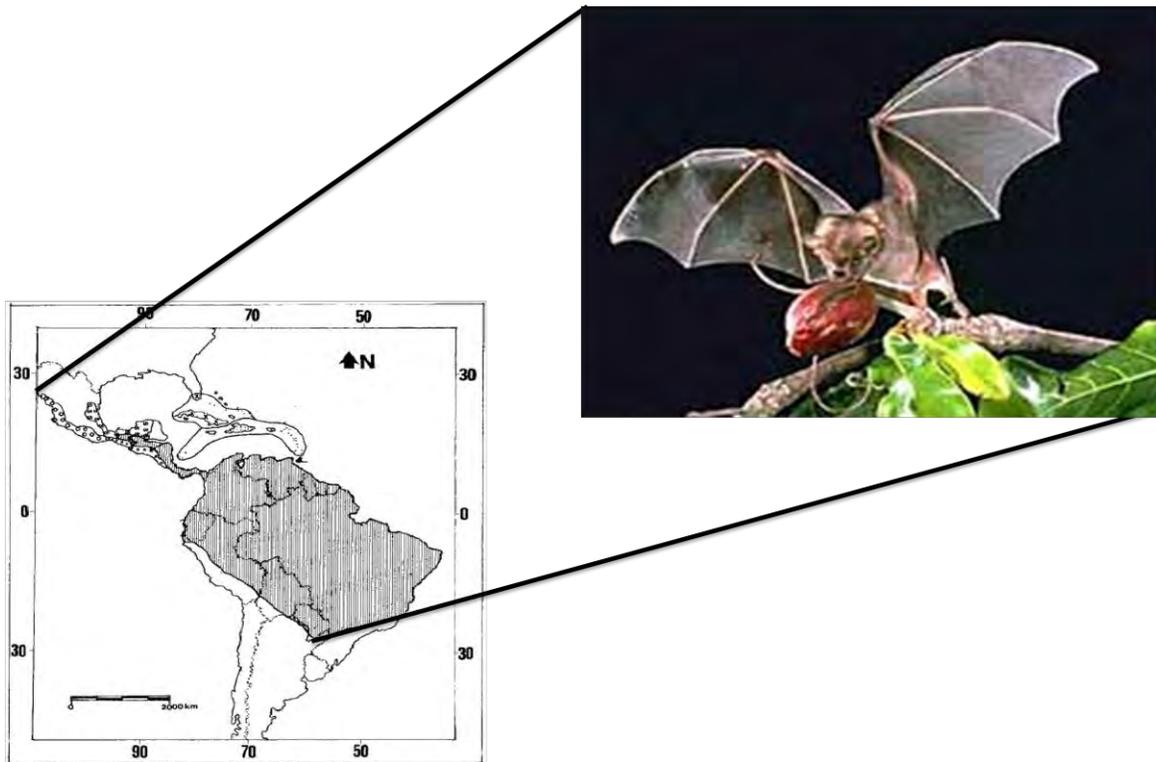


Figura 3. Distribución geográfica de *Artibeus jamaicensis* (Ortega y Castro-Arellano, 2001).

Se considera un murciélago de tamaño mediano con la variación morfológica considerable, se distribuye en México desde Sinaloa a Tamaulipas, hacia el sur va desde Ecuador, Venezuela, Trinidad, Tobago, Antillas Mayores y Menores, Cayos de Florida y Brasil y en el noroeste de Argentina (Fig. 3) (Mares *et al.*, 1981; Myers y Wetzel, 1983; Redford y Eisenberg, 1992). Se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2.135 m (Eisenberg 1989; Tamsitt 1966).

✿ **Alimentación:**

Como todos los murciélagos neotropicales, este es nocturno. Se alimenta de frutas, entre las cuales incluye higos (*Ficus*), guarumos (*Cecropia* sp.), guayabas (*Psidium guajaba*), papaya (*Carica papaya*) y bananos. En épocas en que estos son difíciles de conseguir también puede alimentarse de néctar, polen, hojas e insectos. Durante la noche puede volar entre 10 y 15 kilómetros en busca de árboles donde comer. Los frutos los toma con la boca y los lleva a un sitio de percha donde los come. Cuando el fruto contiene semillas grandes, estos no son comidos completamente, pero si tienen semillas pequeñas estas generalmente son consumidas con todo el fruto. Estas semillas generalmente son defecadas en poco tiempo, sin que hayan sido digeridas y por lo tanto tienen gran oportunidad de germinar. Por lo tanto este murciélago contribuye a la dispersión de semillas y por lo tanto a la regeneración del bosque.

✿ **Patrón reproductor:**

En el caso de las hembras de *A. Jamaicensis*, estas presentan un útero simple tubular con un extremo cubierto por los oviductos. Los oviductos entran en el cuerpo del útero, cerca de la línea de mediosagital. Internamente, el útero tiene una luz única y común sin cuernos uterinos intramurales (Hood y Smith, 1983).

Tiene un patrón bimodal de reproducción poliéstrico, con picos de producción de crías, probablemente relacionados con la disponibilidad de frutas (Heithaus *et al.* 1975). Cada hembra tiene dos periodos de celo posparto y produce anualmente una cría o, en raras ocasiones gemelos (Barlow y Tamsitt, 1968) en cada parto. El pico de cría se produce al final de la temporada de lluvias y el parto se produce durante los meses secos. En Panamá en la época de reproducción, las hembras pueden mostrar retraso en el desarrollo embrionario (período de 2,5 meses), y los crías son nacidas en el siguiente período de cría (Fleming 1971).

Artibeus jamaicensis en México presentan crías durante todo el año México; muchas hembras lactantes han sido capturados con embriones en diferentes momentos del año (Hall y Dalquest 1963; Jones et al. 1972, 1973). En América Central y las islas del Caribe, el parto tiene lugar durante todo el año (Tamsitt y Mejía 1962, Wilson 1979), *A. jamaicensis* es estacionalmente poliéstrico en hábitats tropicales de América Central (Fleming et al., 1972; Wilson et al., 1991). Pocos registros en América del Sur muestran un patrón de reproducción acíclicos poliéstrico en *A. jamaicensis* (Tuttle, 1970).

Gestación normal es de 3.5 a 4 meses, pero puede extenderse a 7 meses con retraso en el desarrollo embrionario (Wilson et al., 1991). Los embriones alcanzan el estadio de blastocisto antes de entrar en el útero. La implantación se intersticial y la placenta es discoidal y hemochorial (Bleier, 1979). Al final de la gestación, la masa de una hembra preñada es 35% más que de una hembra no preñada (Keast y Handley, 1991).

Los espermatozoides de *A. jamaicensis* se asemejan a los de *Glossophaga soricina* en la morfología y el tamaño. Cada espermatozoide tiene una cola corta, la cabeza es casi circular y carece de un cuello. Dimensiones de la cabeza del espermatozoide van del rango 4,28 a 4,65 μm de longitud y 3,16 a 3,44 μm de ancho. Las medidas son (en μm): longitud acrosoma, 2.51-2.98; longitud nuclear 3.35-4.00, la longitud de la cola varía entre 8,23 hasta 8,32 μm (Forman y Genoways, 1979). La temperatura corporal de *A. jamaicensis* depende de la temperatura ambiental, pero está muy regulada en un rango medio de la temperatura ambiente de 8 a 33°C (Studier y Wilson, 1979).

✿ **Estatus de conservación:**

La longevidad máxima del murciélago de la fruta *A. jamaicensis* es de 9 años (Gardner et al. 1991). Este murciélago no está en ninguna lista de la conservación (Arita y Ceballos 1997). La mayoría de los informes lo consideran como común a abundante en hábitats perturbados y sin molestias a lo largo de su distribución (Fenton et al. 1992).

Glossophaga soricina



Orden: Chiroptera
Suborden: Microchiroptera
Superfamilia: Phyllostomoidea
Familia: Phyllostomidae
Subfamilia: Glossophaginae
Género: *Glossophaga*
Especie: ***Glossophaga soricina***
(Pallas, 1766)
Murciélago lengüillargo

✿ Descripción:

El pelaje de *G. soricina* en la parte dorsal es de color café rojizo hasta café parduzco (en raras ocasiones es café oscuro), algunas veces está ligeramente escarchado sobre la parte inferior de la espalda. La parte ventral es más descolorida, de color café grisáceo con un escarchado pálido. El pelaje es bicolor (o tricolor si las puntas son escarchadas), la base de los pelos es blancuzca.

El hocico es alargado, la mandíbula inferior es casi del mismo tamaño que la mandíbula superior. La lengua es muy larga y angosta. La hoja nasal es bastante pequeña (la lanceta mide cerca de 4 mm), la herradura de la hoja nasal está fusionada al labio superior. La barbilla es acanalada y está bordeada por cojinetes con bordes en forma de sierra (parecen verrugosos). Tienen cuatro incisivos inferiores, en contacto uno con otro. Además cuatro incisivos superiores pequeños, casi del mismo tamaño.

✿ Medidas somáticas:

Este murciélago “lengüetas largas” tiene una longitud de alrededor de 52-79 mm; longitud de muesca de la oreja alrededor de 8-16mm; longitud mayor del cráneo 20.4-26.6mm; longitud condilobasal 18.7-21.9 mm; amplitud cigomática 8.6-9.9 mm; amplitud de la cubierta cerebral 7.9-9.0 mm; amplitud mastoidea 8.4-9.7 mm; amplitud interorbital 3.8-4.6 mm; amplitud maxilar 6.8-7.8 mm (Álvarez *et al.*, 1991).

🌿 **Habitad y Distribución:**

Viven en bosques de galería, bosques secos, bosques húmedos y en plantaciones de banano. *Glossophaga soricina* es conocida desde el norte de México (en el oeste de Sonora y en el este de Tamaulipas). Se reproduce en amplias variedades de hábitats, desde zonas áridas subtropicales a la selva tropical, bosques y sabanas, y se distribuye desde el nivel del mar altitudinal aproximado a 2.600 m, pero es más común en hábitats de tierras bajas. *G. soricina* ocupa la mayor parte de América del sur al este de los Andes, incluyendo la Isla de Margarita y Trinidad (fig. 4).

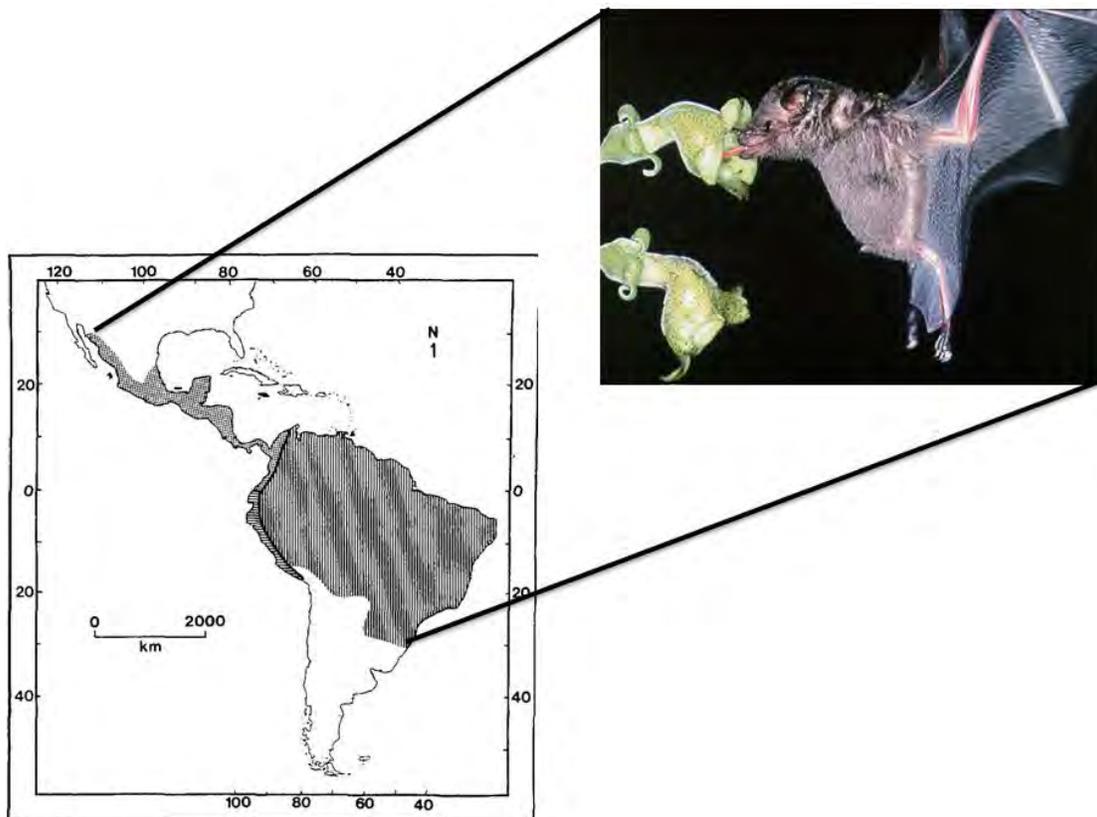


Figura 4. Distribución geográfica de *Glossophaga soricina* (Álvarez *et al.*, 1991).

🌿 **Alimentación:**

Son polinívoros y nectívoros; pero también se pueden alimentar de insectos, frutos y partes de flores (Gardner, 1977). Se alimentan de frutos, polen, néctar e insectos. Su dieta incluye frutos

de *Solanum rugosum* (Elizondo, 1999). En los bananales, producen daños a las manos de bananos, las cuales rayan con sus uñas, lo que hace que la fruta no califique para ser exportada. También se alimentan del néctar de las flores del guabo de monte y la polinizan.

Esta especie se alimenta de insectos, frutas, polen, néctar y partes de la flor (Gardner, 1977). Arata y col. (1967) dedujeron hábitos carnívoros en base a carne y pelo en el estomago de un espécimen, Gardner (1977) sugiere que esto puede haber representado el canibalismo entre el momento en el espécimen fue capturado y su muerte. La dieta parece variable en base a la geografía.

Howell (1974) informó que *G. soricina* en México y Costa Rica, se alimenta de néctar y polen sólo de abril-junio, después se alimentan exclusivamente de insectos. Del mismo modo, Bonaccorso (1979) informó de que *G. soricina* en Panamá se alimenta de néctar y polen durante la estación seca (de enero a marzo) y frutas durante la estación lluviosa (mayo a noviembre). Por el contrario, *G. soricina* en el bosque seco de Costa Rica se alimenta todo el año flores, incluso durante la estación seca cuando la abundancia de flores es baja (Heithaus et al., 1975), Fleming y col. (1972) no encontró diferencias estacionales en los hábitos alimentarios en Costa Rica y Panamá. En México el polen es un recurso alimenticio importante a 800 m de altitud, pero rara vez se utiliza a bajas altitudes (Álvarez y González-Quintero, 1970).

✿ Patrón reproductor:

Presenta una alta territorialidad y gusta de mantenerse en árboles. Además son adaptables a las condiciones que se le presentan en las grandes ciudades. Su reproducción es extendida y las hembras son capaces de dar lactancia hasta dos meses. La fisiología de reproducción en *G. soricina* es similar en muchos aspectos a los primates antropoides (Hamlett, 1934, 1935; Rasweiler, 1974, 1979; Rasweiler y Badwaik, 2000).

Presenta un útero simple; la ovulación ocurre espontáneamente y puede tomar lugar con alternancia entre los ovarios. Los patrones reproductivos y el desarrollo de *G. soricina* se han estudiado ampliamente (Bleier, 1979; Rasweiler, 1972, 1974, 1979, Wilson, 1979), la ovulación es espontánea y por lo general sólo un óvulo es liberado por ciclo. Los primeros informes sugirieron que *G. soricina* es monoestral (Hamlett, 1934) pero trabajos posteriores han sugerido

que es poliestrica en México (Cockrum, 1955) y Colombia (Tasitt, 1966), o poliestrica binomial en cautiverio. (Rasweiler, 1972). La cópula no es anterior a la ovulación, pero probablemente se produce simultáneamente con ella (Hamlett, 1934).

Los ciclos de no preñez son determinados por menstruación verdadera, caracterizada por desprendimiento y muda de la lamina superficial funcional del endometrio, evento asociado con sangrado. La menstruación es presumiblemente causada por regresión lútea. El ciclo ovárico es de 22-26 días con una fase lútea funcional (Rasweiler, 1972). La implantación del embrión es intersticial y discoidal, con formación de placenta hemocorial.

La etapa de dos células de desarrollo es alrededor del día 2 ó 3 después de la fertilización, la etapa de ocho células es por 5-7 días, la etapa de 32 células al día ocho, y el estadio de blastocistos al día 10. El embrión está contenido en la ampolla en el oviducto hasta el día 12 ó 13, por lo general la zona pelúcida se pierde. Implantación en ocho etapas ocurre en la unión uterotubal durante los días 12-14. La implantación es un principio central y en segundo lugar intersticial. No hay evidencia de diferenciación de las capas germinales durante el periodo de implantación. Las crías nacen bien cubiertas de pelo (Kleiman y Davis, 1979), una hembra continua lactando aproximadamente por dos meses (Kleiman y Davis 1979). Las hembras llevan a sus crías (Davis, 1970; Tamsitt y Valdivieso, 1963), en una posición en cruz o lateral (Kleiman y Davis, 1979).

La media y el rango de dimensiones de los espermatozoides son: la amplitud de la cabeza, $8,80 \mu$ ($3,53-4,00 \mu$); longitud del acrosoma, $3,19 \mu$ ($3,09-3,26 \mu$); longitud del núcleo, $2,86 \mu$ ($2,70-3,26 \mu$); ancho de la cabeza, $3,19 \mu$ ($3,07 - 3,26 \mu$). La cabeza del espermatozoide es pequeña, corta y redonda, y la base es en forma de pala con un desarrollado cóncavo. El acrosoma, que es más amplio que el núcleo, tiene un ápice casi simétrico (Álvarez *et al.*, 1991).

Estatus de conservación:

Este murciélago no está en ninguna lista de la conservación. La mayoría de los informes lo consideran como común a abundante en sus hábitats (Álvarez *et al.*, 1991).

Sturnira liliium



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

✿ Descripción:

El dorso de *S. liliium* varía de gris oscuro a marrón rojizo, la cabeza, cuello y hombros son más amarillentos; los pelos son bicolors con puntas color marrón oscuro y el fondo amarillento. El vientre es más pálido que el dorso y el patagio es de color marrón. El uropatagio es reducido con pelo abundante y se presenta al borde interior de las extremidades posteriores.

La mayoría de los machos poseen en los hombros glándulas que producen un característico color amarillento o rojizo manchado, que aparecen como charreteras. Las características craneales de *S. liliium* incluyen una alta a moderada envoltura craneal y una cresta sagital, el cráneo es corto, ancho y globoso (Gannon *et al.*, 1989).

✿ Medidas somáticas:

Sturnira liliium es un murciélago de tamaño mediano en relación a las otras especies de la familia con una longitud total de 62 a 65 mm, longitud de antebrazo, 36.6 a 45.0 mm.

✿ Hábitad y Distribución:

S. liliium, habita en bosques y selvas tropicales de tipo caducifolio y siempre verdes, además de comunidades vegetales propias de zonas áridas y por lo general seleccionan áreas abiertas, también habita en cuevas, túneles y puentes. Es ampliamente distribuido, va desde el noroeste

de México (Sonora) a través de Centroamérica hacia América del Sur, al norte de Argentina y Uruguay, también en las Antillas Menores al norte de Dominica y en Trinidad. De las seis subespecies reconocidas, cuatro están aisladas geográficamente en las Antillas Pequeñas. *S. liliium* tiene una amplia distribución, que se produce en Trinidad y se conoce en todas las naciones de América del Sur, excepto en Chile. En México es de distribución amplia, está presente en la vertiente Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas y por la vertiente del Golfo de México desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán (Fig. 5).

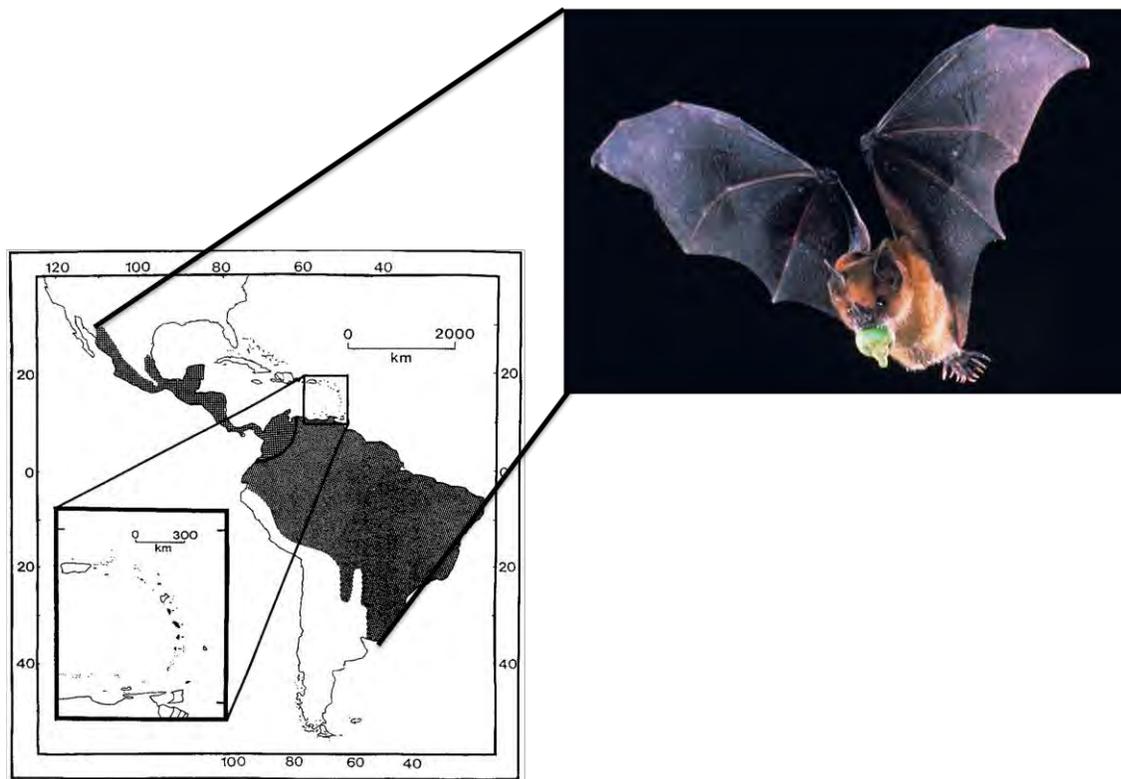


Figura 5. Distribución geográfica de *S. liliium* (Gannon *et al.*, 1989).

