



Universidad Nacional del Nordeste.

Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y Agrimensura.

Aspectos morfológicos y
determinantes moleculares de la
Biología reproductiva de
Eumops patagonicus
(Chiroptera: Molossidae)

Tesis para optar al título de Doctor De la Universidad Nacional del
Nordeste en Biología.

Lic. Rodríguez Florencia Evelyn

Director: Dr. Daniel M. Lombardo

Codirector: Dra. María Victoria Aguirre

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigaciones bioquímicas de
la Facultad de Medicina (LIBiM). IQUIBA-NEA. CONICET
Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción animal.

Facultad de Ciencia Veterinarias. UBA

Corrientes, Argentina. 2023

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Índice

Índice:

| | |
|---|----|
| Índice: | 3 |
| Índice de Figuras | 6 |
| Resumen | 8 |
| Abstract | 11 |
| Introducción: | 15 |
| 1.1 Desarrollo embrionario: gonadogénesis | 15 |
| 1.1.1 Gonadogénesis en mamíferos | 15 |
| 1.1.1.1 Diferenciación del testículo: | 17 |
| 1.1.1.2 Diferenciación del ovario | 18 |
| 1.1.1.3 Factores que determinan la formación del ovario | 19 |
| 1.1.1.4 Células germinales primordiales | 21 |
| 1.2 Ciclo ovárico y uterino | 22 |
| 1.3 Dimorfismo sexual en mamíferos | 26 |
| 1.3.1 Glándulas tegumentarias en mamíferos como carácter de dimorfismo sexual | 27 |
| 1.4 Orden Chiroptera | 28 |
| 1.4.1.1 Desarrollo embrionario en murciélagos | 31 |
| 1.4.1.2 Gonadogénesis en murciélagos | 32 |
| 1.4.2 Características reproductivas de los murciélagos | 33 |
| 1.4.2.2 Regulación endócrina de la reproducción en Chiropteros | 34 |
| 1.4.2.3 Hormonas en microquirópteros hembras | 36 |

| | |
|---|----|
| 1.4.3 Organización general del tracto reproductor de la hembra | 37 |
| 1.4.3.1 Ovario en Quirópteros | 39 |
| 1.4.4 Asimetrías reproductivas en las hembras | 41 |
| 1.4.5 Glándulas tegumentarias en murciélagos | 42 |
| 1.5 Familia Molossidae (Gervais, 1856) | 44 |
| 2 Hipótesis y Objetivos | 47 |
| 2.1.1 Hipótesis general | 47 |
| 2.1.2 Hipótesis particulares | 47 |
| 2.2.1 Objetivos generales: | 48 |
| 2.2.2 Objetivos particulares: | 48 |
| 3 Materiales y métodos | 50 |
| 3.1. Captura de ejemplares: | 50 |
| 3.2 Estudios morfológicos: | 52 |
| 3.3. Detecciones histoquímicas | 53 |
| 3.3.1 Tricromica de Gómori | 53 |
| 3.3.2 Impregnación argéntica de Gomori | 53 |
| 3.3.3 Rojo Nilo: detección de lípidos en glándula gular | 53 |
| 3.3.4 Coomassie blue: detección del contenido proteico de la glándula gular. | 54 |
| 3.4 Detecciones Inmunohistoquímicas | 54 |
| 3.4.1 Evaluación del estado proliferativo del tejido gonadal: (detección de PCNA) | 54 |
| 3.4.2 Análisis inmunohistoquímico para detección de OCT4 en la cresta gonadal | 55 |
| 3.4.3 Detección de apoptosis con método indirecto IHQ de proteínas de la familia Bcl (Bax-BCL) | 55 |
| 3.4.4 Detección de Hormona Folículo estimulante: FSH | 55 |
| 3.4.5 Detección de glucoproteína OVGP 1 en oviducto. | 56 |

| | |
|---|-----------|
| Biología reproductiva de <i>Eumops patagonicus</i> (Chiroptera: Molossidae) | |
| Índice | |
| 3.4.6 Detección de la proteína S-100 en glándula gular | 56 |
| 3.5 Detección de apoptosis con método directo: Ensayo de TUNEL | 57 |
| 3.6 Análisis de imágenes | 57 |
| 3.7 Alineamiento de proteínas | 58 |
| 3.8 Determinación del contenido de ácidos grasos por cromatografía de Gs/Ms: | 58 |
| 4 Resultados: | 59 |
| 4.1 Desarrollo gonadal | 59 |
| 4.1.1. Cresta urogenital/gonadal en formación | 59 |
| 4.1.2. Gónada Bipotente o Indiferenciada | 61 |
| 4.1.3. Ovario y oviducto embrionario | 63 |
| 4.1.4. Apoptosis y proliferación en ovario embrionario: | 67 |
| 4.1.5. Testículo embrionario | 68 |
| 4.2 Histología del ovario adulto: | 69 |
| 4.2.1. La Corteza: | 70 |
| 4.2.2. La médula ovárica | 71 |
| 4.2.2. Sistema Folicular | 72 |
| 4.3. Asimetría morfológica y funcional del ovario | 77 |
| Expresión de FSH: hormona folículo estimulante. | 78 |
| Evaluación del estado proliferativo en los ovarios por la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) | 80 |
| Expresión de proteínas pro y anti apoptóticas Bax y Bcl XL | 81 |
| Detección de apoptosis por método directo de TUNEL | 82 |
| 4.4 Morfología uterina: útero borce | 83 |
| 4.4.1. Oviducto | 84 |

| | |
|--|-----|
| Biología reproductiva de <i>Eumops patagonicus</i> (Chiroptera: Molossidae) | |
| Índice | |
| 4.4.2. Cuernos Uterinos | 85 |
| 4.4.3. Detección de la proteína OVGP-1 | 86 |
| 4.5. Ciclo ovárico y uterino | 87 |
| 4.6. Dimorfismo sexual: glándula gular en machos | 90 |
| 4.6.1. Histología de la glándula gular | 90 |
| 4.6.2. Análisis histoquímico de la glándula gular | 93 |
| 4.6.3. Inmunohistoquímica para PCNA | 94 |
| 4.6.4. Inmunohistoquímica de S-100 en la glándula gular | 94 |
| 4.6.5. Análisis del contenido lipídico de la secreción de la glándula (lipidómica) | 94 |
| 4.7. Alineamiento de proteínas: | 95 |
| Discusión de resultados | 97 |
| 5.1. Desarrollo gonadal: | 97 |
| 5.1.1. Cresta gonadal, identificación de CGPs y establecimiento de la gónada bipotente | 97 |
| 5.1.2. Gónadas diferenciadas | 99 |
| 5.2. Morfología ovárica y uterina de <i>E. patagonicus</i> | 100 |
| 5.3. Asimetría funcional | 105 |
| 5.4 Ciclo ovárico y uterino | 110 |
| 5.5. Glándula gular como carácter de dimorfismo sexual | 113 |
| Conclusiones | 117 |
| Agradecimientos | 119 |
| Bibliografía | 123 |
| Producción científica | 151 |

Índice de Figuras

| | |
|----------------|----|
| Figura 1..... | 17 |
| Figura 2..... | 21 |
| Figura 3..... | 23 |
| Figura 4..... | 24 |
| Figura 5..... | 25 |
| Figura 6..... | 29 |
| Figura 7..... | 30 |
| Figura 8..... | 39 |
| Figura 9..... | 43 |
| Figura 10..... | 46 |
| Figura 11..... | 51 |
| Figura 12..... | 59 |
| Figura 13..... | 60 |
| Figura 14..... | 62 |
| Figura 15..... | 64 |
| Figura 16..... | 65 |
| Figura 17..... | 66 |
| Figura 18..... | 67 |
| Figura 19..... | 68 |
| Figura 20..... | 71 |
| Figura 21..... | 73 |
| Figura 22..... | 74 |

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Índice

| | |
|-----------------|-----|
| Figura 23..... | 75 |
| Figura 24..... | 77 |
| Figura 25..... | 78 |
| Figura 26..... | 80 |
| Figura 27..... | 81 |
| Figura 28..... | 82 |
| Figura 29..... | 83 |
| Figura 30..... | 84 |
| Figura 31..... | 85 |
| Figura 32..... | 87 |
| Figura 33..... | 88 |
| Figura 34..... | 89 |
| Figura 35..... | 92 |
| Figura 36..... | 96 |
| Figura 37..... | 97 |
| Figura 38..... | 98 |
| Figura 39..... | 99 |
| Gráfico 1 | 100 |

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resumen

Resumen

La biología reproductiva en mamíferos ha sido objeto de numerosos estudios a lo largo de tiempo. El grupo mejor estudiado en esta área es el modelo murino del cual se obtuvo la mayor cantidad de información existente hasta la fecha. Sin embargo, el estudio en especies silvestres es de gran importancia para la recopilación de información que los modelos domésticos no aportan.

El orden Chiropteras es el más diverso en cuanto a número de especies luego del orden Rodentia, siendo un orden cosmopolita, y con características reproductivas muy variables dependiendo de la especie. Por lo tanto, este es un orden objeto de numerosos estudios a lo largo de todo el mundo, desde aspectos morfológicos hasta comportamentales. Estudios realizados en hembras sobre la anatomía uterina y ovárica han demostrado que existe gran variedad de morfologías uterinas, así como también existen especies con dominancia funcional de un ovario. Los estudios realizados en machos muestran que en la mayoría de las especies el dimorfismo sexual se limita los órganos genitales y a una pequeña diferencia en el tamaño corporal, sin embargo, en algunas especies se puede observar la presencia de glándulas tegumentarias que se encuentran únicamente en machos. Estas glándulas estarían relacionadas no solo al comportamiento de marcaje territorial, sino también al cortejo y marcaje de hembras.

Por otra parte, el estudio del desarrollo embrionario en el orden Chiroptera es un área poco estudiada y restringida a la estadificación del desarrollo por características morfológicas externas. En cuanto a la morfogénesis interna, específicamente de las gónadas la información actual se reduce a un par de especies.

Eumops patagonicus es una especie Sudamericana perteneciente a la Familia Molossidae, es una especie insectívora que habita en zonas urbanizadas de la cual se posee muy poca información en general principalmente relacionada a su biología reproductiva, siendo esta una especie abundante en la región noreste de Argentina. Por ello el objetivo de esta tesis es “Estudiar los parámetros reproductivos de *Eumops patagonicus* a nivel anatómico,

histológico, histoquímico e inmunohistoquímico, a fin de describir el desarrollo gonadal, y caracterizar el ciclo reproductivo normal". Además "Describir la glándula gular presente en Machos de *Eumops patagonicus* a nivel anatómico y químico y evaluar su actividad en épocas reproductivas y no reproductivas".

Para cumplir con los objetivos planteados se capturaron ejemplares de *E. patagonicus* en el campus universitario de la FaCENA de la UNNE, durante un período de dos años. Se diseccionaron los órganos necesarios para el estudio. En las hembras se extrajeron el útero, los ovarios y se obtuvieron embriones en diferentes estadios de gestación. En cuanto a los machos se procedió a la extracción de la glándula gular. Estos órganos fueron procesados siguiendo el protocolo de técnica histológica convencional para coloración de rutina. Adicionalmente, se realizaron detecciones histoquímicas como PAS, tinción argéntica y tricrómica en los ovarios, tinción de PAS en embriones y en machos se realizaron tinciones para detección de lípidos como Oil red y Rojo Nilo en secciones realizadas con criostato. Paralelamente, se realizaron detecciones inmunohistoquímicas en los diferentes tejidos, en embriones se inmunodetectaron las CGP mediante la detección de OCT4 y se evaluaron las proteínas pro y anti apoptóticas como responsables de la remodelación del tejido ovárico. Asimismo, en secciones de ovario y útero se evaluó además de la actividad apoptótica en el tejido por método directo e indirecto, la actividad proliferativa a través de la inmunomarcación de PCNA. La expresión de la hormona FSH fue evaluada también en ambos ovarios por inmunohistoquímica. Además, en las hembras adultas se realizó la detección de la proteína OVGP-1 para la identificación de reservorios espermáticos en el oviducto. En cuanto a la glándula de los machos se realizó la inmunomarcación de la proteína S-100 para la detección de mecanoreceptores. Todas las muestras fueron fotografiadas y analizadas con el software LASZ LEICA. Además, las muestras obtenidas de la glándula gular se sometieron a identificación de la composición lipídica de su secreción por cromatografía Gs/Ms.

Como resultado se observó que en cuanto al desarrollo gonadal en embriones se identificaron los estadios de desarrollo embrionario en los cuales se distinguen la formación de la cresta gonadal con la localización de las CGP por inmunomarcación de

OCT4 (E.13), el estadio de gónada indiferenciada (E. 17). En los embriones hembras se distinguió el ovario y el útero bien definidos (E. 23) donde se observan cistos formados por nidos de ovogonios. Mientras que en un estadio más avanzado (E. 25) en el ovario se pudieron distinguir en corteza y médula, hallándose las ovogonias rodeadas por las células foliculares. Asimismo, se observan procesos de proliferación y apoptosis actuando sobre el tejido. En los testículos de los embriones machos se observaron los túbulos seminíferos con células de Sertoli y espermatogonias (E. 21). Estos resultados concuerdan con lo observado para las especies de murciélagos estudiadas hasta el momento y aportan nueva información acerca de la formación de las gónadas en este grupo.

En las hembras adultas de *E. patagonicus* se determinó la existencia de una marcada asimetría morfológica dextral y funcional tanto en el ovario como en el oviducto. Observándose que esta diferencia en el ovario se refleja además en la localización de la hormona FSH en los mismos, así como con la existencia de un mayor tamaño. Mientras que en el oviducto se observa la implantación y gestación solamente en el cuerno uterino derecho. Por otra parte, se describe el ciclo reproductivo de las hembras y se propone un nuevo patrón para quirópteros Sudamericanos, en donde la ovulación y fecundación ocurren durante el invierno. Además, se observó que esta es una especie que posee características compatibles con la presencia de una menstruación verdadera, siendo esta la primera especie de su género en ser reportada. Estos resultados nos muestran que *E. patagonicus* al igual que otros representantes de la familia Molossidae poseen una asimetría dextral marcada, pero a diferencia de otros molossidos, sus ovarios no poseen gran presencia de tejido intersticial glandular. También se diferencia de otras especies ya que su ciclo reproductivo concuerda con los modelos descriptos hasta el momento.

La glándula gular en los machos se caracteriza como una glándula exocrina sebácea sacular, con un mecanismo de secreción holocrina. Esta contiene además presencia de mecanorreceptores identificados por la inmunomarcación positiva de s-100, los cuales ante estímulos externos provocan la expulsión del contenido glandular. *E. patagonicus* a diferencia de otros molósidos descriptos, posee una glándula gular netamente sebácea, donde se estableció su importancia en la época reproductiva, siendo un carácter de

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resumen

dimorfismo sexual y utilizado por los machos como herramienta de delimitación territorial y marcaje de hembras.

La presente tesis aporta información innovadora sobre la biología reproductiva de *E. patagonicus*, revelando a esta especie abundante en la región, como un buen modelo animal para investigaciones en el área de biología reproductiva dadas sus particulares características.

Abstract

Reproductive biology in mammals has been the subject of numerous studies over time. The best-studied group in this area is the murine model from which the largest amount of existing information was obtained. However, the study of wild species is useful to obtain the information that domestic models do not provide.

The Chiroptera order is the most diverse in terms of the number of species after the Rodentia order, being a cosmopolitan order with highly variable reproductive characteristics, depending on the species. Therefore, this order has been the focus of numerous studies from morphological to behavioral aspects worldwide. Studies carried out in females, in terms of uterine and ovarian anatomy, have shown a great variety of uterine morphologies, and there are species with functional dominance of one ovary. Studies carried out in males show that in most species, sexual dimorphism was limited to the genital organs and differences in body size. However, the presence of integumentary glands could be observed only in males of certain species. These glands would be related not only to territorial marking behavior but also to courtship and marking of females. On the other hand, the study of embryonic development in the order Chiroptera is less studied and restricted to the developmental staging by external morphological characteristics. Regarding gonadal morphogenesis, the current information is reduced to a couple of species.

Eumops patagonicus is a South American species belonging to the Molossidae Family, it is an insectivorous species that inhabits urbanized areas. It is commonly found in the northeast region of Argentina.. However, there is limited information on this specie, mainly related to its reproductive biology.

Therefore, the objective of this thesis is "To study the reproductive parameters of *Eumops patagonicus* at the anatomical, histological, histochemical, and immunohistochemical levels to describe gonadal development and characterize the normal reproductive cycle." In addition, an additional aim is to "Describe the gular gland present in Males of *Eumops patagonicus* at an anatomical and chemical level and evaluate its activity in reproductive and non-reproductive times".

To achieve the stated objectives, we captured specimens of *E. patagonicus* on the FaCENA university campus UNNE, for two years. The organs necessary for the study were dissected. In females, the uterus and ovary were removed, and embryos were obtained in different stages of gestation. The gular glands were excised from males. These organs were processed following the conventional histological technique protocols for routine staining. In addition, histochemical detections such as PAS, argentic and trichromic staining were performed in samples from ovaries, PAS staining in embryos, and lipid detection staining such as Oil red and Nile Red in sections made with a cryostat was performed in gular glands from males.

On the other hand, immunohistochemical detections were carried out in the different tissues. PGCs were immunodetected with OCT4 in embryos. Pro and anti-apoptotic proteins were evaluated as responsible for ovarian tissue remodelling. Likewise, in sections of the ovary and uterus, in addition to the apoptotic activity in the tissue by direct and indirect methods, the proliferative activity was evaluated through PCNA immunolabeling. In addition, the FSH hormone expression was studied in both adult ovaries by immunodetection. In addition, the detection of the OVG-1 protein was performed in adult females to identify sperm reservoirs in the oviduct.

Regarding the gland of the males, immunolabeling of the S-100 protein was performed to detect mechanoreceptors. All samples were photographed and analyzed with Laz EZ software. In addition, the samples obtained from the gular glands were subjected to lipidomic analysis of their secretion by Gs/Ms chromatography.

Experimental data related to gonadal development in embryos, let us identify the following stages: the formation of the gonadal crest through the location of the PGCs that could be distinguished by OCT4 immunomarking (E.13), the stage undifferentiated gonadal stage (E. 17). In the female embryos, the well-defined ovary and uterus were distinguished (E. 23) where the cysts formed by nests of oogonia were noticed. Moreover, in a more advanced stage (E. 25), the ovaries have already differentiated into cortex and medulla while the oogonia were surrounded by their follicular cells. Likewise, the coexisting processes of proliferation and apoptosis in ovaries were observed.

In male embryos, the testicle conformed by seminiferous tubules, Sertoli cells and, spermatogonia were observed (E. 21). These results agree with those that have been previously communicated for this bat species and provide new information about the gonadal development.

In the ovary and the oviduct of *E. patagonicus* adult females, a marked dextral morphological and functional asymmetry was noticed.

This study demonstrates that the differences include the location of the FSH hormone and the seizures between them. While in the oviduct, implantation and gestation were only observed in the right uterine horn.

On the other hand, the reproductive cycle of females of these South American bats is proposed, revealing a new pattern where ovulation and fertilization occur during winter. In addition, this work describes for the first time, at least in our knowledge, female characteristics compatible with true menstruation in this specie. These results show us that *E. patagonicus*, like other representatives of the Molossidae family, have marked dextral asymmetry, but unlike other Molossians, their ovaries do not have a large

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resumen

presence of interstitial glandular tissue. It also differs from other species since its reproductive cycle not consistent with the models described.

The gular gland in males is characterized by a saccular exocrine sebaceous gland with a holocrine secretion mechanism. It also contains the presence of mechanoreceptors identified by the positive immunolabeling of S-100, which, when faced with external stimuli, cause the expulsion of the glandular contents. *E. patagonicus*, unlike other described Molossians, has a sebaceous gular gland, where its importance in the reproductive season was established, being a sexually dimorphic character and used by males as a tool for territorial delimiting and marking females.

This thesis provides innovative information on the reproductive biology of *E. patagonicus*, revealing this abundant species in the region as a good animal model for research in the area of reproductive biology given its particular characteristics.

Biología reproductiva e *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Introducción

Introducción:

1.2 Desarrollo embrionario: gonadogénesis

El desarrollo de un embrión es el resultado coordinado de la morfogénesis, crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular (Hogan, 1999). La morfogénesis abarca todos los procesos mediante los cuales una sola célula, el óvulo fertilizado o cigoto, da lugar primero a un embrión y luego a un feto que al nacer tiene la capacidad de adaptarse a la vida postnatal (Morten Vejlsted, 2010). Asimismo, involucra numerosos procesos de organización tisular tales como la interacción entre las tasas de proliferación celular, migración de diferentes poblaciones celulares, diferenciación de formas celulares mesenquimatosas a células epiteliales, cambios en la densidad celular dentro de un tejido y muerte celular fisiológica o apoptosis (Moriss-kay y Sokolova, 1996). Por ello la existencia de un equilibrio entre estos procesos de muerte y proliferación celulares es un requerimiento fundamental para la homeostasis y el desarrollo de un organismo (Matson y Cook, 2017).

1.2.1 Gonadogénesis en mamíferos

En todos los vertebrados, los ovarios y los testículos se desarrollan a partir de una gónada embrionaria, la cual es inicialmente bipotente (o indiferenciada según la literatura más antigua). En algún momento durante su desarrollo, este primordio bipotente, define su destino como testículo u ovario, denominándose este evento de diferenciación: “**determinación primaria del sexo**”. Una vez que ocurre la determinación primaria del sexo, la producción de hormonas por parte del testículo o el ovario influye en la diferenciación de las **características sexuales secundarias** masculinas y femeninas,

incluidos los conductos sexuales internos, los genitales externos y otras características sexualmente dimórficas, como la pigmentación y el tamaño corporal (DeFalco y Capel, 2009), considerándose a esta etapa como: “**determinación secundaria del sexo**”.

Dentro de los mamíferos, la determinación del sexo y la morfogénesis gonadal ha sido extensivamente estudiada en el **ratón** (*Mus musculus*). El primordio gonadal comienza como una protuberancia en la cara celómica del epitelio que recubre al mesonefros, a los 10 días post coito (dpc). Este epitelio sufre sucesivas divisiones que van a dar lugar a la mayoría de las células somáticas de la gónada, en este estadio comienzan a ingresar al primordio las células germinales primordiales (Karl & Capel 1998, Schmahl et al. 2000). Al comienzo de su formación, el primordio gonadal bipotente es morfológicamente indistinguible entre un individuo genéticamente macho (XY) o hembra (XX). Este primordio comienza a diferencianse cuando un subgrupo de células somáticas, de la gónada XY, expresan el gen SRY (región determinante del sexo del brazo corto del cromosoma Y) y se convierten en células de Sertoli. SRY codifica un factor de transcripción del grupo de alta movilidad (HGM) que activa la transcripción del gen Sox9 ((Sekido et al. 2004, Sekido y Lovell-Badge, 2008). Sox 9 codifica otro factor de transcripción HGM que es necesario para el desarrollo masculino (Chaboissier et al. 2004, Vidal et al. 2001).

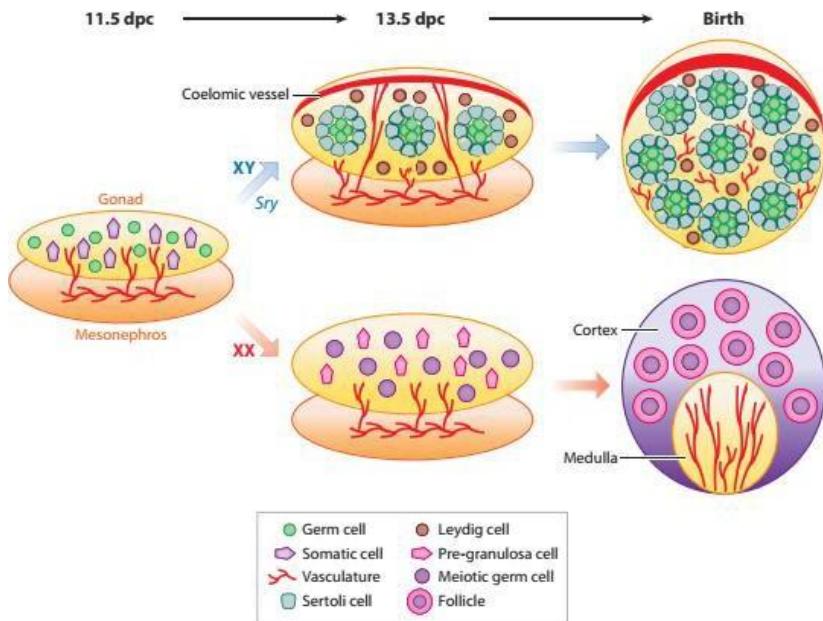


Figura 1: Diferenciación gonadal a partir de una gónada bipotente a los 11,5 días post coito (dpc) a los 13 dpc y al momento del nacimiento en el ratón. Modificado de DeFalco (2009).

1.2.1.1 Diferenciación del testículo:

Durante la formación del testículo, en el embrión de **ratón**, en individuos genéticamente machos (XY), la gónada bipotente se forma a partir del epitelio celómico que rodea el mesonefro y comienza a dividirse por oleadas. Durante la primera oleada, las células se dividen y forman las células de Sertoli, y durante la segunda ola, se originan las células intersticiales (Karl y Capel 1998, Schmahl *et al.* 2000). Posteriormente, estas células de Sertoli junto con las células germinales primordiales se agrupan, lejos de las células intersticiales, y forman los cordones testiculares sólidos, rodeados por su lámina basal. En estos cordones testiculares, las células germinales primordiales (CGPs) ingresan en un arresto mitótico hasta al momento del nacimiento. Los cordones sufren remodelaciones durante su vida fetal y es posible observar un conducto poco después del nacimiento, para formar los túbulos seminíferos. Al mismo tiempo que se forman los cordones, células

mioides del intersticio se diferencian y los rodean para formar parte de los túbulos seminíferos.

Una vez formado los **cordones testiculares**, un grupo de células intersticiales comienza a diferenciarse en células de Leydig que se definen por su morfología y por la producción de enzimas como 3β HSD y el citocromo p450, componentes necesarios para la posterior escisión de la cadena lateral de colesterol. Agrupamientos de células de Leidig localizadas cerca de los vasos sanguíneos también producen hormonas necesarias para la masculinización del embrión (Yasuda *et al.*, 1985).

1.2.1.2 Diferenciación del ovario

En **ratones** genéticamente hembras (XX) no se observa diferenciación morfológica de la gónada, cuando en los machos ya se evidencia morfogénesis. Las CGPs, permanecen dispersas homogéneamente por toda la gónada (Fig. 3), hasta que entran en meiosis por la influencia de ácido retinoico (RA) (Bowles *et al.* 2006). En el ovario en formación se observan pocos cambios hasta poco antes del nacimiento, donde se evidencia la apoptosis de gran número de células germinales en la médula del ovario, mientras que en la región cortical estas proliferan (Yao *et al.*, 2004). Según DeFalco (2009), se ha observado que la foliculogénesis comienza en etapas perinatales. Cada una de las células germinales sobrevivientes está encerrada por varias células foliculares somáticas para formar un folículo primordial. En esta etapa, la vascularización, el tejido conectivo y otras células somáticas no caracterizadas se concentran en la zona medular. Los experimentos en mamíferos sugieren que las células del folículo (granulosa) se derivan del mismo linaje que las células de Sertoli (Albrecht y Eicher, 2001; Couse *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2006).

Así como en el modelo murino, en **otros mamíferos** también se ha observado que la gónada bipotente está compuesta por distintas poblaciones celulares: las células germinales primordiales (CGPs) de las cuales se originan las gametas y las células somáticas. Esta línea somática posee una doble potencialidad: ser las células de soporte de la línea germinal, son las que derivan en las células de la granulosa y por otra parte la

línea que origina las células esteroidogénicas que originan las células de la teca de los folículos (Bowles *et al.* 2010).

A diferencia de lo observado en ratones, en otros mamíferos, las CGPs colonizan la cresta gonadal, lo que induce la proliferación de las células epiteliales celómicas rodeando a las células germinales conformando así los **cordones sexuales primitivos** en ambos sexos (Stévant y Nef, 2019).

Durante la determinación ovárica, los **cordones sexuales primitivos** se segmentan en grupos en los que se encuentran las células germinales primordiales. Estos cordones sexuales primitivos están conectados a los tubos mesonéfricos por una red de cordones celulares que constituyen la red-ovárica. El epitelio superficial de la gónada femenina sigue proliferando, desarrollando una segunda generación de cordones, los cordones sexuales corticales, que penetran en la mesénquima subyacente. El proceso de formación del ovario es mucho más largo que el de los testículos. Los gonocitos se convierten en ovogonias y las células de los cordones sexuales se organizan alrededor de las células germinales, lo que resulta en la formación de folículos primordiales (Monniaux *et al.* 2014).

En humanos, los folículos se forman cuando el ovocito se encuentra detenido en profase I (diplonema) de la meiosis. Este proceso comienza cuando las CGPs colonizan la gónada y se dividen para formar grupos llamados cistos, estos cistos se organizan en **cordones ovígeros** conectados por puentes citoplasmáticos; rodeados por células somáticas. La formación de los folículos primordiales se da por la fragmentación de los cordones ovígeros. Estos folículos primordiales consisten en un ovocito rodeado por una capa de células planas que darán origen a las células de la granulosa (Lamothe *et al.* 2020).

1.2.1.3 Factores que determinan la formación del ovario

En los mamíferos, la formación de los testículos y ovarios dependen de un conjunto de señales hormonales y celulares que interactúan en un orden específico. Existen varios

genes que juegan un papel crucial en la formación de las crestas genitales, en particular, WNT1 (tumor de Wilm gen 1) y SF1 (factor esteroidogénico 1). Las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células somáticas en la gónada (Lamothe *et al.* 2020). Se ha observado que en ratones la ausencia de WNT1 causa la ausencia de formación de riñones y gónadas (Kreidberg *et al.*, 1993), mientras que en humanos su ausencia provoca varios síndromes como el desarrollo parcial o impar del sistema urogenital. Por otra parte, la proteína SF1 es un factor de transcripción implicado en el desarrollo y proliferación de las células soporte de la gónada bipotente, estando involucrado en el desarrollo de los testículos y el mantenimiento del pool ovárico (Lamothe *et al.*, 2020).

En cuanto al correcto desarrollo de los testículos, es muy importantes la presencia del gen SRY localizado en el brazo corto del cromosoma Y. Las proteínas codificadas por SRY son factores de transcripción que modulan la expresión de genes esenciales de la diferenciación testicular, incluyendo SrY-box que contiene al gen9 (SOX9) (Palmer *et al.*, 1989 y Sinclair *et al.* 1990). Además, se ha observado que el desarrollo del ovario ocurre por defecto en ausencia de los genes SRY y/o SOX 9 (Morel *et al.*, 2014) (Fig.4). Mientras que los principales efectores en el desarrollo de una gónada femenina se consideran a la vía de WNT4/β-catenina modulado por R-Spondin-1 (RSPO1) y el Forkhead box L2 (FOXL2) (Chassot *et al.*, 2008).

El gen WNT4 se expresa en la gónada indiferenciada, su expresión decrece en la gónada masculina al diferenciarse y persiste en el ovario en diferenciación (Jääskeläinen *et al.*, 2010). Asimismo, a nivel molecular WNT4 inhibe la expresión de SOX 9 en el ratón. (Bernard *et al.*, 2008). El gen RESP1 es responsable de la activación de la vía de WNT4/β-catenina y forma parte de la familia de factores de crecimiento. El tercer gen conocido implicado en la formación del ovario es el FOXL2 que codifica un factor de transcripción que se expresa al comienzo de la formación del ovario e inhibe la expresión de SOX 9 (Pannetier *et al.*, 2010).

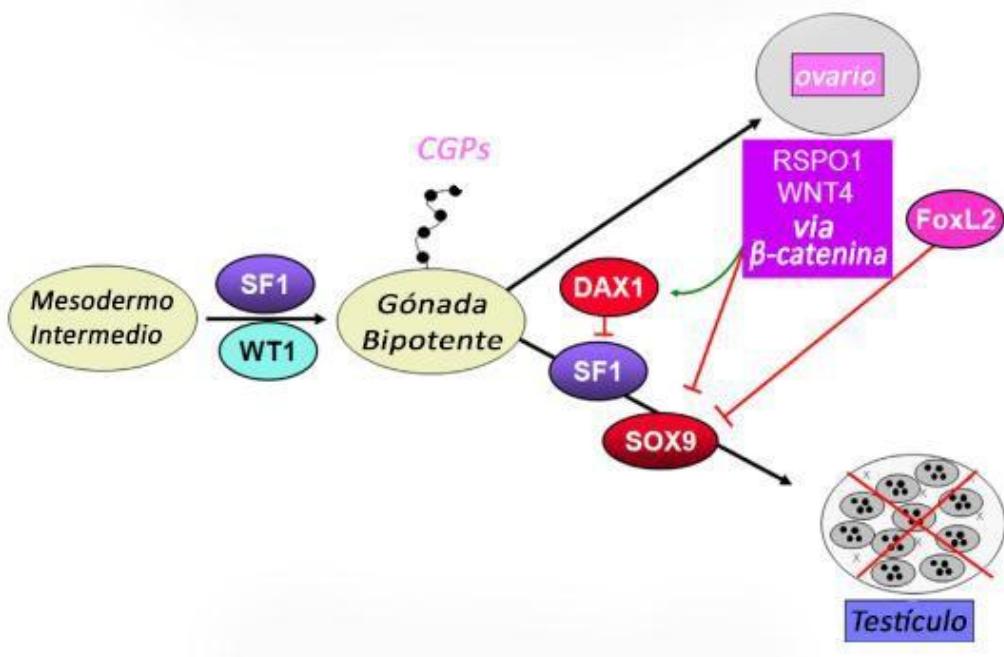


Figura 2: Factores involucrados en el desarrollo del ovario. Modificado de Morel *et al.* (2014).

1.2.1.4 Células germinales primordiales

Las células germinales primordiales (CGPs), precursores de los gametos, al llegar a las gónadas, continúan proliferando activamente. En el ovario, luego de la fase de proliferación, las células germinales cesan la multiplicación mitótica para entrar en la meiosis, y más precisamente en la profase I de la meiosis. La meiosis **en la especie humana** se detiene antes del nacimiento. La profase I se divide en cinco etapas (leptoteno, cigoteno, paquiten, diploteno, diacinesis) caracterizadas por cambios en los cromosomas. Las primeras cuatro etapas tienen lugar durante la vida fetal, luego las células germinales se bloquean en la etapa de diploteno. El último paso (diacinesis) se reanuda en la pubertad. La meiosis finalmente se completa cuando el óvulo se fertiliza. Después de entrar en meiosis, las ovogonias se denominan ovocitos I.

La expresión de un conjunto de genes que controla a las células germinales involucra tres pasos principales: la especificación de las CGPs, la migración y la diferenciación de las CGPs (Soto-Suazo y Zorn, 2005). En el desarrollo de embriones de rata, se ha observado

que las CGPs son identificadas tempranamente en el epiblasto para posteriormente migrar desde el mesodermo lateral a través del mesenterio posterior hacia la cresta urogenital y la colonizan entre el estadio 12 y 13 del desarrollo. Luego de proliferar en la gónada, pierden su capacidad de migrar y comienzan la colonización (Wilhelm *et al.*, 2007). Estudios recientes han demostrado el aumento de ciertos factores (STAT3) en las CGPs durante su fase migratoria lo que sugiere el cambio en su naturaleza, de epitelial a mesenquimatosa, y que estaría coordinando el traslado de estas células hasta colonizar las gónadas pudiéndoseles utilizar como marcación para su identificación (Aeshra *et al.*, 2020.).

Otro factor (regulador de transcripción) utilizado en la identificación de células pluripotentes o CGPs es OCT4 (Goto *et al.*, 1999; Hansis *et al.*, 2000) ya que es requerido para el mantenimiento de la pluripotencialidad en células madre embrionarias (stem cell) (Nichols *et al.*, 1998). Sin embargo, según lo reportado por Pesce (1998) en ratones se ha observado la expresión de OCT4 en células luego de la profase I (meiótica). Por otra parte en estudios más recientes, OCT4 también se ha descripto en células germinales y tumorales pluripotentes de carcinomas embrionarios y seminomas (Looijenga *et al.*, 2003). Asimismo, estos autores previamente mencionados han comunicado expresión de OCT4 (POU class 5 homeobox gen 1, también conocido como POU5F1) en CGPs de testículos humanos en estadios tempranos del desarrollo. Así también, a diferencia de lo reportado para el sexo masculino, en ovarios la expresión de OCT4 en células germinales involucradas en la foliculogénesis en ovarios fue indetectable y sólo ocasionalmente fue observable en ovocitos tempranos Stoop *et al.*, (2005). Por estas razones, OCT4 es un buen marcador para la identificación de células germinales con capacidad pluripotente.

1.3 Ciclo ovárico y uterino

Los mamíferos euterios se caracterizan por llevar a cabo la gestación del embrión dentro del tracto reproductor de la hembra (en el útero). Este es posible gracias a una coordinación compleja de eventos, que ocurren de forma cíclica, tanto en el ovario como en el útero de los mamíferos (Arthur, 1991; Reece *et al.*, 2017). Los cambios que ocurren

en el ovario se conocen como ciclo ovárico, y este varía en los diferentes grupos de mamíferos. En los humanos se denomina ciclo menstrual ya que ocurre a lo largo del mes (Owen, 1975), mientras que en resto de los mamíferos se conoce como **ciclo estral**, que puede dividirse en dos fases basado en la estructura ovárica y las hormonas que este produce. Durante la **fase folicular** ocurre el crecimiento de los folículos en el ovario y un marcado aumento de estrógenos. Cuando se alcanza el umbral de estrógenos, el hipotálamo libera el factor liberador de gonadotropinas (GnRh). La GnRh estimula la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) por parte de la hipófisis (Figura 3) (Santos *et al.*, 2012), cuyo pico induce a la ovulación. La **fase lútea** ocurre cuando se produce la ruptura del folículo y la formación del cuerpo lúteo el cual secreta progesterona (Figura 6) (Mahoney *et al.*, 2011; Reece *et al.*, 2017).

Mientras que en el ovario ocurren cambios cíclicos coordinados por las hormonas, en el útero también se observan cambios histológicos de anabolismo y catabolismo. Durante el proestro y el estro que forman parte de la fase folicular en el ovario, el útero se encuentra en su **fase proliferativa**. Mientras que durante la fase de metaestro y diestro o fase luteínica el útero se encuentra en **fase secretora** (Smith, 1970).

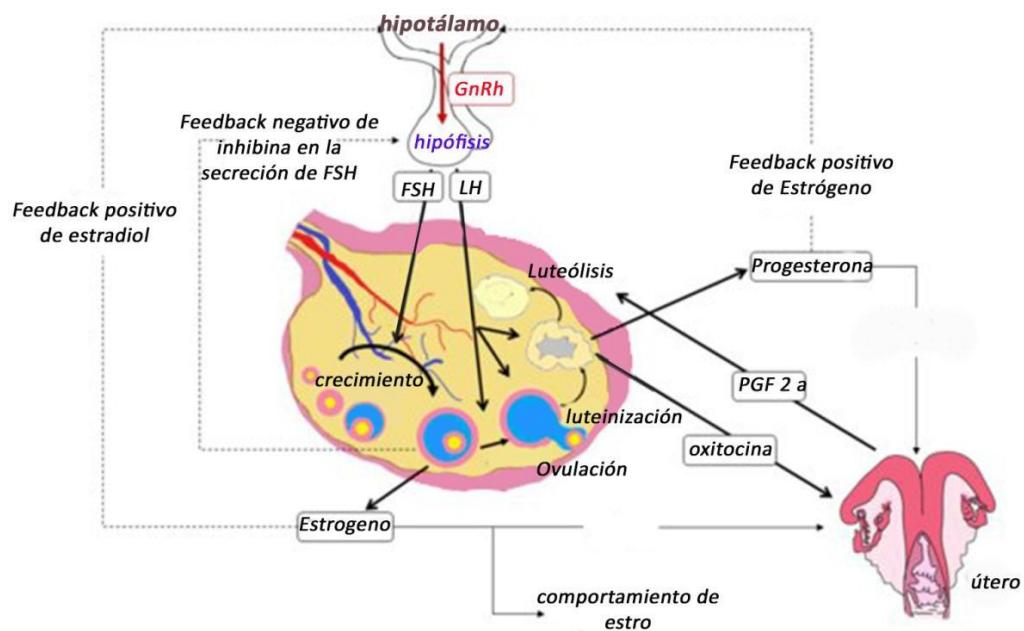


Figura 3: Eje Hipotálamo- Hipofisario - Gonadal durante el ciclo estral de la vaca. Modificado de Mongelli et al.,(2021).

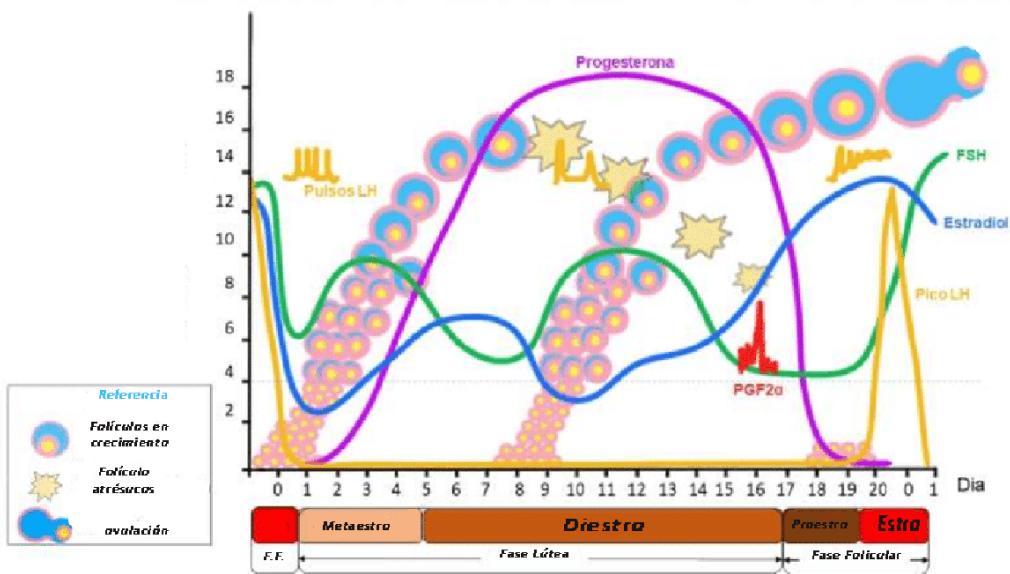


Figura 4: Ciclo ovárico: Fase folicular y fase lútea en bovinos. Modificado de Mongelli et al., (2021).

A lo largo del ciclo reproductivo, los folículos ováricos están presentes en todas las etapas de desarrollo y generalmente se pueden clasificar en tres etapas, quiescente, en desarrollo y atrésicos. Una gran población de folículos primordiales permanece en estado de reposo o estado estacionario, donde cada folículo contiene un ovocito detenido en la primera profase meiótica, etapa que dependiendo de la especie puede durar semanas, meses o incluso años (Peters y McNatty, 1980).

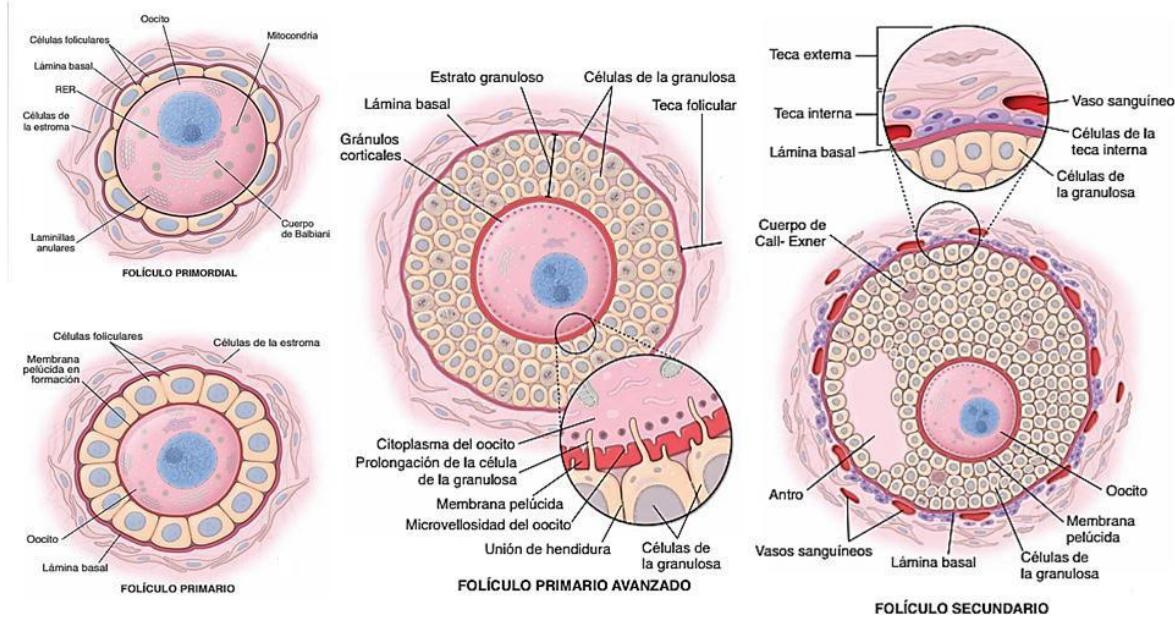


Figura 5: Diferentes estadios de maduración de los folículos ováricos. Extraído de Ross *et al.*, 2016.

El crecimiento de los folículos se inicia antes del nacimiento en el ratón, con la formación del **folículo primordial** (Da Silva-Buttkus *et al.*, 2008). El ovocito se encuentra rodeado por una capa simple de células foliculares planas y limitada por su lámina basal (Fig. 5) (Ross *et al.*, 2016). El inicio del crecimiento folicular está asociado con el crecimiento del ovocito, la división de las células de la granulosa y la dramática transformación de las células de la granulosa de planas a cúbicas (Picton, 2001). En el **folículo primario** el ovocito, rodeado por células foliculares cúbicas, comienza a secretar proteínas que forman la zona o membrana pelúcida. Las células de la granulosa comienzan a proliferar por divisiones mitóticas dando origen a un epitelio estratificado, configurando así un **folículo primario avanzado**. A su vez las células del estroma circundante al folículo comienzan a proliferar formando una vaina de tejido conjuntivo denominada *teca folicular*. Se diferencia una *teca interna* de células cúbicas secretoras de hormonas esteroideas y una *teca externa* compuesta por tejido conectivo con células musculares y haces de colágeno. Este folículo continúa madurando hasta que comienzan a aparecer cavidades (lagunas) entre las células de la granulosa, que finalmente coalecen formando un espacio ocupado por el líquido folicular denominado antro folicular. Este folículo se denomina **folículo secundario o**

folículo antral en donde el ovocito comienza a ubicarse excéntrico adquiriendo su mayor tamaño (Fig. 7). El folículo continúa creciendo por aumento del antro folicular. El ovocito queda rodeado por una capa de células foliculares llamada *cúmulo oóforo* conectado al resto de las células foliculares. Una vez que adquiere su mayor tamaño, el folículo se denomina **folículo de Graaf** o **folículo maduro**. Luego de la ovulación, las células de la granulosa remanentes y las células de la teca atraviesan un proceso de luteinización dando lugar a la formación del **cuerpo lúteo** (Ross *et al.*, 2016).

Actualmente existen muchos estudios enfocados en la descripción de la foliculogénesis, la estadificación de los folículos como así también en ciclo ovárico de especies domésticas como en el gato (Bristol-Gould *et al.* 2006), en vacas y búfalas (Braw-Tal *et al.*, 1997; Rodgers *et al.*, 2010; Feranil *et al.*, 2005); y en modelos animales como las ratas y ratones (Parkes, 1926; Guraya; Gilbert, 1924; Pedersen y Peters, 1968). Por otra parte, nuevos estudios en especies silvestres como en armadillo (*Chaetophractus villosus*), el coypo (*Myocastor coypus*) o la vizcacha (*Lagostomus maximus*) revelan una gran variedad de estrategias y mecanismos reproductivos (Codón *et al.*, 2001; Felipe *et al.*, 1999; Dorfman *et al.*, 2016). Por ejemplo, estudios desarrollados en roedores no convencionales como como los conejillos de Indias y los hámsteres, que comparten con los humanos algunas características endocrinas y reproductivas, han contribuido a una mejor comprensión de la fisiología y de las enfermedades humanas (Mitchell *et al.*, 2009; Keightley., 1996). Un mejor conocimiento sobre la variedad de mecanismos que regulan la reproducción podrían conducir a mejorar el diagnóstico precoz, el tratamiento, o el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la fertilidad y garantizar una reproducción exitosa en diferentes especies de interés (Dorfman *et al.*, 2016).

1.4. Dimorfismo sexual en mamíferos

Las diferencias de género en los mamíferos no se limitan a las vías genitales y los órganos sexuales secundarios, sino que afectan a muchas estructuras y funciones, si no a todas, aunque no estén directamente relacionadas con la reproducción. Las diferencias sexuales se reflejan en las tasas de crecimiento y maduración, el metabolismo, la actividad

endocrina, la formación de la sangre, las respuestas inmunitarias, la sensibilidad a las drogas, los patrones de enfermedad, la esperanza de vida, el comportamiento y la psicología (Glucksmann, 1974). Otras áreas de divergencia incluyen el tamaño del cuerpo, la lucha o las características de exhibición y el comportamiento de apareamiento. El embrión indiferenciado está sujeto a la determinación del sexo fenotípico, descrito como el desarrollo hacia una de las dos principales vías que lo llevan a la determinación de lo que se conoce como dimorfismo sexual. Luego se produce la diferenciación sexual, por lo que los factores producidos por los precursores gonadales determinan el sexo fenotípico (Biason-Lauber, 2010).

Las características sexuales secundarias fueron descritas por Darwin (1871) como características exageradas que facilitan la selección de la pareja, a pesar de que estas características podrían tener poco o ningún beneficio aparente en la supervivencia. Así, estas características sexuales secundarias pueden considerarse características físicas o de comportamiento transmitidas genéticamente que aparecen en animales sexualmente maduros y que pueden utilizarse para diferenciar entre sexos (McPherson y Chenoweth, 2012). Asimismo, en mamíferos pequeños como roedores y murciélagos, se observan pequeños dimorfismos sexuales como el tamaño corporal entre machos y hembras, así como también la presencia de glándulas tegumentarias con composición particular de secreciones según el sexo (Blaustein, 1981; Fernández-Vargas *et al.*, 2008).

1.4.1 Glándulas tegumentarias en mamíferos como carácter de dimorfismo sexual

Una característica distintiva de los mamíferos es la presencia de glándulas en la piel, estas juegan un papel importante en la comunicación interespecífica e intraespecífica, en la transmisión de mensajes relacionados con el sexo y la reproducción (Eisenberg and Kleiman, 1972; Blaustein, 1981; Penn and Potts, 1998; Brennan and Kendrick, 2006). En primer lugar, se aprecia dimorfismo sexual con respecto a la presencia, grado de desarrollo y secreción de glándulas cutáneas. Por ejemplo, en el conejo europeo, el

mentón, las glándulas anales e inguinales son más grandes en los machos que en las hembras de edad y peso corporal comparables (Myktytowycz, 1972).

Numerosos experimentos realizados con diferentes especies han demostrado claramente que el desarrollo y la secreción de las glándulas de la piel permanecen bajo el control de las hormonas sexuales esteroides, principalmente andrógenos. Asimismo, la variación estacional en la intensidad de la secreción de las glándulas de la piel es otra indicación de su conexión con la actividad sexual. Se ha demostrado que las glándulas anales e inguinales de los conejos fluctúan en tamaño, actividad secretora según estudios con técnicas histológicas y registros de la intensidad del olor con fluctuaciones dependientes de la temporada de reproducción (Myktytowycz, 1972). Todo esto lleva a señalar que el modo de comunicación principal de los mamíferos es el olfatorio, ya que se observa que estas señales químicas modifican muchos comportamientos sociales de los mismos. (Thiessen y Rice, 1976). Por otra parte, numerosos estudios demuestran que los olores individualmente distintos se utilizan en muchos contextos sociales, incluida la marcación de territorios, la elección de pareja, el reconocimiento de miembros del grupo y el reconocimiento de madre e hijo. Por lo que el estudio de glándulas tegumentarias en mamíferos es de gran relevancia para entender no solo la interacción con sus pares, sino también su comportamiento reproductivo.

1.5 Orden Chiroptera

El orden Chiroptera se caracteriza ser el único grupo de mamíferos capaces de volar en vuelo batido (González, 1989; Gardner, 2007) y ser uno de los grupos más diversos en cuanto a números de especies, con más de 1400 especies (Montero y Autino, 2018; Simmons y Cirranello, 2020) luego del orden Rodentia. Poseen una distribución cosmopolita exceptuando las regiones polares del planeta. Antiguamente este orden, el cual ha tenido dificultades a la hora de organizar su filogenia, se subdividía en dos subórdenes: Megachiroptera y Microchiroptera (Gray, 1821; Miller, 1907 y Barquez y Diaz, 2009) donde solo los segundos se encuentran representado en América. Actualmente estudios moleculares han demostrado que el orden Chiroptera es monofilético y formado

por dos subórdenes, Yinpterochiroptera y Yangochiroptera (Amador *et al.*, 2016; Lei y Dong, 2016) (Fig. 6).

El suborden Yangochiroptera engloba a la mayor parte de los géneros existentes, los cuales poseen una distribución cosmopolita. Este suborden se caracteriza por tener especies de pequeño a mediano tamaño y poseer cola con uropatagio, además de poseer solamente, el dedo pulgar del miembro anterior con presencia de una garra (Montero y Autino, 2018). Este suborden se conforma por 3 grandes clados: **Emballonuroidea** (Emballonuridae, Myzopodidae y Nycteridae), **Noctilionoidea** (Furipteridae, Mormoopidae, Mystacinidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae) y **Vespertilionoidea** (Cistugidae, Miniopteridae, Molossidae, Natalidae y Vespertilionidae). (Barquez y Díaz, 2009; Díaz *et al.*, 2011; Urquiza *et al.*, 2017).

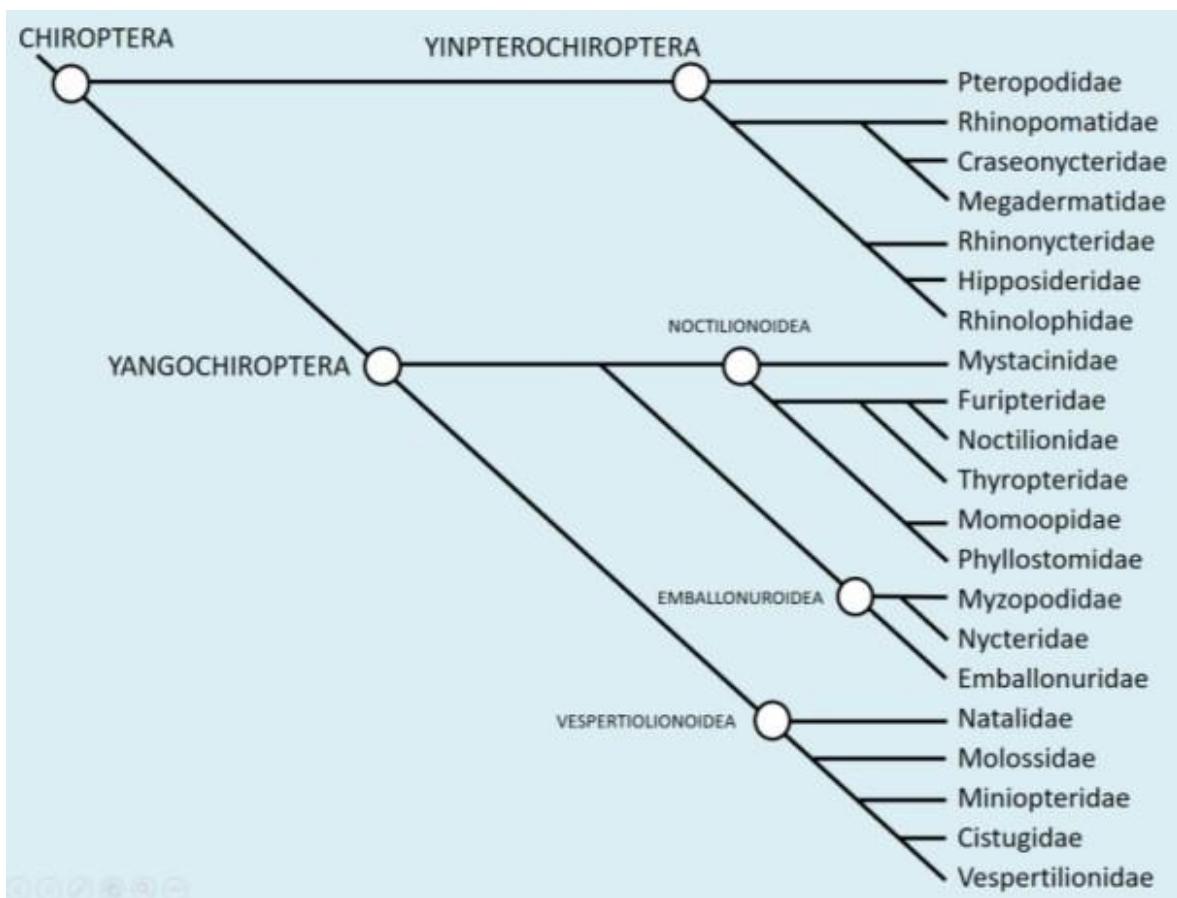


Figura 6: Filogenia molecular de Chiroptera (Modificado por Montero y Autino 2018 de Amador *et al.*, 2016).

Este orden posee como característica sobresaliente de su anatomía la modificación del miembro anterior adaptado al vuelo, en el cual los elementos óseos sufren gran desarrollo, principalmente las falanges de los dedos II al V (fig. 7). Estos elementos óseos tienen como función ser el sostén de la expansión tegumentaria que forma el ala. Los pliegues de piel, denominados patagios, que forman el ala se extienden desde el hombro hasta el primer dígito (propatagio), entre los dedos (dactilopatagio) y desde estos hasta el tobillo (plagiopatagio), así como entre las piernas y la cola dependiendo de la especie (uropatagio) (Cretekos *et al.*, 2005).

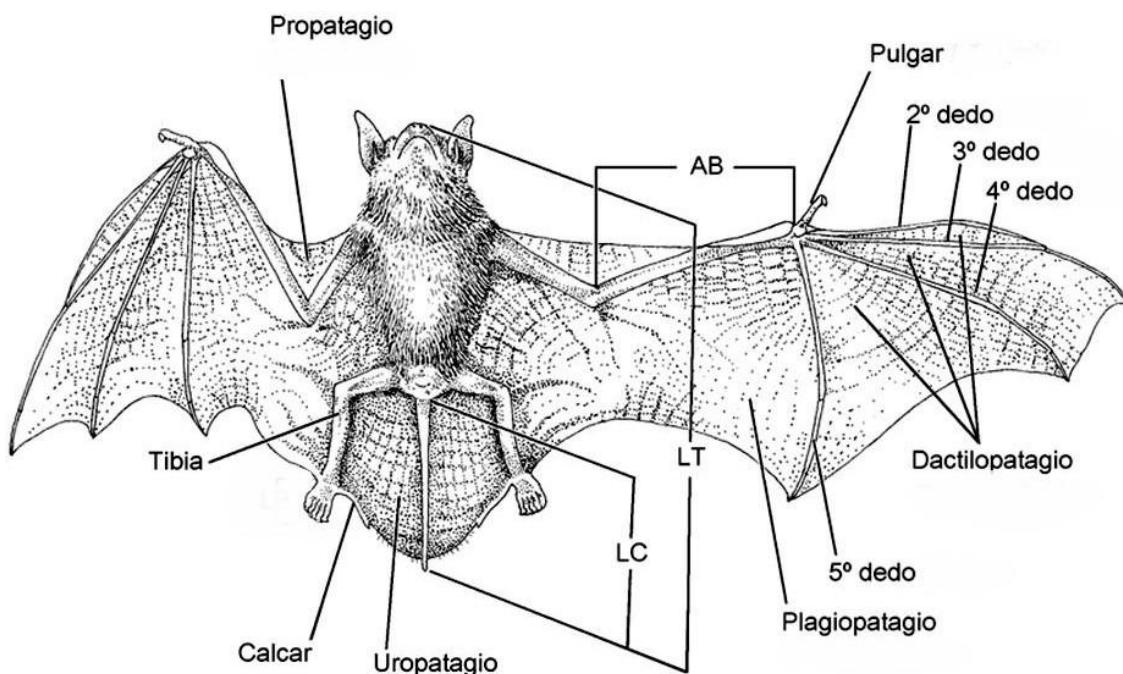


Figura 7: Anatomía general de Chiropteros. Nomenclatura de los distintos pliegues tegumentarios que forman el ala (modificado de Diaz *et al.*, 2011).

Con respecto a su alimentación, el orden Chiroptera posee hábitos alimentarios tan variados como los existentes en el grupo de los mamíferos. Existen especies insectívoras, piscívoras, nectarívoras, frugívoras y consumidoras de sangre. Esta gran diversidad de hábitos alimenticios también favoreció la gran distribución de este orden dando como

resultado la ocupación de diferentes ambientes naturales como artificiales (Altringham, J. D., 2011).

Por otra parte, la biología reproductiva de los murciélagos ha sido objeto de numerosos estudios en todo el mundo, desde aspectos morfológicos hasta comportamentales. Al pertenecer al grupo de los mamíferos, las hembras se caracterizan por gestar a los embriones en su útero los cuales son nutridos a través de la placenta (Stephens, 1962; Gopalakrishna *et al.*, 1991; Rasweiler, 1990b, 1991). Se han estudiado numerosas especies en donde se evidenció gran variedad de morfologías uterinas, así como también de ciclos reproductivos (Rasweiler IV y Badwaik, 2000). En cuanto a los machos se han observado especies en las que presenta como carácter de dimorfismo sexual, estructuras ornamentales que en algunas se asocian a estructuras glandulares (Brossset, 1966, y Mc William, 1982). Asimismo, especies de mediano o pequeño porte no presentan rasgos propios en los machos, exceptuando los genitales (Muñoz-Romo *et al.*, 2021). En cuanto al conocimiento sobre su morfogénesis y desarrollo embrionario los estudios se han centrado en la descripción y caracterización de los estadios del desarrollo embrionario basándose en caracteres morfológicos externos para su clasificación. Estos estudios se han realizado en unas pocas especies siendo uno de los primeros el realizado por Adams en 1992 para *Miotis lucifigus*.