🌿 Alimentación:

Sturnira liliium se alimenta de una gran variedad de frutas, así como de insectos y polen, sin embargo dietas específicas no han sido bien documentadas (Gardner, 1977). Se alimenta de *Solanaceas*, *Piperaceas* y *Moraceas*, siendo probablemente el murciélago más oportunista, ya que se alimenta de lo que está disponible en el momento, por ejemplo en Argentina se alimentan de la fruta de la palmera (*Phoenix*) y se siente muy atraídos por los plátanos (*Musa*

Villa-R. Villa y Cornejo, 1969, 1971) y en Sonora por los higos silvestres (*Ficus*) (Cockrum Bradshaw, 1963). Ruschi (1953) reporto par Yucatán una dieta rica en frutas y en insectos.

✿ Patrón reproductor:

Este murciélago exhibe un patrón reproductivo poliestro bimodal (Fleming et al., 1972), que reproduce dos veces al año, una vez en la estación seca y una vez en la temporada de lluvias. También hay un patrón bimodal de picos de embarazo y la lactancia, pero el embarazo se ha registrado en todos los meses del año (Nowak, 1991). Se han reportado picos de actividad reproductiva en tres períodos durante todo el año, generalmente de febrero hasta junio, octubre y diciembre (Fleming, Hooper, y Wilson, 1972). La longitud exacta de la gestación se desconoce, en otros filostómidos la duración es de cuatro a siete meses (Grzimek, 1990). Las hembras dan a luz una cría, pero los nacimientos se producen dos veces al año, una vez hacia el final de la estación seca y una vez en la temporada de lluvias de mediana a tardía (Stoner, 2001). Los biólogos debaten si este patrón estacional de parto se desencadena por la disponibilidad de alimentos o señales de temperatura (Mello, Kalko, y Silva, 2008). Las crías nacen con gran desarrollo de las extremidades traseras, los ojos abiertos. Se tarda 5 a 20 semanas para destetar a los jóvenes (Kurta y Kunz, 1987). Los filostomidos jóvenes tienden a ser independientes 1 mes después del nacimiento. Los jóvenes alcanzan la madurez sexual o reproductiva a los 8-11 meses de edad (Fleming et al., 1972). (Fleming, Hooper, y Wilson, 1972; Gannon et al., 1989; Grzimek, 1990; Kurta y Kunz, 1987; Mello et al., 2008; Nowak, 1991; Stoner, 2001).

Sturniura liliium es un homeotermo estricto mantiene una temperatura corporal media de 36.4° C (34 a 38 ° C dependiendo de la temperatura ambiente). Las glándulas de los hombros de los machos tienen un fuerte y dulce olor almizclado que puedan tener alguna función cuando los individuos están reproductivamente activos. La presencia o ausencia de estas glándulas puede ser correlacionado con la madurez reproductiva, estado reproductivo, o la temporada de cría, y son generalmente ausentes en los juveniles. Los espermatozoides de *S. liliium* poseen grandes cabezas son relativamente estrechos y ovalados. El acrosoma es grande, simétrico, y más corto que el núcleo. El núcleo es ovalado y el ápice ampliamente redondeado, la base es muy estrecha.

✿ **Estatus de conservación:**

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

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el conocimiento sobre los patrones reproductores en varias especies de murciélagos filostómidos es extenso, los procesos de determinación y diferenciación sexual gonadal, así como el establecimiento de la línea germinal y el desarrollo de los ovarios en la vida adulta son poco conocidos. Específicamente, se desconoce si existe algún mecanismo de auto-renovación de la línea germinal en gónadas postnatales. Considerando las estrategias reproductivas de algunos murciélagos filostómidos, y las similitudes que estos presentan con los humanos y roedores, tales como la presencia de un útero simple y bicorne y ciclos menstruales estrales, respectivamente representa un buen modelo de estudio en términos comparativos.

Los murciélagos son dignos de mención por sus asimetrías anatómicas y funcionales en los órganos reproductores femeninos ya que son mucho más frecuentes y profundas que los registrados en cualquier orden de mamíferos. En cuanto a la organización general del tracto reproductor femenino en murciélagos, este consiste en dos ovarios, dos oviductos, un útero, un cérvix y una vagina. Sin embargo, en este marco básico, existen muchas especializaciones anatómicas y funcionales. Dependiendo de la especie de murciélago del cual se hable, pueden implicar un dominio total o parcial de uno de los ovarios, sucesiva alternancia de ovulaciones, una estimulación diferencial de los oviductos y / o la dominación de un cuerno uterino.

Dentro de la clase de los mamíferos el orden quiróptera exhiben una amplia variedad de características en el ovario que son inusuales, lo que hace de estos animales un interesante modelo de estudio, en los cuales se puede estudiar histológicamente el desarrollo gonadal además que pueden aportar o ampliar el conocimiento sobre la diferenciación sexual, así como, generar información para determinar si las CGP indiferenciadas pueden permanecer en el ovario adulto y contribuir al desarrollo folicular a través de la vida reproductora del individuo, ya que en otros mamíferos (principalmente en roedores y humanos) este hecho aún no es claro y aún permanece en continúa controversia.

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los patrones reproductivos de los murciélagos y que la funcionalidad de los ovarios es variable, es decir, que la ovulación puede darse consistentemente desde un solo ovario que suele ser de mayor tamaño, se espera que un mecanismo de neo-ovogénesis se esté llevando a cabo en las tres especies de murciélagos filostómidos *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la presencia de células progenitoras de la línea germinal en el ovario adulto de los murciélagos filostómidos *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium* que sugieran que se está llevando a cabo un mecanismo de auto-renovación de ovocitos (neo-ovogénesis) se está llevando a cabo.

Objetivos particulares

- 1) Estudiar las características morfológicas del ovario adulto y su correlación con las estrategias reproductoras de los murciélagos *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium*.
- 2) Cuantificar el número de folículos presentes tanto en el ovario derecho como izquierdo en las tres especies de murciélagos filostómidos.
- 3) Identificar la presencia de células progenitoras de la línea germinal en los ovarios de los murciélagos *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium*.

METODOLOGÍA

Para la realización de este proyecto se llevaron a cabo las siguientes estrategias y métodos:

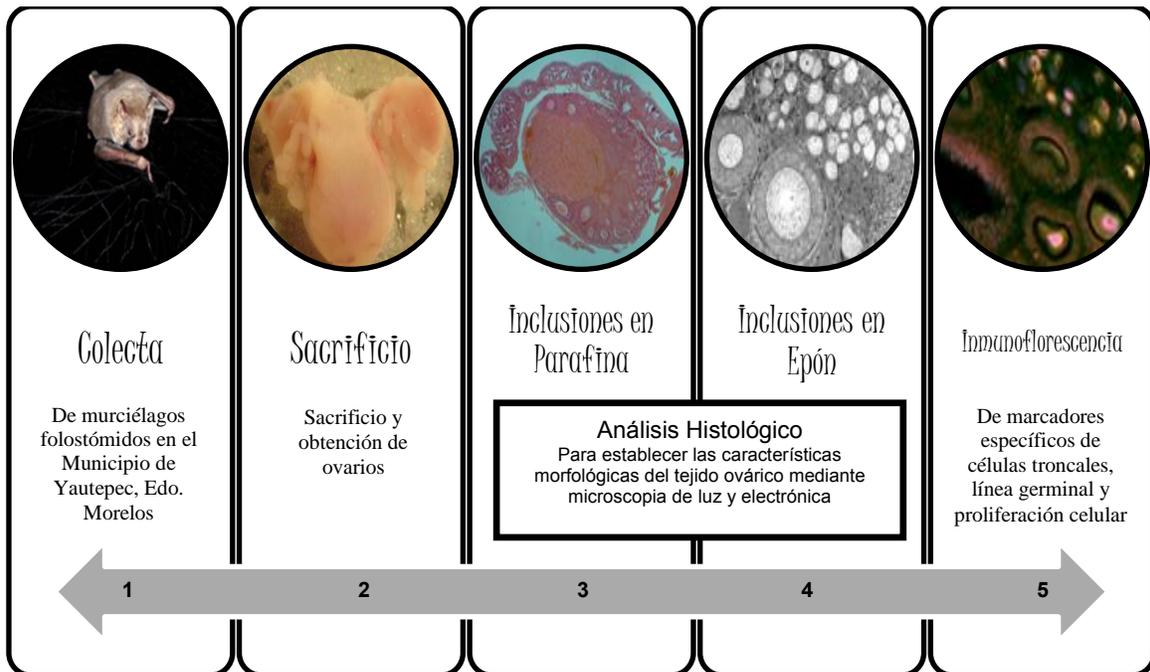


Figura 6. Esquema general de la metodología empleada en este estudio.

Colecta

Para la realización del presente trabajo se llevaron a cabo colectas de ejemplares hembras adultas de tres especies murciélagos filostómidos (*Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium*) en el municipio de Yautepec (ver mapa) el cual se encuentra ubicado en la parte norte del estado de Morelos y colinda con los municipios de Cuautla y Atlatlahucan en el este, al sur con los municipios de Ayala, Tlaltzapán y Emiliano Zapata; al oeste colinda con los municipios de Jiutepec y Tepoztlán y finalmente al norte con el municipio de Tlayacapan. La localización geográfica es 18° 53' de latitud norte y 99° 04' de longitud este con una altura a nivel del mar de 1,210 metros, con una superficie de 203 km², lo que representa el 4.09% total del estado (INEGI).



Figura 7. Mapa del estado de Morelos donde se encuentra marcada por un cuadro la localización del municipio de Yautepec.

El municipio de Yautepec 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 esta constituida principalmente por selva baja caducifolia, de clima cálido: jacaranda, casahuate, ceiba y bugambilias (CNDM, 1988 y 2001). Su fauna está constituida por venado cola blanca, jabalí, mapache, tejón, zorrillo, armadillo, liebre, conejo, coyote, gato montes, comadreja, tlacuache, pájaro bandera, chachalaca, arruca copetona, zopilote, cuervo, lechuza, aves de ornato y murciélagos (CDNM, 1988 y 2001). Particularmente, dentro de las especies de murciélagos que presenta encontramos las tres especies de murciélagos filostómidos que se emplearon en este estudio, *Sturnira lilium*, *Glossophaga soricina* y *Artibeus jamaicensis*, razón por la cual se eligió este municipio para coleccionar.

Para poder llevar a cabo las colectas en este Municipio se realizaron los trámites correspondientes ante la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre con número de registro SGPA/DGVS/05609/09 (SEMARNAT) en el cual se establece poder capturar tres especies de murciélagos filostómidos *Sturnira lilium*, *Glossophaga soricina* y *Artibeus jamaicensis*.

Para la colecta de los murciélagos se colocaron redes de niebla entre la vegetación para que se camuflaen con esta en horas crepusculares (alrededor de las 6:00-8:00 pm) (Fig. 8 A y B). Posteriormente una vez colocadas las redes se revisaban alrededor de cada hora para coleccionar las hembras de las tres especies de murciélagos utilizados *A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium*. Para determinarlas las especies de murciélagos se utilizaron claves taxonómicas, y posteriormente se colocaron en sacos de tela individualmente (Fig. 8 C y D).



Figura 8. Imágenes donde se muestran las redes de niebla colocadas entre la vegetación (A y B). C y D muestran la captura de un murciélago hembra *Artibeus jamaicensis*.

Se realizaron seis salidas al campo, las fechas son mostradas en la tabla número 1, de las cuales se obtuvieron un total de 28 animales de los cuales diez fueron *Artibeus jamaicensis*, nueve *Glossophaga soricina* y nueve *Sturnira liliium*.

Los murciélagos se mantuvieron en cautiverio en jaulas hechas de tela de mosquetero y armazones de madera cuyas medidas fueron 1x1x1m en el bioterio del Departamento de Zoología del Instituto de Biología hasta su sacrificio. La temperatura del lugar se mantuvo dentro de un intervalo que oscilo entre 25-31°C y una humedad relativa del alrededor 60%.

Tabla 1. Registro de las fechas de colecta y el número de animales colectados

Fecha de colecta	Estación del año	Número de animales en cada colecta		
		<i>Artibeus jamaicensis</i>	<i>Glossophaga soricina</i>	<i>Sturnira lilium</i>
17-18 mayo 2009	Primavera	2	---	---
11-13 julio 2009	Verano	3	3	2
8-9 agosto 2009	Verano	---	2	---
5-7 septiembre 2009	Verano	2	---	---
29-30 septiembre 2009	Otoño	3	3	2
20-21 octubre 2009	Otoño	---	1	5

Sacrificio y obtención de muestras

Los murciélagos se transportaron al laboratorio, donde se pesaron para conocer la cantidad de anestésico pentobarbital sódico SEDAL-VET que se iba aplicar, se empleo una dosis de 0.7mL/20gr de peso.

Una vez anestesiados se colocaron bajo el microscopio estereoscopio y se realizo una incisión sobre la parte abdominal del animal retirando las vísceras para localizar el tracto reproductor femenino, el cual fue retirado para aislar los ovarios derecho e izquierdo del animal (Fig. 9). Se obtuvo el peso de los ovarios y se procesaron para su análisis histológico (microscopia de campo claro y electrónica) e inmunofluorescencia de diferentes marcadores de la línea germinal.

Inclusiones en Epón

El método de inclusiones en Epón busca lograr una buena penetración de la resina (Epón 812) de baja viscosidad en el procesamiento del tejido ovárico con base en una fijación, deshidratación, aclaramiento e inclusión del tejido.

Todos los pasos de la metodología se realizaron bajo la campana de extracción a temperatura ambiente. Los ovarios derecho e izquierdo después de ser pesados se colocaron en viales con

3ml de fijador de Karnovsky (Karnovsky, 1965) sin calcio pH 7.4 durante 24 horas a 4 °C, transcurrido ese tiempo se colocaron en buffer de cacodilatos 0.1M a un pH 7,4 durante 24 horas a 4 °C. Los ovarios se pos-fijaron en tetròxido de osmio (OsO4) durante 1 hora, la ventaja de utilizar osmio es su rápida acción sobre los componentes de los tejidos lo cual limita al máximo los peligros de autólisis intracelular; también el osmio permite un aumento apreciable del contraste de la imagen debido a que es un material pesado.

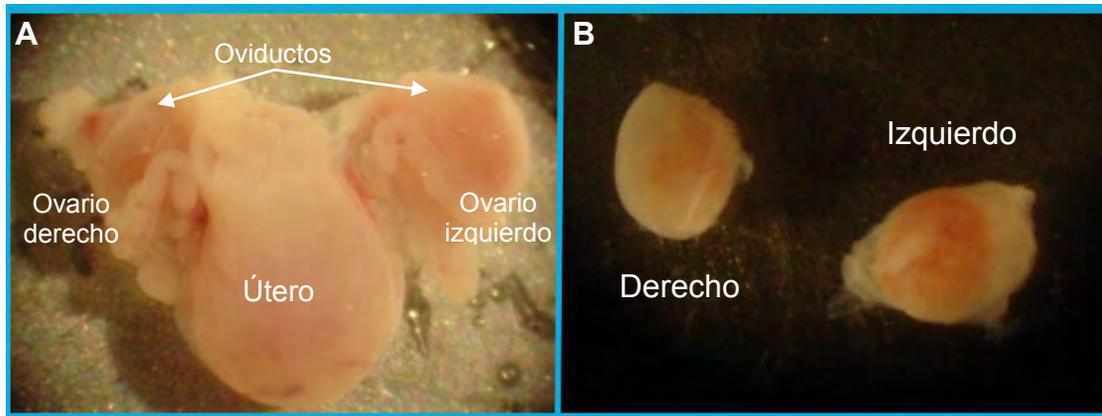


Figura 9. Imágenes de el tracto reproductor femenino de *Sturnira liliium* (A), ovario derecho izquierdo aislados (B).

El siguiente paso es la deshidratación del tejido, esta se realizó colocando los ovarios de forma escalonada en alcoholes que iban incrementando su concentración de 10 en 10%, se comenzó con alcohol 70% durante 10 min, transcurrido el tiempo se colocó en alcoholes al 80%, 90%, 96% por el mismo tiempo hasta llegar a alcohol absoluto con dos cambios de 15 min cada uno, después se colocaron en acetonitrilo con dos cambios de 20 min cada uno. Posteriormente se realizó la infiltración colocando los ovarios en una mezcla 1:1 de Epon:Acetonitrilo durante 1 hora, se realizó un cambio a la mezcla 2:1 de Epon:Acetonitrilo durante el mismo tiempo, transcurrida la hora se colocaron en Epón puro durante 24 horas en rotación.

La orientación de la muestra en las cápsulas de inclusión se realizó de forma horizontal, se añadió a las capsulas la resina de inclusión (Epón puro) hasta la mitad y se colocó el número de registro de la muestra en la cápsula y se incluyeron los ovarios separando el derecho del izquierdo. Una vez incluidos se llevó con el Epón al tope el molde de la capsula de inclusión y finalmente se colocaron en la estufa a 60 °C durante 24 h para su polimerización.

Para microscopia de luz el bloque se cortó en secciones lo suficientemente delgadas para permitir el paso de la luz alrededor de un 1 μm , para realizar estos cortes se utilizó el ultramicrotomo y los cortes fueron teñidos con azul de toluidina. Para Microscopia Electrónica de Transmisión se obtuvieron cortes más delgados (*denominados ultra finos*) de aproximadamente 25 a 100 nm de espesor y de 0.5 mm de lado medio. Para esto se empleo un ultramicrotomo con hoja de vidrio o diamante. Una vez preparados, se montaron sobre rejillas de cobre con un diámetro de 3mm y se e tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación al microscopio electrónico.

Inclusiones en parafina

De igual forma los ovarios después de ser pesados se colocaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4 °C para fijar el tejido, lo que le permitió mantener las propiedades de las células lo mejor posible, esto se logra al inactivar ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post-mortem.

El siguiente paso es deshidratar los tejidos sumergiéndolos de forma escalonada en alcohol etílico de graduación creciente el cual se inició con alcoholes al 70%, 80%, 90%, 96% hasta llegar alcohol absoluto durante 30 min donde se realizaron dos cambios. Posteriormente el tejido se aclaró colocándolo en xilol ya que este es una sustancia miscible tanto al alcohol como al medio de inclusión que es la parafina líquida. Se hicieron dos cambios de xilol, el primero a temperatura ambiente durante 15 min, y el segundo a 60 °C en la estufa por 15 min, se denomina aclaramiento del tejido ya que este se torna transparente o claro en el Xilol, debido a que cambia su índice de refracción

Posteriormente los ovarios fueron incluidos en un medio de soporte, este medio es parafina líquida, ya que esta tiene la capacidad de penetrar y rodear el tejido, de esta forma se puede producir el endurecimiento del tejido formándose un bloque sólido que puede ser cortado fácilmente en el ultramicrotomo. El objetivo de la inclusión es facilitar la sección del tejido en cortes lo suficientemente delgados como para permitir el paso de la luz y ser examinados mediante el microscopio. La inclusión se logra al infiltrar la parafina líquida al tejido, los ovarios son colocados en un vial dentro del cual se agregó la parafina fundida, estos se mantuvieron dentro de la estufa a 60°C por una hora, posteriormente se realizó un cambio de parafina y se dejó otra hora dentro de la estufa, se dejan a 60°C debido a que el calor hace que el xilol se

evapore y los espacios anteriormente ocupados por el xilol sean ocupados ahora por la parafina. Finalmente se colocó el ovario derecho e izquierdo de forma separada en un molde de metal y plástico con un poco de parafina fundida el cual se dejó solidificar a temperatura ambiente, formándose un bloque sólido de parafina con el ovario completo incluido.

El bloque se cortó en secciones de 8µm, los cortes se realizaron con una cuchilla de acero en un micrótomo. Para fijar las muestras una vez cortadas a un portaobjetos se realizó la técnica del baño termostático que consiste en colocar agua dentro de un baño dentro del cual se colocó la solución de montaje, que estuvo formada por agua bidestilada con gretina aproximadamente al 1% a 50°C, esta solución tiene la función de adhesivo de la muestra en el portaobjeto.

Para teñir los cortes de parafina, previamente se eliminó la parafina porque es insoluble en agua, esto se hizo colocando las laminillas con los cortes durante 30 min en la estufa a 60°C y posteriormente se colocó en un solvente orgánico xilol durante 10 min. Lo siguiente es la hidratación del tejido lo cual se realizó con una serie decreciente de alcoholes, iniciando con alcohol 100%, pasando por alcoholes al 96%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50% durante 5 min cada uno. Posterior a la hidratación viene la tinción de núcleos con hematoxilina de Harris (color púrpura) la cual se dejó por 8 min se realizó un lavado con agua corriente por 5 min, ya que esta produce viraje al azul debido a las sales que contiene el agua del grifo, se realizó un segundo lavado con agua bidestilada durante 2 min y posteriormente se llevó a cabo la tinción de citoplasma con eosina durante 10 min. Posterior a esta tinción se realizó la deshidratación del tejido con una serie escalonada de alcoholes empezando con alcohol 70%, pasando por alcoholes al 80%, 90%, durante 3 min y luego se pasó a alcoholes al 96% y 100% durante 5 min cada uno y finalmente se realizó el aclaramiento del tejido con xilol durante 5 min y se realizó el montaje de las laminillas con una sustancia adhesiva llamada cytosil.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluoró cromos. Los fluoró cromos (Rodamina, FITC y Cy5) son moléculas que al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor. Las ventajas de la inmunofluorescencia son: que es una técnica rápida, reproducible y permite la observación simultánea de proteínas empleando tinciones dobles y triples.

Las técnicas de inmunofluorescencia se realizaron sobre tejido congelado, porque el procedimiento de fijación en formol e inclusión en parafina presenta numerosos inconvenientes en el desarrollo de estos métodos. Entre los inconvenientes figuran el aumento de los fenómenos de autofluorescencia y el bloqueo de gran cantidad de determinantes antigénicos provocados por los agentes fijadores. El primer paso de la inmunofluorescencia, es la fijación inmediata a la obtención del tejido para evitar la autólisis, el fijador que se utilizó fue paraformaldehído al 4% durante 15 min y posteriormente se dejó en sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C.

Para la obtención de cortes en congelación se utilizó el adhesivo tisular Tissutek, el cual se agregó en capsulas de Beem con el ovario derecho e izquierdo de manera individual, y se congeló en hexano frío. Los cortes en el criostato se realizaron a 20 micrómetros de espesor, se colocaron en laminillas de poli L-lisina y se secaron al aire a temperatura ambiente. Una vez obtenidos los cortes las laminillas se colocaron en vacío durante una hora. Transcurrido el tiempo, las laminillas se retiraron del vacío y se colocaron en una cámara húmeda para prevenir la evaporación de los reactivos principalmente los anticuerpos. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente, ya que la temperatura influye en la velocidad de la reacción del antígeno.