1.5.1 Desarrollo embrionario en murciélagos

El estudio del desarrollo embrionario en murciélagos es un campo con escasos conocimientos. Los estudios existentes se centran en la descripción de la morfología externa, donde se establecen tablas con estadios de desarrollo embrionario. Una de las más completas es la realizada por Cretekos *et al.*, (2005) para *Carollia perspicillata*, en donde se detalla la morfología externa de los diferentes estadios embrionarios hasta la etapa fetal. Esta tabla emplea como referencia de base para la confección de los estadios embrionarios, el sistema clásico de Carnegie para el desarrollo humano (Streeter, 1942; O'Rahilly y Müller, 1987). Existen algunas descripciones embrionarias anteriores a esta, como la realizadas para *Myotis lucifugus* publicada por Adams (1992) la cual consta de 7

estadios de desarrollo de acuerdo a la longitud del embrión. Actualmente existen varias especies, pertenecientes a diferentes familias, que cuentan con su tabla de desarrollo: *Rousettus amplexicaudatus* (Giannini et al., 2006) de la familia Pteropodidae; de la familia Hipposideridae: *Hipposideros armiger* y *H. prati* (Wang et al., 2010). En la Familia Vespertilionidae: *Pipistrellus abramus* (Tokita, 2006), *Miniopterus natalensis* con énfasis en el desarrollo de extremidades comparado con el desarrollo de *Mus musculus* (Hockman et al 2009), *Myotis myotis* (Paksuz et al., 2017), *Vespertilio sinensis* (Nojiji et al., 2021) y *Myotis albescens* (Rodríguez et al., 2018), donde se comparan las estructuras embrionarias con otras especies. En la familia Molossidae (*Molossus rufus* (Nolte et al., 2009), se relacionan con la estructura y función en el adulto, así como en *Eumops patagonicus* (Rodriguez et al., 2018). Así como algunos representantes de la familia Phyllostomidae: *Artibeus lituratus* y *A. obscurus* (Ventura et al. 2018) para los cuales se proponen características comunes a todas las especies al caracterizar cada estadio. Mientras que para la familia Rhinolophidae: *Rhinolophus ferrumequinum* además se añade una descripción histológica de la formación de la hoja nasal (Usuy y Tokita, 2019).

1.5.1.1 Gonadogénesis en murciélagos

Como se ha descripto en el apartado 1.2.1 el estudio del desarrollo gonadal en mamíferos se ha centrado en el modelo murino, del cual se obtiene la mayor cantidad de información. Por otra parte, a pesar de que el orden Chiroptera es uno de los más diversos en cuanto a número de especies, los datos que se tiene acerca de esta temática en dicho orden es casi nula. Actualmente se ha caracterizado la ovogénesis temprana en *Carollia perspicillata* (Lechowska et al., 2012) donde se ha observado, en ovarios embrionarios, la formación de cistos de células germinales compuestos por 10 a 12 células germinales (citocitos). Además, se pudo observar la existencia de puentes citoplasmáticos transitorios entre los diferentes cistos lo cual es una característica atípica. Posteriormente células somáticas ingresan a los cistos y sus proyecciones citoplasmáticas rodean y separan a los ovocitos. Así se forman los folículos primordiales formados por una capa simple de células que rodean al ovocito.

Antonio-Rubio *et al.*, (2013) realizaron la identificación de células germinales en la corteza de ovarios adultos en tres especies de la familia *Phyllostomidae*: *Artibeus jamaiquensis*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira lillium*. Demostraron la persistencia de la pluripotencialidad de las ovogonias ya que las mismas continuaban expresando marcadores de pluripotencialidad (POUF1), sugiriendo que podrían actuar como un reservorio para el ovario adulto. Además, se ha descripto para *S. lillium* la gonadogénesis en embriones y el establecimiento de la línea germinal, enfocado el estudio en la formación del testículo (Gómez-Porras *et al.* 2017). Este estudio determina que la formación de la cresta gonadal y el establecimiento de la gónada bipotente se da entre el estadio 11 y 14 del desarrollo, y la primera diferenciación de la gónada masculina se da en el E.17. Esto demostró que el desarrollo gonadal en esta especie es semejante a lo descripto para el ratón con algunas diferencias en el tiempo de formación con respecto a los estadios embrionarios.

Debido a la falta de información con respecto al desarrollo gonadal existente dentro del orden Chiroptera, esta tesis plantea como uno de sus objetivos: “Describir los eventos de la diferenciación gonadal a partir del análisis histológico y la marcación de las células de la línea germinal y células Somáticas por técnicas histológicas histoquímicas e inmunohistoquímicas”.

1.5.2 Características reproductivas de los murciélagos

Los quirópteros son mamíferos euterios (Eutheria), pertenecen por tanto al grupo más evolucionado de los vertebrados con mamas, pelo y una placenta desarrollada. El aparato reproductor de los quirópteros tiene grandes similitudes con el del resto de la Clase Mamíferos, sin embargo, este grupo posee peculiaridades fisiológicas y etológicas que han surgido como adaptaciones a sus no menos curiosas condiciones de vida. Dentro del grupo de los quirópteros existen tantas características reproductoras diferenciales entre las distintas especies y familias, que se puede afirmar que encierran gran parte de las variaciones existentes en el

conjunto de los mamíferos. Poseen una tasa reproductora sorprendentemente baja, si la comparamos con la de otros mamíferos de su mismo tamaño: tienen una cría y en algunos casos dos al año, mientras los roedores o insectívoros producen camadas numerosas varias veces por año. (Balmori, 1990).

1.5.2.1 Regulación endocrina de la reproducción en Chiropteros

En quirópteros al igual que el resto de los mamíferos la glándula hipófisis (pituitaria) es la encargada de la regulación hormonal de la reproducción, actuando en la regulación de hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la prolactina sobre la función de las glándulas mamarias, testiculares y ováricas. Anatómicamente se ha observado que presenta las mismas estructuras distinguibles en los primates y roedores, pero con una diferencia en su posicionamiento, en donde el tallo del infundíbulo ocupa un surco entre la pars distal y la pars intermedia (Antony, 2000).

En todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha, la **hormona liberadora de gonadotropina** (GnRH), dirige la secreción pulsátil tónica de LH y FSH de los gonadotropos dentro de la pars distalis de la hipófisis. Estudios realizados en *Miniopterus schreibersii* confirman la presencia conservada de esta hormona así como también la expresión de la forma no sustituida de GnRH (King *et al.*, 1994). La distribución de esta hormona se realiza a través de un sistema porta hasta la pars distal, aunque se demostró que la arquitectura de estos puede variar en los mamíferos. Los sitios de síntesis y secreción de GnRH se han estudiado en varios murciélagos vespertiliónidos utilizando técnicas inmunocitoquímicas: *Myotis lucifugus* (King *et al.*, 1984), *M. schreibersii* (Mikami *et al.*, 1988b; Fernandez *et al.*, 1992), *Eptesicus fuscus* (Oelschläger y Northcutt, 1992). Los sitios principales de secreción de GnRH en murciélagos vespertiliónidos parecen estar dentro del tallo infundibular inferior y el lóbulo neural. Esto contrasta marcadamente con las ratas, en las que el sitio primario de secreción es la zona externa de la eminencia media (Anthony *et al.*, 1987). Diversos estudios realizados con respecto el mecanismo de liberación de la GnRH sugiere que podría existir en los murciélagos una estimulación local para su liberación (cambios en

el microambiente), lo que estaría indicando un nuevo sistema de regulación, no observado en otros mamíferos (King *et al.*, 1995).

Con respecto el estudio de las **hormonas gonadotroficas**, no hay estudios que demuestren certamente que existan grupos de células destinadas a la producción exclusiva de LH o FSH. Los estudios inmunohistoquímicos si evidencian que estas células gonadotrofas de la hipófisis son positivas tanto para LH como FSH en *M. lucifugus* y *Macrotus californicus*. En una especie cosmopolita *Miniopterus schreibersii* se han inmunodetectado subunidad beta de LH de anti ovino como anti bovino, así como de FSH anti-rata (Mikami *et al.*, 1988^a; Bojarski, 1990; Bernard *et al.*, 1991a).

Un estudio realizado en *M. schreibersii* (Bernard *et al.* 1991b) se enfoca en los cambios en la concentración de **LH**, a lo largo del año, relacionándolo con el retraso en la implantación del embrión característica en esta especie. Se observaron niveles bajos de LH en los meses previos al desarrollo folicular y un posterior aumento que coincide con la ovulación. Estos niveles de LH durante el período de retraso de implantación caen (invierno), para luego volver a tener un segundo pico estacional en noviembre (primavera), durante el parto, coincidiendo con elevados niveles de progesterona. Niveles bajos de LH también se constataron en *M. Lucifugus* durante el retraso en la ovulación y se elevaron en la primavera (Canney y Butler, 1987). Estudios realizados durante el periodo de retardo (delay) en *S. heathi* sugieren que la LH podría tener un control por feedback negativo de ciclo largo por parte de los andrógenos (Abhilasha y Krishna, 1996).

La **Prolactina**, una hormona muy estudiada debido a su rol en la producción de leche, también fue ampliamente estudiada debido a que se observó en Mustelidos, su papel fundamental en la sincronización de eventos neuroendocrinos de implantación retrasada con cambios foto periódicos en el medio ambiente (Curlewis, 1992). Bajos niveles de esta hormona imposibilitarían el funcionamiento normal del cuerpo lúteo. Este descenso de la prolactina se correlacionó a los días cortos y la disminución de **melatonina**. Bojarski (1993) describió en *M. schreibersii* una disminución de la actividad lactotrofa durante el crecimiento folicular y en comienzo del delay, asociadas a un bajo nivel de prolactina.

1.5.2.2 Hormonas en microquirópteros hembras

La actividad esteroidogénica del ovario de los mamíferos ha sido y sigue siendo un campo activo de investigación, sin embargo, muy pocos estudios han examinado la esteroidogénesis ovárica en murciélagos. Esto es a pesar del hecho de que la estructura del ovario de varias especies plantea preguntas interesantes sobre la esteroidogénesis ovárica (Martin y Bernard, 2000).

Se han realizado estudios de las células intersticiales y tecales de *Tadarida brasiliensis* y *Scotophilus heathi* donde se observó que poseen las enzimas necesarias para producir andrógenos (Jerrett, 1979; Krishna, 1996). Sin embargo, en la mayoría de los miembros del género *Tadarida*, el ovario izquierdo es esencialmente un órgano intersticial sin grandes folículos de Graaf ni cuerpos lúteos y se desconoce el destino de los andrógenos de dicho ovario.

Estudios realizados en *Antrozous pallidus* y *Macrotus californicus* evaluando la capacidad de producción de estrógenos, mediante la detección de 17β -HSD como para 3β -HSD, sugieren que los ovarios poseen la capacidad de síntesis de novo de estos. Aunque en *A. pallidus* está restringida esta actividad a las células intersticiales (Oxberry, 1979), mientras que en *M. californicus* carece de estas, pero estas enzimas se localizan en la teca interna y la granulosa (Crichton y Krutzsch, 1985; Crichton *et al.*, 1990). Los autores señalan esta característica en folículos atrésicos de *M. californicus*. La atresia folicular a menudo se asocia con la luteinización de las células de la teca y la granulosa, lo que produce cuerpos lúteos accesorios. Este fenómeno se ha reportado en algunos vespertilionidos (Guthrie y Jeffers, 1938; Mossman y Duke, 1973; van der Merwe, 1979).

En *Miniopterus schreibersii*, el estradiol plasmático alcanza su punto máximo a mitad de la gestación, lo que sugiere que, al menos durante el embarazo, esta hormona puede ser de origen placentario (Crichton *et al.*, 1989).

Existen dos fuentes principales de progesterona en los murciélagos, el cuerpo lúteo y la placenta, y la importancia relativa de estos dos órganos difiere tanto temporalmente

dentro de una especie como entre especies. Fuentes adicionales de progesterona son el tejido intersticial ovárico y la glándula suprarrenal. Se ha observado que el cuerpo lúteo no se encuentra presente hasta el final de la gestación en algunas especies como *Myotis lucifugus* (Buchanan y Younglai, 1988) y *Miniopterus schreibersii* (van Aarde *et al.*, 1994) y la progesterona es producida por la placenta. En otras especies también se observó esto ya que el cuerpo lúteo presenta luteólisis, como por ejemplo *Otomops martiensseni* (Kayanja y Mutere, 1975), *Chalinolobus gouldi* y *Eptesicus regulus* (Kitchener y Halse, 1978), *Chalinolobus morio* (Kitchener y Coster, 1981), *Rousettus leschenaulti* (Gopalakrishna, 1969; Gopalakrishna *et al.*, 1986), *Pteropus poliocephalus* (Towers y Martin, 1995). Por otra parte en especies perteneciente a las familias Nycteridae; *Nycterus luteola* y *N. thebaica* (Matthews, 1941; Bernard, 1982,), Rhinolophidae (incluido Hipposideridae) *Triaenops afer* (Matthews, 1941); *Hipposideros caffer* (Bernard y Meester, 1982), *H. fulvus*, *Rhinolophus rouxi*, *R. microphyllum* (Gopalakrishna y Badwaik, 1988); *Hipposideros lankadiva*, (Gopalakrishna y Badwaik, 1989,) y Megadermatidae: *Megaderma lyra*, (Gopalakrishna y Badwaik, 1988), poseen un cuerpo lúteo invertido que se pierde a principio de la preñez.

Muchas otras especies de quirópteros tienen un cuerpo lúteo que persiste durante el embarazo hasta justo antes o después del parto (*Mormopterus planiceps*, (Crichton y Krutzsch, 1987); *Antrozous pallidus*, (Oxberry, 1979); *Tadarida brasiliensis*, (Jerrett, 1979) y *Macrotus californicus* (Crichton *et al.*, 1990)). En *M. californicus*, se observa además la expresión de 3β -HSD y débilmente para 17β -HSD en el cuerpo lúteo y los folículos multilaminares, lo que sugiere que en ambos sitios se sintetizan progesterona y estrógeno (Crichton *et al.*, 1990).

1.5.3 Organización general del tracto reproductor de la hembra

Los murciélagos exhiben especializaciones reproductivas que a veces son singularmente similares a las de los primates o inusuales en comparación con las que operan en los mamíferos más comúnmente estudiados. Estos incluyen la menstruación verdadera y una

variedad de asimetrías funcionales del tracto reproductivo. Además, se ha establecido que algunos murciélagos se pueden mantener, criar y trabajar en un ambiente de cautiverio controlado, los representantes de este orden pueden proporcionar modelos animales útiles en biología reproductiva (Rasweiler y Badwaik, 2000).

El tracto reproductor de las hembras de murciélagos consiste en dos ovarios, dos oviductos, la porción gestacional del útero, el cérvix uterino y la vagina. Este esquema clásico puede variar dependiendo de la especie, en cuanto a características anatómicas y funcionales. Entre las diferentes especies del Orden se observan diferentes morfologías uterinas, existiendo dúplex, bicornes y simples (Fig. 8). Por ejemplo existen estudios realizados en representantes de la familia Phyllostomidae que presentan úteros simples, como *Carollia perspicillata*, *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* (Rasweiler, 1974, 1979; Hood and Smith, 1983; Rasweiler and Badwaik, 1999^a); representantes de las familias Emballonuridae, como *Taphozous longimanus* (Hood and Smith, 1983); Megadermatidae, como *Mormopterus planiceps* (Crichton and Krutzsch, 1987), Familia Nycteridae (Matthews, 1941) y Rhinolophidae (Bernard and Meester, 1982) poseen úteros dobles, mientras que en especies de la familia Megadermatidae (Gopalakrishna, 1950), Molossidae (Rasweiler, 1990; Stephens, 1962), Rhinopomatidae (Karim and Fazil, 1987), Thyropteridae (Wimsatt and Enders, 1980), Vespertilionidae (Kitchener and Coster, 1981; Hood and Smith, 1983; Gopalakrishna *et al.*, 1985) se observa la presencia de úteros bicornes, pudiendo ser estos cortos o largos .

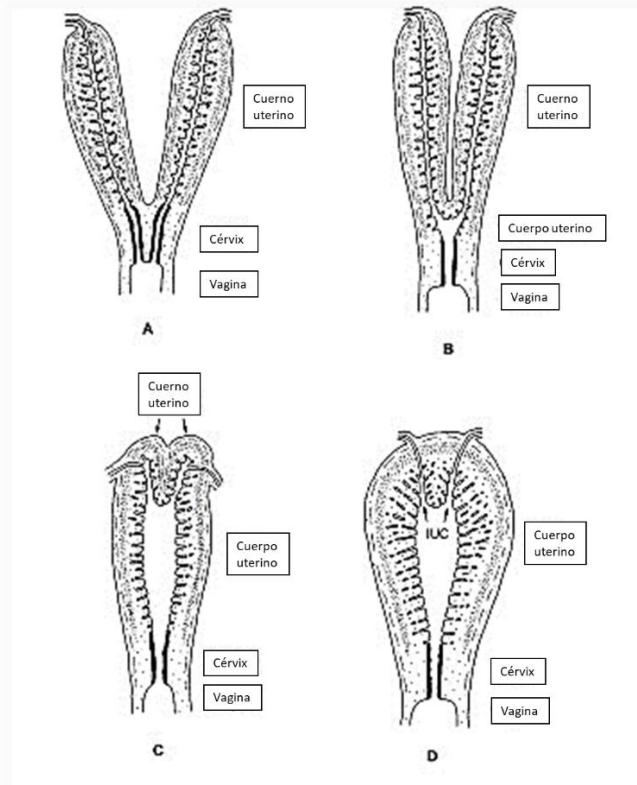


Figura 8: Morfologías uterinas . A) utero doble. B) útero bicorne largo. C) Útero bicorne corto. D) Útero simple .Extraído de Rasweiler y Badwaik, 2000.

1.5.3.1 Ovario en Quirópteros

En la mayoría de los mamíferos, así como en muchos murciélagos, el ovario se divide en dos zonas principales: una corteza externa y una médula interna. En los adultos, la corteza contiene los folículos, cuerpos lúteos (cuando están presentes), algunos tipos de tejido glandular intersticial, formas degeneradas de estos elementos y células estromales. La médula contiene los principales vasos sanguíneos y linfáticos intraováricos, nervios, cordones medulares y sus derivados, tejido glandular intersticial y la red ovárica. Un epitelio superficial o "germinal" envuelve el exterior de la corteza (Rasweiler IV y Badwaik, 2000).

En los Quirópteros, los ovarios poseen diferente tipo y cantidad de tejido intersticial glandular, que varía entre las especies (Mossman and Duke, 1973). Muchos Vespertilionidos (Wimsatt, 1944; Pearson *et al.*, 1952; Medway, 1972; Myers, 1977; Richardson, 1977; Oxberry, 1979; Krishna, 1985), y representantes de otras familias (Rasweiler, 1988; Krishna and Dominic, 1981) poseen típicamente ovarios con abundante estroma de tejido glandular intersticial. Esto difiere marcadamente de otras especies en donde el tejido intersticial glandular no es distingible (Rasweiler, 1970).

En *M. tuberculata*, el tejido glandular intersticial es abundante en los ovarios izquierdos que contienen un cuerpo lúteo bien desarrollado y no es abundante en la médula. Sin embargo está ausente de los ovarios derechos, que son más pequeños y exhibían solo las primeras etapas de desarrollo de una pequeña cantidad de folículos. Estas observaciones sugieren que el tejido de la glándula intersticial en esta especie puede ser de origen tecal, en lugar de estromal. Por el contrario, en el murciélagos vespertilioide *M. rufus*, el tejido intersticial glandular es de tipo estromal y contiene gran parte de la corteza y la médula tanto en los ovarios funcionales (derecho) como en los no funcionales más pequeños (izquierdo) (Rasweiler, 1988).

Se observó que en especies que habitan zonas templadas son de ciclo anual y su etapa reproductiva se superpone con su periodo de hibernación en donde crecen los folículos y comienza el apareamiento. Al final de la hibernación en la primavera, los mismos folículos experimentan un crecimiento preovulatorio y finalmente la ovulación. El tracto femenino permanece en estado de celo durante la hibernación, y esto también favorece el almacenamiento prolongado de espermatozoides que retienen la capacidad de fertilización exitosa (Wimsatt y Parks, 1966; Wimsatt, 1969; Racey, 1979).

Estudios realizados, sugieren que en estos folículos antrales que se mantienen durante el periodo de hibernación poseen características en las células de sus cúmulos ooforos, como el almacenamiento de glucógeno o gotas de lípidos. Se cree que esto ayudaría al mantenimiento del ovocito durante la hibernación (Wimsatt and Kallen (1957); Son *et al.*, 1987, 1988; Mori *et al.*, 1989).

1.5.4 Asimetrías reproductivas en las hembras

Los murciélagos tienen la peculiaridad de poseer asimetrías anatómicas y/o funcionales del tracto reproductor femenino, las cuales son mucho más marcadas que en otros grupos de mamíferos (Wimsatt, 1979). Así, mientras que algunos géneros manifiestan una dominancia dextral exclusiva del tracto genital femenino (Jaroli, 1980; Wimsatt, 1979; Khaparde, 1976), otros muestran dominancia del lado izquierdo de sus órganos reproductores. Actualmente no está completamente documentado en qué medida, esta simetría reproductiva caracteriza a los quirópteros. Asimismo, esta asimetría en los murciélagos siempre se ha asociado con el hábito monótoco (Pillai y Sastry, 2012).

La asimetría reproductiva funcional dextral, es decir dominancia del ovario derecho y gestación en el cuerno uterino derecho es el tipo de asimetría más común en los quirópteros y parece ser una característica de la familia Rhinolophidae (Matthews, 1937; Wimsatt, 1979 y Bernard, 1985). Esta particularidad también ha sido comunicada en muchas especies como *Tadarida melanopogon* (Badwaik y Gopalakrishna, 1990), *Tadarida aegyptiaca* (Gopalakrishna *et al.*, 1991b), *Pteronotus parnelli* (Badwaik y Rasweiler, 1998), *Molossus rufus*, *Macrotus mexicanus* y *Pteronotus rubiginosa* (Rasweiler y Badwaik, 2000).

Por otra parte, se han documentado especies en las cuales se observa una dominancia del ovario izquierdo con implantación en el cuerno derecho (Courrier, 1927; Matthews, 1941; Medway, 1971; Richardson, 1977; Wallace, 1978; Bernard, 1980). La asimetría ovárica parece tener también una base molecular. En *Hipposideros speoris* se observó una clara dominancia sinistral fisiológica ya que las enzimas lisosomales, mitocondriales y esteroidogénicas mostraron actividades retardadas en los ovarios derechos asimétricos (Pillai, 2004). La tinción diferencial para proteínas, hidrolasas lisosomales y enzimas mitocondriales en los tipos de folículos ováricos, cuerpo lúteo y células de las glándulas intersticiales en el murciélagos, *Megaderma lyra* soportan esta observación (Trivedi y Lall, 1987). Este hecho evidentemente enfatiza que tanto los ovarios como el cuerno uterino pueden no responder de manera similar a las gonadotrofinas y los esteroides gonadales, pero el desarrollo de un solo folículo de Graaf en el ovario izquierdo podría deberse a una

mayor estimulación de la hormona gonadotrófica en el ovario izquierdo. De manera similar, la formación del cuerpo lúteo en el ovario izquierdo puede ser ocasionada por un alto título de gonadotrofinas. Asimismo, la dominancia fisiológica del ovario izquierdo en *Hipposideros speoris* podría ser justificada por algún tipo de coordinación en la expresión genética existente entre el ovario izquierdo y el derecho no funcional (Pillai y Sastry, 2012).

1.5.5 Glándulas tegumentarias en murciélagos

Los mamíferos producen secreciones odoríferas que juegan un papel importante durante la atracción, el reconocimiento, la identificación y el apareamiento (Eisenberg y Kleiman, 1972; Blaustein, 1981; Penn y Potts, 1998; Brennan y Kendrick, 2006). Los pequeños mamíferos, como los roedores y los murciélagos, tienen pequeños dimorfismos sexuales, como el tamaño del cuerpo. Además, estas características también se pueden notar en sus glándulas tegumentarias y los compuestos que producen (Blaustein, 1981; Fernández-Vargas *et al.*, 2008). En los mamíferos, las glándulas tegumentarias pueden tener diferentes localizaciones, como la cabeza, el tronco o las extremidades (Myktytowycz, R., 1970 y 1972). En el orden Chiroptera se han realizado estudios respecto a glándulas tegumentarias en representantes de las familias Phyllostomidae, Vespertilionidae, Emballonuridae y Molossidae las cuales pueden localizarse en diferentes regiones del cuerpo (Fig. 9), como ser la región supra escapular en el caso de *Leptonycteris curasoae* y *L. yerbabuenae* (Nassar *et al.* 2008). En *Tadarida cynocephala* se analizó la presencia de glándulas faciales, determinándose la existencia de dos tipos glandulares; uno del tipo sebáceo y otro del tipo salival con secreción holócrina (Werner *et al.*, 1950), estas mismas habían sido descriptas para *Noctula noctula* por Harrison and Davies (1949), pero denominadas según su ubicación en paranhinales (en el hocico) y submentales (debajo de la mandíbula).

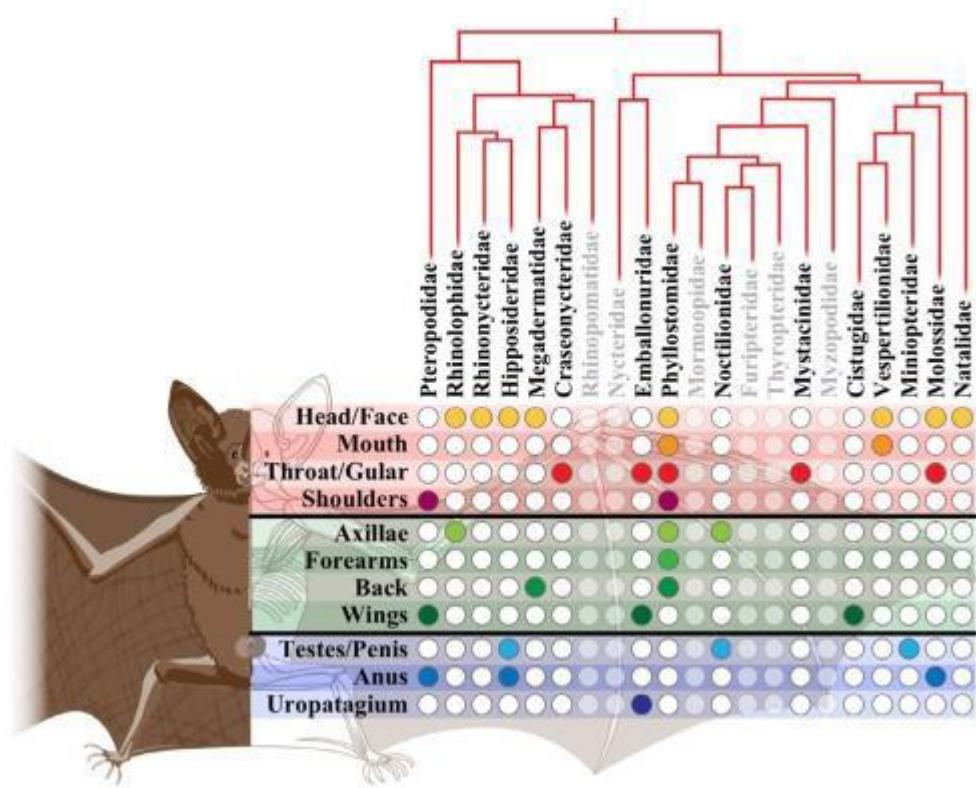


Figura 9: Localización diferencial de las glándulas tegumentarias en las diferentes familias de Chiropteros. Extraído de Muñoz-Romo *et al.*, 2021.

En el orden Chiroptera, algunos representantes de diferentes familias se caracterizaron por tener una glándula en la región supraesternal (gular), la cual solo está presente en los machos (Werner y Dalquest, 1952; Werner y Lay, 1963). Esta glándula ha sido descrita histológicamente para *Molossus rufus* (anteriormente llamado *Molossus ater*), representante de la familia Molossidae. El parénquima de la glándula gular consta de dos porciones, la sebácea y la sudorípara. Ambas estructuras están organizadas en lóbulos delimitados por tejido conectivo y están compuestas por un epitelio secretor con células simples cúbicas bajas. La secreción se colecta en un conducto común y luego se secreta a través de un poro queratinizado (Warner y Lay, 1963). En otros lugares, se ha comunicado la aparición de acinos sebáceos con secreción holocrina y glándulas sudoríparas tubulares con secreción apocrina en *Taphozous longimanus* (Emballonuridae) (Pandey y Dominic, 1987).

La histología y el contenido bioquímico de *Tadarida brasiliensis*, *Molossus bondae* y *Eptesicus fuscus* (Vespertilionidae) fueron descritos por Dapson *et al.*, (1977). Estos autores comunicaron que *Tadarida brasiliensis* y *Molossus bondae* tenían glándulas sudoríparas y sebáceas ricas en mucopolisacáridos y lípidos neutros, a diferencia de *Eptesicus fuscus* (Vespertilionidae), donde el contenido fue exclusivamente lipídico.

La morfología de la glándula gular también fue descrita en *Molossus molossus*, otro ejemplar representativo de la familia Molossidae. Está compuesto por acinos tubulares ramificados de tipo holocrino ricos en secreción lipídica. Además, las células basales del adenómero sebáceo tienen un papel proliferativo en la glándula gular de *M. molossus* (Dourado *et al.* 2001).

A la glándula gular de *Molossus sinaloae* se le atribuyó una función para el marcado de las hembras por parte del macho, así como para la delimitación del territorio. Los investigadores, también observaron que el pico de actividad glandular y la aparición de hembras marcadas coinciden con el final de la gestación y dos meses después del parto (Heideman *et al.* 1990). Además, se sabe que las señales químicas son particularmente importantes para los quirópteros porque ocupan refugios oscuros donde cohabitan miles de individuos (Bloss, 1999; Altringham y Fenton, 2003; Dechmann y Safi, 2005).

Recientemente un estudio propuso el papel de la glándula gular como un rasgo dismórfico en murciélagos (Moñoz-Romo *et al.*, 2021), pero aún no se conoce bien la naturaleza química de la secreción que producen estas glándulas.

1.5.4 Familia Molossidae (Gervais, 1856)

La Familia *Molossidae*, perteneciente al suborden de los Yangochiropteras, tiene una amplia distribución mundial principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Barquez *et al.*, 2020). Como característica distintiva poseen una cola parcialmente cubierta por el uropatagio, alas estrechas debido a que la longitud de los dígitos III y V es semejante. Además, poseen el autopodio del miembro posterior redondeado.

La mayoría de las especies de esta Familia se encuentran en el Norte y centro de Argentina. Se caracterizan por ser especies insectívoras capaces de consumir insectos duros y blandos (Freeman, 1979). En cuanto a su hábitat son particularmente oportunistas con respecto a la elección de sus dormideros, y muchos han sido asociados a viviendas humanas (Barquez, et al., 1999). Con respecto a su biología reproductiva, son pocos los estudios realizados en esta familia en América del sur, solo se tienen estudio focalizados en datos acerca de caracteres reproductivos masculinos de *Molossus molossus* (Morais et al. 2013; Christane et al. 2015 y Soares et al. 2020) y morfología ovárica, uterina, ciclo reproductivo e implantación en *Molossus rufus* (Rasweiler IV, 1988, 1990 y 1991), mientras que en el género *Eumops* (Miller, 1907) los estudios en el área reproductiva son muy escasos.

Por todo lo antes expuesto, la presente tesis centra su estudio en la biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (fig. 10) representante de la Familia Molossidae, que habita en la región noreste de Argentina, la cual es una especie poco estudiada a pesar de ser abundante en zonas antropizadas. Para el desarrollo de esta tesis se exponen a continuación los objetivos generales y particulares planteados y desarrollados en las siguientes secciones.



Figura 10: Ejemplar de *Eumops patagonicus*.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis general

Eumops patagonicus es una especie perteneciente a la familia Molossidae por lo que su biología reproductiva y sus características anatómicas son semejantes a las descriptas para otras especies pertenecientes a esta familia.

Hipótesis particulares

1. Los eventos de formación y diferenciación gonadal en *E. patagonicus* respetan el patrón general descripto para mamíferos.
2. Las hembras siguen un patrón morfológico del tracto reproductor semejante al descripto para las especies de la familia Molossidae: presencia de un útero bicorne con dominancia dextral del ovario.
3. La existencia de la dominancia dextral del ovario es a causada por la falta de receptores de la hormona folículo estimulante en el ovario izquierdo.
4. Las hembras poseen la presencia de reservorio espermático como se ha observado en otras especies de murciélagos.
5. La apoptosis en los ovarios es uno de los mecanismos que intervienen en la remodelación del tejido ovárico a lo largo del ciclo reproductivo de la hembra.
6. Los machos poseen una glándula gular de carácter únicamente lipídico que utilizan para la marcación de las hembras.

Objetivos generales:

- A- Estudiar los parámetros reproductivos de *Eumops patagonicus* a nivel anatómico, histológico, histoquímico e inmunohistoquímico, a fin de describir desarrollo gonadal, y caracterizar el ciclo reproductivo normal.
- B- Describir la glándula gular presente en machos de *Eumops patagonicus* a nivel anatómico y químico y evaluar su actividad en épocas reproductivas y no reproductivas.

Objetivos particulares:

1. Describir los eventos de la diferenciación gonadal a partir del análisis histológico y la marcación de las células de la línea germinal y células somáticas por técnicas histológicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.
2. Describir el ciclo reproductivo de las hembras a través de un examen anatómico, histológico e inmunohistoquímico de los ovarios y conductos genitales durante las cuatro estaciones del año. Establecer la diferencia existente entre ovarios derecho e izquierdo de *Eumops patagonicus*.
3. Determinar la presencia/ausencia de posibles reservorios espermáticos el oviducto de las hembras a partir de estudios histológicos y de marcación inmunoespecífica.
4. Examinar la actividad apoptótica y su rol en la organización del tejido ovárico, mediante métodos directos como TUNEL (TdT-mediated d UTP biotin end labeling), e indirectos a través de la expresión de las proteínas pro y antiapoptóticas.
5. Evaluar la actividad proliferativa celular durante la ontogenia gonadal mediante estudios histológicos y de inmunohistoquímica.

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Hipótesis y Objetivos

6. Analizar y describir la histología y la composición química de la sustancia secretada por la glándula gular de los machos de la especie en estudio.

Materiales y métodos

3.1. Captura de ejemplares:

Los ejemplares de *Eumops patagonicus* fueron Capturados en el Campus universitario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (Coordenadas: 27º 28' 07''S y 58º 46' 54'' O) de la ciudad de Corrientes, Argentina. Los ejemplares se capturaron utilizando redes de niebla de 6 x 2,4 metros de longitud soportadas por varillas metálicas de 2 m de alto, situadas próximas a dos refugios artificiales (cielorrasos) (Figura 11 a). Dichas colectas se realizaron en horarios próximos al atardecer y noche, durante dos años con 2 muestreos por mes con un intervalo de 15 días entre muestreo. Los individuos se separaban manualmente de las redes seleccionando 2 hembras y 2 machos, los cuales se depositaron en bolsas de tela de lienzo para ser transportados al laboratorio (Figura 11 b - d). Los individuos capturados fueron identificados con la siga AMA y una numeración. Se colectaron un total de 142 individuos de los cuales 77 Hembras y 65 macho, y se obtuvieron 18 embriones. El resto de los individuos retenidos por las redes o pertenecientes a otras especies fue liberado al alcanzar los ejemplares requeridos por sexo. Las colectas fueron avaladas por la dirección de recursos Naturales de la Ciudad de Corrientes: autorización N º 845 / 2019.



Figura 11: a) imagen aérea del campus Universitario de la Universidad Nacional del Nordeste “Deodoro Roca” con la localización de los dos refugios artificiales muestreados: colonia 1 (A) depósito de sillas, colonia 2 (B) baño externo. b) Colocación de redes de nieblas en área de muestreo. c) Imagen de bolsas de telas utilizadas para el transporte de ejemplares. d) Ejemplar de *E. patagonicus* capturado en los sitios de muestreo.

Una vez en el laboratorio los animales se anestesiaron con Lidocaína 2% intraperitoneal con 0,012ml/g; se realizaron toma de medidas de longitud hocico- cola con calibre digital y peso con balanza de precisión. Se sacrificaron siguiendo los lineamientos de AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition (Underwood *et al.*, 2013) y la Guía de la American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education (Sikes *et al.*, 2016). Posteriormente los Especímenes fueron colocados en la colección de Mastozoología de FACENA (Res: 0768/14 CD).

Los individuos colectados se diseccionaron para aislar las gónadas masculinas y femeninas y el oviducto de las hembras. Las hembras preñadas colectadas se diseccionaron para extraer el útero con el embrión. Los embriones a partir del estadio 13 (según tabla de desarrollo publicada para *E. patagonicus* propuesta por Rodríguez *et al.* (2018)) se aislaron

del útero y se procesaron para histología convencional: Embrión estadio 13 completo y en estadios avanzados (estadios 17, 23, 24 y 25) solo se utilizaron las gónadas. Todo el material fue fijado en solución de Bouin por 48 h y posteriormente conservados en formol 10%.

Por otra parte, en los machos capturados se aisló el tegumento de la región supra esternal que contiene a la glándula gular. Un pool de estas muestras se fijó para procesamientos histológicos convencionales y otro pool se conservó en freezer a -20°C para procesamientos de identificación de lípidos.

3.2 Estudios morfológicos:

Con el fin de realizar las descripciones de la morfología de las gónadas y de su formación durante el desarrollo embrionario, los embriones y las gónadas embrionarias y adultos y la glándula gular se seleccionaron y fotografiaron. Posteriormente se procesaron siguiendo los pasos de la técnica histológica convencional: deshidratación, inclusión en parafina y coloraciones para la elaboración de preparados histológicos. El material previamente fijado se deshidrató en concentración de alcoholes crecientes (70°, 80°, 96°, 100°) y posteriormente se lo aclaró con dos baños consecutivos de Xilol de 1h cada uno. Luego se procedió a la inclusión en 2 baños sucesivos de parafina por 2hs cada uno para la confección de un tajo histológico. Las muestras fueron orientadas para la obtención de cortes histológicos de forma transversal de 2 a 5 μ m de espesor. Las secciones fueron obtenidas con el uso de un micrótomo rotatorio tipo Spenser Manual y colocadas sobre portaobjetos limpios para histología convencional. Algunas muestras seleccionadas para inmunohistoquímica se ubicaron sobre portaobjetos silanizados. Las muestras se colorearon para su descripción con coloración convencional de Hematoxilina- Eosina y con la reacción histoquímica de PAS (ácido peryódico reactivo de Schiff). Los preparados fueron observados y fotografiados con un sistema compuesto por un microscopio de epifluorescencia y campo claro, trilocular LEICA DM4000B LED® y cámara LEICA DFC310 FX® con soporte digital para captura de imágenes LASZ LEICA Inc®.

3.3. Detecciones histoquímicas

3.3.1 Tricrómica de Gómori

Esta tinción se utiliza con el fin de distinguir con diferentes coloraciones las estructuras:

Nucleos: violeta/ azul oscuro

Citoplasma, queratina y fibras musculares: gama de rojos

Colágeno: verde/azul

Procedimiento: Los cortes de tejido desparafinados e hidratados se trajeron con solución de Bouin para intensificar la coloración final. Los núcleos se tiñeron con Hematoxilina por 5 minutos y luego de virar se tiñeron con solución tricrómica de Gomori (Biopack®) durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con solución de Ac. Acético al 2%, 2 min, se deshidrataron y montaron.

3.3.2 Impregnación argéntica de Gomori

Esta tinción se utiliza para distinguir las fibras colágenas de las reticulares.

Procedimiento: Los cortes histológicos de tejido desparafinados e hidratados se oxidan con permanganato potásico al 1% durante 90 segundos, se lavaron en agua corriente y blanquearon con metabisulfito potásico al 2%. Luego de lavados en agua corriente se los sometió a un baño mordiente con una solución de alumbre férrico al 2% durante un minuto. Se lavaron nuevamente en agua corriente durante 5 minutos y se les hicieron dos pasajes por agua destilada. A continuación, se los trató durante un minuto con el complejo argéntico (plata amoniacial y agua destilada, 50:50), se los lavó con agua destilada y se redujeron en formol al 10%. Luego de lavarlos con agua corriente se les hizo un pasaje rápido por hiposulfito sódico al 2%, se lavaron y secaron. Posteriormente se deshidrataron en alcohol de concentración creciente y por xilol para ser montados.

3.3.3 Rojo Nilo: detección de lípidos en glándula gular

La tinción de rojo Nilo es de tipo vital, se utiliza para la detección de gotas de lípidos intracelulares por microscopía de fluorescencia. Se preparó una solución de trabajo por dilución en dimetil sulfóxido (DMSO) en una concentración de 1mg/ml a partir de una solución madre de rojo Nilo,

esta solución de trabajo se almacenó a temperatura ambiente en oscuridad. El tejido glandular seleccionado se fijó en formol al 10% y se realizaron cortes por congelamiento para evitar la pérdida del contenido lipídico. Las secciones histológicas se tiñeron con 500 µL de 10ug/ml de la solución stock diluida en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) por 3 hs en oscuridad. Luego se lavaron con PBS y se incubaron 15 min con 10µg/ml Hoechst 33342 en PBS, se monta con glicerol-PbS (1:1) en un portaobjetos y se examinaron inmediatamente en microscopio de fluorescencia. Se utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión de 450-490nm y 515-565nm, respectivamente. Se tomaron imágenes digitales con un microscopio trilocular LEICA DM4000B LED® y cámara LEICA DFC310 FX® con soporte digital para captura de imágenes LASZ LEICA Inc®.

3.3.4 Coomassie blue: detección del contenido proteico de la glándula gular.

La tinción de azul de Coomassie (Kiernan, 1999) se utiliza cuando la cantidad de proteínas es alta. En secciones histológicas de glándula gular, previamente desparafinadas e hidratadas se procedió a colorear con solución de azul de Coomassie durante 20 min. Posteriormente se deshidrató y montó para observación en microscopio.

3.4 Detecciones Inmunohistoquímicas

3.4.1 Evaluación del estado proliferativo del tejido gonadal: (detección de PCNA)

Para evaluar el estado proliferativo de las gónadas embrionarias se seleccionaron secciones de tejido de 3 – 5 µm de espesor colocadas sobre portaobjetos previamente silanizados. Estas fueron sometidas a detección por inmunohistoquímica de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). Los cortes histológicos fueron desparafinados en dos baños de xilol durante 20 min cada uno y rehidratados en concentraciones decrecientes de alcohol y agua destilada (100º, 96º I, 96ºII, 70º y agua destilada). Con la muestra hidratada se procede a un lavado y luego una incubación en baño en PBS Tween por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 10 min y bloqueo de las peroxidatas endógenas con H₂O₂ al 3% en PSB durante 20 min. Previa a la incubación con anticuerpo secundario se procedió al bloqueo de las muestras durante 20 min con Blocking Serum (suero normal) perteneciente al Vectastain ®ABC Universal Kit

peroxidase (Horse anti-mouse/Rabbit IgG). Se incubaron las muestras overnight en Cámara húmeda a 4°C, con anticuerpo 1º PCNA anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology PCNA Antibody (sc-7907, FL - 261) dilución 1:50 y su control negativo se realizó con PBS. Se lavaron las nusturas con PBS Tween por 10 min y se incubaron por 30 min con Biotinilated Universal Abtibody Vectastain® ABC Universal Kit y posteriormente con Vectastain elite ABC reagent por 30 min. Se realizó la inmunodetección con DAB (diaminobenzidina) (DAKO K3468) y se contrastaron los núcleos con hematoxilina.

3.4.2 Análisis inmunohistoquímico para detección de OCT4 en la cresta gonadal

Para la determinación de la expresión de OCT-4 se utilizó como anticuerpo primario el políclonal anti OCT-4 de origen humano anti-ratón a una dilución de trabajo estándar y el kit de revelado según el protocolo indirecto de “avidina/ biotina” (Vectastain Elite ABC Universal Kit Peroxidase), según lo descripto en el apartado 3.4.1.

3.4.3 Detección de apoptosis con método indirecto IHQ de proteínas de la familia Bcl (Bax-BCL)

Se reveló la expresión de Bax utilizando un anticuerpo monoclonal hecho en ratón, Anti-Bax Clon 6A7, (Sigma Chemical Co, catálogo Nº B 8429) a una dilución de trabajo 1:300 y el kit de revelado según el protocolo indirecto de “avidina/ biotina” (Vectastain Elite ABC Universal Kit Peroxidase), según lo descripto en el apartado 3.4.1. Se realizó un control negativo incubando con el secundario y terciario de DAKO pero sin la incubación con el anticuerpo primario anti-Bax.

Para el caso de Bcl2 se utilizó un anticuerpo políclonal anti Bcl2 (C 21): sc-783, Santa Cruz, hecho en conejo, a una dilución de trabajo de 1:400 e incubación ON a 4 °C.

3.4.4 Detección de Hormona Folículo estimulante: FSH

Para la detección de la presencia de la hormona FSH en el tejido ovárico y detectar su ubicación, se seleccionaron secciones de tejido de 2 – 4 µm de espesor colocadas sobre portaobjetos

previamente silanizados y la utilización del kit de revelado según el protocolo indirecto de “L-streptoavidina biotina” - HRP (DAKO K0690). Estas fueron sometidas a detección por inmunohistoquímica de FSH: Hormona Foliculoestimulante). Los cortes histológicos fueron desparafinados en dos baños de xilol durante 20 min cada uno y rehidratados en concentraciones decrecientes de alcohol y agua destilada (100º, 96º I, 96ºII, 70º y agua destilada). Con la muestra hidratada se procede a un baño en PBS Tween por 10 min previo un lavado en el mismo. Se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 10 min y bloqueo de las peroxidases endógenas con H₂O₂ al 3% en PSB durante 20 min. Se incubaron las muestras over-nigth en Cámara húmeda a 4ºC, con anticuerpo 1º FSH políclonal (Biogenex antibody lot: AR0260997) Ready to use y su control negativo se realizó con PBS. Previo a la incubación de las muestras con el anticuerpo se realizó un bloqueo con 5% de leche descremada en PBS. Luego de lavar el anticuerpo con PBS se incubó a TA por 10 min con el anticuerpo secundario biotinilado universal de DAKO (K0679) listo para usar. Se lavó el anticuerpo secundario y se incubó con la estreptoavidina conjugada a peroxidasa de Rábano picante (HRP), lista para usar (DAKO K0690) durante 10 min a TA. Se lavó con PBS y se reveló la peroxidasa con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) de DAKO (K3468) a TA durante aproximadamente 5 min. Se utilizó hematoxilina como tinción de contraste durante 5 min.

3.4.5 Detección de glucoproteína OVGP 1 en oviducto.

Para la detección de la presencia y ubicación de la proteína OVGP 1 en el tracto oviductal, se seleccionaron secciones de tejido de 2 – 4 µm de espesor colocadas sobre portaobjetos previamente silanizados. Se empleó el anticuerpo anti OVGP 1/OGP abcam® (ab118590) políclonal anti human, dilución 1:100 y la utilización del kit de revelado según el protocolo indirecto de “L-streptoavidina biotina” - HRP (DAKO K0690). Se procedió con el protocolo detallado en la sección 3.4.4.

3.4.6 Detección de la proteína S-100 en glándula gular.

Para la detección de la Proteína S-100, un grupo de muestras fueron cortadas en 3µm de espesor y montadas en portaobjetos, previamente tratadas con silane, para ser sometidos a la técnica de

inmunohistoquímica para poder detectar la presencia de la proteína S-100. Se utilizó el anticuerpo S-100 α anti-rabbit (DAKO-N1573) dilución 1:40 y el kit de revelado según el protocolo indirecto de “L-streptoavidina biotina” - HRP (DAKO K0690). Se procedió con el protocolo detallado en la sección 3.4.4.

3.5 Detección de apoptosis con método directo: Ensayo de TUNEL

La técnica de TUNEL se fundamenta en la incorporación de nucleótidos marcados con FICT (isotiocianato de fluoresceína) al extremo 3' de la cadena interrumpida de ADN, reclutamiento de nucleótidos que realiza una transferasa terminal (desoxinucleotidil transferasa). Dichos nucleótidos son revelados con un anticuerpo secundario anti FITC (fragmento Fab) de oveja, conjugado con peroxidasa de rábano picante (POD). Se utilizó el kit “*In Situ Cell Death Detection, POD*” de Roche®. Primero los tejidos fueron permeabilizados con Tritón X-100 (código 23, 472-9 Aldrich®) al 0,1% por 10 min. Luego se realizaron dos lavados con PBS procediendo a bloquear las peroxidasas internas con una solución de H₂O₂ al 3%. Se lavó dos veces con PBS y se escurrió completamente el líquido de las células antes de la incubación con la mezcla enzimática y los nucleótidos marcados. La incubación se realizó en cámara húmeda por 1 hora a 37°C. Se realizaron los controles positivos (células tratadas con ADNasa) y negativos (células incubadas con los nucleótidos marcados pero sin la enzima (deoxinucleotidil transferasa) que cataliza la polimerización. Luego se frenó la incubación por lavados con PBS y se procedió al revelado por incubación con POD (peroxidasa) durante 30 min a 37°C, en cámara húmeda y posterior incubación por aproximadamente 5 min con DAB (diaminobencidina, código K3468 DAKO). Las células TUNEL positivas tiñen sus núcleos con DAB (marrón) revelando la actividad de la endonucleasa.

3.6 Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa de análisis de imágenes, libre, Image J para poder documentar el volumen de las gónadas en cada etapa de desarrollo obteniendo su ancho y alto y calculando el volumen con la fórmula de volumen de un esferoide (Dunham, 1983).

$$\text{Volumen esfera: } \frac{4}{3} \pi \times (\text{d1}/2) \times (\text{d2}/2)^2$$

3.7 Alineamiento de proteínas

A los fines de garantizar que los anticuerpos utilizados (contra proteínas de otras especies de mamíferos) tienen reactividad cruzada entre especies y así poder utilizarlos en el modelo objeto de estudio (*Eumops patagonicus* Chiroptera: Molossidae), e identificar de esta manera las proteínas, se realizaron los respectivos alineamientos entre las secuencias de las especies target de cada anticuerpo y las de murciélagos. Las secuencias de las proteínas fueron tomadas del GenBank y el alineamiento de proteínas se realizó con el programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.8 Determinación del contenido de ácidos grasos por cromatografía de Gs/Ms:

Muestras de tejido fueron analizadas en su composición y contenido de ácidos grasos mediante extracción por el método de Blight and Dyer y análisis de los tipos de ácidos grasos por cromatografía de GS/MS. Este estudio se realizó a través del servicio brindado por la Universidad Nacional del Litoral. Las muestras fueron separadas en dos pools uno de glándulas durante la época reproductiva (invierno, primavera y principio de verano) y otra época no reproductiva (fines del verano y otoño).

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resultados

Resultados:

4.1 Desarrollo gonadal

4.1.1. Cresta urogenital/gonadal en formación

El primer estadio del desarrollo embrionario analizado fué el E. 13 (Fig. 7a). En este se evidencia el inicio de la formación de las gónadas. Se puede observar la presencia de las crestas gonadales/urogenitales, que se presenta como 2 rudimentos pares que se forman a partir del mesodermo intermedio (Fig. 12b). Estas crestas están formadas por el epitelio celómico ventral, que prolifera hacia el mesénquima que se encuentra por debajo, lateralmente a los esbozos de los riñones. En la sección ventromedial, se encuentra el mesenterio que se conecta con las crestas, delimitado por el epitelio que las recubre. Posterior a las crestas se encuentra la aorta dorsal de gran porte seguida por el tubo neural.

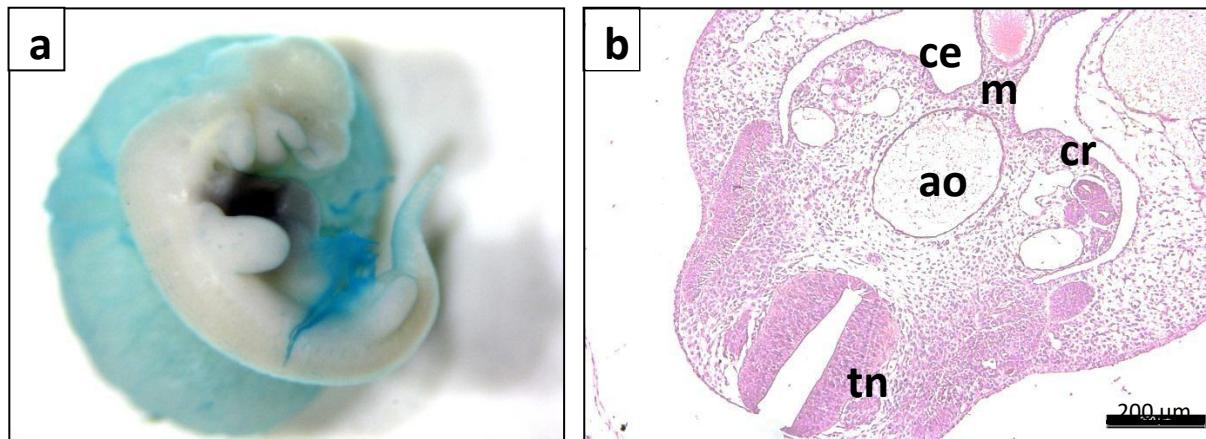


Figura 12: a) embrio de *Eumops patagonicus* en estadio 13 del desarrollo embrionario según tabla de desarrollo Rodríguez et al., (2018). b) Microfotografía de la histología en embrión en estadio 13 donde se observa la presencia de las crestas urogenital/gonadal (cr), mesenterio intestinal (m), celoma embrionario (ce), aorta dorsal (ao), y tubo neural (tn). Tinción: Hematoxilina-eosina.

Se detectó la expresión de OCT4, un marcador de pluripotencialidad celular en este estadio de desarrollo, lo que nos permitió observar la localización de las CGPs. Estas se encontraron distribuidas a lo largo del mesenterio, en el epitelio de recubrimiento de este, así como también en el epitelio de recubrimiento de la cresta gonadal en formación y algunas en su interior, en el mesénquima subyacente. (Figura 13 a-c).

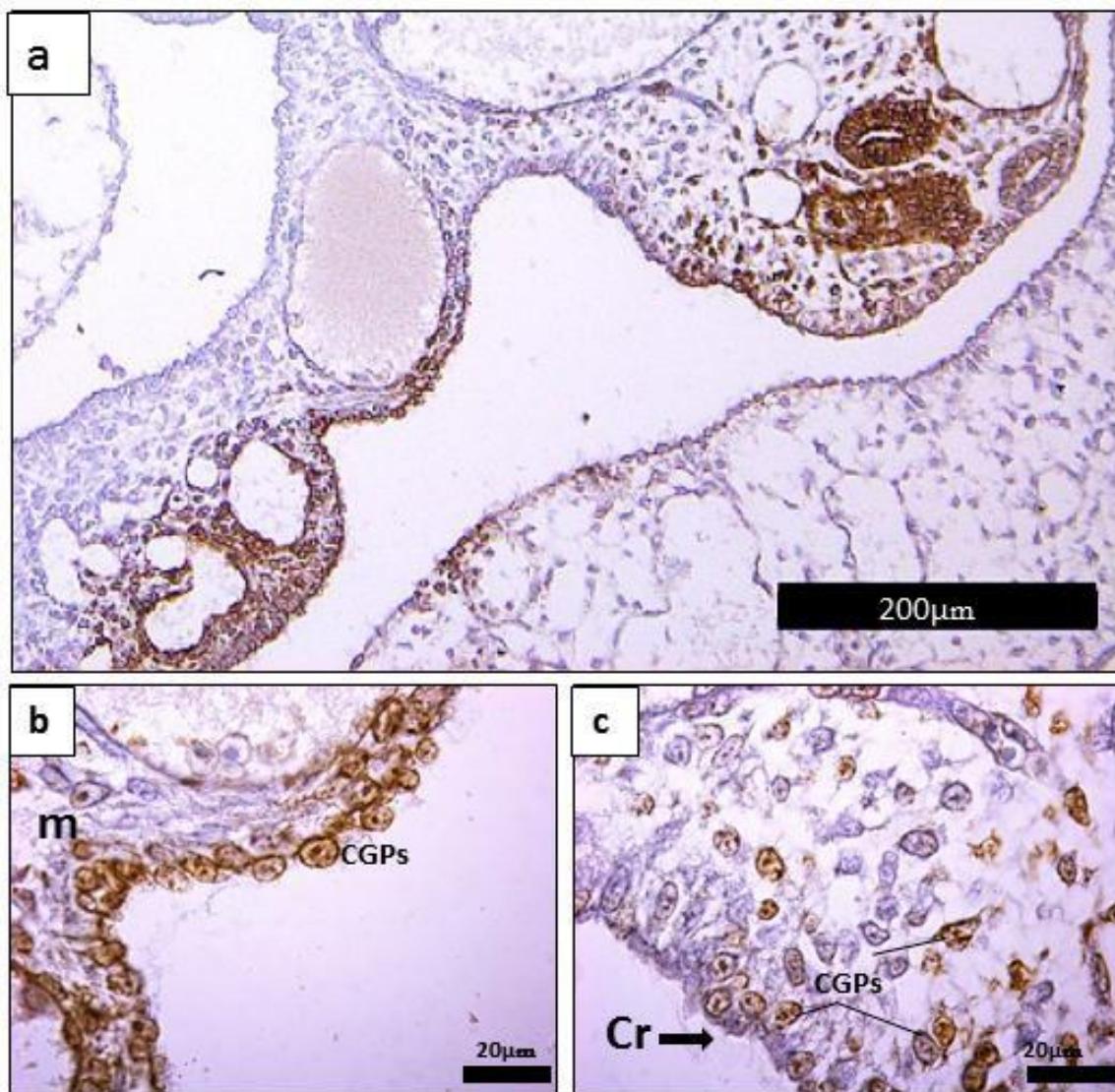


Figura 13: Embrión en estadio 13 con inmunomarcación para OCT4. En estadio 13. a) Imagen panorámica de la histología embrionaria con marca positiva (marrón) para OCT4. b) detalle a nivel

de mesenterio. c) detalle a nivel de la cresta gonadal en formación. Referencias: CGPs. Células germinales primordiales, Cr: cresta gonadal /urogenital, m: mesenterio.

4.1.2. Gónada Bipotente o Indiferenciada

Al examinar embriones en etapa intermedia del desarrollo embrionario, E 17, se pudo observar la presencia de las gónadas bipotentes o indiferenciadas (Fig. 14 a y b). Se presentan como dos estructuras esferoides paralelas al tubo neural y laterales a los esbozos del riñón. Histológicamente se observa un mesénquima de células distribuidas homogéneamente, delimitado por un epitelio de células cúbicas bajas, adoptando una forma esferoide, con un lateral aguzado. En este extremo se identifica la presencia de un conducto delimitado por una capa de células cilíndricas bajas (precursor del conducto de Müller) (Fig. 14 c). La región medular de esta gónada se observa la presencia de pequeños vasos sanguíneos y en la región central se identifica la presencia de cordones sexuales (Fig. 14 b y d). Se observó la expresión de PCNA, un buen marcador de células en proliferación celular, en la región central o medular de esta gónada bipotente (Fig. 14 e y f).

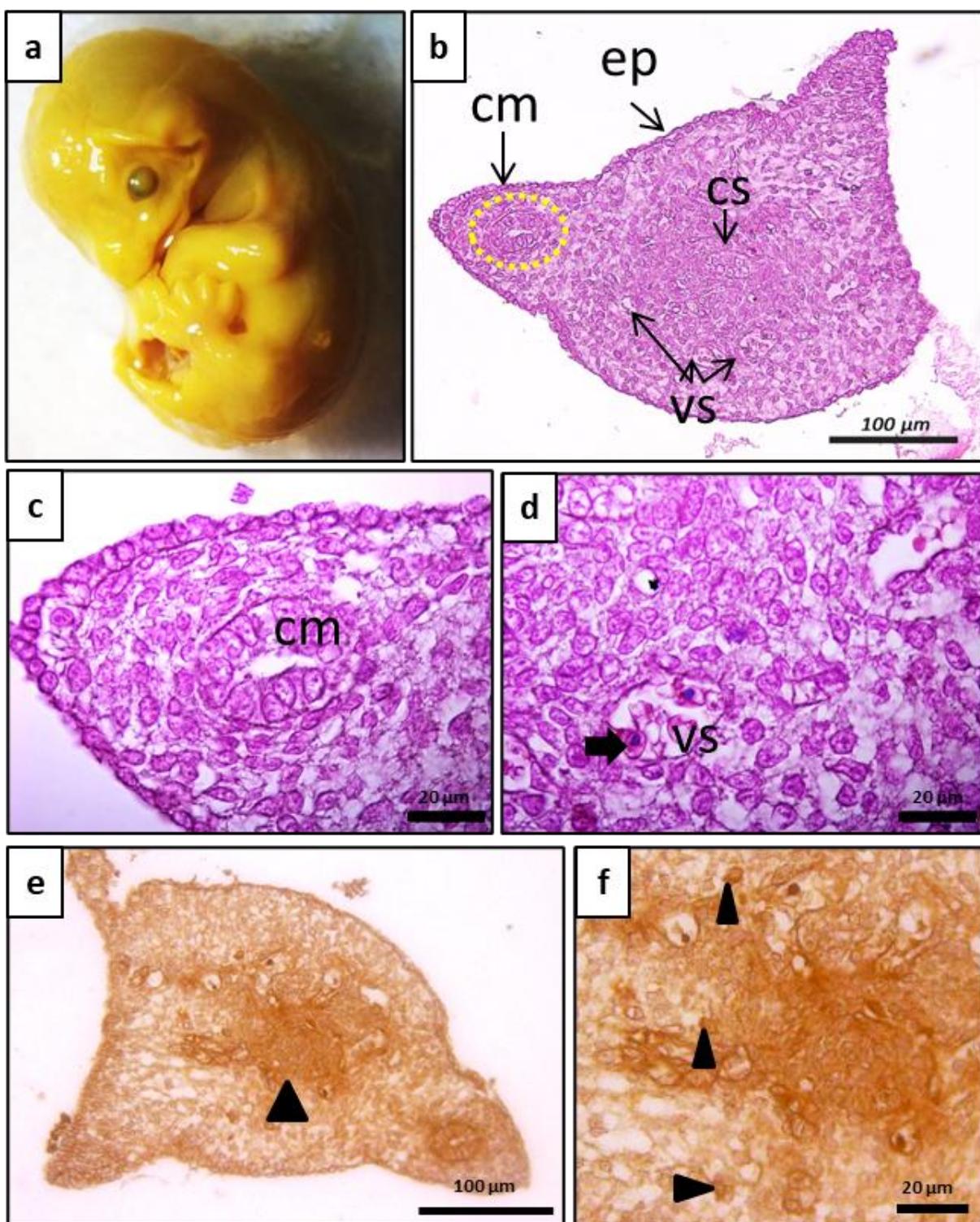


Figura 14: a) Estadio embrionario 17 de *E. patagonicus*. b) vista general de organización histológica de la gónada bipotente. c) detalle del conducto de Müller. d) detalle del mesénquima donde se observan vasos sanguíneos con eritroblastos nucleados. e) Inmunodetección de PCNA en gónada bipotente. f) detalle del mesénquima con inmunoparcación de PCNA de gónada. Referencias: cm:

conducto de Müller; cs: cordones sexuales; ep: epitelio; vs: vasos sanguíneos; Flecha negra: eritroblasto nucleado; cabeza de flecha: inmunomarcación positiva para PCNA.