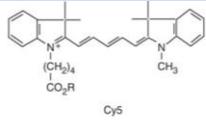
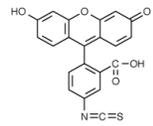
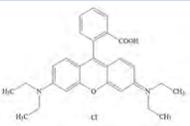
Se hizo un primer lavado con buffer de fosfatos (PBS) 10X durante 10 min, se retiró y se colocó Triton X-100 por 10 min, esto se realizó para permeabilizar las membranas permitiendo de esta forma que los anticuerpos penetren de manera adecuada y alcancen los antígenos correspondientes. Cada laminilla se incubó durante dos horas con albúmina al 1% en PBS para bloquear la tinción de fondo con el fin de evitar la presencia del antígeno en lugares distintos a aquel en que se quiere detectar. Posteriormente las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en albúmina al 1% en PBS durante toda la noche a 4°C. En la tabla 2 se muestra la lista de anticuerpos utilizados y su disolución en albúmina al 1% en PBS.

Se retiró el anticuerpo primario, y se lavaron cuatro veces seguidas con PBS 10X durante 5 min cada uno, posteriormente se colocó albúmina 1% durante 5 min, y se agregó el anticuerpo secundario o fluoróforo, En la Tabla 3 se muestran los fluoróforos empleados.

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Dilución	Hecho en	Fabricado por
C-kit	1:200	Conejo	Santa cruz (sc168)
Fragillis	1:250	Conejo	Abcam (15592)
H3	1:200	Conejo	Upstate (06-570)
Oct-4	1:250	Conejo	Abcam (18976)
Stella	1:250	Conejo	Abcam (19878)
Vasa	1:250	Conejo	Abcam (13840-100)

Tabla 3. Lista de Fluoróforos

Anticuerpo	Disolución	Hecho en	Absorbe luz	Emite fluorescencia
Cy5 	1:100	Anti- conejo	Roja	Azul
FITC 	1:100	Anti-conejo	Azul	Verde
Rodamina 	1:100	Anti-conejo	Verde	Roja naranja

Si la inmunofluorescencia fue sencilla se retiró el anticuerpo secundario y las secciones se lavaron con PBS tres veces 5 min cada una y se montaron en una solución acuosa (Dako) y se almacenaron a 4°C. Para las inmunofluorescencias dobles y triples, se retiró el anticuerpo secundario y se llevó a cabo una post-fijación con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min, se realizaron 4 lavados con PBS 10X por 5 min cada uno, después se colocó tritón durante 5 min, se realizó un lavado rápido con PBS 10X y se colocó el segundo anticuerpo primario (ver tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Al pasar este tiempo se realizaron cuatro lavados con PBS 10X, durante 5 min cada uno, se colocó tritón por 5 min y se bloqueó con albúmina 1% durante 1 hora. Se retiró la albúmina y se colocó el segundo anticuerpo secundario (ver tabla 3)

durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron cuatro lavados con PBS 10X de 5 min cada uno, y se montaron las laminillas con Dako y se guardaron a 4°C.

Tabla 4. Lista de laminillas de inmunofluorescencias realizadas para las tres especies de murciélagos filostomidos *A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium*.

Inmunofluorescencia	Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Sencilla	C-kit			Rodamina		
Sencilla	Fragillis			Rodamina		
Sencilla	Oct-4			Rodamina		
Sencilla	Stella			Rodamina		
Sencilla	Vasa			Rodamina		
Doble	H3	C-kit		CY5	Rodamina	
Doble	H3	Oct-4		CY5	Rodamina	
Doble	Fragillis	C-kit		Rodamina	Cy5	
Doble	Fragillis	Oct-4		Rodamina	Cy5	
Doble	Stella	C-kit		Rodamina	Cy5	
Doble	Stella	Oct-4		Rodamina	Cy5	
Triple	C-kit	Oct-4	Vasa	Cy5	Rodamina	FITC
Triple	H3	Scp1	Vasa	Cy5	Rodamina	FITC
Triple	H3	C-kit	Vasa	Cy5	Rodamina	FITC
Triple	H3	Oct-4	Vasa	Cy5	Rodamina	FITC

Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal láser (LSM Pascal, Zeiss. Argón-Criptón y Helio-Neón). Se utilizaron los filtros BP 546/12 (rodamina-Cy3) y LP 650 (Cy5).

Cuantificación de folículos

Para comprobar si en *A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium* solo es funcional el ovario derecho (como se ha reportado en la literatura para otras especies), se realizó un análisis histológico identificando los cinco tipos de folículos presentes en el ovario derecho e izquierdo en las tres especies de murciélagos y finalmente se realizó un conteo de estos en sus diferentes etapas.

Con base en los cortes de parafina teñidos con hematoxilina & eosina se realizó la caracterización y clasificación de los folículos en sus diferentes fases, tomando en cuenta la tabla publicada por Myers y col. (2004) [Figura 10]. De esta manera se examinaron ambos ovarios de hembras adultas de cada especie de murciélagos filostómidos (*A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium*). Teniendo cinco ovarios derechos y cinco ovarios izquierdos por cada especie. Una vez clasificaron los tipos foliculares (primordiales, primarios, secundarios, pre-antrales y antrales), realizamos el conteo de estos.

Para realizar el conteo de los folículos se empleó el software GSA Imageanalyzer, debido a que nos permite analizar imágenes-2D y fotografías en cualquier formato, a través de las cuales puede reconocer y contar objetos (como algoritmos de Buerker, Fuchs-Rosenthal, Thoma, Schilling, Tuerk, Tennant).

Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias morfológicas entre el ovario derecho y el ovario izquierdo en las tres especies de murciélagos filostómidos (*A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium*) se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos del conteo folicular. El análisis se divide en tres partes: i) se comparó la variable del peso (gr) del ovario derecho e izquierdo en las tres especies, ii) Se compararon entre el ovario derecho e izquierdo los cinco tipos foliculares (folículo primordial, primario, secundario, pre-antral y antral) en las tres especies de murciélagos, iii) y finalmente se comparó el número de las células localizadas en la región cortical en ambos ovarios.

i) Para comparar entre el ovario derecho e izquierdo la variable peso y determinar si este es un dato confiable para determinar la funcionalidad de los ovarios, como se ha reportado, se realizaron gráficas para observar su comportamiento en cada una de las especies (Gráfica 1), después con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística para determinar si existe una diferencia entre los ovarios, primero se aplicó una prueba de F para determinar si las varianzas eran iguales o diferentes (con una α 0.05), ya que el resultado de esta indicaría cuál de los dos tipos de T-student utilizar (varianzas desconocidas pero iguales o bien varianzas desconocidas pero diferentes). El resultado de la prueba de F (Fisher) fue que no existen diferencias entre las varianzas, en las tres especies de murciélagos, por ello para las tres se aplicó T-student para varianzas desconocidas pero iguales (con una α 0.05).

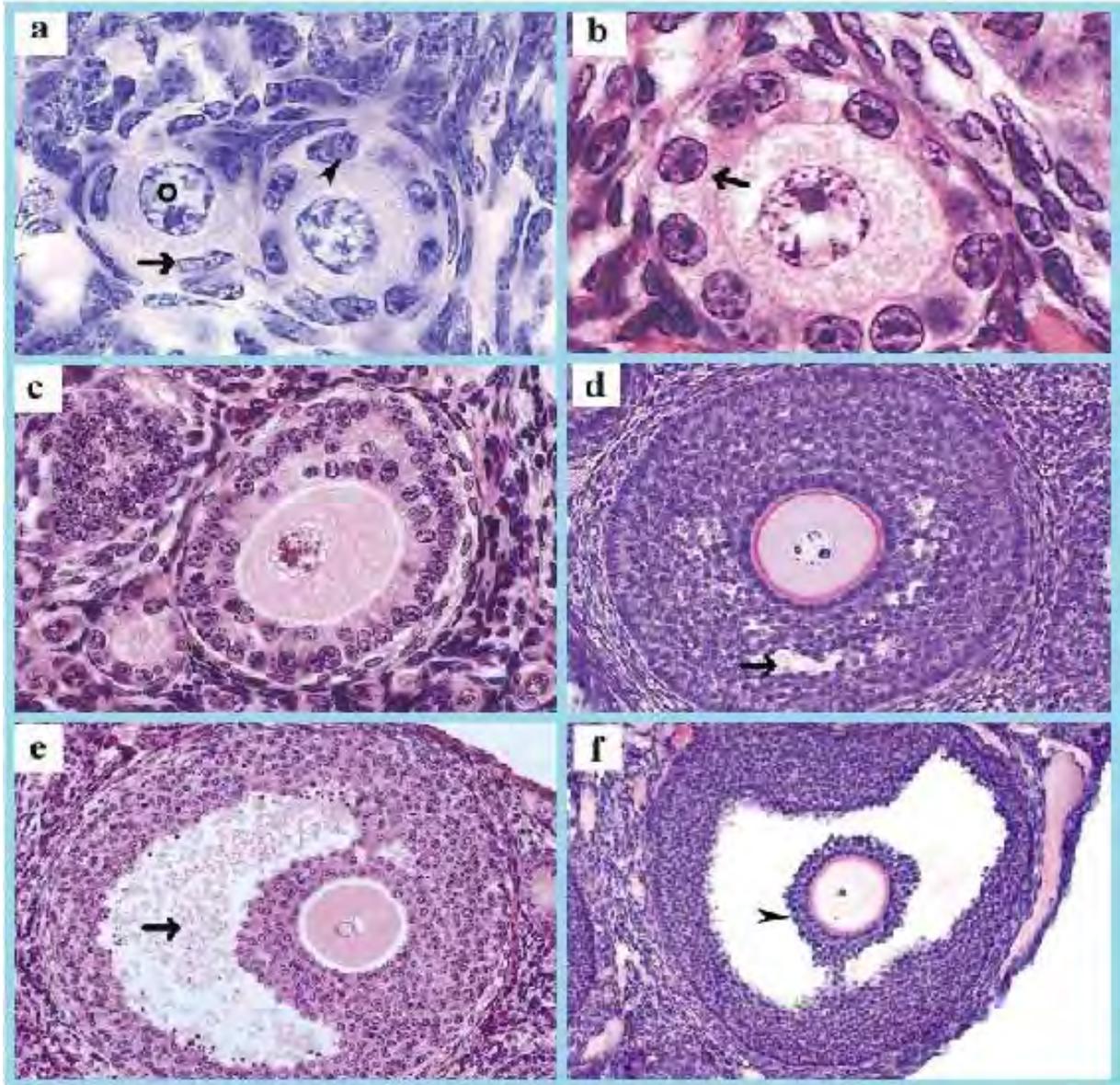


Figura 10. Clasificación de las fases folicular utilizada para el análisis. (a) Folículos primordiales se define como un ovocito (O), rodeada por una capa de células “escamosas”, células de la granulosa (flecha). (b) Folículos primarios poseen un ovocito rodeado por una sola capa de células de la granulosa cúbicas (flecha). (c) Folículos secundarios se encuentran rodeados por más de una capa de células de la granulosa, sin antro visible. (d) Folículos pre-antrales presentan un espacio antral emergente (flecha) (e) Folículos antrales poseen un espacio antral claramente definidos (flecha). (f) Folículos de preovulatorios son los más grandes de los tipos foliculares y presentan cúmulos formados por varias capas de células de la granulosa.

ii) Después para comparar la morfología del ovario derecho e izquierdo con base en los tipos foliculares, y posteriormente poder realizar una comparación entre las variables peso y tipos foliculares para con ello determinar si el ovario izquierdo por ser de menor tamaño no es funcional como se ha reportado por otros autores. El primer paso fue determinar si se aplicaba una prueba paramétrica o una no paramétrica para ello se realizó una prueba de homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlett) y una de prueba de normalidad para todos los datos obtenidos del conteo folicular en cada una de las tres especies de murciélagos filostómidos de forma individual. El resultado de estas pruebas fue, las tres especies presentan homogeneidad; sin embargo, ninguna presenta normalidad, por ello se utilizó una prueba no paramétrica. El segundo paso fue realizar una prueba de independencia χ^2 (de datos categóricos), para determinar la independencia de las dos variables de clasificación: tipo de folículo y el ovario (derecho o izquierdo) para los tres murciélagos filostómidos. Y finalmente se realizó una prueba de RxC (prueba no paramétrica) para determinar diferencias entre el ovario derecho e izquierdo (todas las pruebas se realizaron con una α 0.05).

iii) Y finalmente para comparar el número de CGCA entre el ovario derecho e izquierdo se realizó una prueba F para determinar si las varianzas eran iguales o diferentes (con una α 0.05), y con ello determinar cuál de las dos pruebas de T utilizar (varianzas desconocidas pero iguales o bien varianzas desconocidas pero diferentes). El resultado para *G. soricina* y *S. liliium* fue que no existen diferencias entre las varianzas, por ello se aplicó la prueba de T para varianzas desconocidas pero iguales (con una α 0.05), sin embargo el resultado de *A. jamaicensis* fue que las varianzas son diferentes por ello se realizó la prueba de T para varianzas desconocidas pero diferentes (con una α 0.05). Todos los cálculos realizados se hicieron utilizando Excel 2007 y SPSS v.17.0.

RESULTADOS

Peso de los ovarios

Uno de los datos importantes tomados en este estudio fueron los pesos de los ovarios por separado, distinguiendo entre el ovario derecho e izquierdo con respecto al animal en las tres especies de murciélagos filostómidos. Los valores obtenidos se muestran en la tabla número 5.

Tabla número 5.

Registro del peso en gramos de los ovarios de las tres especies de murciélagos filostómidos utilizados en este estudio.

Especie	Peso de los ovarios (gr)	
	Derecho	Izquierdo
<i>Artibeus jamaicensis</i>		
1	0.0038	0.0025
2	0.0082	0.0078
3	0.0084	0.0077
4	0.0027	0.0015
5	0.0102	0.009
6	0.0049	0.0026
7	0.005	0.0025
8	0.00940	0.00750
9	0.00720	0.00520
<i>Glossophaga soricina</i>		
1	0.0040	0.0033
2	0.0048	0.0037
3	0.0038	0.0027
4	0.0055	0.0022
5	0.0015	0.001
6	0.0016	0.009
<i>Sturnira lilium</i>		
1	0.0051	0.0028
2	0.0098	0.009
3	0.0052	0.0011
4	0.00670	0.00520
5	0.00730	0.00420
6	0.00650	0.00430
7	0.0067	0.006
8	0.0067	0.0044
9	0.011	0.008

Para cada grupo de datos obtenidos por especie de murciélago se construyó un gráfico para mostrar la distribución de pesos de los ovarios de manera individual y un gráfico donde se muestra el promedio de peso para cada uno de los ovarios en las tres especies de murciélagos (Graficas 1 y 2).

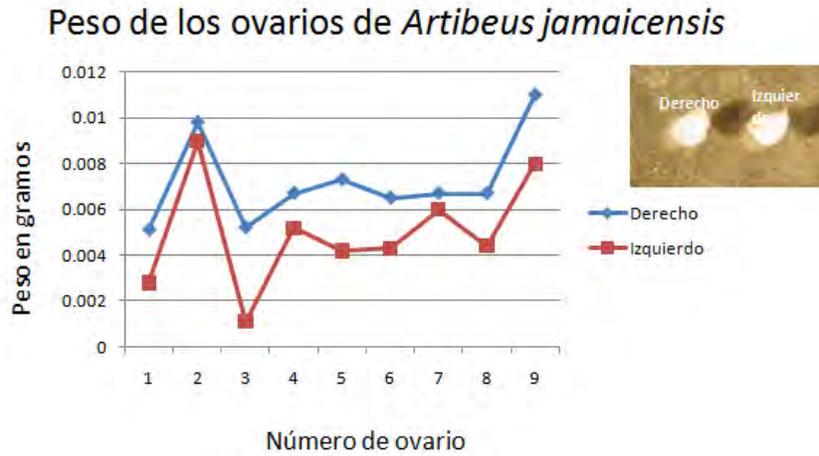
Se puede observar que el ovario derecho es ligeramente más grande y pesado que el ovario izquierdo, este dato es igual en las tres especies de murciélagos y concuerda con lo reportado en la literatura para *M. ater* (Rasweiler, 1988), *M. californicus* (Crichton y Kruttsch, 1985), *M. ater*, *M. tuberculata* y *P. parnellii* (Rasweiler y Badwaik, 2000) la cual nos dice que el ovario funcional suele ser de mayor tamaño. Al realizar el análisis estadístico para la variable peso en cada una de las tres especies de murciélagos filostómidos, el resultado de la prueba muestra que la diferencia entre las medias es diferente de cero, es decir que existen una diferencia estadísticamente significativa entre el peso del ovario derecho y el ovario izquierdo (Tabla 6).

Tabla número 6.

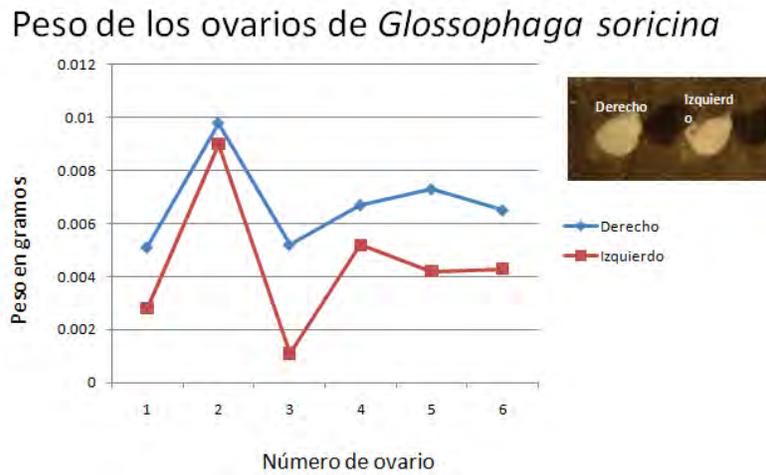
Resultados de la prueba de T para el peso en (gr) entre el ovario derecho e izquierdo en las tres especies de Murciélagos filostómidos.

Especie	Valor de T	α	Grados de libertad	Valor de T de tablas
<i>A. jamaicensis</i>	51.9215	0.05	16	-2.47 y 2.47
<i>G. soricina</i>	-10.9860	0.05	10	-2.6337 y 2.63.37
<i>S. liliium</i>	123.031	0.05	16	-2.47 y 2.47

A



B



C



Gráfico 1. Distribución de peso en gramos del ovario izquierdo y derecho para las tres especies de murciélagos filostómidos, (a) *A. jamaicensis*, (b) *G. soricina* y (c) *S. lilium*,

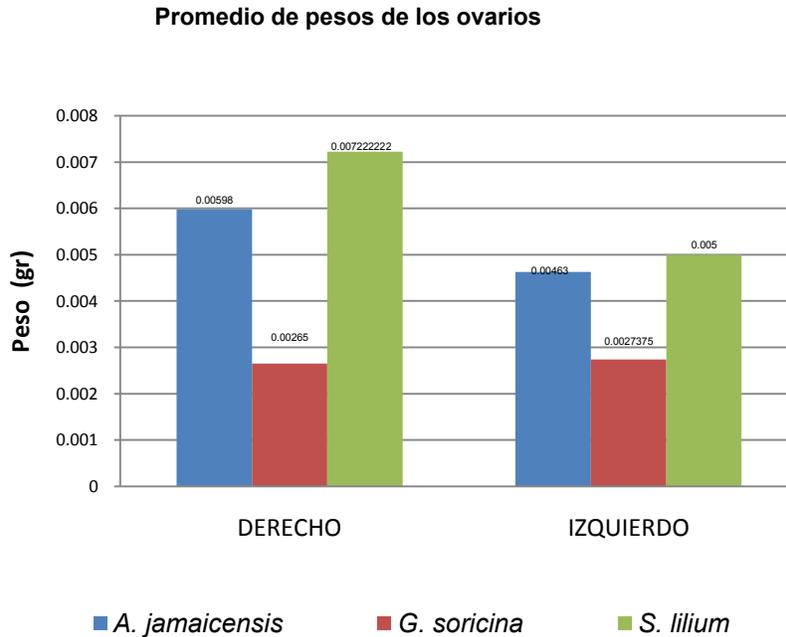


Gráfico 2. Promedio de los pesos en gramos del ovario izquierdo y derecho para las tres especies de murciélagos filostómidos *A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium*.

Morfología del ovario en las tres especies de murciélagos filostómidos

Los datos obtenidos en este estudio nos indican que el ovario derecho es ligeramente de mayor tamaño que el ovario izquierdo sin embargo el peso no es un dato substancial que indique con certeza que este ovario no es funcional, por ello se realizó un análisis morfológico en ambos ovarios para determinar si tanto el ovario derecho como el izquierdo cuentan con las características suficientes para poder llevar a cabo el proceso de ovogénesis y foliculogénesis. Los resultados obtenidos se muestran a continuación por especie de murciélago.

Con microscopía electrónica de transmisión y microscopía de campo claro en cortes histológicos de ambos ovarios, se encontró, que el ovario de las tres especies de murciélagos se puede dividir en dos zonas principales: una corteza externa y médula interna.

En los ovarios adultos de *A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliium*, la corteza contiene folículos en diferentes etapas de crecimiento, algunos tipos de tejidos de la glándula intersticial, formas degeneradas de estos elementos y células del estroma, mientras que la médula contiene la

sangre intra ovárica y los principales vasos linfáticos, nervios, cordones medulares y sus derivados, tejido de la glándula intersticial, y un epitelio germinal que envuelve el exterior de la corteza.

Morfología de los ovarios de Artibeus jamaicensis

En el ovario derecho de *A. jamaicensis* se observa la presencia de un folículo primario (está formado por un ovocito rodeado por dos tipos de células somáticas: células de la granulosa y células de la teca) y un folículo secundario cerca del borde (un ovocito con varias capas de células somáticas de forma cubica), también se observa la presencia de un folículo pre-antral y un folículo antral (muestra un espacio celular llamado antro) bien definido, algo que nos llamo la atención fue un grupo de células localizadas en la región cortical (fig. 11-A) en una miniatura se observa una vista panorámica del ovario donde se observan folículos en tres estadios: primarios, secundarios y pre-antrales.

En el ovario izquierdo se observan; folículos primarios cerca del borde, así como folículos antrales bien definidos y un pequeño folículo pre-antral, de igual forma que en el ovario derecho se observa células agrupadas en la región cortical (fig. 11-B), también se muestra una imagen panorámica del ovario izquierdo, donde se observan folículos primarios y secundarios, y el grupo de células localizadas en la región cortical.

Con microscopia electrónica se pudo observar a más detalle la morfología de estas células corticales, las cuales exhiben una forma redonda, con un núcleo esférico localizado en posición excéntrica, con una cromátida granular muy fina, un número variable de nucléolos, así como gotas de lípidos y glucógeno, sin embargo; algunas de estas se encuentran rodeadas por células fusiformes (fig. 11-C y D), estas características no permiten incluirlas en algunos de los tipos celulares conocidos (célula folicular o germinal), sin embargo; como se verá más adelante son afines a marcadores de la línea germinal, por lo que en este estudio se denominaron Células Germinales Corticales Adultas (CGCA).

Morfología de los ovarios de Glossophaga soricina

El análisis ultraestructural del ovario adulto de *G. soricina* muestra la presencia de folículos en diferentes etapas de crecimiento (Fig. 12-A y 12-B) lo cual funcionalmente equivale a que

ambos ovarios cuentan con las características suficientes para poder llevar a cabo el proceso de foliculogénesis y por ello el de ovogénesis. Al igual que en *A. jamaicensis* un hallazgo innovador fue la presencia de un grupo de células en la región cortical las CGCA en ambos ovarios.

La presencia de un cuerpo lúteo es muy evidente en el ovario derecho de *G. soricina*, rodeando a este cuerpo se encuentran dos estadios diferentes de folículos; folículos primarios y secundarios (fig. 12-A), también en este murciélago encontramos un grupo de células en la región cortical, la microscopía electrónica evidenció detalles finos de estas células muy semejantes a los *A. jamaicensis*, son redondas, algunas rodeadas por células fusiformes, con un núcleo grande, estas células solo muestran la presencia de un nucléolo, y gotas de glucógeno y lípidos (fig. 12-C y D).

El ovario izquierdo las células corticales están agrupadas en la periferia formando una especie de borde, debajo de este borde se observan folículos en tres estadios diferentes: primarios secundarios y pre-antral (fig. 12-B).

Morfología de los ovarios de Sturnira lilium

El ovario de *Sturnira lilium* muestran una morfología típica evidenciada por la presencia de folículos en diferentes etapas de desarrollo (primarios, secundarios y antrales) y de igual forma que en las dos especies de murciélagos filostómidos anteriormente mencionadas se observa la presencia de un grupo de células localizadas en la región cortical del ovario denominadas CGCA (Fig.13).

El ovario derecho de *S. lilium*, muestra la presencia en la zona cortical de folículos primarios, secundarios y un folículo pre-antral que muestra pequeños espacios entre las células foliculares y se observa una porción de un cuerpo lúteo que evidencia que en este ovario se produjo ovulación (fig. 13-A).

También en el ovario izquierdo se observan estos tres estadios foliculares: primario, secundarios y pre-antrales, sin embargo; se observa una gran cantidad de células corticales (CGCA), cuyas características morfológicas son compatibles con las otras dos especies de murciélagos, lo que nos hace pensar, que son del mismo tipo celular, aun no descrito.

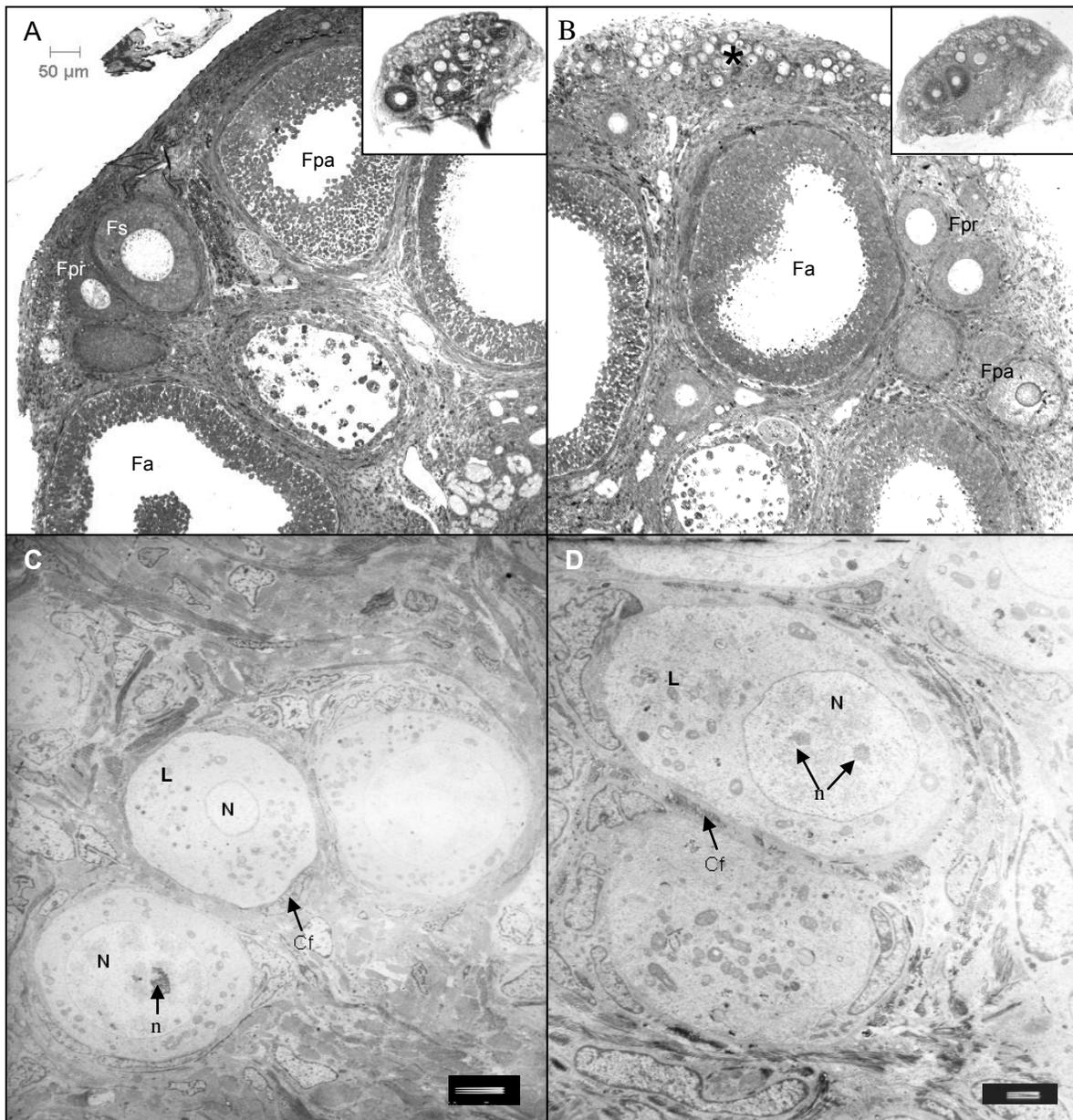


Figura 11: Microscopia de campo claro en cortes histológicos del ovario derecho (A) e izquierdo (B) [20X], micrografías electrónicas del (C) ovario derecho y (D) izquierdo [5nm] de *Artibeus jamaicensis*. (11-A y 11-B) se observa la presencia de folículos primarios (Fpr) secundarios (Fs), se observa en el ovario izquierdo un folículo pre-antral (Fpa) y folículos antrales (Fa). En los recuadros se pueden observar un grupo de células en la región cortical las CGCA (*) en ambos ovarios. (11-C y 11-D) se muestra a mayor detalle la morfología de las células periféricas, se observa la forma redonda de las células, un núcleo excéntrico (N), un nucléolo (n), depósitos de lípidos (L) y algunas células fusiformes planas a su alrededor (Cf).

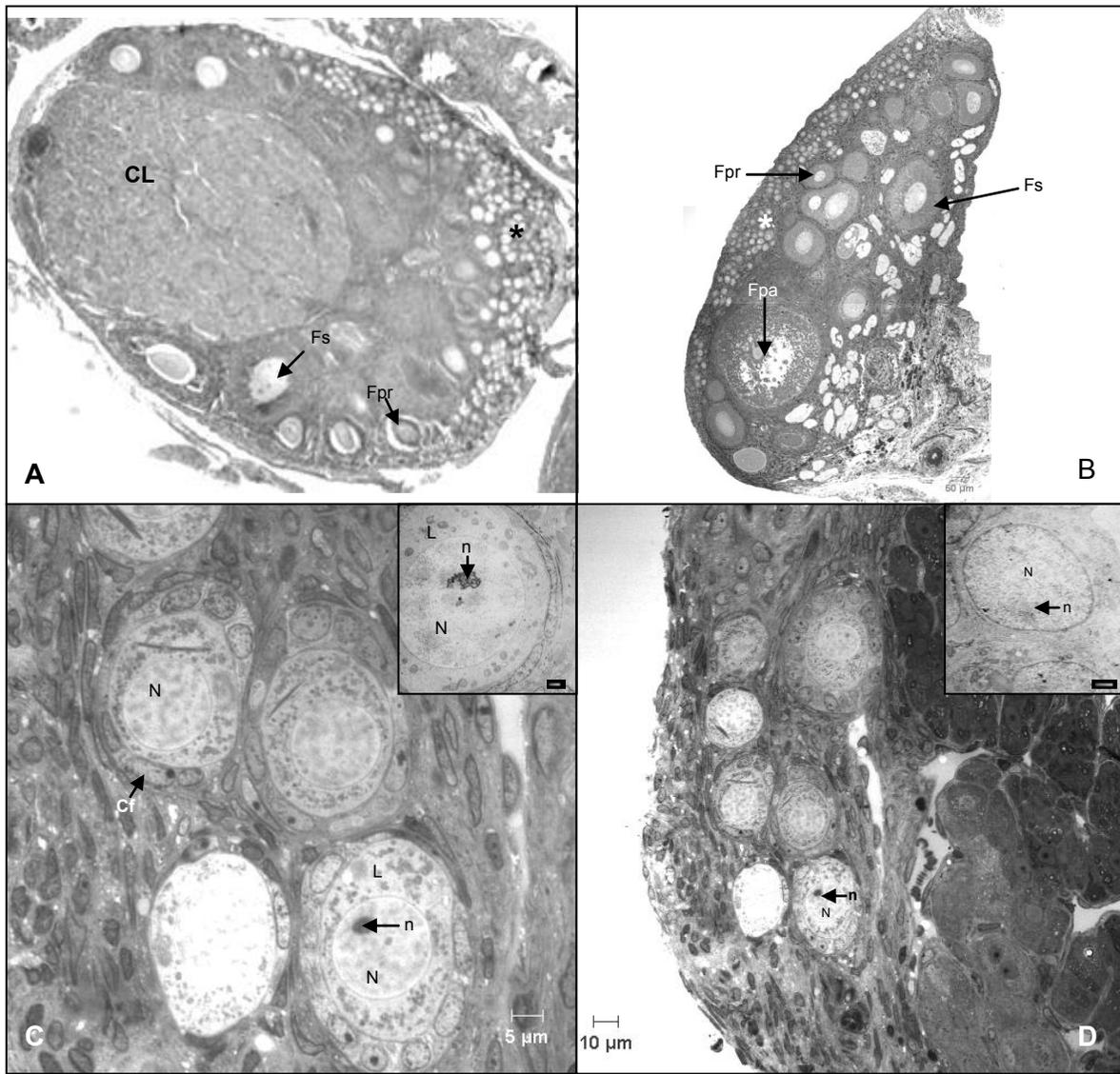


Figura 12. Microscopia de campo claro en cortes histológicos del ovario derecho (A) e izquierdo (B) incluidos en epón [10x], Microscopia de campo claro del (C) ovario derecho [100x] y (D) izquierdo [40x] de *Glossophaga soricina*. (12-A) se observa la presencia de folículos primarios (Fpr) secundarios (Fs), y un gran cuerpo lúteo resultado de la degeneración de las células somáticas después de la ovulación, y (12-B) en el ovario izquierdo muestra la presencia de folículos primarios, secundarios y un folículo pre-antral (Fpa). Se muestran con micrografías electrónicas a mayor detalle las características de las CGCA (recuadros) las cuales presentan una forma redonda, un nucléolo (n), Núcleo (N), depósitos de lípidos (L) y algunas células fusiformes planas a su alrededor (Cf).

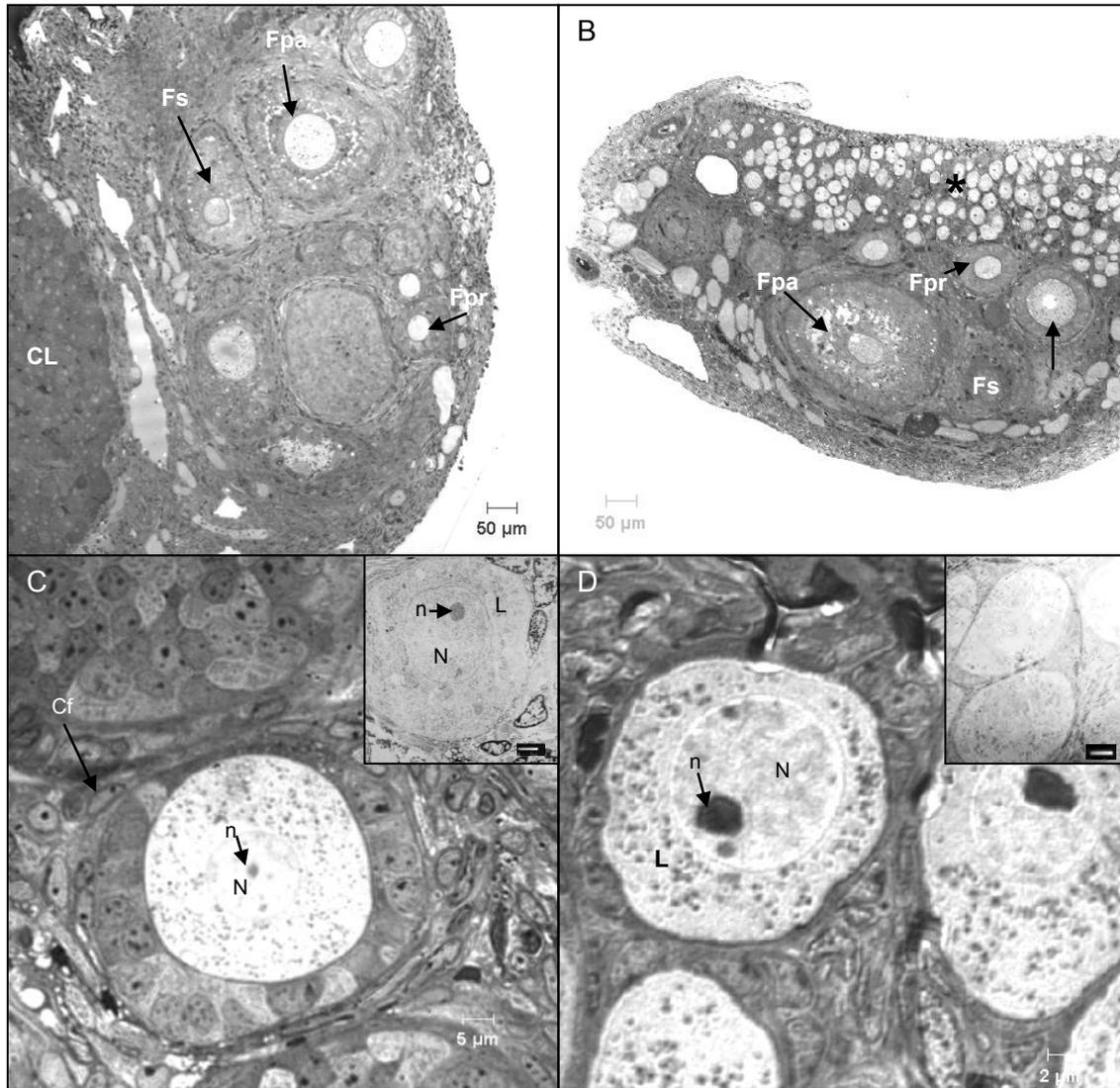


Figura 13. Microscopia de campo claro en cortes histológicos del ovario derecho (A y C) e izquierdo (B y D) [20X], micrografías electrónicas [nm] de *Sturnira lilium*. (13-A) en el ovario derecho se observan folículos primarios (Fpr) secundarios (Fs), un folículo pre-antral (Fpa) y una pequeña sección del cuerpo lúteo y CGCA (*) (13-B) El ovario izquierdo también presenta folículos primarios, secundarios y un pre-antral (Fpa). (13-C y 13-D) se muestra con mayor detalle la estructura de las células de la región cortical (*) que presentan células fusiformes planas a su alrededor, con las micrografías electrónicas (recuadros) se muestra una morfología más detallada de las CGCA, la forma redonda es muy evidente, un nucléolo (n), Núcleo (N), depósitos de lípidos (L) y algunas células fusiformes planas (Cf)

Cuantificación de folículos en el ovario derecho e izquierdo de las tres especies de murciélagos (*A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. Liliun*).

Después de haber realizado el análisis ultraestructural y de haber identificado los cinco tipos de folículos descritos por Myers y col. (2004), se realizó un conteo folicular en 5 ovarios derecho y 5 ovarios izquierdos en cada una de las tres especies de murciélagos filostómidos. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 7-9. Y el número de Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) se muestran en la tabla 10.

Tabla número 7.

Número de folículos presentes en el ovario derecho e izquierdo de *Artibeus jamaicensis*.

Ovario	Individuo	ESTADIO FOLICULAR					
		Primordial	Primario	Secundario	Preantral	Antral	Total
DERECHO	1	2	4	5	0	0	13
	2	2	4	2	0	0	8
	3	0	1	3	0	4	8
	4	0	1	4	0	2	7
	5	3	2	3	0	2	10
IZQUIERDO	1	2	9	4	0	0	15
	2	0	6	0	0	0	6
	3	0	0	1	0	2	3
	4	0	1	4	2	4	11
	5	3	3	3	3	2	14

Tabla número 8.

Número de folículos presentes en el ovario derecho e izquierdo de *Glossophaga soricina*.

Ovario	Individuo	ESTADIO FOLICULAR					
		Primordial	Primario	Secundario	Preantral	Antral	Total
DERECHO	1	4	1	4	0	0	9
	2	20	1	2	0	0	23
	3	7	3	9	0	0	20
	4	0	0	0	2	0	2
	5	0	0	3	1	2	6
IZQUIERDO	1	2	7	4	0	0	13
	2	0	2	2	4	4	12
	3	6	4	7	0	0	17
	4	0	3	5	0	0	8
	5	8	0	4	0	2	14

Tabla número 9.

Número de folículos presentes en el ovario derecho e izquierdo de *Sturnira lilium*.

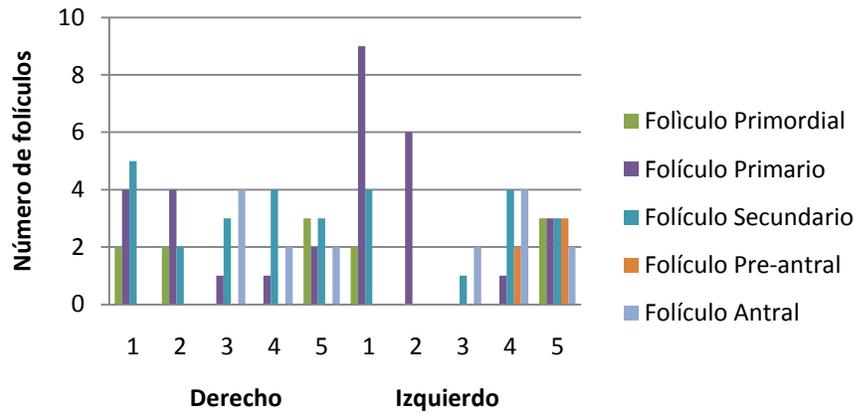
Ovario	Individuo	ESTADIO FOLICULAR					
		Primordial	Primario	Secundario	Preantral	Antral	Total
DERECHO	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	6	4	2	2	14
	3	0	15	5	2	0	22
	4	2	10	3	0	1	16
	5	0	0	0	1	2	3
IZQUIERDO	1	0	2	5	0	0	7
	2	12	10	5	0	2	29
	3	14	14	7	0	12	47
	4	0	0	1	0	0	1
	5	0	1	0	0	2	3

Tabla número 10.

Número de Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) presentes en los ovarios en las tres especies de murciélagos

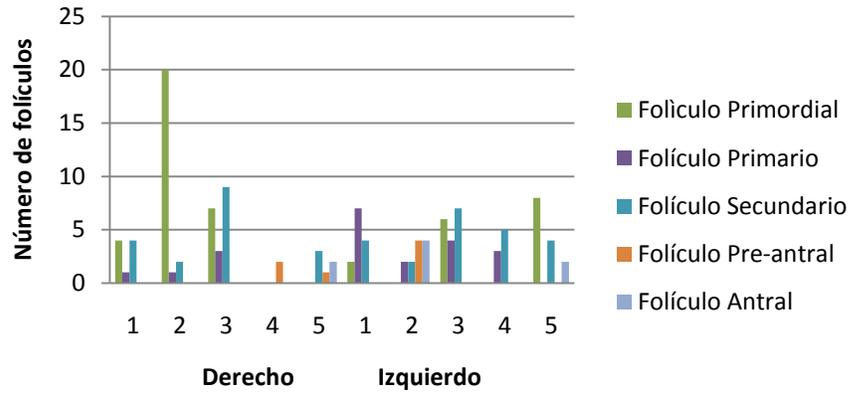
Individuo	Ovario de <i>Artibeus jamaicensis</i>		Ovario de <i>Glossophaga soricina</i>		Ovario de <i>Sturnira lilium</i>	
	Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo
1	32	53	30	30	109	0
2	25	35	38	41	103	52
3	9	3	142	138	61	0
4	6	26	27	0	0	72
5	212	70	87	45	0	0

Foliculos de *Artibeus jamaicensis*



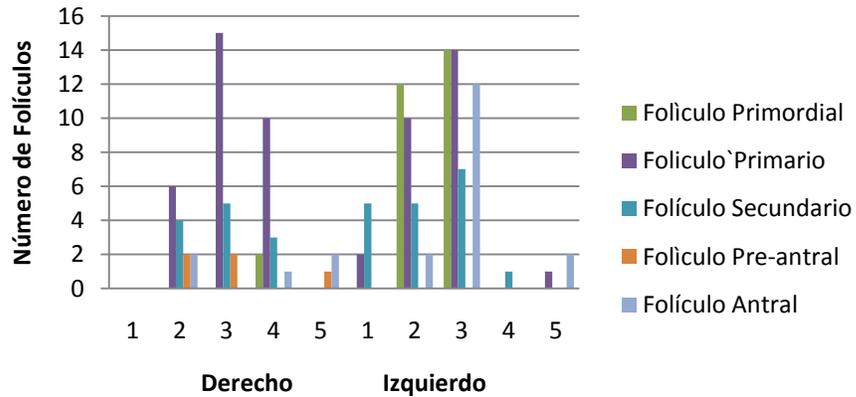
A

Folículos de *Glossophaga soricina*



B

Folículos de *Sturnira lilium*



C

Gráfico 3. Número de folículos presentes en el ovario derecho e izquierdo de (A) *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lilium*.

Con los datos obtenidos del conteo de los diferentes estadios de desarrollo de los folículos se realizó un análisis estadístico, cuyo resultado obtenido por la prueba RxC fue que, no hay diferencias significativas entre el número de folículos del ovario derecho y el ovario izquierdo en las tres especies de murciélagos (*A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. liliun*).

Tabla número 11.

Resultados de la prueba de RxC para comprar el numero de folículos entre el ovario derecho e izquierdo en las tres especies de murciélagos filostómidos.