4.1.3. Ovario y oviducto embrionario

En la etapa tardía del desarrollo embrionario, en E 23, se observan los ovarios (derecho e izquierdo) bien delimitados con un oviducto embrionario formado (Fig. 15 a). El ovario se observa como una estructura ovoide con un volumen de 190.681.368 μm^3 . Se observa el hilio en la región medio lateral, revestido por un epitelio germinal de células cúbicas (Fig. 10 b). El ovario se observa como una estructura maciza, con una corteza muy desarrollada donde se evidencian los cystos o nidos de ovogonios formados por 5 a 10 ovogonios (Volumen \bar{x} ovogonios: 173.013,7 μm^3) delimitados por una lámina basal (Flg. 15 b y c). En la región del hilio se evidencia la formación de la futura médula del ovario.

El ovario en este estadio se observa rodeado por el oviducto en formación el cual es acompañado por una delgada capa de mesénquima que forma una bursa o bolsa ovárica (4 o 5 células de espesor). En el oviducto ya se identifica la presencia de un epitelio de revestimiento de células cilíndricas (Fig. 15 d).

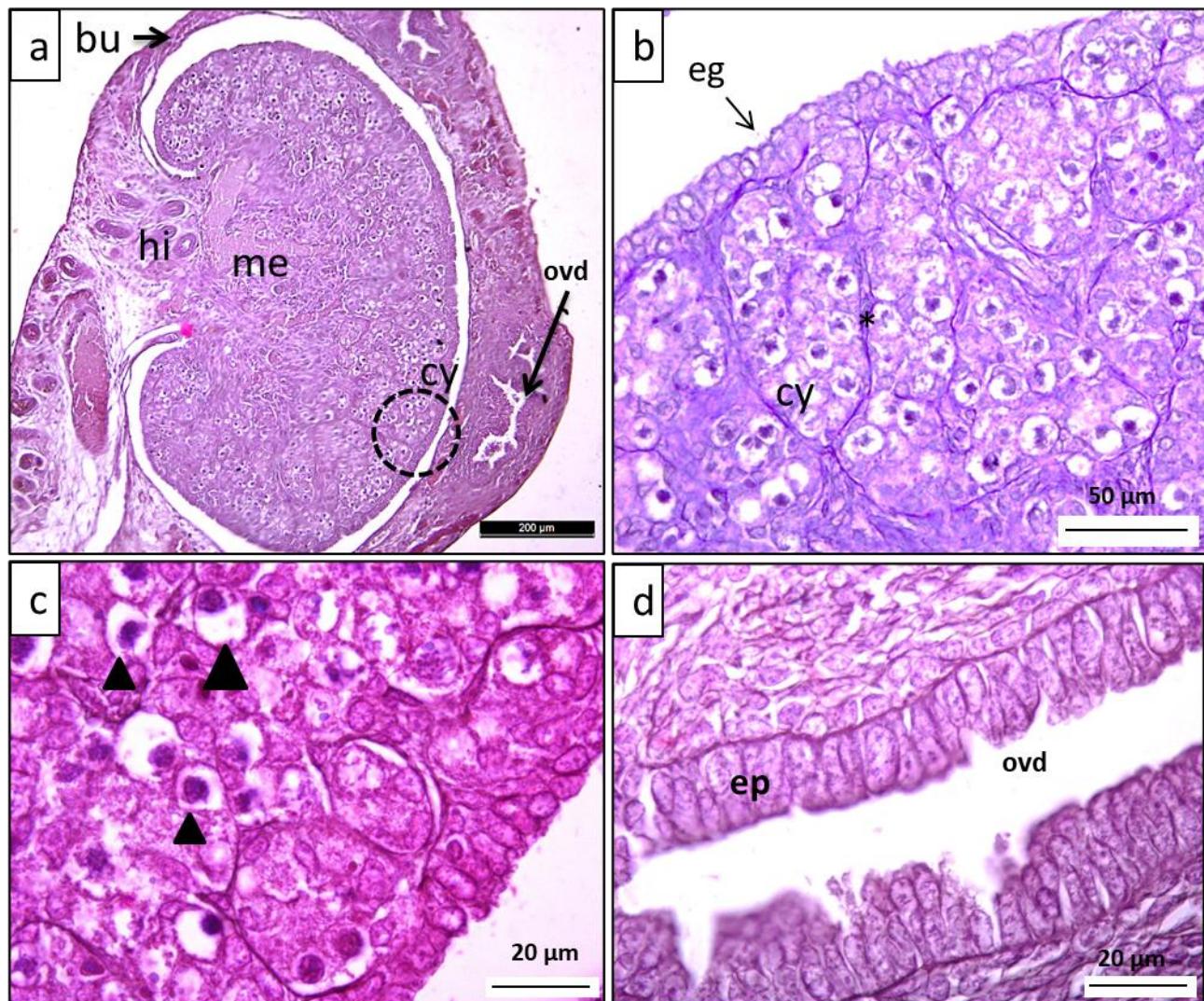


Figura 15: a) Histología panorámica del ovario embrionario de *E. patagonicus* en E.23. b) detalle de la corteza ovárica con cystos o nidos de ovogonios y detalle de epitelio germinativo. c) detalle de ovogonias en cystos. b) detalle de oviducto embrionario y detalle del epitelio de revestimiento interno. Referencias: bu: bursa/bolsa ovárica; cy: cysto/ nido de ovogonias; eg: epitelio germinativo; ep: epitelio de revestimiento; hi: hilio; me: medula ovárica; ovd: oviducto. Asterisco: lámina basal del cysto. Cabeza de flecha: ovogonios. Coloración: HE: A y D; PAS: B y C.

En un estadio más avanzado del desarrollo, E. 25, se observó en ambos ovarios (volumen $\bar{X}: 154.216.850 \mu\text{m}^3$) que la corteza se encuentran formada por gran cantidad de folículos primordiales compuestos por ovogonios (volumen $\bar{X}: 4.422.556,3 \mu\text{m}^3$) delimitadas por los precursores de las células foliculares. Las células foliculares son bajas en su eje basal-

apical. La médula del ovario se encuentra más desarrollada a la altura del hilio. En ella se observa la presencia de vasos sanguíneos y tejido conectivo laxo (Fig. 16).

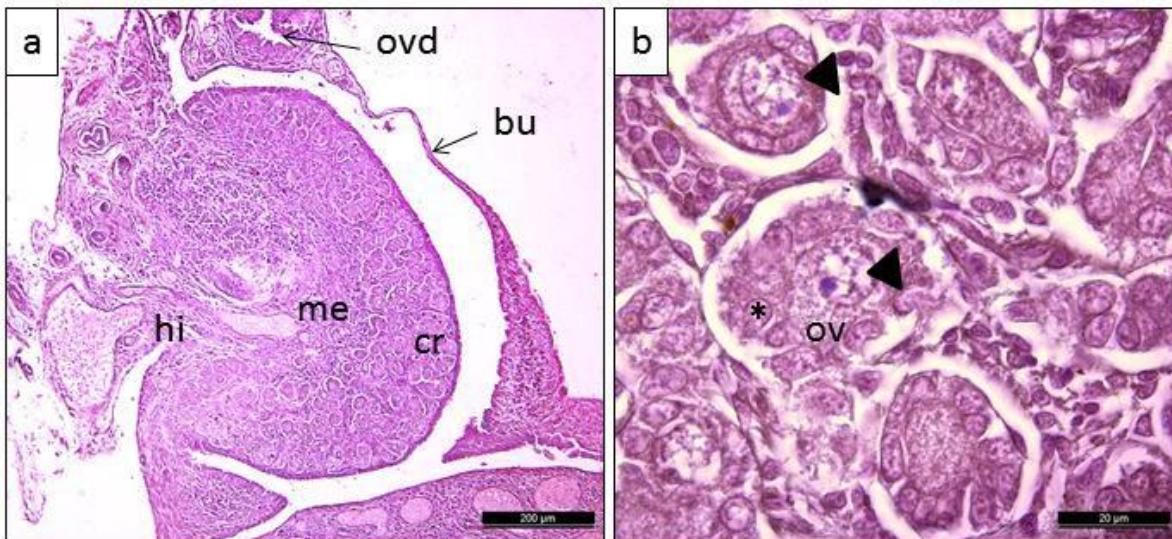


Figura 16: a) Histología panorámica del ovario embrionario de *E. patagonicus* en E.25. b) detalle de la corteza ovárica con folículos primordiales. Referencias: bu: bursa/bolsa ovárica; cr: corteza ovárica; hi: hilio; me: medula ovárica; ovd: oviducto; ov: ovogonio. Asterisco: células foliculares. Cabeza de flecha: núcleo del ovogonios. Coloración: HE.

En este estadio se observa el oviducto, con su forma cilíndrica típica y su mucosa con pliegues característico tapizado por un epitelio de células cilíndricas. La bursa ovárica que acompaña al ovario, presenta unas pocas células de espesor (1 o 2 células de espesor). Tanto el ovario izquierdo como derecho se observan de similares características.

En cuanto al desarrollo del útero, en el estadio 23, puede distinguirse macroscópicamente un útero bicorne bien definido con una vagina única (Fig. 17 a). Histológicamente se observa la presencia una cavidad en el cuerno uterino, de moderada amplitud al igual que en la región vaginal (Fig. 17 b). En el estadio 25 se observa la cavidad uterina bien definida y amplia, conectada con la cavidad vaginal (Figura 17 c y d). En la región cefálica del órgano se evidencia la presencia de grandes vasos sanguíneos en las paredes.

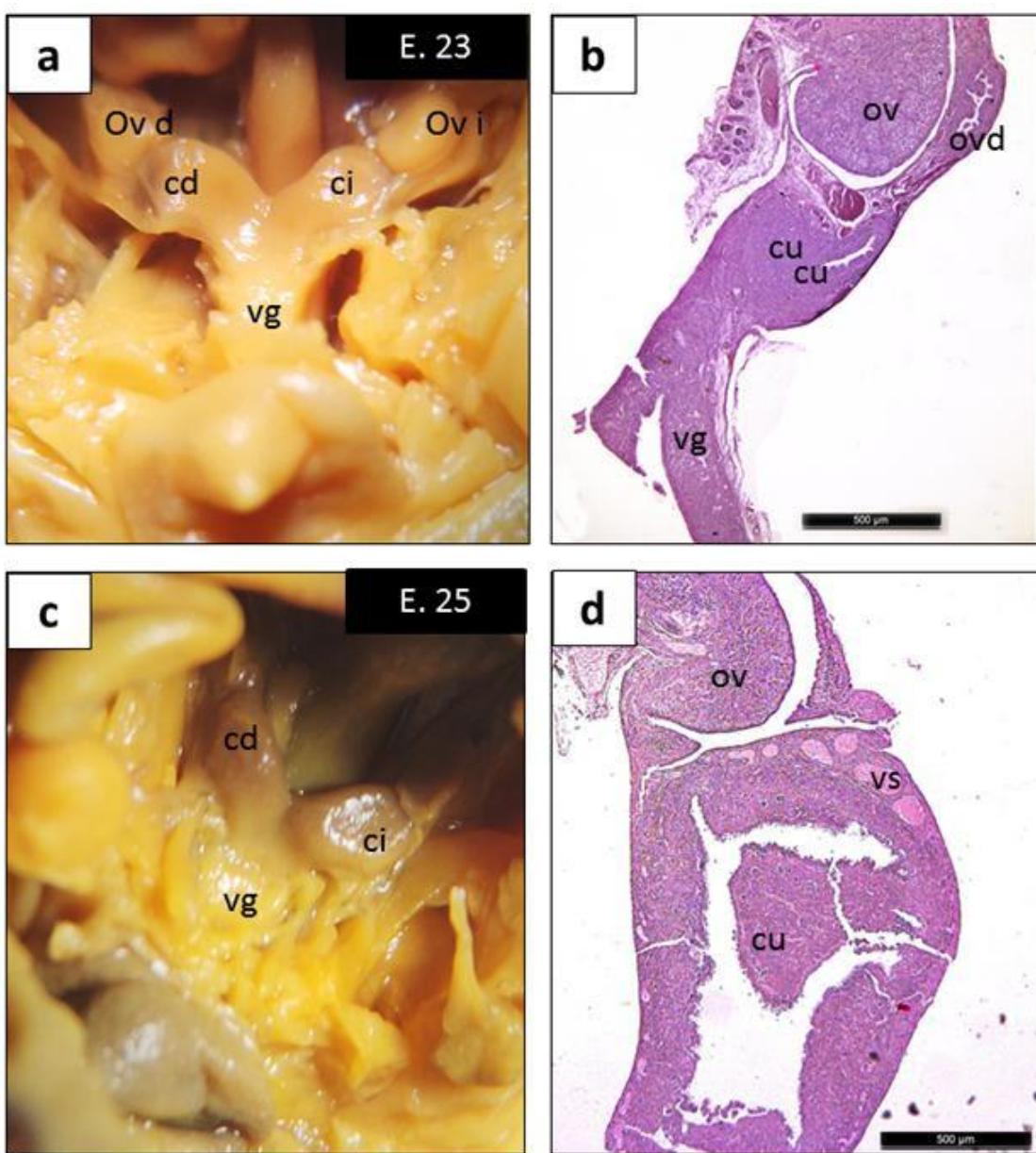


Figura 17: a) Morfología del aparato reproductor de *E. patagonicus* en estadio 23 de desarrollo embrionario. b) Microfotografía de la histología del sistema reproductor en E.23. (corte longitudinal) c) Morfología del sistema reproductor en E. 25 (Corte longitudinal). d) Histología del ovario y cuerno uterino en E. 25. Referencias: cd: cuerno uterino derecho; ci: cuerno uterino izquierdo; cu: cuerno uterino; ov: ovario; ov d: ovario derecho; ov i; ovario izquierdo; ovd: oviducto; vg: vagina; vs: vaso sanguíneo.

4.1.4. Apoptosis y proliferación en ovario embrionario:

En el ovario embrionario en formación se detectó la expresión de proteínas de la familia Bcl, que participan en el proceso de apoptosis en el E. 23 de desarrollo embrionario, se detectó la expresión moderada de proteínas anti apoptóticas Bcl-xL en la región caudal del ovario. Mientras que la expresión de la proteína pro apoptótica Bax, se observó en este mismo sector pero con un rango de expresión más amplio. Esto estaría indicando un aumento de las células apoptóticas, en este caso ovocitos, lo cual es propio de la fisiología ovárica fetal. (Fig. 18). A su vez, se detectó la expresión del factor de transcripción PCNA en núcleo de los ovocitos en la zona cefálica del ovario.

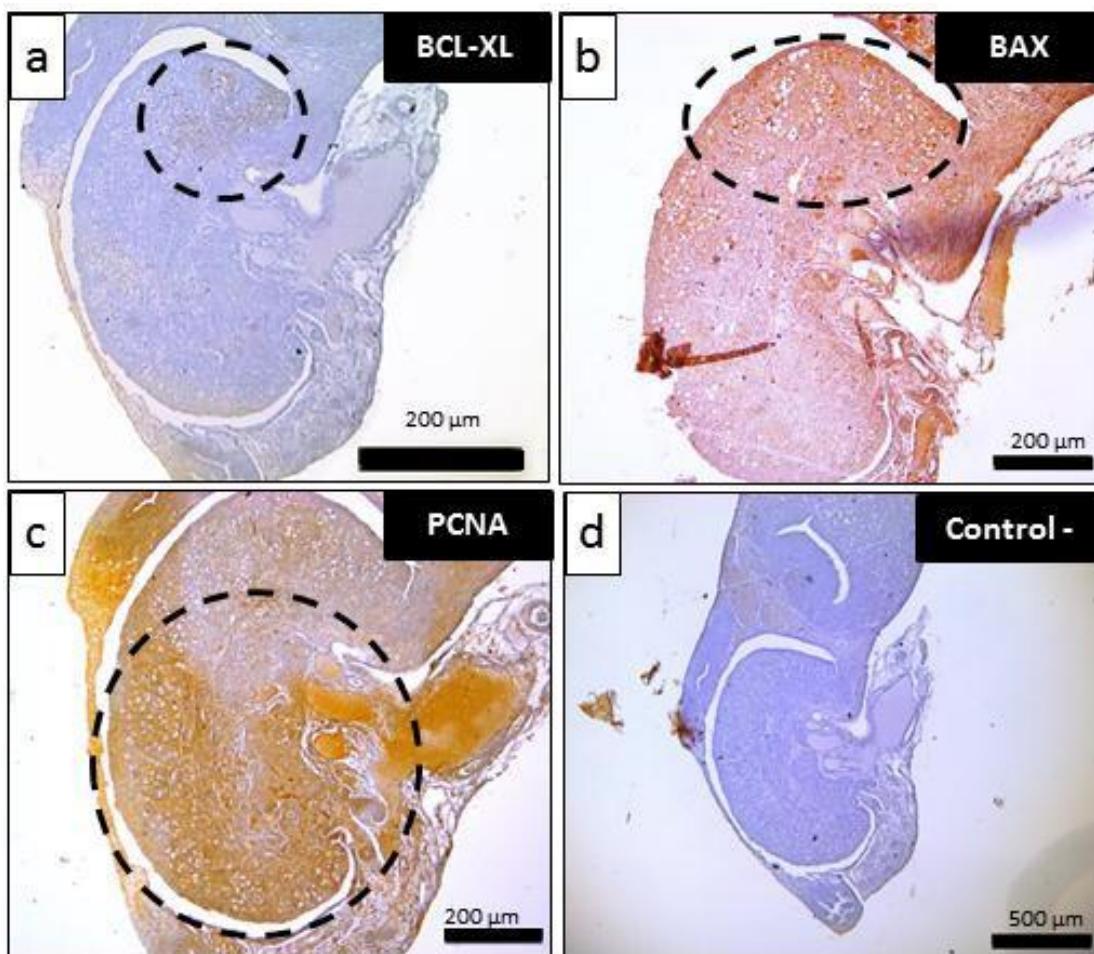
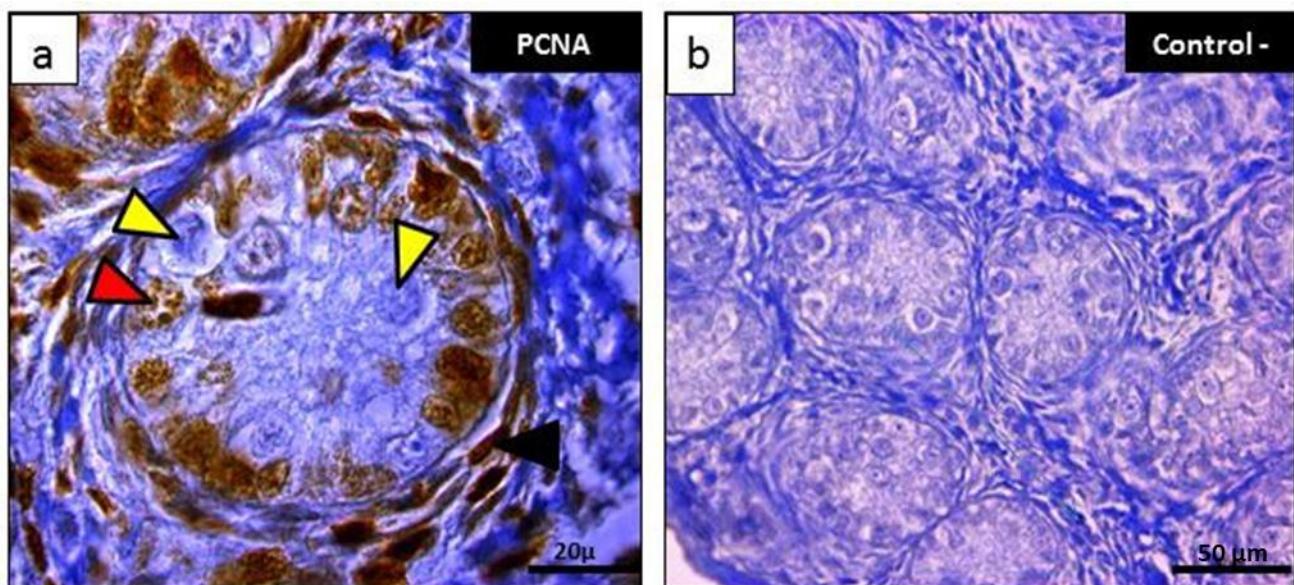


Figura 18: Ovario de Embrión de *E. patagonicus* en estadio 23. a) Inmunohistoquímica BCL-XL en ovario embrionario. b) Inmunodetección de proteína pro apoptótica BAX en ovario embrionario. c) inmunodección del antígeno de proliferación Nuclear PCNA. d) Control negativo de la técnica. Referencia: Circulo línea interrumpida encierra la zona con marcación positiva.

4.1.5. Testículo embrionario

En un embrión en estadio 21 del desarrollo embrionario de *E. patagonicus* se observa que el testículo es una estructura maciza formada por un estroma de tejido conectivo denso que lo rodea por fuera pero sin la presencia de tabiques que delimiten lobulillos. Se distingue un parénquima formado por túbulos seminíferos y tejido intersticial. Los túbulos seminíferos se observan macizo sin luz en su interior, formado por células germinales (espermatogonias) y células somáticas de sostén. Las espermatogonias se observan como células de gran tamaño y esférica, mientras que las células de sostén son de menor tamaño. El tejido intersticial (entre los túbulos seminíferos) es abundante formado por células que darán origen las células de Leydig, con núcleos alargados y poco material intercelular.

Al realizar la inmunodetección de PCNA se observó gran actividad mitótica tanto en las células somáticas de sostén que se encuentran dentro de los túbulos, como en las células intersticiales (Fig. 19).



Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resultados

Figura 19: Testículo embrionario de *E. patagonicus*, E. 21 del desarrollo embrionario. a) Inmunodetección de antígeno de proliferación celular (PCNA) en testículo embrionario. b) control negativo de la técnica. Referencias: flecha amarilla: espermatogonia; flecha negra: células intersticiales; flecha roja: células de Sertoli (células somáticas).

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resultados

4.2 Histología del ovario adulto:

El ovario del adulto en *E. patagonicus* es una estructura ovoide maciza, cubierta por un epitelio cúbico simple, el epitelio germinal. Se observan tres zonas bien distinguibles: la corteza, que se ubica hacia la periferia, una médula poco desarrollada y el hilio donde ingresa el sistema vascular (sanguíneo y linfático). A su vez el ovario se encuentra rodeado por una bursa o bolsa ovárica formada por una prolongación de la serosa del oviducto. (Fig. 20)

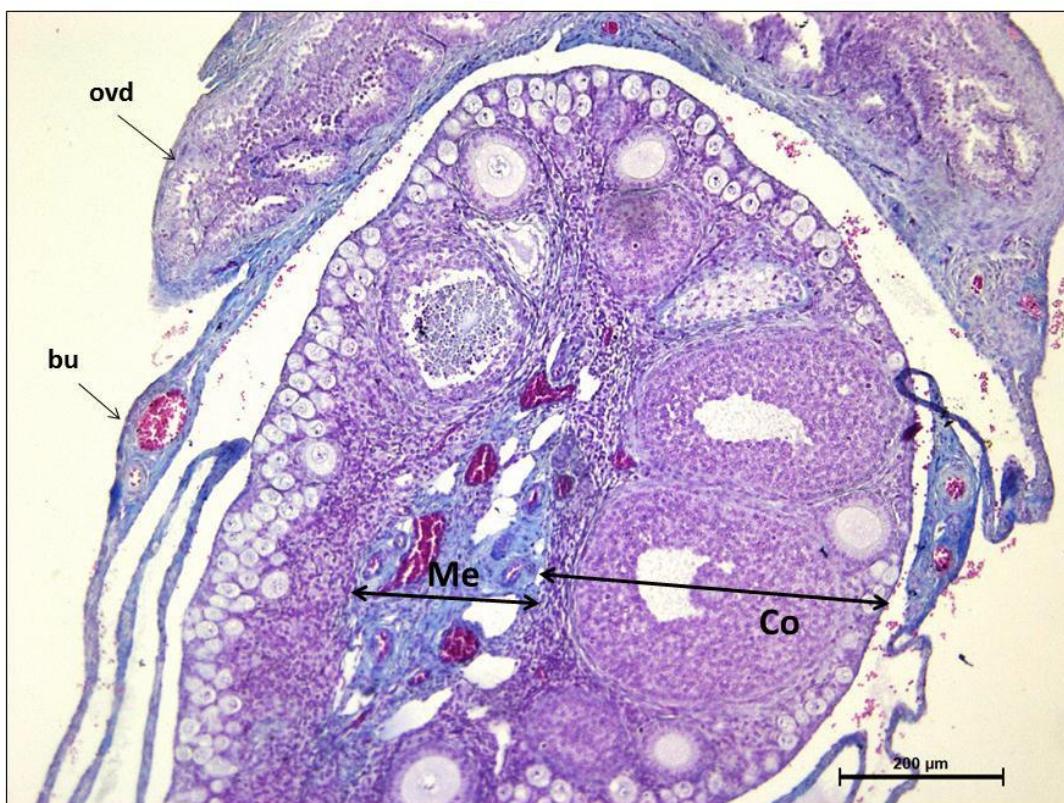


Figura 20: Histología de ovario derecho en hembra adulta donde se evidencia la morfología ovárica diferenciándose corteza externa donde se localizan los folículos ováricos de una médula interna de tejido conectivo con gran vascularización. Por fuera del ovario se distingue una bursa o bolsa

ovárica de tejido conectivo que deriva del oviducto. Tinción: Tricrómica de Gómori. Referencias:
Bu: bursa ovárica; Co: Corteza ovárica; Me: médula; ovd: oviducto.

4.2.1. La Corteza:

La corteza es la zona más periférica del ovario, se inicia por debajo del epitelio de recubrimiento o mesotelio (antiguamente conocido como epitelio germinativo), comienza con una túnica albugínea poca o nulamente distingible, formada por una capa de células con escasa vascularización. A continuación, se localizan los diferentes folículos ováricos rodeados por células estromales polimorfas de núcleos esféricos. La estructura de la corteza es sostenida por fibras reticulares dispuestas en forma de red, las cuales rodean a los diferentes folículos. Los folículos menos desarrollados se ubican hacia la periferia mientras que los folículos más avanzados en su desarrollo se localizan hacia la región más interna. (Fig. 21).

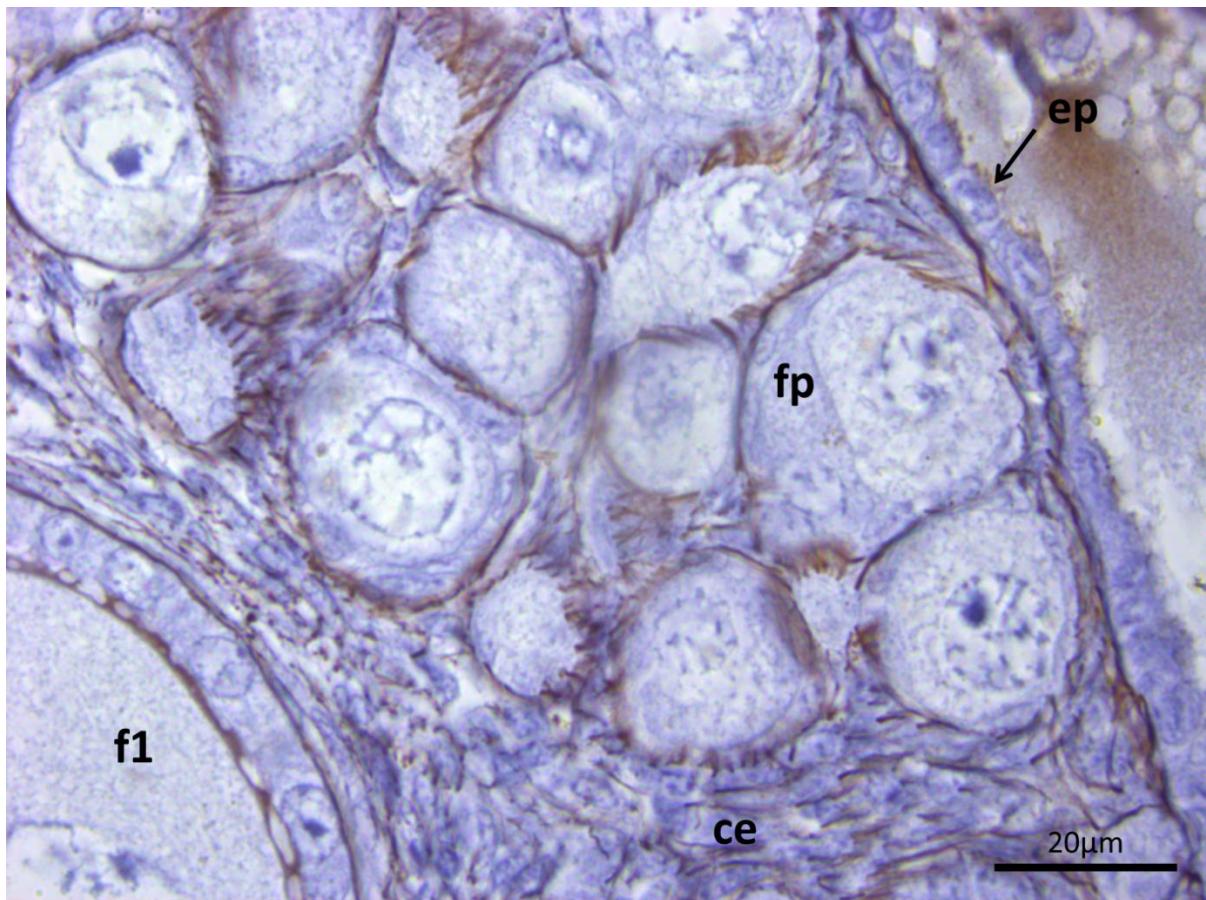


Figura 21: Detalle de la corteza externa, donde se observa el epitelio de recubrimiento de células cúbicas. Por debajo una túnica albugínea muy delgada y los folículos primordiales ubicados en la periferia. Tinción: Argéntica contrastado con hematoxilina. Referencias: ce: células estromales; ep: epitelio de recubrimiento; f1: folículo primario; fp: folículo primordial. Tinción: Argéntica – hematoxilina.