Especie	Valor de RxC	α	Grados de libertad	Valor de T de tablas
<i>A. jamaicensis</i>	7.5289	0.05	4	9.48
<i>G. soricina</i>	12.9100	0.05	4	9.48
<i>S. liliun</i>	27.3104	0.05	4	9.48

El resultado de la prueba estadística para el número de Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) del ovario derecho e izquierdo, fue que existe una diferencia estadísticamente significativa, entre el número de CGCA del ovario derecho e izquierdo en las tres especies de murciélagos.

Tabla número 12.

Resultados de la prueba de T para comprar el numero de CGCA entre el ovario derecho e izquierdo en las tres especies de murciélagos filostómidos.

Especie	Valor de T	α	Grados de libertad	Valor de T de tablas
<i>A. jamaicensis</i>	2.2414	0.05	8	9.48
<i>G. soricina</i>	-3.398×10^{-8}	0.05	8	9.48
<i>S. liliun</i>	-3.4639×10^{-7}	0.05	8	9.48

Prueba de reserva ovárica

Actualmente en humanos se realiza la prueba de reserva ovárica para evaluar el funcionamiento y la calidad de los ovarios, con esta prueba se puede tener una visión más detallada si una persona es fértil y por ello podría quedar embarazada (Arce *et al.*, 2009). Los resultados de la prueba de reserva ovárica pueden englobarse en dos categorías: normal o deficiente (Hansen *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1998; Arce *et al.*, 2009). Una reserva ovárica normal indica que los ovarios están funcionando adecuadamente, todo lo contrario a una deficiente la cual indica altas posibilidades de no quedar embarazada o que será muy difícil procrear. Extrapolamos esta información a los murciélagos con los datos obtenidos del conteo folicular, para poder determinar de esta forma la funcionalidad ovárica.

En general, las mujeres que poseen menos de cinco folículos ováricos, presentan altas posibilidades de no responder exitosamente a las medicaciones para mejorar la fertilidad. Por otro parte, las mujeres cuyo conteo folicular se encuentra entre 5 y 11, cuentan con un número reducido de folículos y deben someterse a medicaciones para mejorar su fertilidad. Y finalmente si el conteo folicular se encontrara entre 12 y 30, son consideradas buenas candidatas ya que sus ovarios están funcionando adecuadamente, no obstante un alto número de folículos podría estar indicando la presencia de ovarios poliquísticos (Hansen *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1998; Arce *et al.*, 2009).

En base a estas proporciones y realizando una analogía a los resultados obtenidos en los murciélagos observamos que en el caso del murciélago *Artibeus jamaicensis* solo uno de los cinco ovarios derechos obtuvo una reserva ovárica normal lo que indica que ese ovario está funcionando adecuadamente, en los restantes la reserva fue reducida, es decir cuentan con pocos folículos pero indica que el ovario está funcionando; por otra parte encontramos dos ovarios izquierdos con una reserva ovárica normal, dos reducidos y uno deficiente es decir, que no cuenta con los folículos necesarios para ser fértil. Los ovarios de *Glossophaga soricina*, muestran un buen patrón en los cinco individuos estudiados: dos cuentan con una reserva ovárica normal, dos con una reducida y solo uno es deficiente esto para el ovario derecho. El izquierdo por su parte cuatro de cinco fueron normales y solo uno reducido. Finalmente el patrón de *Sturnira lilium* muestra tres ovarios derechos normales y dos deficientes; el izquierdo dos normales, un reducido y dos deficientes (Tabla 13).

Tabla 13:

Resultado del conteo folicular en las tres especies de murciélagos, clasificación: Deficientes (Menos de cinco folículos); Intermedios (Entre 5-11 folículos); Normales (Entre 12-30 folículos).

Especie	Individuo	Ovario derecho	Clasificación	Ovario izquierdo	Clasificación
<i>Artibeus jamaicensis</i>	1	13	Normal	15	Normal
	2	8	Reducido	6	Reducido
	3	8	Reducido	3	Deficiente
	4	7	Reducido	11	Reducido
	5	10	Reducido	14	Normal
<i>Glossophaga soricina</i>	1	9	Reducido	13	Normal
	2	23	Normal	12	Normal
	3	20	Normal	17	Normal
	4	2	Deficiente	8	Reducido
	5	6	Reducido	14	Normal
<i>Sturnira lilium</i>	1	0	Deficiente	7	Reducido
	2	14	Normal	29	Normal
	3	22	Normal	47	Normal
	4	16	Normal	1	Deficiente
	5	3	Deficiente	3	Deficiente

Caracterización de las Células Germinales Corticales Adultas (CGCA) localizadas en la región cortical del ovario adulto

Con base en, el análisis histológico realizado por microscopia de campo claro y microscopia electrónica de transmisión en el grupo de células localizadas en la región cortical de ambos ovarios y en correlación con las estrategias reproductivas de los murciélagos se planteo la idea de que este grupo de células podría tratarse de células progenitoras de ovocitos. Sin embargo, algunas de estas células se encuentran rodeadas por unas cuantas células fusiformes planas muy parecidas a células de la granulosa, lo que hace suponer que este grupo de células sean folículos primordiales. Para ahondar más a cerca de este tipo celular, realizamos la caracterización de estas células por su inmunoreactividad a marcadores específicos de la línea germinal, de células progenitoras y de proliferación celular, cuyos resultados se muestran a continuación.

Caracterización de las Células Germinales Corticales Adultas en *Artibeus jamaicensis*

Los perfiles de inmunohistoquímica de marcadores específicos, en el grupo de células localizadas en la región cortical de ambos ovarios en *Artibeus jamaicensis*, fue interesante, ya que estas células son positivas a la expresión de marcadores de: línea germinal, células troncales y proliferación celular, lo cual es innovador. Los seis marcadores (*Vasa*, *c-kit*, *Oct4*, *H3*, *fragilis* y *stella*) utilizados para la caracterización, dieron positivo en estas células corticales de manera independiente y colocalizando (Fig. 14 y 15).

La expresión del marcador *Oct4* (correlacionado con la retención de la totipotencialidad) [Scholer *et al.*, 1989; Yoshimizu *et al.*, 1999], se detectó en el núcleo de las células corticales, como en ovocitos dentro de folículos (en ambos ovarios). *C-kit* (marcador de algunas células progenitoras) se expresó de forma citoplasmática en las células corticales también fue positivo en algunos ovocitos en ambos ovarios. *Fragilis* (marcadores de línea germinal) [Saitou *et al.*, 2002] se detectó en el núcleo de las células corticales en ambos ovarios y en un ovocito en el ovario derecho. El marcador *stella* (marcador de línea germinal) [Saitou *et al.*, 2002], fue evidente en el citoplasma de estas células corticales tanto en el ovario derecho e izquierdo. Finalmente estas células corticales fueron positivas al marcador *Vasa* (relacionado con la migración y mantenimiento de las células germinales) [Fujiwara *et al.*, 1994; Noce *et al.*, 2001], *Vasa* también se detectó en algunos ovocitos del ovario derecho e izquierdo.

En el ovario derecho se detectó la expresión de los marcadores en las siguientes combinaciones, *Vasa-ckit-Oct4*; *H3-ckit*; *ckit-fragilis*; *ckit-stella* (fig. 14). El ovario izquierdo por su parte muestra las siguientes combinaciones, *Vasa-ckit-Oct4*; *ckit-Oct4*; *ckit-fragilis* (fig 15).

Caracterización de las Células Germinales Corticales Adultas en *Glossophaga soricina*

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias en el ovario adulto de *G. soricina*, fueron muy semejantes a los obtenidos en *A. jamaicensis*, ya que el grupo de células localizadas en la región cortical de ambos ovarios fueron positivas para los seis marcadores empleados. La expresión *Oct4* y *fragilis* fue nuclear, de manera citoplasmática *c-kit* y *stella*, también expresan *Vasa* y el marcador de proliferación *H3*, estos marcadores se expresan de manera independiente pero también colocalizan en combinaciones dobles y triples (Fig. 16 y 17). Se

detecto la expresión de Vasa también en un ovocito en el ovario derecho y en varios en el izquierdo.

Los marcadores se encontraron colocalizando en las siguientes combinaciones en el ovario derecho, *Vasa-ckit-Oct4*; *H3-Vasa*; *H3-ckit*; *Fragilis-ckit* en este ovario todas las combinaciones fueron específicas a las células corticales (fig. 16) y para el ovario izquierdo fueron, *Vasa-ckit-Oct4*; *H3-Vasa*; en este ovario estas combinaciones también fueron positivas en algunos ovocitos (fig. 17). Estos resultados pueden indicar que estas células, tienen una relación con la línea germinal evidenciada por la expresión de *Vasa*, *Fragilis* y *stella* y con células troncales por la expresión de *c-kit* y *Oct4*.

Caracterización de las Células Germinales Corticales Adultas en *Sturnira liliium*

Mediante la técnica de inmunofluorescencia y microscopía confocal se detectó la expresión de marcadores de línea germinal (*Vasa*, *fragilis*, *stella*) células troncales (*Oct4*, *c-kit*) y marcadores de proliferación (*H3*) en el grupo de células localizadas en la periferia del ovario adulto, encontrando que estos marcadores se expresan de manera independiente pero también colocalizan en combinaciones dobles y triples (Fig. 18 y 19).

Los resultados obtenidos de la expresión de marcadores en los ovarios de *Sturnira liliium*, son muy semejantes a los que presentan *A. jamaicensis* y *G. soricina*, ya que estas células localizadas en la región cortical son positivas en la expresión de marcadores de línea germinal (*fragilis*, *stella* y *vasa*); células troncales (*Oct4* y *c-kit*); y proliferación celular (*H3*), estos marcadores se expresan de forma independiente y colocalizando en combinaciones dobles y triples (fig. 18 y 19).

En el ovario derecho, colocalizan los marcadores de la siguiente, *Vasa-ckit-Oct4*; *H3-ckit*; *stella-fragilis*; *stella-ckit*, estos se expresan en las células localizadas en la región cortical, a excepción de *Vasa-ckit-Oct4* que se detecta expresión en un ovocito (fig. 18).

El ovario izquierdo por su parte exhibe las siguientes combinaciones, *Vasa-ckit-Oct4*, *fragilis-ckit*; *stella-ckit*, las cuales solo se expresan en las células localizadas en la región cortical, si embargo la expresión de *Vasa* se detectó en un ovocito (fig. 19).

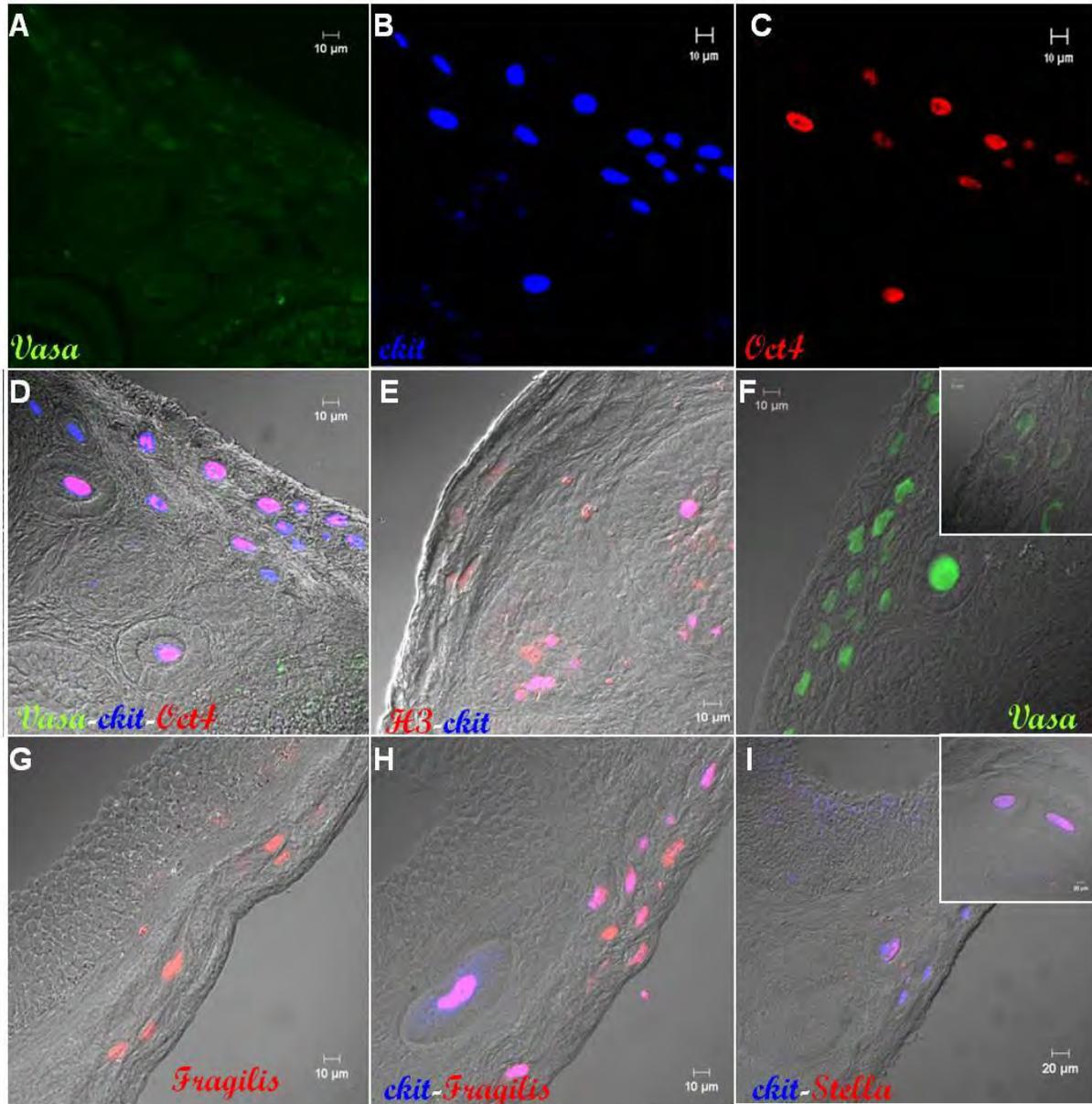


Figura 14. (A-D) Detección simultánea por inmunofluorescencia de ovario derecho de *A. jamaicensis* de marcadores específicos de células progenitoras y troncales. (A-C) Visualización independiente de cada uno de los marcadores *Vasa*, *c-kit*, *Oct4*. (D) Visualización simultánea de los tres marcadores. (E) Detección del marcador de proliferación celular (*H3*) y marcador de células troncales (*c-kit*). (F) Células positivas a *Vasa* con un aumento de la expresión de *Vasa* en las células corticales [100x]. (G) Detección de la proteína del gen *fragilis*, relacionado con la diferenciación temprana de la línea germinal. (H) Visualización simultánea de dos marcadores *c-kit-fragilis*. (I) colocalización de *c-kit-stella*, (*stella* otra proteína relacionada con la diferenciación temprana de la línea germinal) [40x] con un aumento de células corticales donde colocalizan estos dos marcadores [100x].

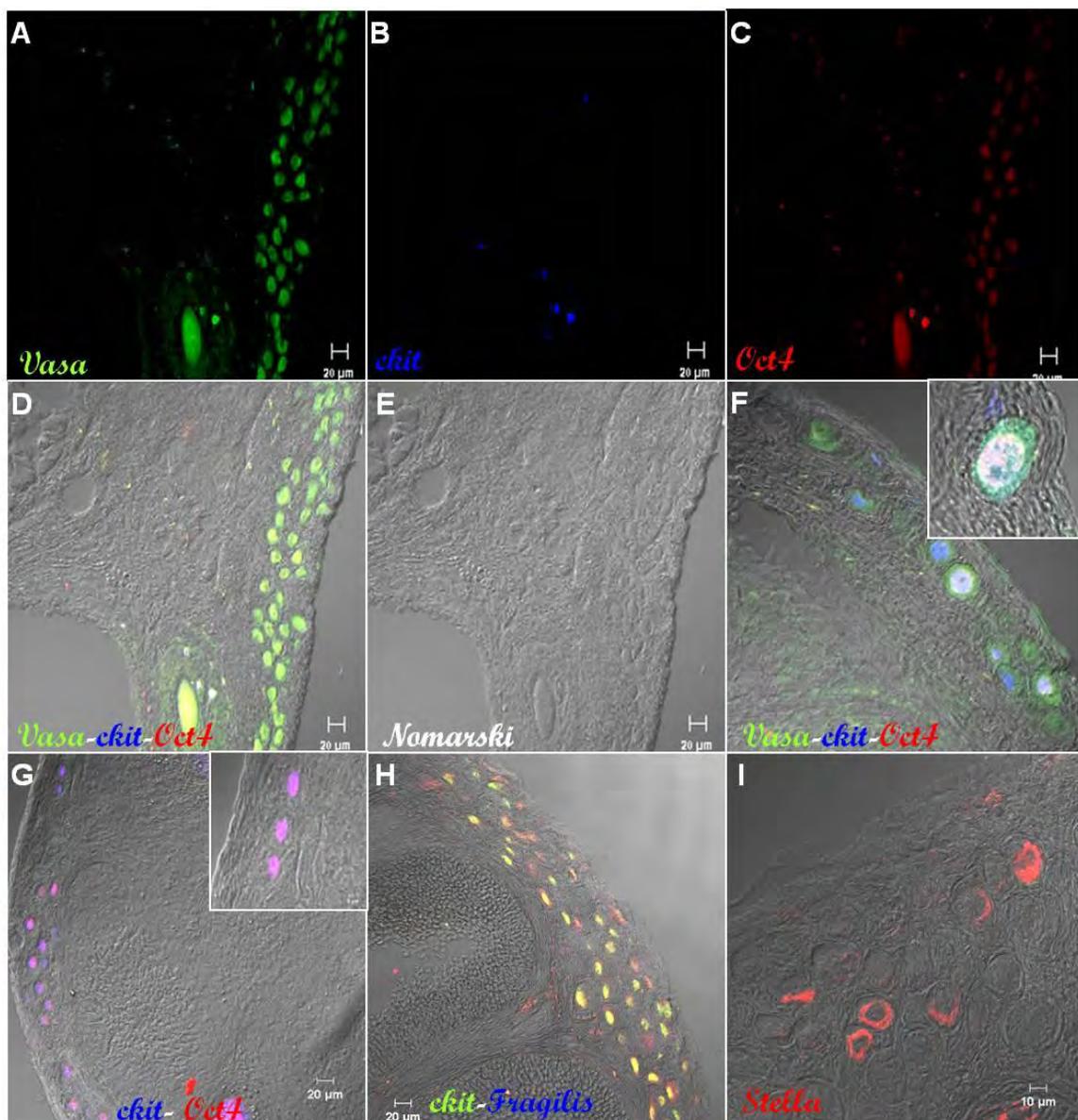


Figura 15. Ovario izquierdo de *A. jamaicensis*. (A-C) Visualización independiente de cada uno de los marcadores *Vasa*, *H3*, *Oct4*. (E) Visualización por la técnica de Nomarski, (F) Detección simultánea de los tres marcadores *Vasa*, *c-kit* y *Oct4* [20x] y se muestra el aumento 100x de una célula cortical que expresa los tres marcadores. (G) Colocalización de *c-kit* y *Oct4* [40x] y un aumento al 100x de la región cortical, donde se observa la expresión de estos dos marcadores. (H) Células periféricas positivas a dos marcadores de células troncales; *Ckit* y *Fragilis* [20x]. (I) Detección de *Stella* [40x].

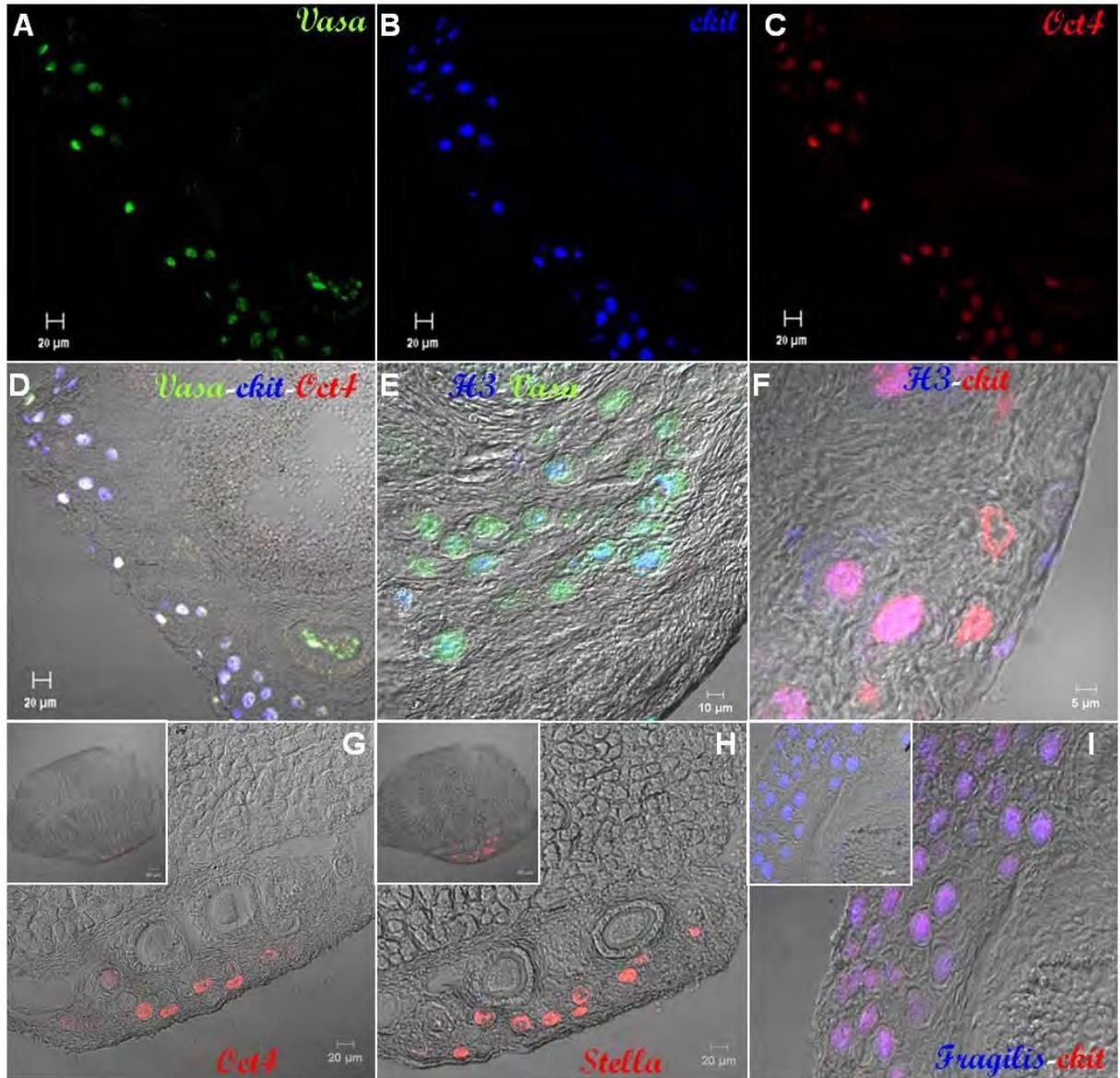


Figura 16. Inmunofluorescencia de ovario derecho de *G. soricina* de marcadores específicos de células progenitoras y troncales. (A-C) Visualización independiente de cada uno de los marcadores *Vasa*, *c-kit*, *Oct4* [20x]. (D) Visualización simultanea de los tres marcadores [20x]. (E) Detección del marcador de proliferación celular (*H3*) en combinación con un marcador de línea germinal (*Vasa*) [100x]. (F) Detección *H3*, colocalizando con un marcador de células troncales (*c-kit*). [100x]. (G) células corticales positivas a *Oct4* [40x] con una miniatura que muestra un vista general del ovario y la expresión *Oct4* [10x]. (H) Detección de la proteína del gen *stella*, relacionado con la diferenciación temprana de la línea germinal con una miniatura al 10x del ovario y la expresión de este marcador. (I) Visualización simultanea de dos marcadores *fragilis-c-kit* [100x].