4.2.2. La médula ovárica

La medula en los ovarios es escasa, es la continuación histológica y anatómica del hilio. Formado por un tejido conectivo laxo muy vascularizado con escasas fibras colágenas distribuidas irregularmente y reticulares dispuestas en cordones. (Fig. 22)

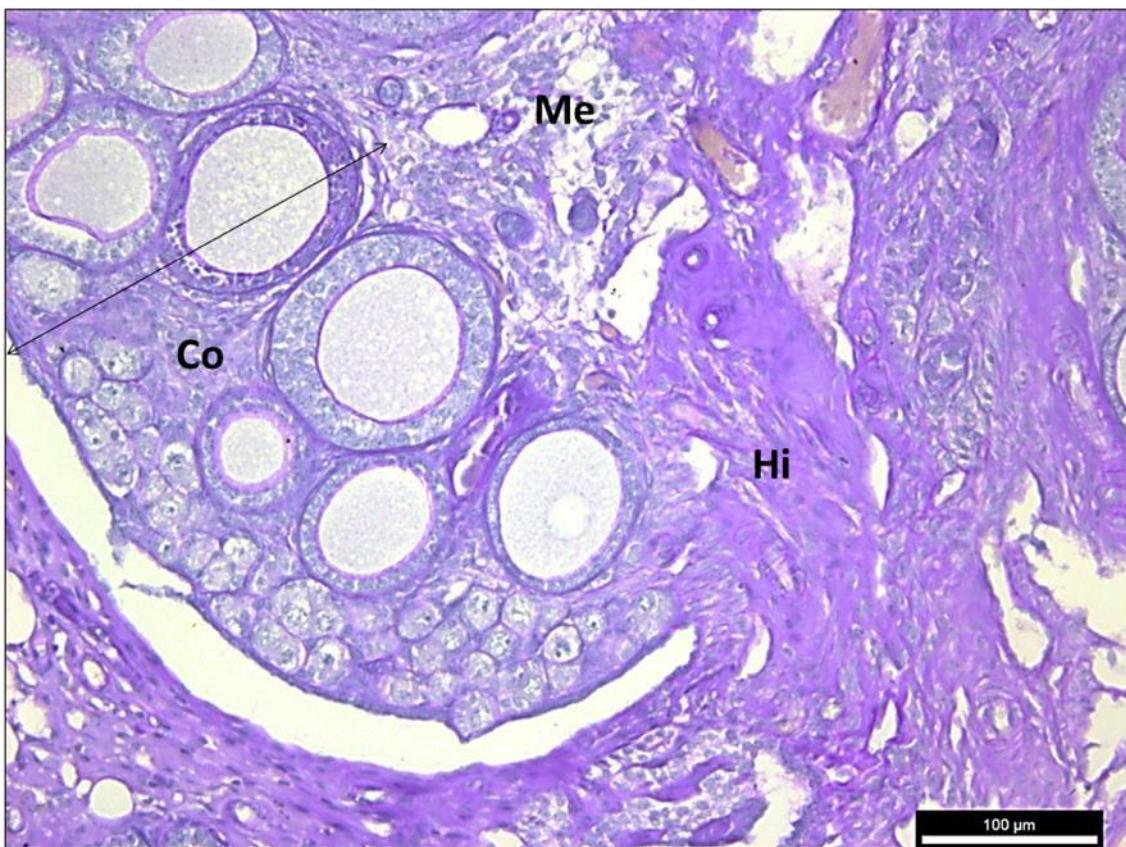


Figura 22: Detalle de médula e hilio del ovario de *E. patagonicus*. Tinción PAS. Referencias: Co: corteza; Hi: hilio; Me: medula. Tinción: PAS.

4.2.2. Sistema Folicular

En el ovario adulto de *Eumops patagonicus* se pueden observar distintos tipos de estadios foliculares característicos en los mamíferos: folículo primordial, folículo primario, folículo secundario, folículo antral y folículo maduro o de Graaf, así como folículos atrésicos y cuerpo lúteo. A continuación, se detalla la morfología histológica para cada uno de los folículos observados:

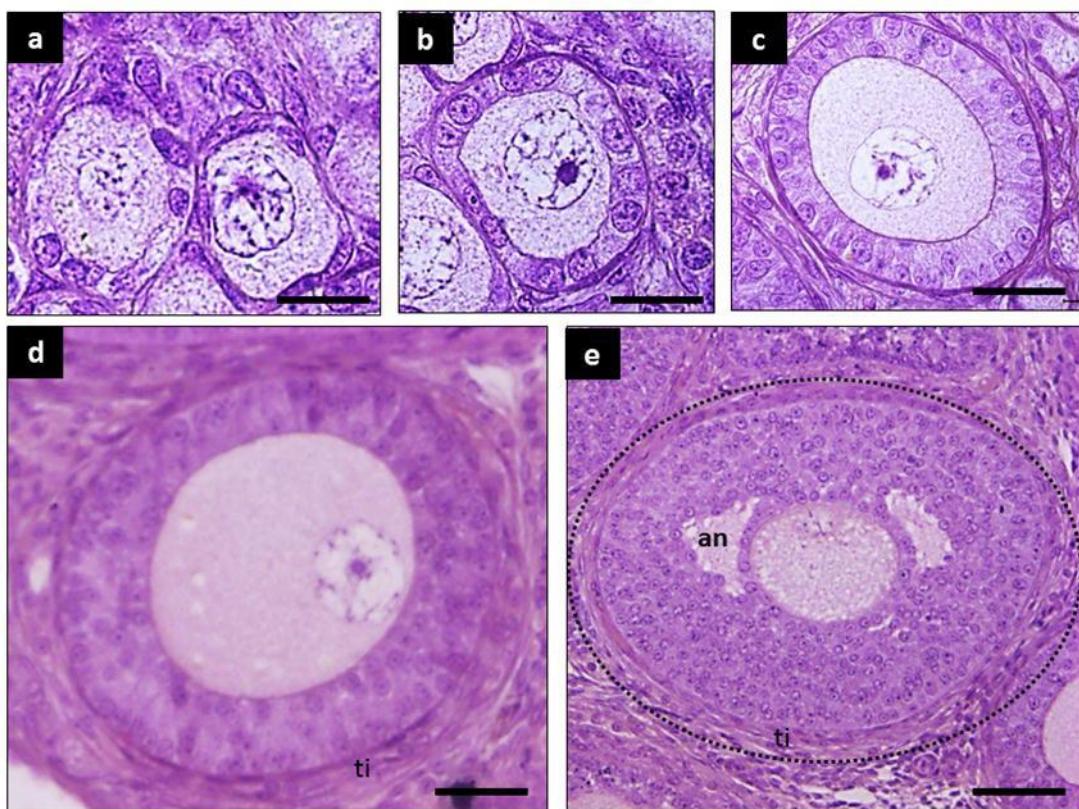


Figura 23: Folículos ováricos en diferentes estadios de diferenciación. a) Folículos primordiales. b) Folículo primario temprano con células foliculares cúbicas. c) Folículo primario temprano con células foliculares cilíndricas. d) folículo primario avanzado con células dos estratos de células foliculares. e) Folículo secundario o antral. Tinción: H-E. Referencias: an: antro; ti: túnica interna. Escala 20 μm .

Folículo primordial: ($\bar{x}13.536,5 \mu\text{m}^3$) es el folículo en menor desarrollo que se encuentra ubicado en la región más externa de la corteza, por debajo de la túnica albugínea. Se encuentra formado por un ovocito ($\bar{x}: 7832,5 \mu\text{m}^3$) rodeado por un epitelio de células foliculares planas. (Fig. 23 a).

Folículo primario temprano: ($\bar{x}: 471.886,1 \mu\text{m}^3$) se encuentra en la corteza ubicado por debajo de los folículos primordiales. En este folículo el ovocito comienza a crecer y aumentar de tamaño ($\bar{x} 191079,8 \mu\text{m}^3$) y a su vez las células foliculares cambian de planas a cúbicas (Fig. 24 b) y posteriormente a células cilíndricas (Fig. 23 c). En estos folículos, los ovocitos se observan con núcleos con cromatina laxa y nucléolo bien definidos.

Folículo primario avanzado: ($\bar{x}2.483.248,4 \mu\text{m}^3$) están formados por un ovocito que ya se encuentra rodeado por la zona pelúcida, la cual se evidencia como una región de coloración fucsia cuando se colorea con PAS. Seguido de esta región se observa a las células foliculares que ya se encuentra formada por una capa biestratificada de células cúbicas. Por fuera de la membrana basal de las células foliculares se observa a las células del tejido intersticial organizándose en forma concéntrica al folículo. El núcleo del ovocito se observa de forma excéntrica con su cromatina laxa y nucléolo definido (ovocito, $\bar{x}: 288.395,2 \mu\text{m}^3$). (Fig. 23 d).

Folículo secundario o antral: ($\bar{x}12.391.110,6 \mu\text{m}^3$) en este folículo el ovocito se encuentra rodeado por varios estratos de células foliculares, las que adquieren una forma esférica, denominándose células de la granulosa. Se observa en estos folículos la presencia de espacios entre las células de la granulosa. Por fuera de estas se observa una teca interna bien definida que se continúa con las células intersticiales. (Fig. 23 e). Dentro de esta categoría se observó un folículo antral biovascular, el cual no se volvió a observar en otras hembras analizadas.

Folículo maduro o de Graaf: ($\bar{x}26.261.944,29 \mu\text{m}^3$) se observa el ovocito rodeado por la zona pelúcida y un grupo de células foliculares. A su vez estas células se unen al resto de células de la granulosa por un grupo de células denominado *cúmulus ooforus*. El resto de las células foliculares o granulosas se encuentra rodeando una gran cavidad ocupada por el líquido folicular o antral. Las células de la granulosa que miran hacia el antro folicular se denominan células de la granulosa antral y células de la granulosa mural, que se ubican próximas a la teca. Por fuera se pueden distinguir las tecas internas y externas.

Cuerpo lúteo: ($\bar{x}71.107.945,24 \mu\text{m}^3$) formado por las células derivadas de la granulosa, que forman las células granuloso-luteínicas. Estas son células de gran tamaño esféricas, con núcleo esférico, excéntrico con nucléolo bien distingible. Se observa contenido PAS positivo en el citoplasma de las células granuloso-luteínicas. A su vez se encuentra

formado por las células derivadas de la teca interna, denominadas teco-luteínicas, las cuales son células de menor tamaño con forma ahusada. (Fig. 24).

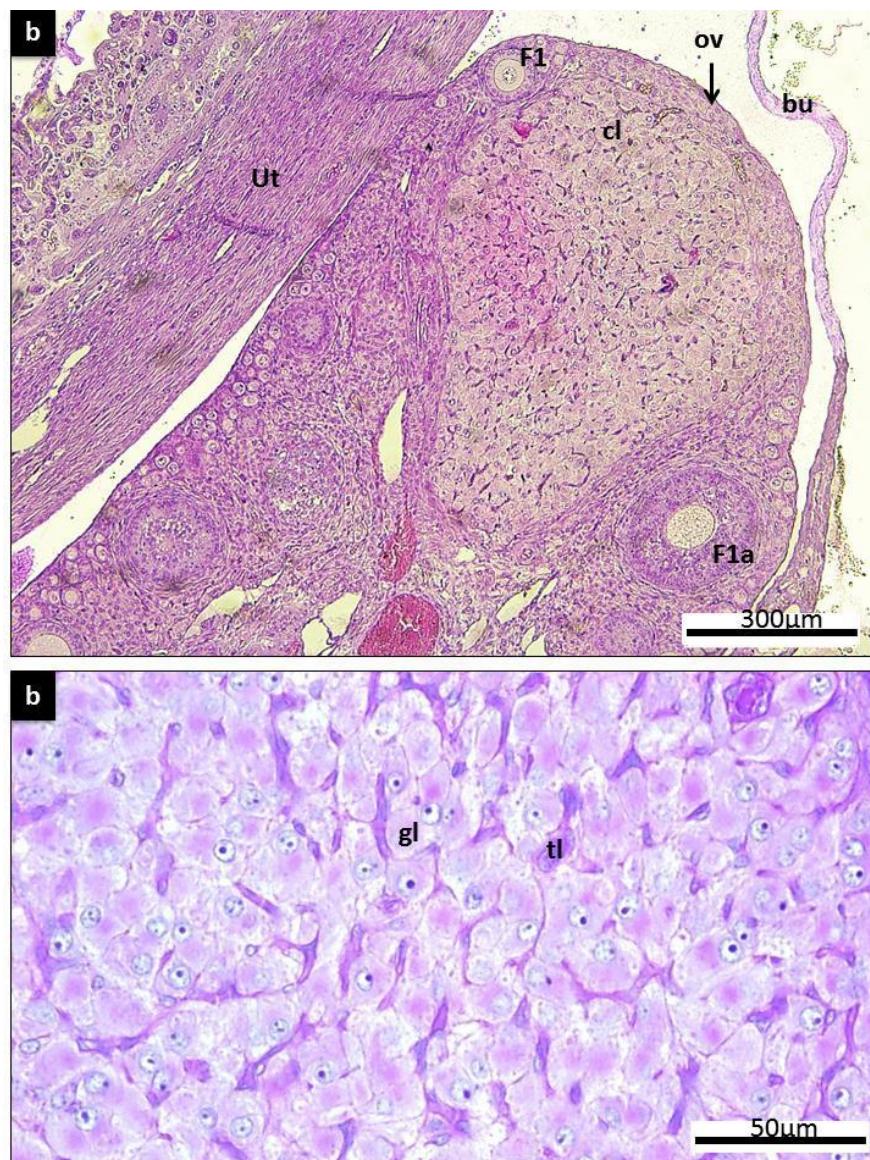


Figura 24: a) Ovario de útero gestante con presencia de cuerpo lúteo y folículos en desarrollo Tinción H-E. b) detalle de cuerpo lúteo donde se observan las células granulosoluteínicas con contenido PAS positivo en su citoplasma y células teco-luteínicas de menor tamaño. Referencias: bu: Bursa ovárica; cl: Cuerpo lúteo; F1: folículo primario temprano; F1a: folículo primario avanzado; gl: células granulosoluteínicas; ov: ovario; ut: útero; tl: células teco-luteínicas.

Folículos atrésicos: se observan folículos en atresia, en donde se distingue la desorganización de las células de la granulosa con la evidente formación de núcleos picnóticos. En los folículos primarios se observa la presencia de células de la granulosa con núcleos picnóticos (Fig. 25 a). En los folículos antrales se observa la desorganización de las células de la granulosa que se encuentran en la periferia del antro folicular, desprendiéndose hacia el antro (Fig. 25 b).

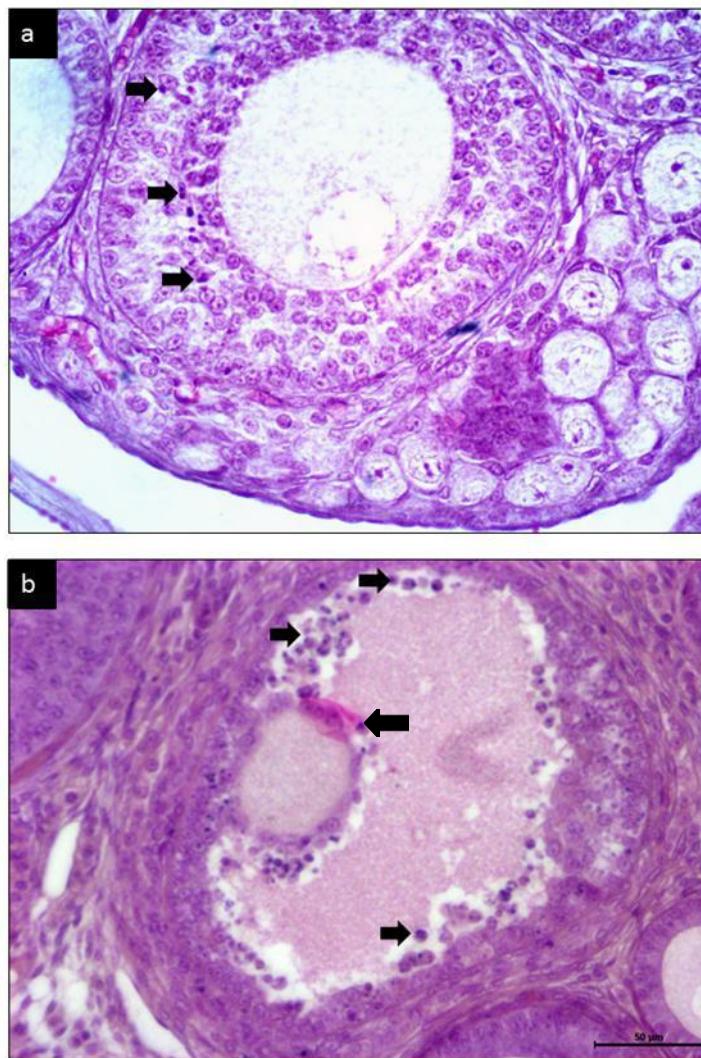


Figura 25: a) Corteza del ovario con folículo primario con células apoptóticas de la granulosa. b) Folículo antral en el que se observa desprendimiento de las células de la granulosa en apoptosis, hacia el antro. Referencias: Flechas negras: Núcleo picnóticos.

4.3. Asimetría morfológica y funcional del ovario

Se pudo determinar que en *Eumops patagonicus* existe una diferencia morfológica y funcional entre los ovarios derecho e izquierdo. El ovario derecho es un ovario típico donde se observan todos los estadios foliculares antes descriptos. Con una medula y su corteza bien definidas, poseen un volumen promedio de $1,198\text{mm}^3$. En todos los ejemplares examinados ($n: 77$) este patrón de dominancia del ovario derecho es evidente (Fig. 26 a y c).

Por otra parte, el ovario izquierdo es de menor tamaño, contando con un volumen promedio de $0,090293\text{ mm}^3$, en él se observa una corteza en la que predominan los folículos primordiales por debajo del epitelio germinativo y la túnica albugínea. En cuanto a los folículos en desarrollo solo se observan folículos primarios con una capa de células foliculares cúbicas y cilíndricas, en todas las hembras analizadas ($n: 26$), no se encontró la presencia de folículos antrales ni la presencia de cuerpo lúteo que evidencie una ovulación (Fig. 26 b y d).

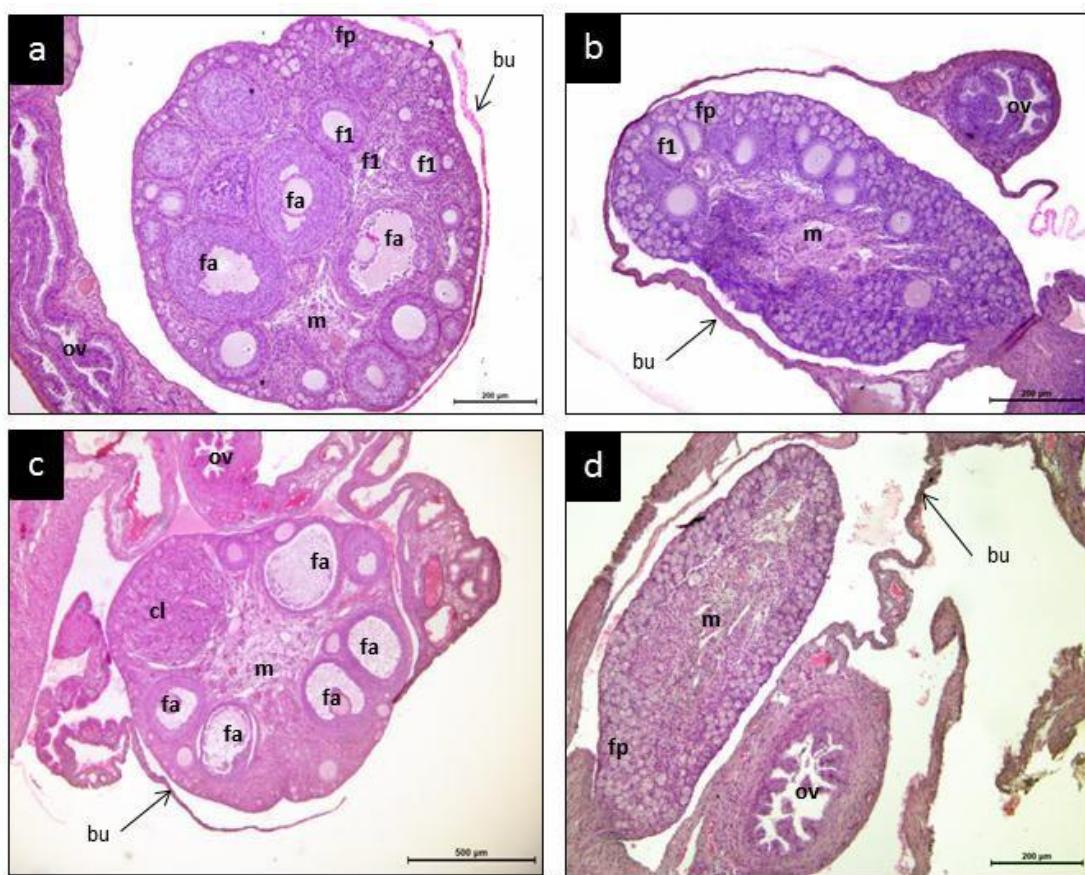


Figura 26: a) ovario derecho AMA 172 con folículos en diferentes estadios de desarrollo, desde folículos primordiales a folículos antrales. b) ovario izquierdo de AMA 172 donde se observan solo folículos primordiales y primarios. c) ovario derecho de AMA 210 con folículos en diferente grado de desarrollo, folículos atrésicos y presencia de cuerpo lúteo. d) ovario izquierdo de AMA 210 donde se observan solamente la presencia de folículos primordiales en la corteza. Referencias: bu: bursa ovárica; cl: cuerpo lúteo; f1: folículo primario; fa: folículo antral; fp: folículo primordial; m: médula; ov: oviducto. Coloración Hematoxilina-Eosina.

Expresión de FSH: hormona folículo estimulante.

Al evaluar la localización de la hormona folículo estimulante en los ovarios, se observó que la misma varía entre el ovario derecho e izquierdo. En el ovario derecho se observa la presencia de esta hormona en los folículos en desarrollo, en el citoplasma de las células de la granulosa de algunos folículos primarios avanzados, tanto en invierno (Fig. 27 a) como en otoño (Fig. 27 c). Mientras que en los ovarios izquierdos no se observa la presencia de

la hormona en los folículos, pero si se observa presente tanto en el tejido intersticial del hilio (Fig. 28 b) y en el oviducto (Fig. 27 d).

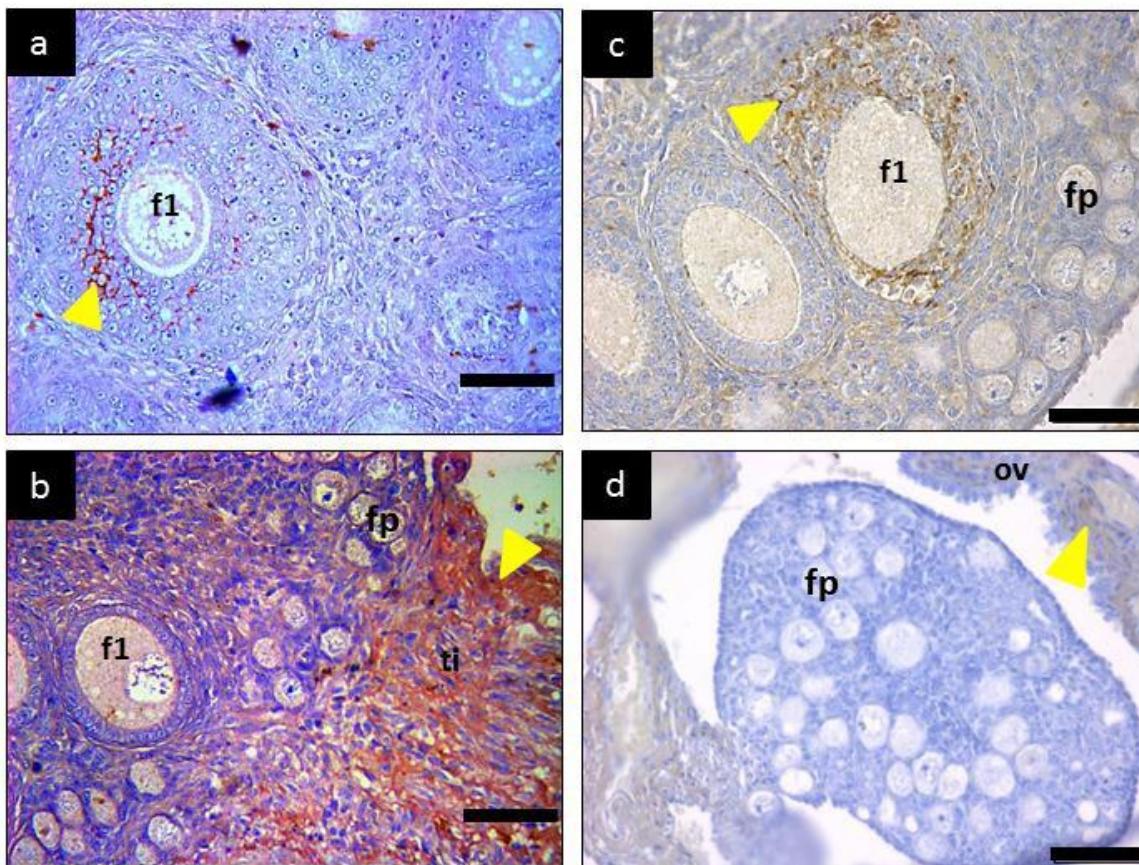


Figura 27: Inmunomarcación para la localización de la hormona FSH. a) ovario derecho de AMA 59 (invierno), se observa folículo primario avanzado con inmunomarcación positiva para hormona FSH en células de la granulosa. b) ovario izquierdo de AMA 59 (invierno), se observa inmunomarcación positiva para FSH en tejido intersticial del hilio. c) Ovario derecho de AMA 23 (otoño) donde se observa inmunomarcación positiva de hormona FSH en ovario células de la granulosa de folículo primario avanzado. d) ovario izquierdo y oviducto de AMA 23 (otoño) donde se observa la ausencia de marca positiva para FSH en ovario y la presencia en el oviducto. Referencia: f1: folículo primario, fp: folículo primordial, ov: oviducto, ti: tejido intersticial del hilio, flecha amarilla: inmunomarcación positiva para FSH. Barra de escala: 50 μ m.

Evaluación del estado proliferativo en los ovarios por la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular)

Se pudo observar la expresión del antígeno PCNA tanto en ovario derecho (Fig. 28 a y b) como en izquierdo (Fig. 28 c y d) en las diferentes estaciones del año, pero en diferentes tipos de folículos antrales en ovario derecho, y primarios en el ovario izquierdo. Se observan los núcleos con inmunomarcación positiva tanto en el ovocito como en las células de la granulosa.

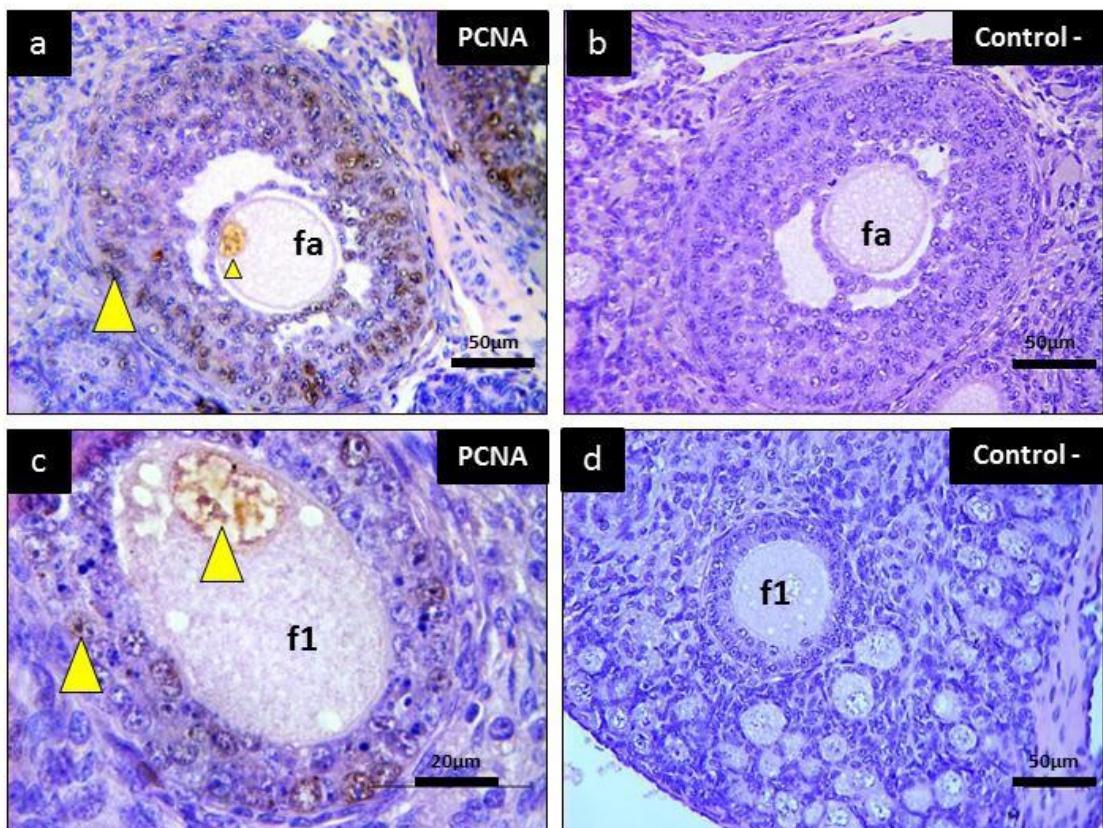


Figura 28: Inmunomarcación para la localización de PCNA a) ovario derecho de AMA 169 (primavera), se observa folículo antral con inmunomarcación positiva para PCNA. b) control negativo ovario derecho de AMA 169. c) Ovario izquierdo de AMA 169 donde se observa folículo primario con inmunomarcación positiva para PCNA. d) control negativo ovario izquierdo de AMA 169. Referencias: fa: folículo antral, f1: folículo primario, Cabeza de flecha amarilla: marca positiva para PCNA.

Expresión de proteínas pro y anti apoptóticas Bax y Bcl XL

Se realizó la inmunodetección de la proteína Bax en los ovarios de *Eumops patagonicus* y observándose marcación positiva en el ovario derecho con presencia de cuerpo lúteo. Se detectó Bax tanto en el citoplasma de las células granuloso-luteínicas así como en las células tejido intersticial y de la granulosa en folículos atrésicos (Fig. 29 a y b). En el ovario izquierdo no se observó inmunomarcación para esta proteína.

La inmunomarcación de Bcl-xL en el mismo ovario demostró la presencia de esta proteína en las mismas células teca-luteínicas del cuerpo lúteo, como en los ovocitos de los folículos primordiales de este ovario con una localización citoplasmática (Fig. 29 c y d). En ovario izquierdo se observa la inmunomarcación positiva en el citoplasma de los ovocitos en los folículos primordiales.

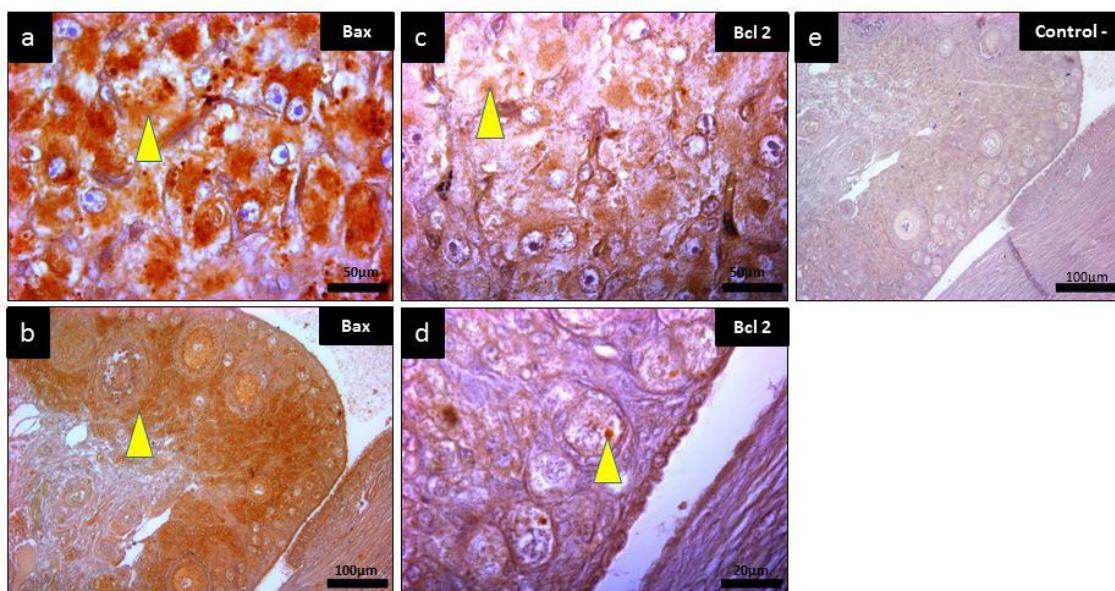


Figura 29: Inmunomarcación para la detección de las proteínas pro y anti apoptóticas Bax y Bcl-XL en ovario derecho. a) cuerpo lúteo de hembra AMA 102 (primavera) con inmunomarcación positiva para Bax. b) ovario de hembra AMA 102 con inmunomarcación positiva para Bax en células del intersticio. c) cuerpo lúteo de hembra AMA 102 (primavera) con inmunomarcación positiva para Bcl-XL. d) corteza de ovario de hembra AMA 102 con inmunomarcación positiva para

Bcl-XL en folículos primordiales. e) control negativo de inmunomarcación de Bax y Bcl-XL en ovario de AMA 102. Referencias: cabezas de flechas amarillas muestran las marcas positivas.