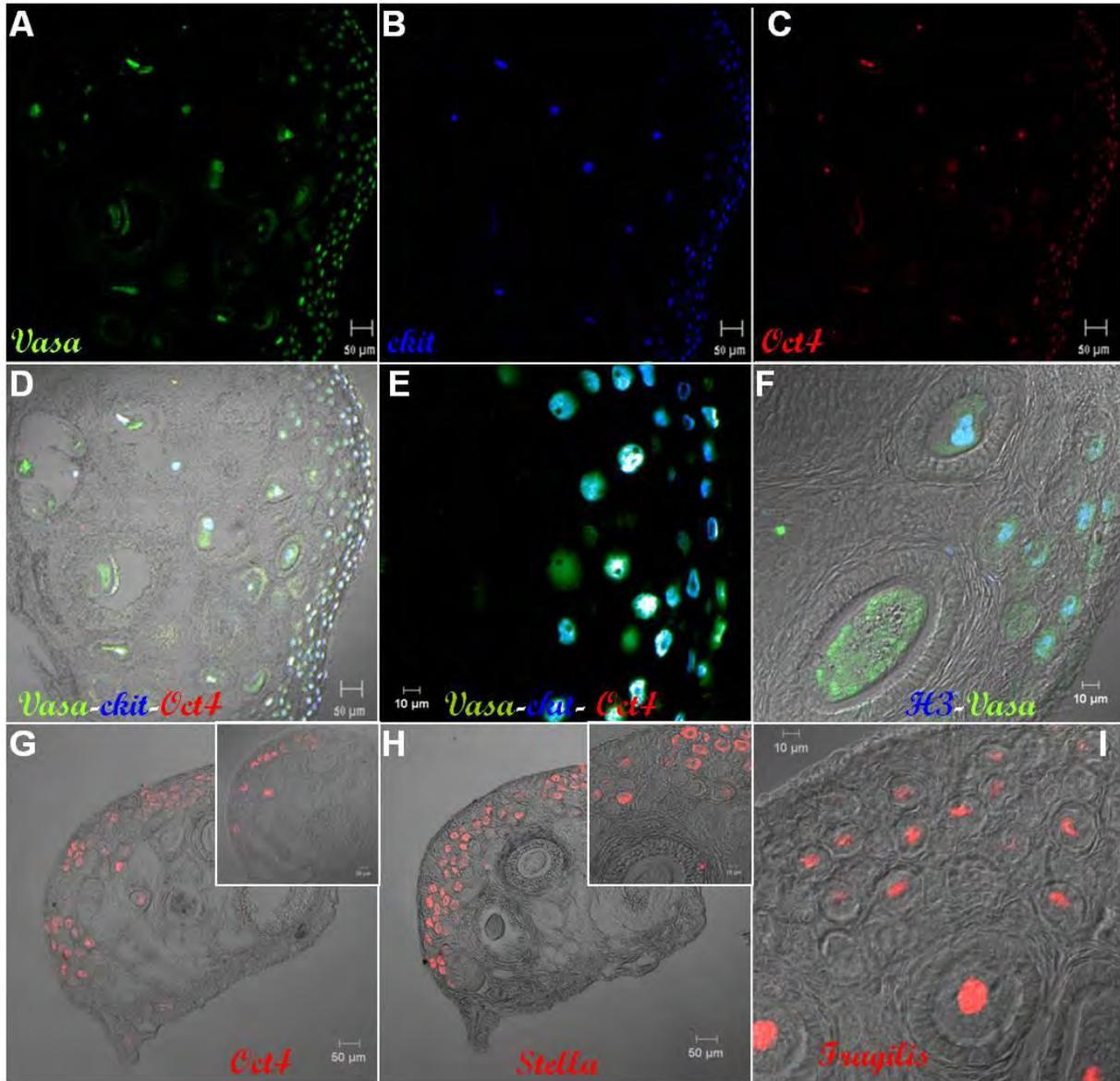


Figura 17. Detección simultánea por inmunofluorescencia de ovario izquierdo de *G. soricina* de marcadores específicos de células progenitoras y troncales. (A-C) Visualización independiente de cada uno de los marcadores *Vasa*, *c-kit*, *Oct4* [10x]. (D) Colocalización de los tres marcadores [10x]. (E) Visualización simultánea de *Vasa*, *c-kit*, *Oct4* a mayor detalle [10x]. (F) Detección de *H3* en combinación con *Vasa* [100x]. (G) Detección de *Oct4* [10x] con un aumento de la expresión de *Oct4* en las células corticales [20x]. (H) Visualización *stella* una proteína relacionada con la diferenciación temprana de la línea germinal [10x] con un aumento de su expresión en las células corticales. (I) visualización de *fragilis* marcador de línea germinal [100x].

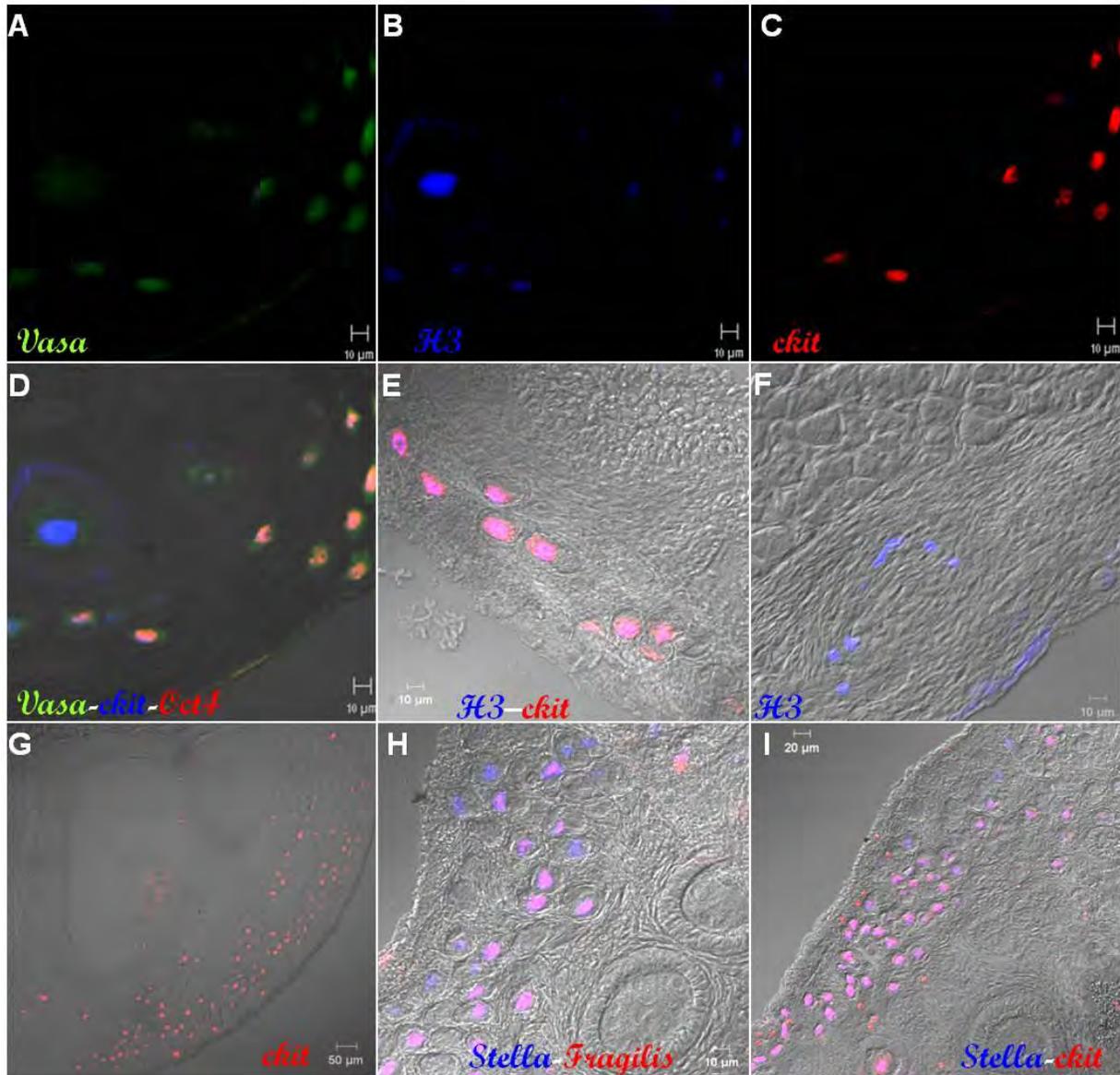


Figura 18. Inmunofluorescencia de ovario derecho de *S. liliun* de marcadores específicos de células progenitoras y troncales. (A-C) Visualización independiente de cada uno de los marcadores *Vasa*, *c-kit*, *Oct4* [100x]. (D) Combinación de los tres marcadores positivos en las CGCA [100x]. (E) Detección de *H3* y *c-kit* en las células de la región cortical del ovario [100x]. (F) Células positivas a marcador de proliferación celular *H3* [100x]. (G) Expresión del marcador *c-kit* [10x]. (H) visualización simultánea de dos marcadores relacionados con la diferenciación temprana de la línea germinal *Stella-fragilis* [100x]. (I) detección simultánea de dos marcadores *Stella* y *ckit*.

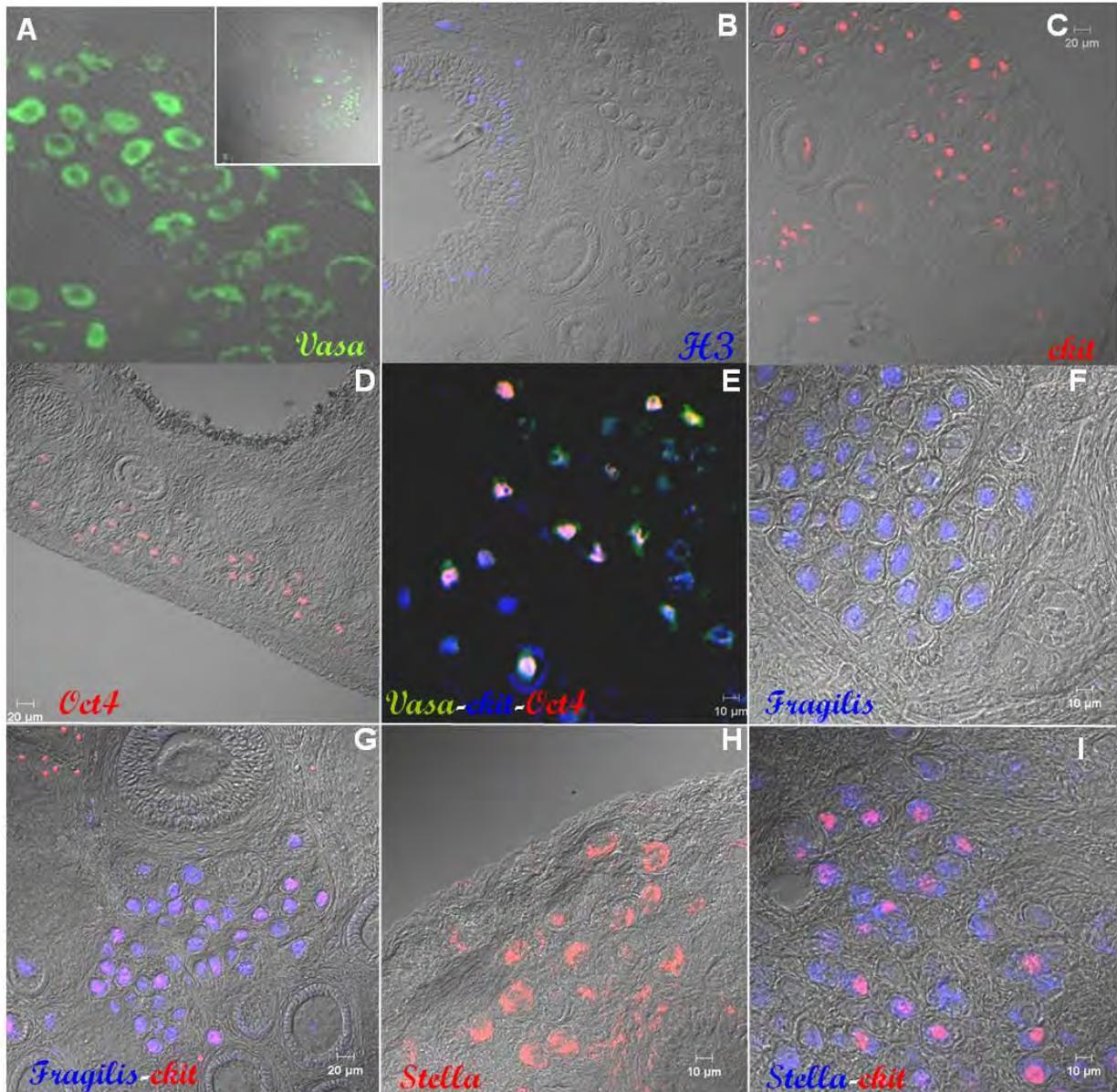


Figura 19. Expresión de de marcadores específicos de células progenitoras y troncales en el ovario izquierdo de *S. liliium*. (A) Visualización de un marcador de línea germinal *Vasa* [100x], con una vista general de su expresión en el ovario [10x]. (B) Detección de *H3* un marcador de proliferación celular. (C) Detección de la expresión de *c-kit* en células corticales del ovario. (D) células de la región cortical del ovario positivas a *Oct4*. (E) Visualización simultanea de tres marcadores *Vasa*, *ckit* y *Oct4* [100x]. (F) Detección de la proteína del gen *fragilis*. (G) Detección de *fragilis* colocalizando con *ckit* [100x]. [100x]. (H) Detección de la proteína del gen *stella*, relacionado con la diferenciación temprana de la línea germinal. (I) visualización simultanea de *stella-c-kit*, [100x].

DISCUSIÓN

Los resultados acerca de la organización general del tracto reproductor femenino en murciélagos, nos indican que estos animales al igual que el resto de los mamíferos donde se incluyen los humanos y roedores, exhiben un patrón similar debido a que estos presentan dos ovarios, un útero, un cérvix y una vagina, haciendo de estos animales un buen modelo de investigación en asuntos relacionados a la reproducción. Sin embargo, se ha reportado que diferentes especies de murciélagos muestran especializaciones funcionales del tracto algunas ovulan de un solo ovario, por lo que el ovario funcional suele ser de mayor tamaño incluso en ausencia de un cuerpo lúteo (Rasweiler, 1988; Rasweiler y Badwaik, 2000). Correlacionando esta información en base al peso de los ovarios, los resultados obtenidos concuerdan con lo antes citado, el ovario derecho fue ligeramente más pesado en las tres especies murciélagos. Sin embargo, en nuestras preparaciones histológicas el cuerpo lúteo solo se encontró en el ovario derecho, por esto consideramos que este dato somático no puede ser considerado para argumentar que el ovario izquierdo no sea funcional y este atrofiado, ya que no toma en cuenta la morfología interna del ovario, como la presencia de folículos que indican de manera indirecta, que se está dando el proceso de foliculogénesis y la ciclicidad ya sea estral o menstrual. Por ello realizamos un análisis histológico y un conteo folicular, para poder dar una conclusión más certera sobre la funcionalidad ovárica.

Reserva ovárica

En base a los parámetros establecidos en la prueba ovárica y realizando una analogía con los resultados obtenidos en los murciélagos observamos que *G. soricina* muestra el mejor patrón del conteo de reserva ovárica para ambos ovarios ya que muestra más ovarios con una reserva folicular normal, dos derechos y cuatro izquierdos aquí se refleja claramente que el peso no es un buen dato que indique la funcionalidad del ovario ya que no toma cuenta la morfología interna. Después sigue el patrón de *S. liliium*, mostrando un buen comportamiento tres de los cinco ovarios derechos son normales y tres izquierdos. Finalmente el que muestra un patrón más bajo es *A. jamaicensis*, donde solo dos ovarios izquierdos son normales y uno derecho. Con estos datos también podemos determinar que el ovario izquierdo en estas tres especies de murciélagos es funcional, al menos en la región en donde se colectó ya que encontramos un

mayor número de conteo de reserva ovárica normal en el izquierdo lo cual indica que es funcional.

La variación de los resultados obtenidos puede deberse a que las hembras se colectaron en diferentes épocas del año y al azar, donde la edad se calculaba de acuerdo con el desgaste de las piezas dentarias cuya observación puede sugerir si un ejemplar es adulto o juvenil. De esta manera, en nuestro estudio los ovarios empleados resultaron ser de hembras tanto juveniles como adultas y adultas preñadas, por lo que es importante determinar la edad de los individuos realizando un análisis más detallado (histológico) del desgaste dentario o en su caso evaluando el grado de osificación de epífisis de los huesos largos de las alas (Paz, 1986).

Morfología del ovario adulto

El hecho de que tanto el ovario derecho e izquierdo presenten folículos en diferentes estadios del ciclo, nos indica que dos procesos fundamentales para la reproducción se están llevando a cabo: la ovogénesis y la foliculogénesis.

La histología en los ovarios muestra claramente la presencia exclusiva del cuerpo lúteo en el ovario derecho, sin embargo; los folículos en sus diferentes estadios, se encuentran en ambos ovarios. El tipo folicular más abundante en las tres especies fue el folículo primario, lo que sugiere que existe un “pool” de folículos en espera de la etapa de crecimiento. En ambos ovarios de las tres especies de murciélagos estudiados encontramos folículos antrales, lo cual nos indica que el ovocito se está preparando para ser liberado desplazándose hacia la superficie del ovario, lo cual nos indica que están en época de reproducción.

Se ha reportado en la literatura que *Artibeus jamaicensis* presenta un patrón reproductor poliéstrico bimodal (Heithaus et al., 1975), y los picos de crías están relacionados con la disponibilidad de fruta, correlacionamos esta información con lo encontrado en el campo para el municipio de Yautepec. Las seis salidas al campo abarcaron tres estaciones del año primavera, verano y otoño encontrando cinco hembras gestantes en las tres estaciones lo que nos habla de un patrón poliéstrico, así como la morfología interna que evidencia la actividad continua de ambos ovarios por la presencia de folículos en diferentes estadios de crecimiento.

En *Artibeus jamaicensis* los folículos de Graaf se observaron en verano y otoño en ambos ovarios, lo cual nos indica que los dos son capaces de ovular por ello son funcionales, sin

embargo; en las preparaciones histológicas solo apreciamos la presencia de cuerpo lúteo en el ovario derecho lo que indica que se llevo a cabo el proceso de ovulación en este. Fleming (1971) reportó una ovulación alterna para *Artibeus jamaicensis* pero en su estudio este autor no realizo un análisis histológico de los ovarios solo hizo observaciones macroscópicas que no le permitieron apreciar y determinar la ovulaciones sucesivas de los ovarios, A pasar de estas limitaciones su estudio concuerda con nuestros hallazgos que muestran una ovulación alterna, por la presencia de folículos de Graaf en ambos ovarios y la presencia de cuerpo lúteo en el ovario derecho, también estos datos nos indican que ambos ovarios son funcionales ya que cuentan con todas las características morfológicas para serlo. También sugerimos que la presencia exclusiva del cuerpo lúteo se debe a una estimulación preferencial del oviducto por uno de los ovarios el cual presenta el folículo pre-ovulatorio más desarrollado, como ocurre en los murciélagos *pteropodidos* y *emballonuridos* (Marshall, 1953; Gopalakrishna y Murthy, 1960; Gopalakrishna y Karim, 1971).

El patrón reproductivo de *G. soricina* se han estudiado ampliamente, los primeros informes sugirieron que *G. soricina* es monoestral (Hamlett, 1934), pero trabajos posteriores han sugerido que es poliestrica en México (Cockrum, 1955) y Colombia (Tasitt, 1966). Esta contradicción puede explicarse al hecho de que este orden de animales tiende a cambiar ciertas conductas reproductivas en base al clima, latitud, disponibilidad de alimentos, lo que los hace ser un fascinante modelo de estudio. Por ello, las predicciones obtenidas solo las sustentamos para el Municipio de Yautepec. Capturamos cinco hembra preñadas de *G. soricina*, en dos temporada verano y otoño; lo que indica un patrón poliéstrico, mas el análisis histológico de los ovarios nos permite corroborar esta información ya que identificamos varios tipos foliculares (folículo primordial, primario, secundario, pre-antral y antral) en diferentes proporciones, también localizamos cuerpos lúteos en las tres estaciones (primavera, verano y otoño) en el ovario derecho lo que indica indirectamente el proceso de ovulación ya que el cuerpo lúteo se forma una vez que el ovocito ha sido ovulado y las células remanentes del folículo se transforman a células luteínicas, estos resultados nos indican un patrón poliestrico.

En *G. soricina* en verano encontramos cuatro folículos de Graaf solo en el ovario izquierdo lo que nos indica que en ese momento el ovario izquierdo es el que está activo; en otoño observamos dos folículos de Graaf en ambos ovarios, estas observaciones reflejan una ovulación alterna en este murciélago, lo cual concuerda con Rasweiler (1970), quien reporto ovulaciones alternas y sucesivas de un mismo ovario a partir de un estudio histológico.

Fleming y col. (1972) reportaron que *S. liliium* presenta un patrón reproductivo poliestro bimodal, reproduciéndose dos veces al año, una vez en la estación seca y una vez en la temporada de lluvias, también reporta picos de actividad reproductiva en tres períodos durante todo el año, generalmente de febrero hasta junio, octubre y diciembre. En los meses de colecta encontramos hembras gestantes en julio, agosto (temporada de lluvias) y octubre (temporada seca), esta información concuerda con la reportada por Fleming y col. (1972), lo cual sustenta que las hembras de *S. liliium* en el municipio de Yautepec muestran un patrón poliestríco continuo. En *S. liliium* encontramos folículos de Graaf en verano y otoño en ambos ovarios, pero también encontramos este tipo folicular en un solo ovario, por ejemplo en verano localizamos 12 folículos de Graaf en el ovario izquierdo y un folículo de Graaf en otoño solo en el derecho, sin embargo los sistemas de apareamiento de *Sturnira liliium* no han sido ampliamente estudiados, por lo que no se sabe con exactitud el tipo de ovulación, es por ello que no podemos comparar nuestros resultados, pero sugerimos en base al análisis histológico que este murciélago presenta una ovulación alterna, por la presencia de folículo de Graaf en ambos ovarios. Aunque al igual que en *A. jamaicensis* y *G. soricina* el cuerpo lúteo solo se observa en el ovario derecho por lo que sugerimos que presenta una estimulación preferencial del oviducto por uno de los ovarios el cual presenta el folículo pre-ovulatorio más desarrollado.