Detección de apoptosis por método directo de TUNEL

Se realizó la detección de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL en ovarios de *E. patagonicus*, donde se evidenciaron células túnel positivas en células foliculares de folículos en diferente estadio de desarrollo folicular. Se observaron tanto en folículos antrales avanzados (Fig. 30 a y b) como en folículos primarios (Fig. 30 c). Asimismo, se observan células TUNEL positivas en el intersticio. Estos resultados sugieren que el proceso de apoptosis actúa tanto en folículos avanzados, como en folículos primarios.

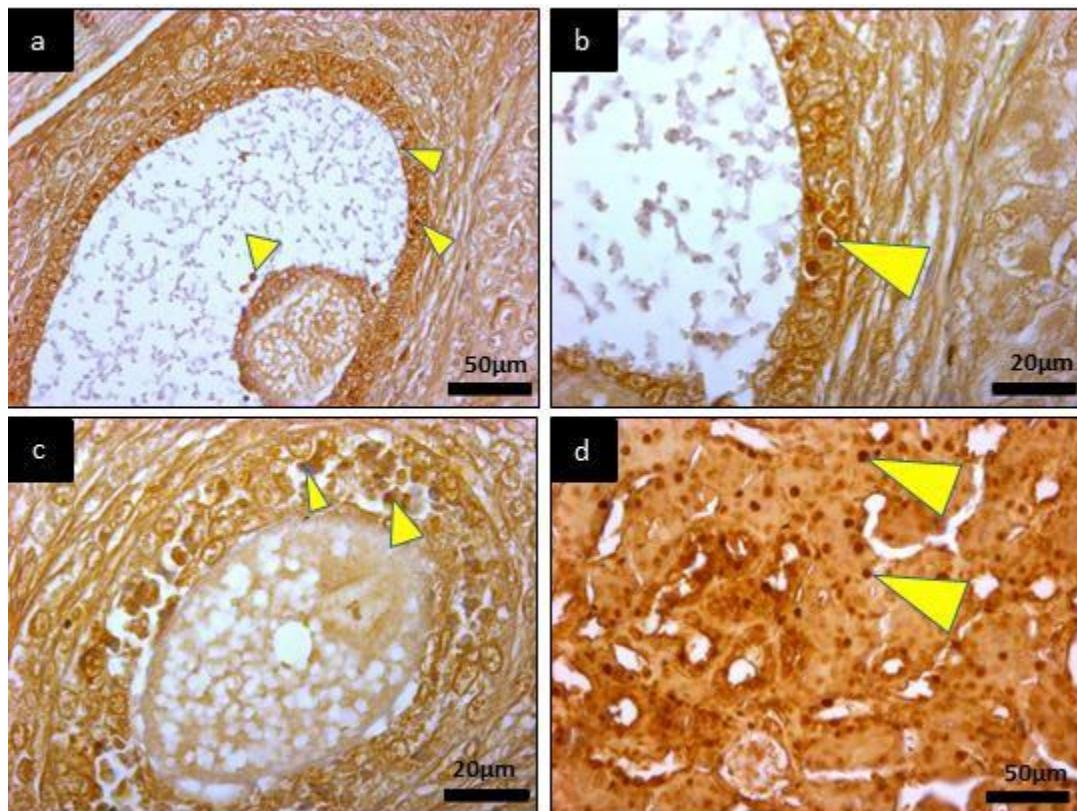


Figura 30: Ovarios de *Eumops patagonicus* con tinción positiva para evidenciar células apoptóticas con técnica de TUNEL. a) Folículo antral con células TUNEL positivas en sus células de la teca. b) Detalle de células tecales con tinción positiva para TUNEL. c) Folículo primario bilaminar con

células TUNEL positivas en su granulosa. d) Control positivo de la técnica tratado con ADNasa y células TUNEL positivo. Referencias: Flecha amarilla señala núcleos TUNEL positivos.

4.4 Morfología uterina: útero bicornе

Observaciones macroscópicas demostraron que *E. patagonicus* posee un útero bicornе con una cavidad vaginal. El útero consta de dos oviductos, uno derecho y uno izquierdo, cada uno rodeando a un ovario, formando a su vez la bursa o bolsa ovárica. Cada oviducto desemboca en el extremo cefálico de su correspondiente cuerno uterino, estos convergen para desembocar en la vagina. Cuando la hembra es juvenil o nulíparas el útero bicornе es simétrico en cuanto al tamaño de los cuernos uterinos derecho e Izquierdo (Fig. 31 a). Por otra parte, cuando la hembra se encuentra preñada o ya atravesó una preñez, el cuerno uterino derecho, el cual fue el único con presencia de embriones en gestación, adquiere un tamaño mayor al del cuerno uterino izquierdo que conserva su tamaño (Fig. 31 b).

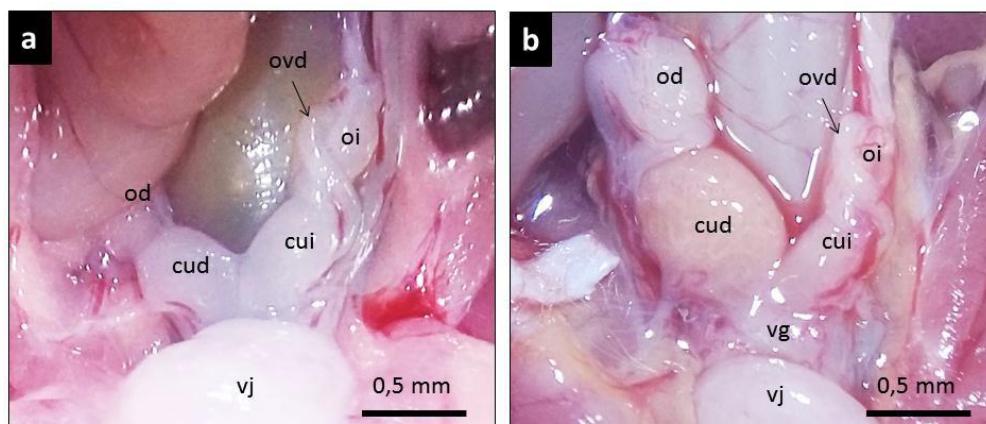


Figura 31: Disección de la cavidad abdominal de Hembras de *E. patagonicus*. a) útero bicornе con ovarios de hembra juvenil. b) útero bicornе de hembra con útero bicornе asimétrico. Referencias: cud: cuerno uterino derecho, cui: cuerno uterino izquierdo, od: ovario derecho, oi: ovario izquierdo, ovd: oviducto, vg: vagina, vj: vejiga.

4.4.1. Oviducto

Es un órgano tubular par, que se extiende desde su inicio, denominando infundíbulo al extremo por donde ingresa el ovocito ovulado desde el ovario, hasta el útero en su extremo intrauterino. El infundíbulo al igual que la totalidad del oviducto se encuentra formado por una mucosa formada por un epitelio cilíndrico con células ciliadas y secretoras apoyadas sobre su membrana basal y una delgada lámina propia de tejido conectivo laxo. A continuación, se observa una túnica muscular y una serosa. Posteriormente se continúa con la ampolla que al igual que el resto del oviducto posee pliegues de la mucosa hacia el interior de la luz. A medida que se avanza entre las distintas secciones desde la ampolla hacia el istmo y la unión útero-tubal se observa un incremento en las capas de células musculares que forman cada sección. No se observan diferencias entre el oviducto derecho e izquierdo (Fig. 32). Mediante la tinción de PAS para mucopolisacáridos se observó que el contenido de las células secretoras del epitelio de la mucosa es PAS negativo (Fig. 32 d).

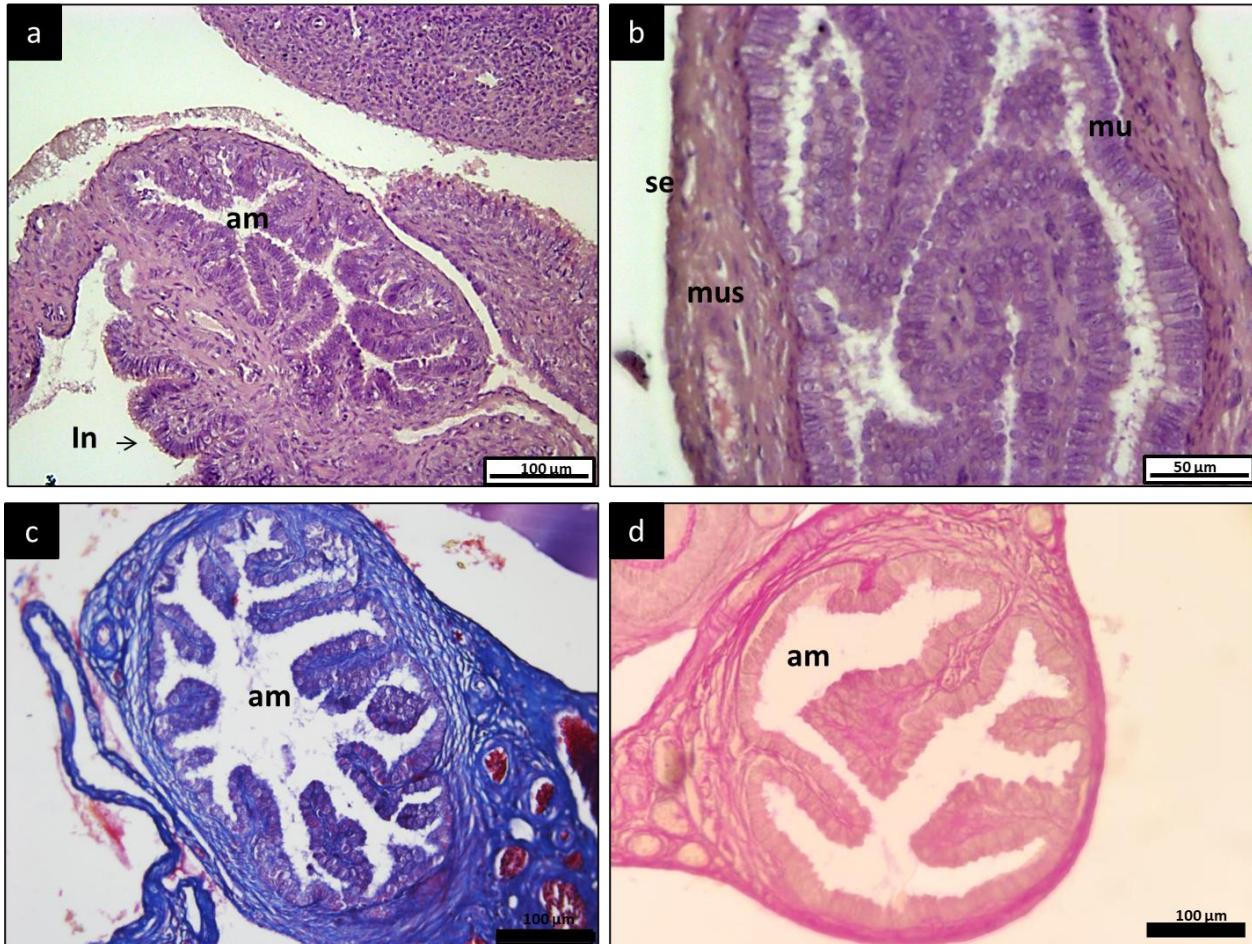


Figura 32: Histología del oviducto de *E. patagonicus*. a) Infundíbulo y ampolla del oviducto de *E. patagonicus*. b) detalle del infundíbulo donde se observan las tres túnicas que lo forman. c) detalle de la ampolla con coloración tricrómica de Gómori donde se observan las fibras de colágeno teñidas de azul. d) ampolla del oviducto con tinción de PAS donde se observa que la secreción de las células secretoras son PAS negativo. Tinciones: a y b: Hematoxilina-Eosina; c: tricrómica de Gómori; d: PAS. Referencias: am: ampolla, mu: mucosa, mus: muscular, se: serosa.

4.4.2. Cuernos Uterinos

Al observar la histología de los cuernos uterinos de *E. patagonicus* se pudo distinguir tanto en el cuerno derecho como izquierdo, las túnicas típicas que se observan en los mamíferos. Se observó un endometrio tapizado por un epitelio cilíndrico simple, por debajo se encuentra la lámina propia de tejido conectivo laxo de gran dimensión, hacia donde ingresan glándulas tubulares simples. La región donde se encuentran las glándulas es la región funcional del endometrio y por debajo se encuentra el endometrio basal. A continuación en el miometrio se distinguen pocas capas de músculo liso en el que se

observan también algunos vasos sanguíneos de gran calibre. Delimitado por fuera se observa el perímetro (Fig. 33).

Los cuernos uterinos en hembras juveniles ($n:7$) no presentan diferencias morfológicas ni histológicas, sin embargo, en hembras adultas ($n: 70$) se observa una asimetría en cuanto al tamaño, siendo el cuerno uterino derecho de mayor tamaño.

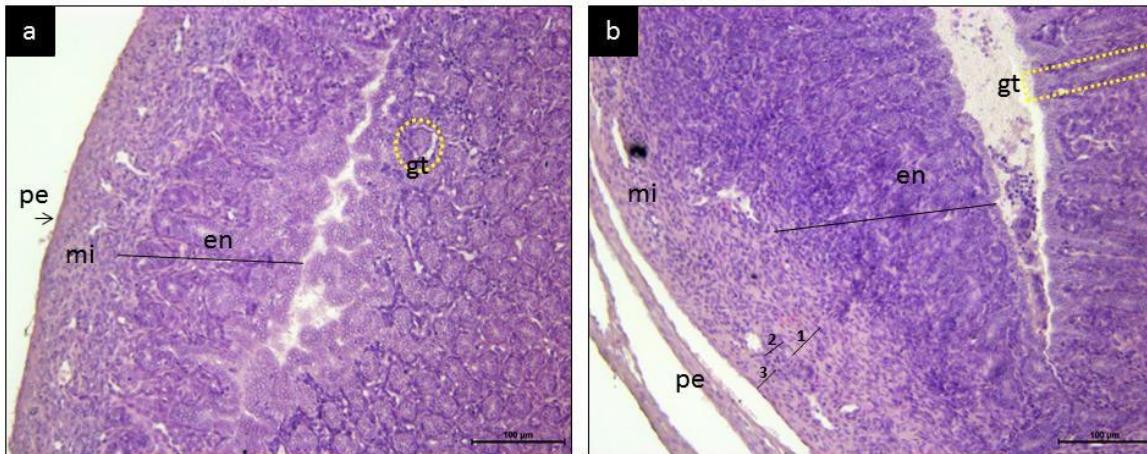


Figura 33: Histología de cuernos uterinos de *E. patagonicus*. a) Cuerno uterino derecho de AMA 172 capturada en invierno, se observan las glándulas endometriales, el miometrio y perímetro. b) cuerno uterino izquierdo de AMA 172 en corte longitudinal donde se observa el endometrio con sus glándulas tubulares, el miometrio donde se distinguen sus 3 capas (longitudinal: 1, circular: 2 y longitudinal: 3) y el perímetro. Referencias: en: endometrio, gt: glándula tubular, mi: miometrio, pe: perímetro.

4.4.3. Detección de la proteína OVG-1

Al realizar la inmunodetección de la proteína OVG-1 se observó su expresión tanto en oviducto como en la cavidad uterina. En hembra capturada durante el invierno se detectaron marcas positivas para esta proteína en ovario, tanto en células intersticiales de la corteza, como en células de la granulosa de algunos folículos, así como también en el citoplasma de las células epiteliales que forman la mucosa del oviducto en la ampolla y el infundíbulo principalmente (Fig. 34 a y b). En esta misma hembra se observó la presencia de esta proteína además en la cavidad uterina, en el epitelio endometrial (Fig. 35 c). En hembra capturada durante el verano también se observó la expresión de OVG-1 en oviducto derecho, en el citoplasma de las células epiteliales de la mucosa oviductal (Fig. 34. d). No se observaron marcas positivas para esta proteína en oviducto izquierdo.

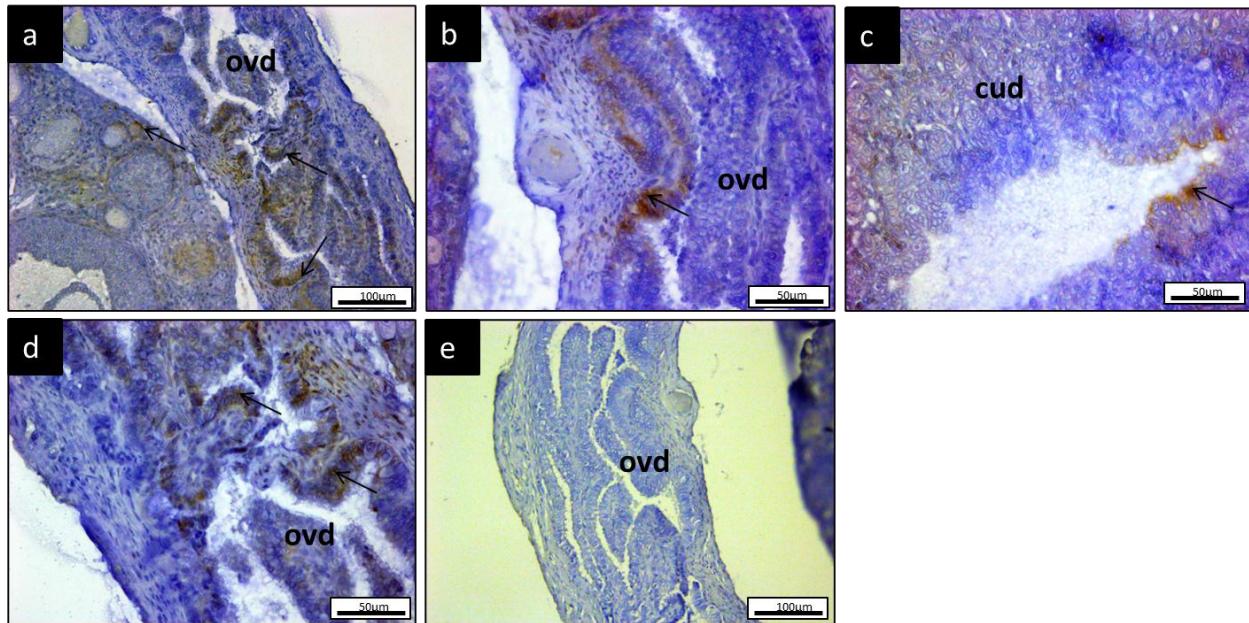


Figura 34: Inmunodetección de la proteína OVGp1 en oviducto y cuerno uterino de *E. patagonicus*.
a) Ovario y oviducto derecho de hembra capturada en invierno, con inmunodetección positiva para OVGp 1. b) Detalle de oviducto derecho con marca positiva para OVGp 1 de hembra capturada en invierno. c) Detalle de cuerno uterino derecho con marca positiva para OVGp 1 de hembra capturada en invierno. d) Detalle de oviducto derecho con marca positiva para OVGp 1 de hembra capturada en verano. e) control negativo de la técnica, sección de oviducto sin marca positiva.

4.5. Ciclo ovárico y uterino

Para este trabajo se realizó un seguimiento continuo durante dos años de las hembras de *E. patagonicus*, por lo que se pudo observar el tracto reproductor de las hembras en las diferentes estaciones del año. La histología de los ovarios y úteros en las diferentes estaciones del año mostraron cambios cíclicos por lo que se pudo identificar el ciclo ovárico y uterino de esta especie. A continuación, se describen las características del ovario y del útero durante cada estación del año, ya que fue posible observar características que se mantenían durante cada estación.

Otoño: (n: 21) al inicio del otoño (marzo) se observa que las hembras de *E. patagonicus* en su ovario derecho (OD) presenta folículos primordiales, primarios y primarios avanzados, además de antrales en atresia folicular (Fig. 35 a). Mientras que el ovario izquierdo (OI) presenta folículos primordiales, y primarios y primarios en atresia (Fig. 35 b). Este patrón se repite en los siguientes meses de otoño, observándose la presencia de

folículos primarios avanzados y algunos antrales tempranos en el OD. Al inicio del otoño, en el útero se observa al algunos restos celulares en su luz, pero escasos, y se distinguen las glándulas tubulares endometriales (Fig. 35 c). En todas las hembras analizadas nunca se observó preñez ni presencia de cuerpo lúteo.

Invierno: (n: 16) al comienzo del invierno (julio) el OD se observa con los folículos en todos sus estadios de desarrollo, y más de un folículo antral o maduro (Fig. 26 a). En una hembra capturada en agosto se pudo evidenciar la presencia de un cuerpo lúteo en el OD (Fig. 35 c y d), mientras que el OI se observa semejante al observado en otoño (Fig. 35 f). En esta hembra se encontró la presencia de un blastocito en el cuerno uterino derecho y se observó que las glándulas endometriales presentan secreción PAS positiva (Fig. 35 g). Al final del invierno (septiembre) se observa la presencia del cuerpo lúteo en el OD (Fig. 35 h) mientras que el OI se observa sin grandes cambios (Fig. 35 i). En el cuerno uterino derecho se observa la presencia de un embrión en estadios tempranos del desarrollo con la formación de una placenta invasiva (Fig. 35 j).

Primavera: (n: 24) se colectaron 24 hembras en la temporada de primavera durante los 2 años de muestreo, donde solamente 3 no se encontraban gestando. En las hembras preñadas se observó la permanencia del cuerpo lúteo y la presencia de embriones en el útero en diferente grado de desarrollo (Fig. 35 k). El OI de las hembras gestantes se observaba semejante al de las anteriores estaciones (Fig. 35 l). Entre las hembras que se colectaron a finales de la primavera (diciembre) se encontraron hembras no preñadas con OD sin presencia de cuerpo lúteo (Fig. 35 m) pero en los cuernos uterinos se observa la desorganización del tejido epitelial, de las glándulas tubulares enrolladas del endometrio, así como la presencia de restos celulares en la luz uterina (Fig. 35 n).

Verano: (n: 16) al inicio del verano (enero) se encontraron hembras en estado avanzado de preñez donde el OD conserva su cuerpo lúteo y el ovario izquierdo presenta folículos primarios en atresia. Durante febrero se observa al OD con gran cantidad de folículos antrales en atresia. También a finales del verano se encontró una hembra con el OD con presencia de cuerpo lúteo (Fig. 35 o) y el OI solo presenta folículos primordiales (Fig. 35 p). En esta hembra (AMA 210) el cuerno uterino derecho presentó pérdida del epitelio

endometrial y desorganización de las glándulas endometriales, así como gran cantidad de restos celulares en su luz, con signos de hemorragia (Fig. 35 r). En el cuerno uterino izquierdo se observa también la desorganización del epitelio endometrial y gran cantidad de restos celulares en la luz (Fig. 35 q).

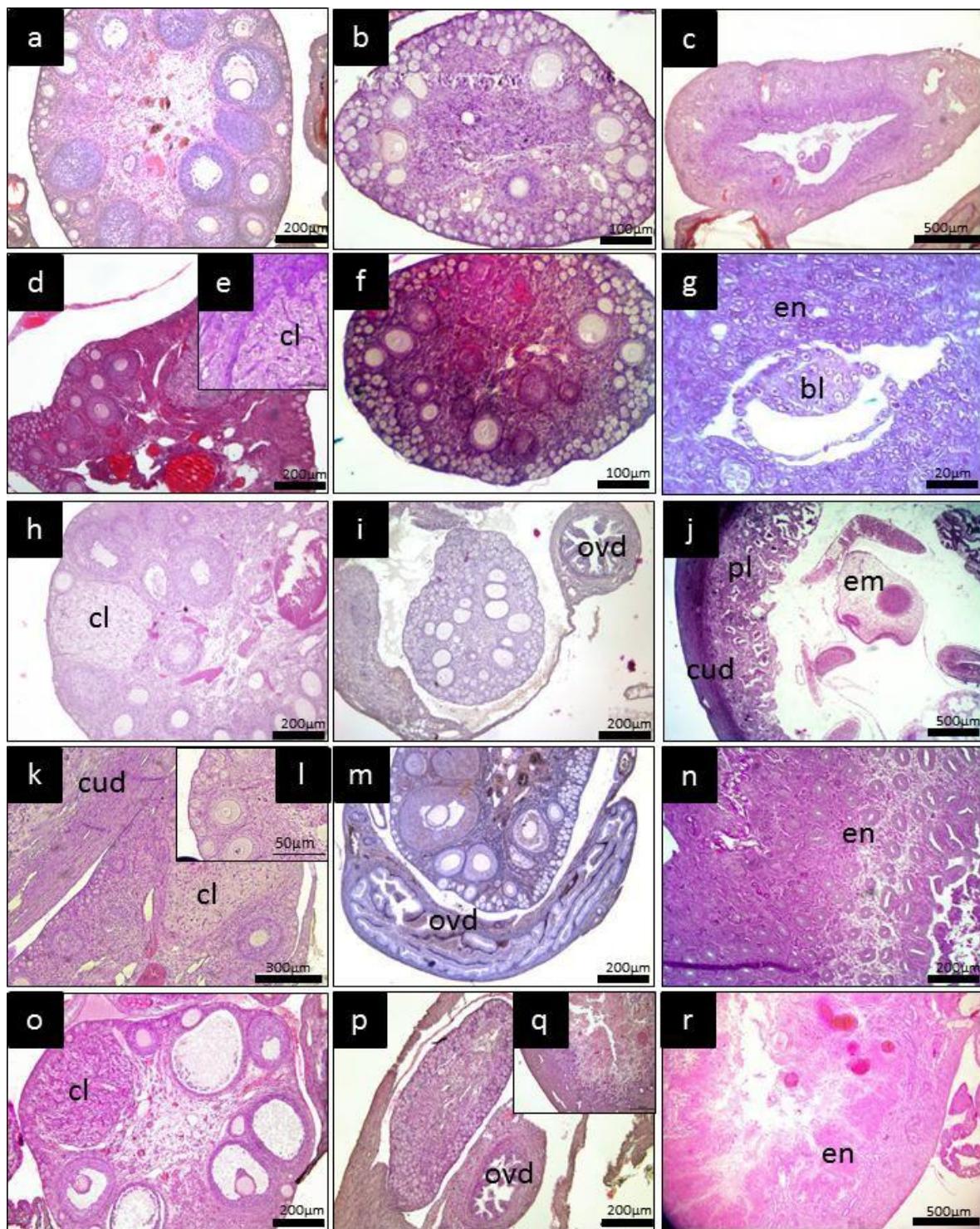


Figura 35: Morfología ovárica y uterina durante las diferentes estaciones del año. **Otoño:** a) Ovario derecho con folículos antrales. b) Ovario izquierdo con folículos primarios avanzados. c) cuerno uterino derecho con glándulas tubulares simples endometriales y pocos restos celulares en su luz.

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resultados

Invierno: d) Ovario derecho del mes de agosto, con cuerpo lúteo. e) Detalle de cuerpo lúteo. f) Ovario izquierdo con folículos primarios y primordiales. g) Luz uterina con blastocito en su interior de hembra de agosto. h) Ovario derecho de hembra en gestación, capturada en septiembre con cuerpo lúteo. i) ovario izquierdo de hembra de septiembre. j) útero de hembra capturada en septiembre en gestación con placenta en formación y embrión en estadios tempranos de desarrollo. **Primavera:** k) Ovario derecho de hembra con cuerpo lúteo y cuerno uterino en gestación. l) Ovario izquierdo de hembra gestante en primavera. m) Ovario derecho de hembra no gestante, donde solo se observan hasta folículos antrales. n) detalle de cuerno uterino derecho donde se observa el endometrio con glándulas endometriales y restos celulares en su luz. **Verano:** o) ovario derecho de hembra AMA 210 capturada en verano con cuerpo lúteo. p) ovario izquierdo de AMA 210. q) detalle de cuerno uterino izquierdo de AMA 210. r) detalle de cuerno uterino derecho sin presencia de embrión, pero con desorganización de la zona funcional del endometrio. Referencias: bl: blastocisto, cl: Cuerpo lúteo, cud: cuerno uterino derecho, em: embrión, en: endometrio, ovd: oviducto. Tinciones: Argéntica: m. Hematoxilina- eosina: a-l y n-r.

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Resultados

4.6. Dimorfismo sexual: glándula gular en machos

Se observó que solo los machos de *E. patagonicus* presentan una glándula exocrina de ubicación supraesternal, denominada glándula gular. Se identifica externamente por una invaginación de la epidermis inmersa en la dermis, que posee un poro delimitado por un borde con un epitelio córneo, oculto por el pelaje circundante (Fig. 36 a).

4.6.1. Histología de la glándula gular

Histológicamente, la glándula gular es una glándula sacular simple, compuesta externamente por una cápsula de tejido conectivo denso y tejido adiposo que la rodea por fuera, que es parte de la hipodermis (Fig. 36 b y c). Septos de tejido conectivo que irradian desde la capsula delimitan lóbulos. Se observó que el parénquima de la glándula se conforma solo de adenómeros sebáceos que secretan su contenido hacia el exterior a través de un conducto. Cada lóbulo posee su propio conducto que desemboca en la invaginación del tegumento (Fig. 36 d). El conducto exhibe un epitelio plano estratificado y queratinizado con una transición a un no queratinizado a medida que se aleja del poro.

En los adenómeros sebáceos, las células basales, apoyadas sobre la membrana basal son cúbicas. Estas células presentan un citoplasma de contenido lipídico y cambian su forma desplazándose hacia la región luminal del adenómero de acuerdo al estado de maduración de la secreción de la célula y la actividad secretoria del adenómero (Fig. 36 e). De acuerdo con el mecanismo de secreción, son holocrinas debido a que toda la célula forma parte de la secreción.