Con la histología del ovario derecho e izquierdo y el análisis del conteo folicular en las tres especies de murciélagos podemos sugerir que morfológicamente ambos ovarios son funcionales y presentan una ovulación alterna.

Caracterización de las células localizadas en la región cortical

En ambos ovarios de los murciélagos estudiados, se realizó un hallazgo interesante, se identificó un grupo de células localizadas en la región cortical, cuyas características ultraestructurales muestran algunas características semejantes a la reportadas por Chuaire y col. (2002) y por Zamboni y Merchant (1973) para células germinales. Es decir, estas células presentan una forma redonda bien definida, un núcleo prominente, varios nucléolos, gotas de lípidos y glucógeno, sin embargo; algunas de estas presentan células fusiformes a su alrededor. Borum (1961) y Beaumont y Mandl (1963) describen un tipo celular rodeado por un epitelio aplanado que presenta características semejantes a las células fusiformes que en conjunto denominan folículo primordial.

Sin embargo, pensamos que este tipo celular cortical por la morfología que exhibe, así como, la afinidad a marcadores de células troncales, línea germinal y proliferación celular no permite agruparlos en uno de estos dos tipos celulares. Recientemente se ha abierto un nuevo campo de investigación el cual ha proporcionado una gran cantidad de evidencia que va en contra del pensamiento tradicional (Zuckerman, 1951), el cual estableció que las hembras cuentan con una *pool* no renovable de los ovocitos que se agotan durante la vida posnatal, conduciendo a una insuficiencia ovárica, estos reportes involucra la presencia de células con actividad mitótica en ovarios adultos que mantienen la renovación de ovocitos en la vida adulta proceso denominados *Neo-ovogénesis* (Jonhson *et al.*, 2004). Desde su identificación en ovarios adultos de *D. melanogaster* y ratón (Jonhson *et al.*, 2004, 2005) no existe mucha información acerca de este nuevo tipo celular que en la mayoría de los reportes se les denomina células progenitoras de la línea germinal. En base al uso de marcadores como *Vasa*, *stella*, *Oct4*, y *c-kit* se han caracterizado a estas células (Duke 1967; David *et al.*, 1979), con cultivos y trasplantes en ovarios adultos depletados de células germinales se ha observado una renovación de ovocitos lo que indica cierto grado de potencialidad en ellas ya que permite la formación de ovocitos *de novo* (Tilly *et al.*, 2009).

En este estudio el grupo de células corticales identificadas en los ovarios de quirópteros adultos se denominaron Células Germinales Corticales Adultas (CGCA), las cuales fueron caracterizadas con la expresión de seis marcadores específicos de células troncales, línea germinal y proliferación celular, escogidos y utilizados en base a las referencias publicadas identificándolos como marcadores específicos de esos linajes celulares.

Los resultados de las inmunofluorescencias muestran la expresión de *c-Kit* en el citoplasma de las células localizadas en la región cortical del ovario, los reportes que hay acerca de *c-Kit* nos dicen que es un receptor de tirosina cinasa codificado por el proto-oncogén *c-Kit* (Dong-Ja *et al.*, 2006), el cual es un marcador de superficie celular utilizado para la identificación de ciertos tipos de células progenitoras (Galli *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 2003). Se ha demostrado sus funciones en el ovario *in vivo* e *in vitro*, las cuales incluyen el establecimiento de las células germinales primordiales (CGPs), la activación de los folículos primordiales, la supervivencia y crecimiento del ovocito, la proliferación de células de la granulosa y células de la teca, y el mantenimiento de la competencia meiótica (Carlsson *et al.*, 2006; Hutt *et al.*, 2006). En el ovario postnatal existe poca información acerca *c-Kit*, Motro y Bernstein (1993) nos dicen que en el ratón, ARNm y proteínas de *c-Kit* se encuentran en CGPs y en ovocitos de todas las etapas del

desarrollo folicular. Por su parte, Clark y col. (1996) reportan lo mismo para ovinos y Silva y col. (2006) lo reportan para caprinos. Estudios *in vivo* han demostrado que una mutación en c-kit induce esterilidad en ratones, ya que CGPs no sobreviven durante la ovogénesis (Buehr et al., 1993). Estudios *in vitro* han demostrado que la activación c-Kit regula negativamente la apoptosis en las CGPs (Sakata et al., 2003), lo que demuestra que c-kit es esencial para la supervivencia y mantenimiento de las CGPs.

De acuerdo con esta información, los resultados de la expresión positiva de la proteína de c-kit en el citoplasma de los agregados localizados en la región cortical apoyan nuestra hipótesis, ya que c-Kit es un marcador de superficie de identificación de células progenitoras, necesario para el mantenimiento y supervivencia de las CGPs. Esto sugiere, que los grupos de células localizadas en la región cortical son células de la línea germinal. Sin embargo, conociendo que en el ovario adulto c-Kit se expresa en los ovocitos de todos los estadios foliculares, podría tratarse de folículos primordiales.

Empleando el marcador *Oct4* en las células de la región cortical del ovario, observamos que la expresión de la proteína fue similar al patrón reportado en la literatura (Anderson *et al.*, 2007; Niikura *et al.*, 2009), donde se señala que las células germinales primordiales son positivas a *Oct4* desde que arriban a la cresta gonadal. La expresión de *Oct-4* se detecta en el núcleo de las células germinales, al igual que en las CGCA observadas en este estudio. Conociendo que *Oct-4* es un factor de transcripción implicado en la regulación de la pluripotencialidad de las células durante el desarrollo embrionario y que su expresión se restringe a células troncales y células germinales embrionarias (Cheng et al., 2004), se puede sugerir que las CGCA localizadas en los ovarios de los murciélagos pudieran corresponder con algunos de estos linajes. Sin embargo, también se sabe que *Oct-4* en etapas postnatales se expresa en los ovocitos en etapas tempranas de la foliculogénesis (Gilbert, 2005), lo que coincide con nuestros resultados además de identificar la expresión de *Oct4* en las CGCA se observo en algunos ovocitos localizados dentro de folículos. Estas referencias sobre la expresión de *c-Kit* y *Oct4* y los resultados de los perfiles de inmunofluorescencia para estos dos marcadores justifica la idea que estos agregados celulares con algunas características morfológicas de células germinales localizadas en la región cortical del ovario, podrían corresponder a células progenitoras relacionadas a la línea germinal.

Para ahondar en este hecho, se estudio el patrón de expresión de la proteína del gen *Vasa*. Las investigaciones sobre la expresión de *Vasa* indican que es un marcador de células germinales con un patrón de expresión citoplasmático, *Vasa* es un componente esencial del plasma germinal el cual se requiere para la determinación de las células germinales primordiales (Saffman y Lasko, 1999), posteriormente la expresión de *Vasa* está dada en las células germinales durante la migración de estas hacia la cresta gonadal y más tarde en la gametogénesis y finalmente su expresión se restringe a los ovocitos (Anderson *et al.*, 2007). En el ratón y la rata los genes y la proteína de *Vasa* se expresan específicamente en el linaje de células germinales (Fujiwara *et al.*, 1994; Komiya y Tanigawa, 1995). Comparando esta información con los resultados de la inmunolocalización de *Vasa* en el citoplasma de las células corticales del ovario, nos brindan la pauta para mencionar que estas células corticales son pertenecientes al linaje germinal.

Otros dos marcadores específicos de línea germinal son *fragillis* y *stella* los cuales se expresan en grupos de células capaces de generar células germinales (Gilbert, 2005), sin embargo; *fragillis* se expresa en células somáticas y células germinales, pero la expresión de *stella* esta restringida a células cuyo destino final es germinal, estos dos marcadores y *Vasa*, junto con los resultados que muestran la expresión de *fragillis* en el citoplasma y *stella* en el núcleo nos permite justificar que estos agregados celulares localizados en la región cortical del ovario son células relacionada al linaje germinal.

Uno de los principales parámetros que permiten clasificar las células troncales como tal es su capacidad de proliferación y manteniéndose al mismo tiempo en un estado indiferenciado (autorenovación) [Fuchs y Segre, 2000]. En este estudio, una evidencia certera de que algunas de las CGCA están experimentando división celular es la expresión de Histona 3 (H3), debido a que la fosforilación singular de H3 en el residuo Ser10 es parte de un mecanismo molecular de la condensación cromosómica (Hendzel *et al.*, 1997). Al contrario de otras histonas que participan en el ciclo celular como H1, donde la fosforilación de esta ocurre durante todo el proceso, la fosforilación de la histona 3 es bajo en la interfase de las células y se produce exclusivamente durante la mitosis (Hendzel *et al.*, 1997). En células de mamíferos, la fosforilación de H3 es necesaria para iniciar la fosforilación durante la profase, es máxima durante la metafase, disminuye durante la anafase y se pierde durante la telofase (Gurley *et al.*, 1978; Paulson y Taylor 1982). Por lo tanto, la expresión de H3 es un buen indicador que se está llevando este proceso celular y nos indica que estas células están en la etapa de metafase

en la cual aparece el huso mitótico y el cinetocoro y los cromosomas muestran el máximo acortamiento y condensación (Alberts *et al.*, 2002; Gilbert, 2005).

Al inmunolocalizar la expresión de dos marcadores de células troncales *c-Kit* y *Oct4* en las células localizadas en la región cortical de ambos ovarios en estas especies de murciélagos, nos indican que estas células tienen cierta potencialidad, ser positivas a estos dos marcadores nos permite ubicarlas como células progenitoras. La expresión de *Vasa*, *fragillis* y *Stella*, nos indica una relación con el linaje germinal y la expresión de *H3* nos indica que estas células están llevando a cabo división celular es decir que están proliferando. Finalmente la colocalización de marcadores de células troncales y línea germinal en los perfiles de inmunofluorescencia de estos agregados celulares corticales identificados como CGCA y la semejanza de estas células con las características reportadas por Johnson y col. (2004) y Niikura y col. (2009), en las células con actividad mitótica localizadas en la superficie del ovario justifica la idea que estas son células progenitoras de la línea germinal y pudieran estar contribuyendo a la renovación de ovocitos de *ovo*.

Dentro de las estrategias reproductoras en murciélagos, no se puede hablar de un patrón de reproducción típico ya que las diferentes especies enfrentan condiciones ambientales variables, por lo que han desarrollado diversas adaptaciones (Rasweiler, 1993), por ejemplo, las tres especies de murciélagos que se usaron en este estudio, son especies tropicales, una vez que han alcanzado la madurez sexual, estos murciélagos presentan un patrón reproductor poliéstrico continuo representado por más de dos periodos de nacimiento (Sánchez-Hernández y Romero-Almaraz, 1995), relacionados con la disponibilidad de frutas (Heithaus et al. 1975). Estos murciélagos al vivir en la zona tropical, no se reproducen estacionalmente debido a que los recursos son relativamente constantes durante todo el año (Racey y Entwistle, 2000), ya que los eventos reproductivos en estas especies tropicales, se basa en la disponibilidad de alimento y los factores climáticos, es por ello que no llevan a cabo el proceso de hibernación donde los ovarios se caracterizan por presentar folículos de Graaf con un antro pequeño y grandes cantidades de glucógeno que le proporcionan los requerimientos energéticos necesarios al ovocito (Rasweiler y Badwaik, 2000). En las preparaciones histológicas de los murciélagos observamos folículos de Graaf con un antro grande y bien definido, lo cual nos indica que no existe un patrón de estacionalidad. Por esta razón sugerimos que los murciélagos de zonas templadas al reproducirse estacionalmente y presentar el proceso de hibernación, el pool establecido de células germinales les basta para cumplir su ciclo reproductivo, no así en los

murciélagos tropicales donde estos se reproducen continuamente necesitando un aporte extra al pool establecido, este aporte la estaría brindando las células progenitoras de la línea germinal (CGCA).

CONCLUSIONES

1. El estudio morfológico del ovario derecho e izquierdo en las tres especies de murciélagos filostómidos, permitió evidenciar la presencia de los folículos, el cual indica que el proceso de foliculogénesis esta activo e indirectamente observamos la ovulación por la presencia de un cuerpo lúteo. La analogía del conteo folicular con los exámenes realizados en humanos nos permite concluir que ambos ovarios son funcionales, ya que los dos ovarios cuentan con una reserva folicular normal.
2. El conteo folicular y el análisis estadístico en base a la prueba RxC indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número de folículos en sus diferentes etapas entre el ovario derecho e izquierdo para las tres especies de murciélagos.
3. Los resultados obtenidos en este estudio por los perfiles de inmunofluorescencia y por el análisis histológico realizado en base a microscopia de campo claro y microscopia electrónica aunado al conjunto de estudios anteriormente citados, brindan una evidencia certera que este grupo de células localizadas en la región cortical del ovario, las CGCA podrían ser células progenitoras de la línea germinal las cuales contribuirían a la renovación de ovocitos en ovarios de hembras adultas en las especies de murciélagos filostómidos (*A. jamaicensis*, *G. soricina* y *S. lillium*). Sin embargo el mecanismo específico por el cual este fenómeno se lleva a cabo sigue siendo un paradigma pero seguramente están involucradas cascadas de genes y un ambiente específico.
4. Por la información disponible y la generada en el presente estudio sobre los patrones reproductivos para cada una de los tres murciélagos filostómidos *Artibeus jamaicensis* (Sánchez et al., 1990), *Glossophaga soricina* y *Sturnira lillium* (Ceballos y Miranda, 1986), podemos concluir que estos presentan un patrón poliestrico continuo. Al no ser estacionales, estos murciélagos tropicales requieren un aporte extra de ovocitos a su reserva que permita reproducirse continuamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P, (2004), *The cell*, New York and London: Garland Science.
2. Albrecht K. y Eicher E., (2001), Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology*, 240: 92–107.
3. Álvarez T. y Gonzales Quintero L., (1970), Análisis poliginico del contenido gástrico de murciélagos Glossophaginae de México. *Anales de la escuela nacional de ciencias biológicas Mexico*, 18:137-165.
4. Anderson R., Copeland T. K., Scholer H., Heasman J. y Wylie C., (2000), The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, 91:61-68.
5. Anderson R. A., Fulton N., Cowan G., Coutts S. y Saunders F., (2007), Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *Developmental Biology*, 7: 136.
6. Arata A. A., Vaughn J. B. y Thomas M. E., (1967), Food habits of certain Colombian bats. *Journal of Mammalogy*, 48:653-655.
7. Arce M., Loayza E., Marroquín P. y Carvallo F. (2009), Cuento de folículos antrales como predictor de respuesta ovárica y de resultados de FIV/ICSI. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 55:37-42.
8. Arita, H. T. y Ceballos G., (1997), The mammals of Mexico: distribution and conservation status. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 2:33–71.

B

9. Baltus A. E., Menke D. B., Hu Y. C., Goodheart M. L., Carpenter A. E., de Rooij D. G. y Page D. C. (2006), In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics*, 38: 1430–1434.
10. Barlow J. C. y Tamsitt J. R., (1968), Twinning in American leaf-nosed bats (Chiroptera: Phyllostomidae). *Canadian Journal of Zoology* 46:290–292.
11. Barnett K. R., Schilling C., Greenfeld C. R., Tomic D. y Flaws J. A., (2006), Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, 5:537-555.
12. Beaumont H. M. y Mandl A. M., (1963), A quantitative study of primordial germ cells in the male rat. *Journal of Embryology y Experimental Morphology*, 11: 715–740.
13. Berta P., Hawkins J. R., Sinclair A. H., Taylor A., Griffiths B. L., Goodfellow P. N. y Fellous M., (1990), Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. *Nature*, 348: 448–450.

14. Bleier W. J., (1979), Embryology. Pp. 379–386 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III* (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 16:1–441.
15. Bonaccorso F. J., (1979), Foraging and reproductive ecology in a Panamanian bat community. *Bulletin of the Florida State Museum*, 24:359-408.
16. Borum K., (1961), Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental Cell Research*, 24:495–507.
17. Borum K., (1967), Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. *Experimental Cell Research* 45: 39-47.
18. Bowles J., Bullejos M. y Koopman P., (2000), Screening for novel mammalian sex-determining genes using expression cloning and microarray approaches. *Australian Biochemist*, 31: 4–6, 2000.
19. Brennan J., Karl J. y Capel B., (2002), Divergent vascular mechanisms downstream of *Sry* establish the arterial system in the XY gonad. *Developmental Biology*, 244: 418–428.
20. Buehr M., McLaren A., Bartley A. y Darling S., (1993), Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Developmental of Dynamic*, 198:182-189.
21. Bukovsky A., Michael R C., Svetlikova M. y Upadhyaya N. B., (2004), Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2:1-30.
22. Bullejos M. y Koopman P., (2001), Spatially dynamic expression of *Sry* in mouse genital ridges. *Developmental Dynamics*, 221: 201–205.
23. Bullejos M., Bowles J. y Koopman P., (2002), Extensive vascularization of developing mouse ovaries revealed by caveolin-1 expression. *Developmental Dynamics*, 225: 95–99, 2002.
24. Byskov A. G., (1982), Primordial germ cell and regulation of meiosis, In Austin C. R., Short R. V., (eds.), *Reproduction in mammals Germ cells and Fertilization*, 2nd ed. London Cambridge University Press, 1-16.
25. Byskov A. G., (1986), Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiology Reviews*, 86:71-117.

C

26. Carlsson I. B., Laitinen M. P. E., Scott J. E., Louhio H., Velentzis L., Tuuri T., Aaltonen J., Ritvos O., Winston R. M. L. y Hovatta O. (2006), *Kit* ligand and *c-Kit* are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction*, 131:641-649.
27. Ceballos G. y Miranda A., (1986), *Los mamíferos de Chamela Jalisco*, Instituto de biología, Universidad Autónoma de México, México, D.F.
28. Chang M. Y., Chiang C. H., Hsieh T. T., Soong Y. K. y Hsu K. H., (1998), Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility*,

69:505–10.

29. Cheng L., Thomas A., Roth L. M., Zheng W., Michael H. y Karim F. W., (2004), OCT4: a novel biomarker for dysgerminoma of the ovary. *American Journal of surgical pathology*, 10:1341-1346.
30. Chiquoine A. D., (1954), The identification origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The Anatomical Record*, 118:135-145.
31. Chuairé L. y Sánchez M. C., (2002), Células germinativas primordiales femeninas: origen y migración hacia los primordios gonadales. *Colombia Medica*, 33:171-178.
32. Clark D. E., Tisdall D. J., Fidler A. E. y McNatty K. P., (1996), Localization of mRNA encoding c-Kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106:329-335.
33. Cockrum E. L., (1955), Reproduction in North American bats. *Transactions of the Kansas Academy of science*, 58:487-511.
34. Cockrum E. L. y Bradshaw G. Van R., (1963), Notes on mammals from Sonora, Mexico. *Amer. Mus. Novitates*, 2138:1-9.
35. Cooper G. M. (2002), *La célula*, 2ª ed, Madrid Marban, 421-452.
36. Crichton E. G. y Kruttsch P. H. (1985), Reproductive biology of the female leaf-nosed bat *Macrotus californicus*, in southwestern United States, 1 A morphometric analysis of the annual ovarian cycle. *The American journal of anatomy* 173:69-87.

D

37. Davis, W. B., (1970), The large fruit bats (genus *Artibeus*) of middle America, with a review of the *Artibeus jamaicensis* complex. *Journal of Mammalogy*, 51:105–122.
38. David, G.F., Anand K.T.C. y Baker, T.G., (1974), Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41: 447-451.
39. De Santa Barbara, P., B. Moniot, F. Poulat and P. Berta., (2000). Expression and subcellular localization of *SF-1*, *SOX9*, *WT1*, and *AHM* proteins during early human testicular development. *Developmental Dynamics*, 217:293-298.
40. Dolci S. Williams D. E., Ernst M. K., Resnick J. L., Brannan C. I., Lock L. F., Lyman S. D., Boswell H. S. y Donovan P. J. (1991), Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, 352:809-811.
41. Dong-Ja Kim, Myung-Hoon Lee, Tae-In Park, y Han-Ik Bae., (2006), Expression and Mutational Analysis of c-kit in Ovarian Surface Epithelial Tumors. *Journal of Korean Medical Science*, 1: 81–85.
42. Duke K.L., (1967), Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slow loris, *Nycticebus cougang*. *Folia Primatologica (Basel)* 7: 150-154.

E

43. Eddy E. M., (1974), Fine structural observation on the form and distribution of *nuage* in the germ cells of the rat. *The Anatomical Record*, 178:731-758.
44. Eisenberg J. F., (1989), *Mammals of the Neotropics, the northern Neotropics*. The University of Chicago Press, Illinois 1:1-449.
45. Elizondo L.H., (1999), UBIs de mamíferos de Costa Rica, INBio.
46. Evelyn M. y Stiles D., (2003), Roosting Requirements of Two Frugivorous Bats (*Sturnira lilium* and *Artibeus intermedius*) in Fragmented Neotropical Forest. *Biotropica*, 3:405-418.

F

47. Fenton M. B., (1992), Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica* 24:440-446.
48. Fleming T. H., (1971), *Artibeus jamaicensis* delayed embryonic developed in a neotropical bat. *Science*, 171:402-404.
49. Fleming T. H., Hooper E. T. y Wilson D. E., (1972), Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. *Ecology*, 53:555-569.
50. Forman G. L., y Genoways H. H., (1979), Sperm morphology. Pp. 177-204 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. Part III (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 16:1-441.
51. Fuchs E. y Segre J., (2000), Stem Cell: a new lease on life. *Cell*, 100: 143-155.
52. Fujimoto T., Miyayama T. y Fujita M., (1977), The origin migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record*, 188:315-330.
54. Fujimoto T., Yoshinaga K. y Kono I., (1985), Distribution of fibronectin on the migratory Pathway of primordial germ cell in mice. *The Anatomical Record*, 211:271-288.
55. Fujiwara Y., Komiya T., Kawabata H., Sato M., Fujimoto H., Furusawa M. y 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 Science USA*, 91:12258-12262.
56. Fukuda O., (1976), Ultrastructural of primordial germ cells in human embryo. *Virchows Arch* 20:85-89.
57. Furukawa R. y Fechheimer M., (1997), The structure function and assembly of actin filament bundles. *International Reviews Cytology*, 175:29-90.

G

58. Galli S. J., Zsebo K. M. y Geissler E. N., (1994), The *kit* ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology*, 55:1-96.
59. Gannon, M.R., Willing, M.R. y Knox, J.J., (1989), *Sturnira lilium*. *Mammalian Species*, 333:1-5.
60. Gardner A. L., (1977), Feeding habits, pp. 293-350. In: Baker, R.J., Jones Jr., J.K., Carter, D.C.

(eds.), Biology of bats of the new world family Phyllostomatidae, Part II. Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ.13: 1-364.

61. Geijse K., Cox J. and Grosschedl R., (1992), The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates the assembly of functional nucleoproteins structures. *Cell*, 69:185-195.
62. Genneer F. *Histología*. Editorial Panamericana. 2ª Edición. México. 1989, pp. 46-72.
63. Gilbert F. S., (2005), *Biología del desarrollo*, Séptima edición, Ed. Medica panamericana, España, pp. 881.
64. Godin I., Wylie C. y Heasman J., (1990), Genital ridges exert long-range effects of mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*, 108:357-363.
65. Goodwin, G. G., y Greenhall A. M., (1961), A review of the bats of Trinidad and Tobago. Descriptions, rabies infection, and ecology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 122:187-302.
66. Gomperts M., Garcia-Castro M., Wylie C. y Heasman J., (1994), Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*, 120:135-141.
67. Gopalakrishna A. y Murthy K. V. R., (1960), Utero ovarian junction in two species of bats. *Bulletin of the zoological Society, Collage of Science, Nagpur* 3:19-22.
68. Gopalakrishna A. y Karim K. B., (1971), Localized progestational endometrial reaction in the uterus of the Indian fruit-bat, *Rousettus .leschenaulti* (Desmarest)-Megachiroptera. *Journal of the Bombay Natural History Society*, 74:1-16.
69. Graves J. A., (1998), Interactions between *SRY* and *SOX* genes in mammalian sex determination. *Bioessays*, 20: 264-269.
70. Gruidl M. E., Smith P. A., Kuznucki K. A., McCrone J. S., Kirchner J., y Rousell D. L. (1996) The human *VASA* gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93:13837-13842.
71. Grzimek B, (1990), Bats. Pp. 584-611 in B. Grzimek, ed. *Grzimek's Encyclopedia of Mammals*, Vol. 1, 2 Edition. New York, NY: Mcgraw-Hill Publishing
72. Guerrero y Enríquez, A., (1994), Patrones de reproducción de tres especies del género *Pteronotus* (Chiroptera: Mormoopidae) en la Costa Sur Occidental de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Morelos. Cuernavaca, Morelos, pp. 1-51.
73. Gurley L. R., Danna J. A., Barhan S. S., Deaven L. L. y Tobey R. A., (1978), Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *European Journal Biochemistry*, 84:1-15.

H

74. Hacker A., Capel B., Goodfellow P. y Lovell-Badge R., (1995), Expression of *Sry*, the mouse

sex determining gene. *Development* 121: 1603–1614, 1995.

75. Handley C. O., (1966), Descriptions of new bats (*Chiroderma* and *Artibeus*) from Mexico. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 36:297–301.
76. Hansen L. M., Batzer F. R., Gutmann J. N., Corson S. L., Kelly M. P., Gocial B., (1996), Evaluating ovarian reserve: FSH and estradiol variability during cycle days 2-5. *Human Reproduction*, 11-3:486-9.
77. Hall E. R., (1981), *The mammals of North America*. Second edition. John Wiley & Sons, New York 1:1–600 1 90.
78. Hamlett, G.W., (1934), Uterine bleeding in a bat *Glossophaga sorina*. *The Anatomical Record*, 60: 9-17.
79. Hamlett, G.W. (1935). Notes on the embryology of a phyllostomatid bat. *American Journal of Anatomy*, 59: 327.
80. Heithaus, E. R., Fleming T. H and. Opler P. A., (1975), Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. *Ecology*, 56:841–854.
81. Hendzel M. J., Wei Y., Mancini M. A, Hooser A., Ranalli T., Brinkley B. R., David P. Bazett-Jones y David Allis C., (1997), Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106:348-360.
82. Hood, C. S. y Smith J. D., (1983), Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomid bats. *Occasional Papers, The Museum Texas Tech University* 86:1–38.
83. Howell D. J., (1974), Acoustic Behavior and feeding in glossophagine bats. *Journal of Mammalogy*, 55:293-308.
84. Hubner K., Fuhrmann G., Christenson L. K., Kehler J., Reinbold R., Word J., Strauss, J. F. III., Boiani M., Scholer H. R., (2003), Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 300:1251-1256.
85. Hutt K.J., McLaughlin E.A. y Holland M.K. (2006), *Kit* ligand and *c-Kit* have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogénesis. *Molecular Human Reproduction*, 2:61-69

I

86. Ishiyama C. V., (1981), Estado funcional de los ovarios en *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Revista de ciencias*, 73:85-94.
- 87 Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática, Anuario Estadístico del Estado de Morelos, Edición 1198.

J

88. Jeon U. W. y Kennedy J. R., (1973), The primordial germ cells in early mouse embryos; light and electron microscopic studies. *Developmental Biology* 31: 275-284.
89. Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J. y Tilly J. C., (2004), Germ stem cells and follicular

renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 42 (80): 145-150.

90. Johnson J., Skaznik-Wikiel M., Lee H. J. , Niikura Y. y Tilly J. C., (2005a), Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle*, 4: 1471–1477.
91. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly J. C., Cortes M. L., Forkert R., Spitzer T. y Lacomini J., (2005b), Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells derived from bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 122:303– 315.
92. Jones J. K. y Phillips C. J., (1966), Bats of the genus *Sturnira* in the Lesser Antilles. *Occasional Papers Mus., Texas Tech Univ.*, 40:1-16.
93. Jones J. K., y Carter D. C., (1976), Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. Pp. 7–38 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Part I* (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 10:1–218.
94. Jones J. K., (1978), A new bat of the genus *Artibeus* from the Lesser Antillean Island of St. Vincent. *Occasional Papers, The Museum, Texas Tech University* 51:1–6.
95. Junqueira, L.C. *Histología Básica*. Editorial Salvat. 3ª Edición. México. 1988, pp. 3-6.

K

96. Kang J. S., Lee C. J., Lee J. M., Rha J. Y., Song K. W. y Park M. H., (2003), Follicular expression of *c-Kit/SCF* and Inhibin- α in mouse ovary during development. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Volume 11:1447-1458.
97. Karl J. y Capel B., (1995), Three-dimensional structure of the developing mouse genital ridge, *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 350: 235–242.
98. Karl J, y Capel B., (1998), Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Development Biology*, 203: 323–333.
99. Keast T. L. y Handley C. O., (1991), Reproduction in a captive colony. Pp. 19–42 in *Demography and natural history of the common fruit bat *Artibeus jamaicensis* on Barro Colorado Island, Panama* (C. O. Handley, Jr., D. E. Wilson, and A. L. Gardner, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
100. Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile I., Boiani M., Lomelí H., Nagy A., McLaughlin K. J., Schöler H. R. y Tomilin A., (2004), *Oct4* is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports*, 11:1078–1083.
101. Kerr J. B., Myers M., Britt K. L., Mladenovska T. y 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.
102. Kleiman D. G. y Davis T. M., (1979), Ontogeny and maternal care. Pp. 387-402, in *Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III* (Baker R. J., Jones J. K. y Carter D. C. eds.). Special Publications, The museum, Texas Tech University, 16:1-441.

103. Komiya T, y Tanigawa Y., (1995), Cloning of gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207:405–410.
104. Konishi I, Fujii S, Okamura H, Parmley T. y Mori T., (1986), Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *Journal Anatomical*, 148: 121–135.
105. Koopman P., A. Munsterberg, B. Capel, N. y Lovell-Badge A. V., (1990), Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 450-452.
106. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P. y Lovell-Badge R., (1991), Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 351:117-121.
107. Kurta A. y Kunz T., (1987), Size of Bats at Birth and Maternal Investment During Pregnancy. *Symposia of the Zoological Society of London*, 57:79-106.
108. Kuwana T. y Fujimoto T., (1983), Active locomotion of human primordial germ cells in vitro. *The Anatomical Record*, 205:21-26

L

109. Lawson K. A., Dunn N. R., Roelen B., Zeinstra L. M., Davis A. M., Wright C., Korving J. y Hogan B., (1999), *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Development*, 13:424-436.
110. Leimaire W. J., Yang N. S., Behram H. H. and Marsh J. M., (1973), Preovulatory changes in concentration of prostaglandin in rabbit Graafian follicles. *Prostaglandins* 3:367-376.
111. Liu Y., Wu C., Lyu Q., Yang D., Albertini D., Keefe, D. y Liu L., (2007), Germ line stem cells and neo-genesis in the adult human ovary. *Developmental Biology*, 306: 112-120.
112. Lo C. M., Wang H. B., Dembo M. y Wang Y. L., (2000), Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysiology Journal* 79:144-152.
113. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaria P., Baltimore D. y Darnell J., (2002), *Biología celular y molecular*, 4^a ed. Madrid editorial Medica Panamericana 751-768, 787-792.

M

114. Mares, M. A., Ojeda R. A. y Kosco M. P. (1981), Observations on the distribution and ecology of the mammals of Salta province, Argentina. *Annals of Carnegie Museum* 50:151–206.
115. Marshall A. J., (1953), The unilateral ebdometrial reaction in the gland fruit bat (*Pteropus giganteus* Brünnich). *Journal endocrinology*, 9:42-44.
116. Matsui Y., Toksoz D., Nishikawa S., Nishikawa S. I., Williams D., Zsebo K. y Hogan B. L. M. (1991), Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 353:750-752.
117. McLaren A., (1991), Development of the mammalian gonad: The fate of the supporting cell lineage. *Bioessays*, 13: 151-156.

118. McLaren A. y Southee D. (1997), Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Development Biology*, 187:107-113.
119. Mello M., Kalko E. Silva W., (2008), Diet and Abundance of the Bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian Montane Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy*, 2:485-492.
120. Merchant-Larios H. (1976) The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. Elsevier New York, 453-462.
121. Merchant-Larios H. y Ceteno B., (1981), Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W mouse, Eleventh International Congress of anatomy: advances in the morphology of cells and tissue, 383-392.
122. Merchant-Larios H., (1984), Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis. In: ultrastructure of reproduction, Blerkmon J. y Motta P. M. (eds), Martinus Nijhoff Publishers. Boston 19-30.
123. Merchant-Larios H. y Chimal-Monrroy J., (1989), The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Developments in Ultrastructural of Reproduction*, 55-63.
124. Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N. and Buehr M., (1993), The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *The International Journal of the Developmental Biology*, 37:407-415.
125. Molyneaux K. A., Stallock J., Schaible J. y Wylie C. (2001), Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration, *Dev Biol*, 240:488-498.
126. Motta P. M. Makabe S. y Nottola S. A. (1997a), The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update* 3:281-295.
127. Motta P. M., Nottola S. A. y Makabe S., (1997b), Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of Obstetrics y Gynecology and Reproductive Biology*, 75:5-10.
128. Motro B. y Bernstein A., (1993), Dynamic changes in ovarian c-Kit and syeel expression during the estrous reproductive cycle. *Developmental Dynamic*, 197:69-79.
129. Myers, P. y Wezel R. M., (1983), Systematics and zoogeography of the bats of the Chaco Boreal. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* 165:1-59.
130. Myers M., Britt K. L., Wreford N. G. M., Ebling F. J. P. y Kerr J. B., (2004), Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127:569-580.

N

131. Nef S., Schaad O., Stallings N. R., Cederroth C. R., Pitetti J. L., Schaer G., Malki S., Dubois-Dauphin M., Boizet-Bonhoure B., Descombes P., Parker K. L. y Vassalli J. D., (2005), Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Development Biology* 287: 361-377.

132. Niikura Y., Niikura T. y Tilly J. L., (2009), Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment, Vincent Center for Reproductive Biology, Vincent Obstetrics and Gynecology Service, Vol. 1, No. 12.
133. Noce T., Okamoto-Ito S. y Tsunekawa N., (2001), *Vasa* homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Structure and Function*, 26:131–136.
134. Nowak R., (1991), Yellow-shouldered Bats, or American Epauleted Bats. Pp. 299-300 in Walker's Mammals of the World, Vol. 1, 5 Edition. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.

O

135. Odor D. L. y Blandau R. J., (1969), Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. *American Journal Of Anatomy*, 124: 163–186.
136. Orr R. T., (1970), Development: Prenatal and postnatal. Pp. 217-231. In: *Biology of bats*, Vol. I. (Wimsatt, W. A., ed.). Academic Press, New York, USA.
137. Ottolenti C., Uda M., Crisponi L., Omari S., Cao A., Forabosco A. y Schlessinger, D. (2006), Determination and stability of sex. *Bioessays*, 29:15-25.

P

138. Paz, O. DE, (1986), Age estimation and postnatal growth of the Greater Mouse Bat *Myotis myotis* (Borkhausen, 1977) in Guadalajara, Spain. *Mammalia*, 50: 243-251.
139. Pedersen T. y Peters H., (1968), Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17 555–557.
140. Pedersen T., (1972), Follicle growth in the mouse ovary. In *Oogenesis*, pp 361–367. Eds. J Biggers y A Schuetz. London: University Park Press.
141. Pepling M. E. y Spradling A. C., (1998), Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, 125: 3323–3328, 1998.
142. Pesce M., Di Carlo A. y De Fellici M., (1997), The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mechanism of Development*, 68:37-44.
143. Pereda J. y Motta P. M., (1991), A unique fibrillar surface of migrating human primordial germ cells. *Archives of Histology and Cytology*, 54:419-425.
144. Peters H. y Crone M., (1967), DNA synthesis in oocytes of mammals. *Archives the Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56: 160-170.
145. Pinkerton J. H. M., McKay D. G., Adams E. C. and Herting A. T. (1961), Development of the human ovary: A study using histochemical techniques. *Obstetrics and Gynecology*, 18:152-181.
146. Paulson J. R. y Taylor S. S., (1982) Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *Journal Biology*

and Chemistry, 257:6064-6072.

R

147. Racey P. y Entwistle A. C., (2000), Life-history and reproductive strategies of bats, In: Crichton, E.G., Krutzsch, P.H., editors. Reproductive biology of bats. London: Academic Press. P 157-219.
148. Rasweiler J. J. IV (1970), The laboratory biology of the long-tongued bat, *Glossophaga soricina* maintenance produces, estivation, the menstrual cycle, histophylogy of the oviduct and intramural implantation, PhD Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
149. Rasweiler J. J., (1972), Reproduction in the long-tongued bat, *Glossophaga soricina*, 1 preimplantation development and histology of the oviduct, Journal of reproduction fertility, 31:249-262.
150. Rasweiler, J.J. IV. (1974), Reproduction in the tongued bat, *Glossophaga soricina*. II. Implantation and early embryonic development. American Journal Of Anatomy, 139: 1-35.
151. Rasweiler, J.J. IV. (1979 a). Bats as models in studies on folliculogenesis, menstruation, early pregnancy, and sperm survival. In: Alexander NA, editor. Animals models for research on contraception and fertility. Hagerstown, MD: Harper and Row Publishers. P 437-446.
152. Rasweiler J. J. IV (1979 b), Early embryonic development and implantation in bats. Journal of reproduction fertility, 56:403-416.
153. Rasweiler J. J. (1988), Ovarian function of captive black mastiff bat, *Molossus ater*. The American journal of anatomy, 191:1-22.
154. Rasweiler J. J. IV y Bonilla H., (1992), Menstruation in short-tailed fruit bats (*Carollia spp.*). Journal of reproduction and fertility, 95:231-248.
155. Rasweiler J.J.,IV. (1993), Pregnancy in Chiroptera. The Journal of Experimental Zoology, 266: 495-513.
156. Rasweiler, J.J. IV. y Badwaik N.K. (2000). Anatomy and physiology of the female tract. In: Crichton, E.G., Krutzsch, P.H., editors. Reproductive biology of bats. London: Academic Press. P 157-219.
157. Redford, K. H., y Eisenberg J. F., (1992), Mammals of the Neotropics. The southern cone, The University of Chicago Press, Illinois 2:1-430.
158. Richards J. S., (2001), Perspective: the ovarian follicle a perspective in 2001. Endocrinology, 142:2184-2193.
159. Ruiz Gutiérrez F., (2005), Contribución al estudio de la diversidad y reproducción de murciélagos en los ejidos corrales, municipio de Petatlán y el Durazno, municipio de Coyuca de Catalán, Guerrero, México, Tesis de licenciatura, Unidad Académica De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, pp. 1-96.
160. Ruschi A., (1953), Morcegos do Estado do Espirito santo XIX. Familia Phyllostamatidae,

descricao de *Tonatia bidens* e *Sturnira lilium lilium*. Familia Vespertilionidae, descricao de *Eptesicus hiliarii* e *Eptesicus brasiliensis*. Familia Molossidae, descricao de *Eumops abrasus abrasus*. Com algunos observacoes a respeito. Bol. Mus. Biol. Prof. Mello-Leitao, Santa Teresa, Zool., 21:1-5.

S

161. Saitou M., Barton S. C. y Surani A., (2002), A molecular programmed for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418:293-300.
162. Sánchez-Hernández, C.; M.T. Catrejon; C.B. Chavez-Tapia. 1986. Patrón reproductivo de *Sturnira lilium pawidens* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la Costa Central del Pacífico Mexicano. *Southwestern Natural*, 31: 331 -340.
163. Schiling B. y Yeh J., (1997), Expression of transforming growth factor TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 and of type I and I TGF- β receptors during the development of the human fetal ovary. *Fertil Steril*, 72:147-153.
164. Schöler H.R., Hatzopoulos A.K., Balling R., Suzuki N. y Gruss P., (1989), A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO Journal*, 8:2543–2550.
165. Secretaría de Gobernación, Centro Nacional de Estudios Municipales, Gobierno del Estado de Morelos, "Los Municipios de Morelos", en *Enciclopedia de los Municipios de México*. Cuernavaca, Mor. 1988.
166. Secretaría de Gobernación, Centro Nacional de Desarrollo Municipal, Sistema Nacional de Información Municipal, agosto de 2001, México, D.F.
167. Silva J. R. V., van den Hurk R., van Tol H. T. A., Roelen B. A. J. y Figueiredo J. R., (2006), The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote*, 14:317-328.
168. 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.
169. Studier, E. H. y Wilson D. E., (1979), Effects of captivity on thermoregulation and metabolism in *Artibeus jamaicensis* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 62A:347–350.
170. Swanepoel P. y Genoways H. H., (1979), Morphometrics. Pp. 13–106 in *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. Part III (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University Press 16:1–441.

T

171. Taddei V. A., (1973), Phyllostomidae da regioao norte-ocidental do Estado de Sao Paulo. Unpubl. Ph.D. dissert., Univ. Estadual de Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, 249 pp.

172. Taddei V. A., (1976), The reproduction of some Phyllostomidae (Chroptera), from the northwestern region of the state of Sao Paulo, Bolm. Zool., Univ. S. Paulo 1:313-330.
173. Tamsitt, J. R. y Mejia C., (1962), The reproductive status of a population of the Neotropical bat *Artibeus jamaicensis*, at Providencia. Caribbean Journal of Sciences 2:139–144.
174. Tamsitt, J. R., y Valdivieso D., (1963), Reproductive cycle of the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* Olfers. Nature, 198.
175. Tamsitt J. R., (1966), Altitudinal distribution, ecology, and general life history of bats in the Andes of Colombia. American Philadelphia Society Yearbook 1966:372–373.
176. Tilly J. L. y Telfer E. E., (2009a), Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock?. Molecular Human Reproduction, pp. 1-17.
177. Tilly J. L., Niikura Y., y Rueda Bo. R. (2009b), The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism?. Biology of Reproduction, 80:2–12.
178. Tuttle, M. D., (1970), Distribution and zoogeography of Peruvian bats, with comments on natural history. University of Kansas Sciences Bulletin 49:45–86.

U

179. Upadhyay S., Luciani J. M. y Zamboni L., (1981), The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In: Development and Function of Reproductive Organs, edited by Byskov AG and Peters H. Amsterdam: Excerpta Medica, p. 18–27.

V

180. Vermande-Van Eck G., (1956), Neo-ovogenesis in the adult monkey. The Anatomical Record, 125:207–224.

W

181. Waldeyer W: Eierstock und Ei. Leipzig: Engelmann 1870.
182. Weissmann A. Die Continuitat des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung Jena: Fischer-Verlag; (1885), Franchi L.L., Mandl A. M., Zuckerman S. (1962): The development of the ovary and the process of oogenesis. In The Ovary Edited by: Zuckerman S. London: Academic Press, 1-88.
183. Wilhelm D, Palmer S. y Koopman P., (2007), Morphology and cell biology of the developing gonad. Physiology Review, 87: 1-28.
184. Wilson D. E., (1979), Reproductive patterns. Pp. 317–378 in Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III (Baker R. J., Jones J. K. and. Carter D. C. eds.). Special Publication 16, The Museum, Texas Tech. University.
185. Wilson D. E., Handley C. O. y Gardner. A. L., (1991), Reproduction on Barro Colorado Island.

Pp. 43–52 in Demography and natural history of the common fruit bat *Artibeus jamaicensis* on Barro Colorado Island, Panama' (C. O. Handley, Jr., D. E. Wilson, and A. L. Gardner, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

186. Wimsatt W. A., (1975), Some comparative aspects of implantation. *Biological Reproductive* 12:1-40.
187. Wimsatt, W.A. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 345-357.
188. Witschi E., (1948), Migration of the germ cells from the of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib embryo Carnegie Inst* 32:67-80.

Y

189. Yao H. H., Matzuk M. M., Jorgez C. J., Menke D. B., Page D. C., Swain A. y Capel B., (2004), Follistatin operates downstream of *Wnt4* in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics*, 230: 210–215.
190. Ying Y., LiuX. M., Marble A., Lawson K. A. y Zhao G. Q. (2000), Requirement of *Bmp8b* for the generation for primordial germ cell in the mouse. *Molecular Endocrinology*, 14:1053-1063.
191. Ying Y. y Zhao G. Q., (2001), Cooperation of endoderm-derived *BMP2* and extraembryonic ectoderm-derived *BMP4* in primordial germ cell generation in the mouse. *Development Biology*, 232:484–492.
192. Yoshimizu T., Sugiyama N., De Felice M., Yeom Y.I., Ohbo K., Masuko K., Obinata M., Abe K., Schöler H.R. y Matsui Y., (1999), Germline-specific expression of the *Oct-4*/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Development Growth and Differentiattion*. 41:675–684.

Z

193. Zamboni L., y Merchant H., (1973), The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. *American Journal Of Anatomy*, 137: 229-336.
194. Zhou Q., Li Y., Nie R., Friel P., Mitchell D., Evanoff R. M., Pouchnik D., Banasik B., McCarrey J. R., Small C. y Griswold M. D. (2008), Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (*Stra8*) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biology Reproduction*, 78:537–545.
195. Zuckerman S., (1951), The number of oocytes in the mature ovary. *Rec Prog Horm Res* 6: 63–108.