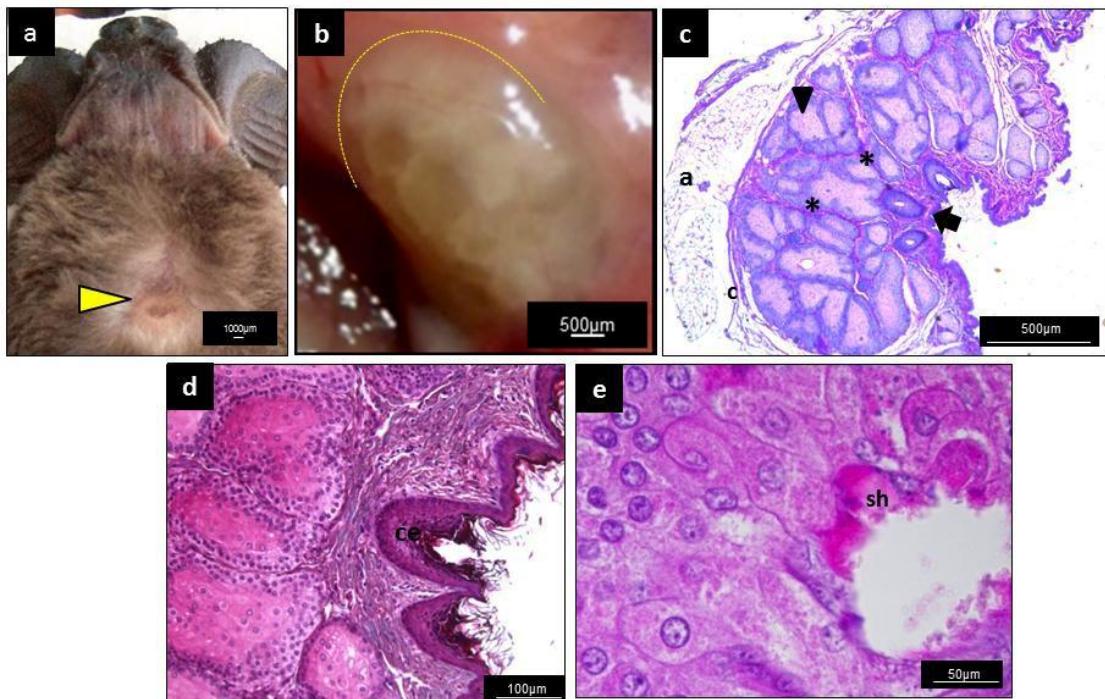


Figura 36: Glándula gular de *E. patagonicus*. a) Fotografía de macho de *E. patagonicus* mostrando el poro epidermal ubicado en la región gular. b) vista interna de la glándula gular al realizar la disección de la piel. c) corte histológico completo de la glándula gular de *E. patagonicus* donde se observa la cápsula de tejido conectivo que emite tabique delimitando lóbulos de adenómeros sebáceos y la invaginación de la epidermis que forma el poro. d) detalle de la región del poro con sus diferentes conductos y detalle de los adenómeros sebáceos. e) detalle de adenómero sebáceo con liberación de la secreción holócrina. Referencia: a: tejido adiposo, c: cápsula de tejido conectivo, ce: conducto excretor, sh: secreción holócrina. Cabeza de flecha negra: adenómero sebáceo; cabeza de flecha amarilla: poro excretor; flecha negra: conducto excretor; asteriscos: tabiques de tejido conectivo. Tinción: PAS: c; tricrómico de Masson: d; H-E: e.

Además, se pudo evidenciar un cambio en la morfología de la glándula dependiente de la estación del año, según la época reproductiva. La época reproductiva se observó desde invierno hasta principio de verano, de acuerdo con la presencia de hembras preñadas y la

máxima actividad testicular (testículos escrotales). Este criterio concuerda con lo propuesto por Barques et al., (1999). De acuerdo con esto, se observó que la pared del adenómero sebáceo se encuentra formada por una capa simple de células cúbicas durante la época no reproductiva (otoño) (Fig. 37 a y b). Sin embargo, durante la época reproductiva (invierno a verano) el epitelio prolifera y las células contienen gran cantidad de secreción almacenada en su citoplasma (Fig. 37 c y d).

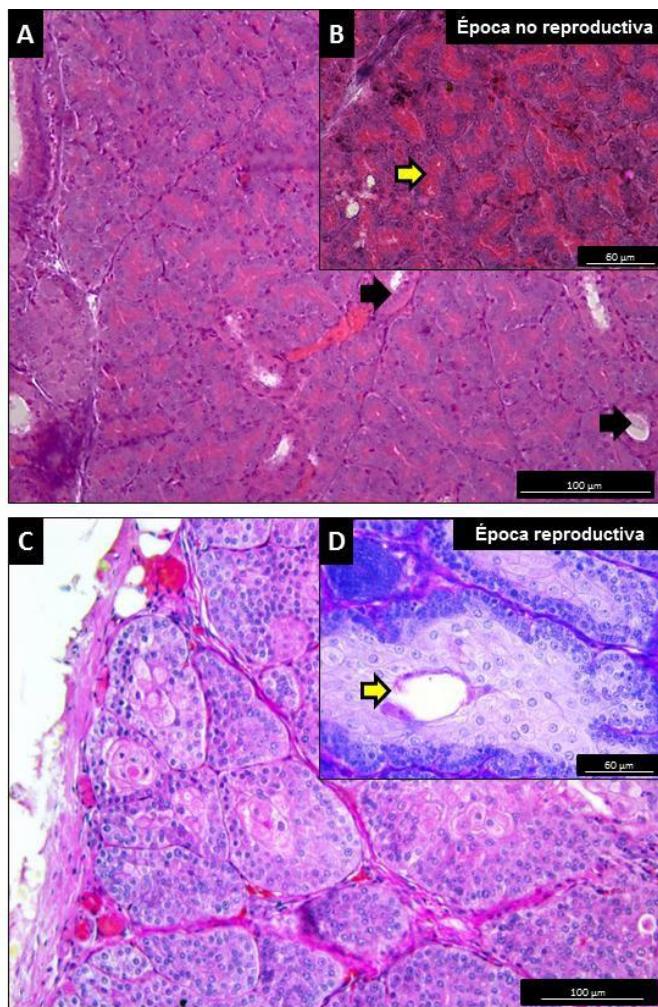


Figura 37: Comparación de la glándula de *E. patagonicus* según la época reproductiva. a) glándula gular de *Eumops patagonicus*; histología durante la época no reproductiva (otoño). b) detalle de la glándula en la época no reproductiva. c) Glándula Gular de *Eumops patagonicus* en temporada reproductiva (invierno a verano). d) Detalle de la glándula durante la temporada reproductiva. Las

flechas negras muestran el conducto de las glándulas y las flechas amarillas muestran la secreción de la glándula en el acino. Tinción: H-E: a y b; PAS: c y d.

4.6.2. Análisis histoquímico de la glándula gular

Se observó que la secreción de la glándula es PAS positiva, lo que indica un contenido de mucopolisacáridos (Fig. 38 a), Asimismo, la secreción exhibió tinción positiva para el colorante Coomasie blue, indicando la presencia de proteínas en el contenido secretado (Fig. 38 b).

La detección de lípidos se realizó mediante la coloración de Rojo Nilo, la cual mostró marca positiva Fig. 38 c y d).

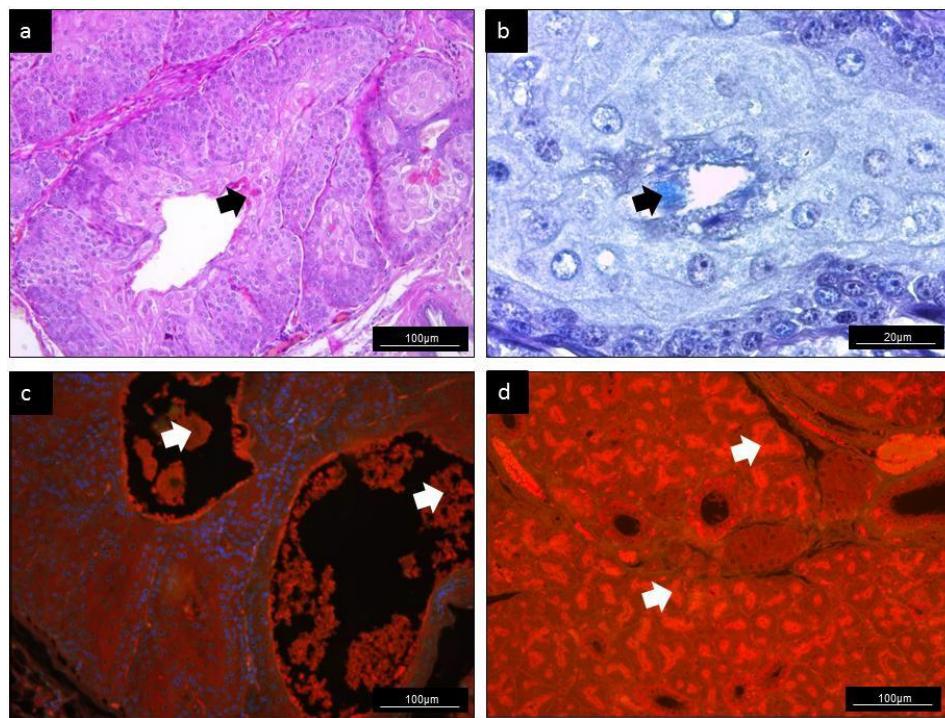


Figura 38: Detecciones histoquímicas en secciones histológicas de glándula gular de *E. patagonicus*. a) adenómero sebáceo con marca positiva para PAS en la secreción liberada. b) adenómero sebáceo con marca positiva para Comassie blue en la secreción liberada. c y d) adenómeros sebáceos con marca positiva para lípidos tanto en la secreción liberada como contenida dentro de la célula. Referencias: flechas marcan la secreción positiva.

4.6.3. Inmunohistoquímica para PCNA

Se observó marca nuclear positiva para PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) en las células basales que se encuentran en la periferia de cada adenómero que forma la porción sebácea. Las células luminales del adenómero no fueron inmunorreactivas para este marcador de proliferación.

4.6.4. Inmunohistoquímica de S-100 en la glándula gular

La inmunodetección de S-100 se observó en el citoplasma de las células mioepiteliales del tejido conjuntivo que rodea el adenómero sebáceo y en las células de Merkel de la epidermis.

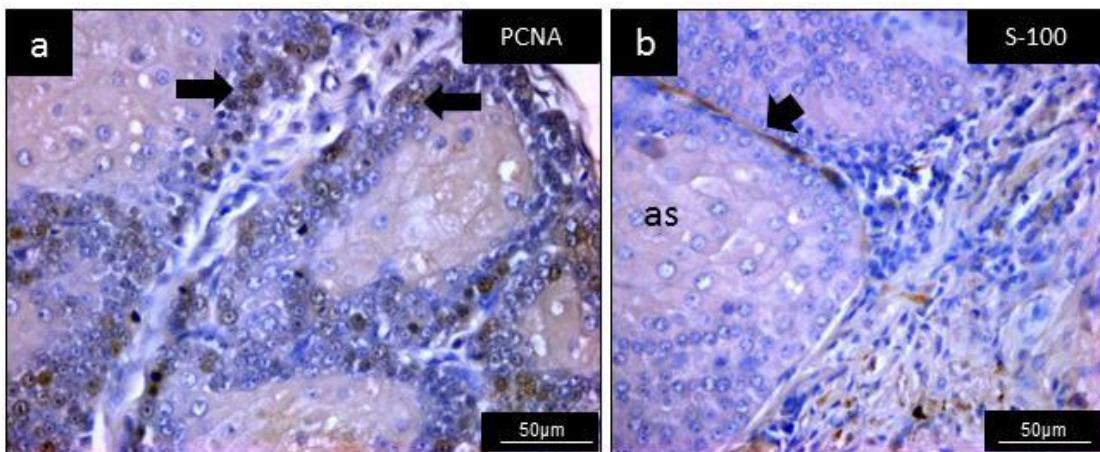


Figura 39: Inmunohistoquímica en glándula gular de *E. patagonicus*. a) detección de PCNA en adenómero sebáceo de glándula gular. b) detección de proteína S-100 en adenómero sebáceo de glándula gular. Referencias: as: adenómero sebáceo; flecha negra: indica la marcación positiva de cada anticuerpo.

4.6.5. Análisis del contenido lipídico de la secreción de la glándula (lipidómica)

Se realizó un análisis de la composición de ácidos grasos, observándose diferencias en su combinación dependiendo de si se encontraba o no en época reproductiva. Durante la

etapa reproductiva se observó un 30,7% de EPA, 29,84 % de Ac. Elaídico y 6,53 % de Ac. Palmítico, mientras que en época no reproductiva la proporción cambiaba a 38,03% de Ac. Elaídico, 18,05% EPA, 15,8% de Ac. Palmítico y un 7,99% de Ac. Linolénico (Grafico 1).

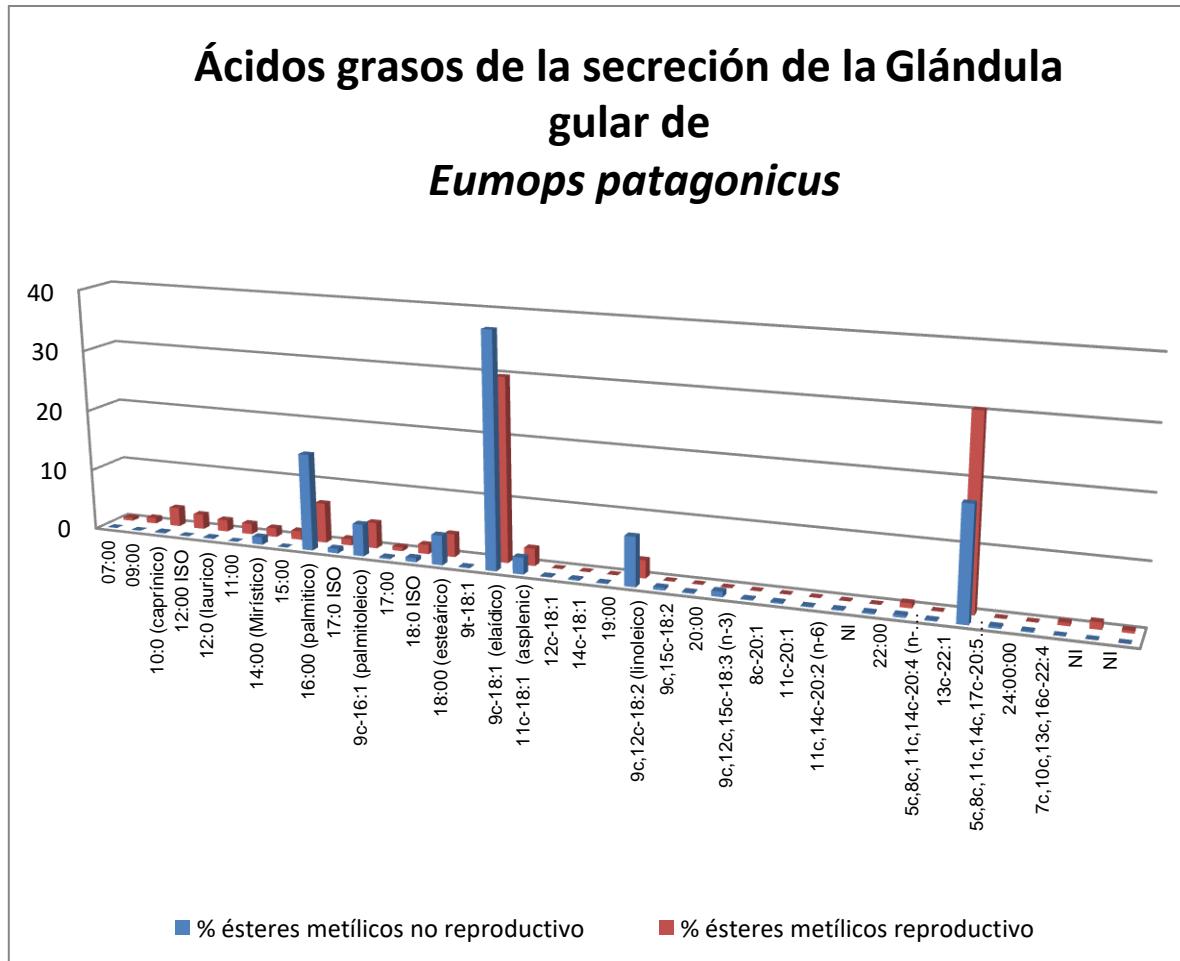


Gráfico 1: esteres de ácidos grasos detectados en la glándula gular de *E. patagonicus*. Barras rojas en época reproductiva y barras azules en época no reproductiva.

4.7. Alineamiento de proteínas:

Como los anticuerpos utilizados no poseen referencia bibliográfica de haber sido usado contra tejidos de Quirópteros, ya que en su mayoría son de origen murino diseñados para la detección de proteínas humanas. Por este motivo, se procedió a hacer un alineamiento de las proteínas de ambas especies para determinar el grado de homología de las proteínas de ambas especies en particular de los dominios de afinidad con los anticuerpos. Se procedió a realizar un alineamiento de secuencias y comparación entre la proteína de humano y las especies de Quirópteros halladas en la base de datos de

GenBank, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de acceso libre.

El alineamiento de las proteínas de interés encontradas en GenBank con las proteínas de la especie particular (*E. fuscus*) son de gran similitud en el caso de PCNA, FSH.

En el caso de PCNA se observó que la proteína de referencia PCNA de *Rattus*: solo se obtuvo 1 match con la PCNA de *E. fuscus* con un 99% de identidad, 99% de positividad y 0% de gaps. Proteína de referencia PCNA de *Homo sapiens*: solo se obtuvo 1 match con la PCNA de *E. fuscus* con un 99% de identidad, 99% de positividad y 0% de gaps. Mientras que la proteína de referencia PCNA de *Mus musculus*: solo se obtuvo 1 match con la PCNA de *E. fuscus* con un 97% de identidad, 98% de positividad y 0% de gaps.

En el caso de FSH, la proteína de referencia filotropin subunidad beta de *Mus musculus*: 1 match con la subunidad beta de filotropina de *E. fuscus* con un 84% de identidad, un 93% de positivos y 0 gaps.

Para la proteína pro apoptótica Bax de obtuvo un 100% de cobertura para la isoforma X1 entre la proteína de *Mus musculus* y *E. fuscus*, con un 86,5% de identidad. Mientras que para Bcl-XL de *M. musculus* se observó un 100% de cobertura con respecto a Bcl-2 isoforma X1 de *E. fuscus*, y un 97,8% de cobertura.

Por otra parte, en el caso de OVG 1 se comparó con la proteína de búfalo ya qué el anticuerpo utilizado es de tipo anti bovino. Se obtuvo un 88 de cobertura y 66,8 % de identidad comparando con *E. fuscus*.

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Discusión de resultados

Discusión de resultados

5.1. Desarrollo gonadal:

La sección 4.1 de esta tesis se centra en describir el proceso de desarrollo gonadal y la caracterización de las gónadas, tomando como modelo un representante de la familia Molossidae: *Eumops patagonicus*. Dentro de los mamíferos, el desarrollo gonadal fue ampliamente estudiado en el modelo Murino (orden Rodentia), del que se conoce la existencia de diferencias respecto del modelo humano. Sin embargo, en mamíferos silvestres la información al respecto es pobre y a pesar de que el orden Chiroptera es el segundo en número de especies, los estudios relacionados al desarrollo gonadal son en la actualidad muy escasos.

La presente tesis describe los principales eventos de formación de la gónada, determinando el estadio de desarrollo embrionario en el que ocurre dicho evento. A su vez, se detalla la histología de la gónada en cada etapa hasta la formación del ovario y el testículo.

5.1.1. Cresta gonadal, identificación de CGPs y establecimiento de la gónada bipotente.

En los mamíferos, durante estadios tempranos de la gestación se observa la formación de la cresta urogenital, la que dará origen a las gónadas derivados del mesodermo intermedio y a su vez esta misma estructura dará origen a los riñones del adulto (Birchmeier y Birchmeier, 1993; Polgar et al., 2007). De esta cresta urogenital primitiva se diferencia la cresta genital la cual es la encargada de dar origen a la gónada indiferenciada. Esta estructura en su inicio está compuesta por un epitelio que comienza a proliferar hacia el interior y que posteriormente será invadida por las CGPs (De Falco, 2009). Los Resultados de este estudio revelan que en embriones de etapas tempranas del desarrollo de *Eumops patagonicus* se observa la formación de la cresta genital en el E. 13

de desarrollo, según la tabla de desarrollo (Rodríguez *et al.* 2018). Recientemente se ha descripto para *S. lilium* (familia Phyllostomidae) (Gómez-Porras *et al.* 2017) la formación de la cresta genital, siendo el establecimiento de la gónada bipotente entre el E. 11 y el 14, a diferencia de lo encontrado en este estudio. Por otra parte, la estructura histológica de la cresta gonadal no muestra diferencias con lo descripto previamente para *Mus musculus*.

Una vez formada la cresta genital, es invadida por las CGP que migran a través del mesenterio posterior. Estas CGPs se originan en etapas tempranas del desarrollo fuera del embrión y luego migran por rutas bien definidas para colonizar la cresta gonadal y formar parte de la gónada (Soto-Suazo y Zorn 2005). En nuestros estudios se localizaron las CGPs mediante la inmunodetección de la proteína OCT4 lo que posibilitó observarlas en el estadio 13 de *E. patagonicus* ubicadas a lo largo del mesenterio posterior, así como en el epitelio de la cresta gonadal y en el interior de la misma. Esto nos estaría indicando que las CGPs inician su proceso de migración en estadios anteriores al analizado para llegar a encontrarse colonizando la gónada en el E. 13. Además, podemos confirmar que esos eventos se mantienen conservados en este orden, ya que se puede asumir que ocurren entre el E. 11 y E. 14 como lo descripto para *S. lilium*. Teniendo en cuenta además, que este pertenece a otra familia, con caracteres morfológicos diferentes a los observados en la familia Mollosidae.

Avanzando en el desarrollo de las gónadas en mamíferos, una vez colonizada la cresta genital por las CGP, se ha descripto la formación de una gónada bipotente o indiferenciada. Este es un estadio gonadal en el cual no es posible distinguir el destino de la misma por su morfología, posteriormente se observaba la formación de cordones testiculares cuando se define el testículo como la primer característica del comienzo de la diferenciación gonadal (Buehr *et al.*, 1993). En *S. lilium* se ha determinado que el establecimiento de la gónada bipotente es semejante a lo descripto para *M. musculus* y que existe una correlación entre el desarrollo embrionario de los miembros anteriores y la

gónada. Al encontrarse la gónada determinada a la formación del testículo, el embrión posee un miembro anterior definido con los esbozos de los dígitos y el dedo pulgar delimitado (Gómez-Porras et al., 2017). Estos mismos hallazgos fueron corroborados en este estudio, en donde en el E. 17 se encuentra la gónada bipotente con la presencia de algunos cordones sexuales.

Por otra parte, mediante inmunodetección de la proteína PCNA se evidenció un marcado número de células en proliferación en la región medular de esta gónada. Teniendo en cuenta que la gónada masculina se evidencia primero y la proliferación comienza en el epitelio (Brenan et al., 2002), al encontrarnos con proliferación a nivel de médula estaríamos en presencia de una gónada femenina, además de contar con la presencia del conducto de Müller distinguible. Asimismo, esto afirmaría lo descripto para *S. lilium* que la diferenciación de las gónadas comienza en el E. 17 el desarrollo embrionario.

5.1.2. Gónadas diferenciadas

Se ha observado en estudios realizados en *C. perspicillata* (Lechowska et al., 2012) en donde se describe la oogénesis temprana en los ovarios prenatales, que en el estadio 12 de desarrollo para esta especie, ya se distinguen los ovarios pares que contienen las CGPs formando cistos de células de la línea germinal. Estos se encuentran asociado por puentes citoplasmáticos debido a una citocinesis incompleta. Los resultados de nuestros estudios no permiten apreciar el estado del ovario en un estadio tan temprano del desarrollo, pero si se observó la presencia cistos en un estadio avanzado del desarrollo, el E. 23. En *E. patagonicus* se puede observar la presencia de ovarios con forma de riñón, con un hilio bien delimitado, un epitelio germinativo de recubrimiento y la presencia de estos cistos formando parte del parénquima ovárico. Esto puede ser una diferencia existente entre familias, la formación tardía de los folículos primordiales. Para *C. perspicillata* se describe que entre el E. 14 y 15 de desarrollo embrionario se observa en los ovarios la formación de los folículos primordiales, formado por los ovocitos rodeados de células somáticas delgadas que lo envuelven (Lechowska et al. 2014). Esto ocurre tardíamente en lo que

observamos para *E. patagonicus*, donde los folículos primordiales recién son distinguibles en el E. 25, un estadio avanzado del desarrollo. Al igual que lo observado para *C. perspicillata*, el ovocito se encuentra en paquitene o postepaqitene con un nucléolo bien distingible. Estas observaciones concuerdan con el resultado hallado por inmunomarcación de las proteínas pro y antiapoptóticas Bcl-xL y Bax, lo que mostró su influencia en la remodelación del tejido ovárico prenatal, pero además una mayor proporción de células en división, evidenciadas con el marcador de proliferación PCNA.

Con respecto a la formación del testículo, este ya se encuentra bien formado en el E. 21 de desarrollo de *E. patagonicus* lo cual concuerda con lo descripto para *S. lilium* (Gomez-Porras et al., 2017), en donde observa al testículo formado por sus túbulos seminíferos en cuyo interior se observan células somáticas y las espermatogonias. Al igual que en *S. lilium*, en *E. patagonicus*, gracias al marcaje de la proteína PCNA se pudo evidenciar la activa proliferación en los mismos. A su vez estos autores asocian el cambio morfológico a nivel gonadal, con caracteres externos como el desarrollo del miembro anterior, lo que concuerda con lo observado para *E. patagonicus*, no así con lo descripto para *C. perspicillata* (Lechowska et al. 2012).

5.2. Morfología ovárica y uterina de *E. patagonicus*

Esta tesis tiene como uno de sus principales objetivos poder describir a nivel anatómico e histológico el tracto reproductor de la hembra de *Eumops patagonicus* y caracterizar su ciclo reproductivo. Por esta razón el primer paso fue describir histológicamente la morfología ovárica y uterina para compararla con las descriptas para otros miembros de la familia Molossidae y representantes de otras familias.

Al examinar la anatomía se pudo confirmar que *E. patagonicus* presenta un útero bicone largo en donde se observa una asimetría en el tamaño de los cuernos uterinos, ya que la mayoría de las hembras adultas presentaban mayor tamaño en el cuerno uterino derecho. La anatomía de este molossoide concuerda con el modelo general de la familia Molossidae, el cual muestra una de las asimetrías más marcada dentro de los Chiropteros (Wimsatt,

1979). El patrón de asimetría molosidae se caracteriza por una dominancia exclusiva del lado dextral del aparato reproductor de la hembra. Esto se ha observado para *M. molossus* (Fabian, et al., 1989) donde se describió que en ejemplares jóvenes ambos cuernos conservan la simetría sin embargo en ejemplares adultos se observa una gran diferencia entre los cuernos, siendo el derecho más desarrollado que el izquierdo. Esta asimetría también es observable en los ovarios, siendo el derecho visiblemente de mayor tamaño. Estas mismas características morfológicas fueron descriptas para *M. rufus* (Rasweiler, 1990).

Los resultados obtenidos mediante el corte seriado de los ovarios de *E. patagonicus* nos permitió observar la morfología de los mismos, en donde al igual a lo descripto para otros molossidos (eg. *M. molossus*, *M. rufus* y *T. brasiliensis*) existe una diferencia en cuanto a tamaño y morfología entre los ovarios derecho e izquierdo. En este estudio se logró caracterizar la morfología en ambos ovarios donde se puede distinguir fácilmente la regionalización típica de una corteza y una pequeña médula que consta de tejido conectivo laxo y una vascularización que se continúa con el hilio, típica de la mayoría de los mamíferos (Spanel-Borowski, 2012). En la corteza se localizan los diferentes estados de maduración folicular donde se distinguieron todos los estadios hasta la formación del cuerpo lúteo. Esto concuerda con descripciones hechas tanto para otros molossidos como para otras familias de Chiropteros (Rasweiler IV y Badwaik, 2000). Al observar la corteza se pudo evidenciar que por debajo del epitelio germinativo existe una delgada capa de túnica albugínea y a continuación de la cual se observan los folículos primordiales y los folículos en maduración. Además de observarse una diferencia en cuanto a tamaño de los ovarios, la que radica en los tipos foliculares observados, otorgándole funcionalidad al mismo.

En el ovario derecho de *E. patagónico* se observan en su corteza los diferentes folículos en desarrollo, los folículos primordiales por debajo de la túnica albugínea y los subsiguientes estadios adentrándose en la corteza, esto se corresponde con lo descripto

para otras especies de molóssidos y otras familias de Chiropteros (Wimsat, 1975, 1979; Rasweiler 1988 y Fabian et al., 1989). En el ovario de la especie en estudio, se observó una diferencia con respecto a los demás representantes de la familia ya descriptos, y es la ausencia de abundante tejido intersticial glandular (Rasweiler, 1988). Las células intersticiales glandulares, son un tipo de células derivadas de las células de la teca y son productoras de andrógenos (Guraya, 1978). Las células de la granulosa producen aromatasa, que convierte los andrógenos en estrógenos, y las células de las glándulas intersticiales actúan como un suministro de sustrato de estrógenos, promoviendo indirectamente el crecimiento de los folículos (Spanel-Borowski, 2012). Pero como se muestra en nuestros resultados, y comparando con lo descripto para la presencia de este tejido no es un carácter propio de las especies de la familia Molossidae, como se observaba hasta el momento. Esto resulta llamativo ya que en otros dos géneros de la familia se ha evidenciado este carácter; Genero Molossidae y Tadarida (Kitchener y Hudson 1982). Sin embargo, la ausencia de este tejido intersticial glandular se ha observado en ovarios de especies de diferentes familias como los Vespertilionidaes (*Eptesicus furinalis*) para lo que se ha propuesto que la diferencia entre la presencia o no de este tejido puede deberse a diferencias en la producción de ovocitos y su requerimiento hormonal (Bueno et al., 2018) o que la producción hormonal de este tejido esté siendo suplida por otras células del ovario (Rodríguez et al., 2019). En nuestra especie en estudio esta ausencia de tejido intersticial glandular podría deberse a un menor requerimiento hormonal debido a que solo se ovula un ovocito.

El ovario izquierdo no es un ovario inerte ya que se observa la presencia de folículos primordiales que avanzan en el desarrollo hasta folículos primarios avanzados, sin embargo, no fue posible observar folículos más avanzados. Se observaron folículos primarios en atresia ya que se distinguen gran cantidad de núcleos picnóticos en la granulosa. Esto nos sugiere que la apoptosis es un proceso fundamental en la remodelación del tejido ovárico, ya que estos folículos no pueden seguir avanzando en su maduración por lo que ingresan en el proceso de atresia folicular. En especies de la familia

Phyllostomatidae, *Macrotus californicus*, una especie con funcionalidad dextral del ovario y con su consiguiente gestación dextral, se procedió a la ovariotomía del ovario derecho, observándose que el izquierdo reasume su funcionalidad logrando la ovulación y formación de un blastocito. Esto evidencia la capacidad del ovario izquierdo de madurar sus folículos ante la ausencia del ovario derecho (Bleier y Ehteshami, 1981).

Por otra parte, al observar las secciones histológicas del oviducto y los cuernos uterinos se pudo distinguir que *E. patagonicus* presenta a nivel de las trompas uterinas una característica particular, la presencia de una bursa o bolsa ovárica. Esta es una estructura que se ha descripto para especies de la familia Phyllostomidae (Hood y Smith, 1983) además se lo describió también entre representantes del orden Yinpterochiroptera de la familia Pteropodidae (Hood, 1989). Es una estructura derivada del peritoneo que envuelve al ovario y en los Pteropodidae solo deja una diminuta abertura peritoneal próxima a las fimbrias (Mosman y Duke, 1973). Esta estructura también es descripta en *M. rufus*, observada por Rasweiler IV (1988). La presencia de esta estructura en especies de chiróptero podría ser el resultado de una adaptación para asegurar el éxito del ingreso del ovocito ovulado a las trompas uterinas y asegurar de esta manera la fecundación. Esta característica es de gran importancia para esta especie debido a su baja tasa reproductiva, por lo que resulta una buena adaptación para compensar el hecho de que se ovule un solo ovocito.

El oviducto, presenta una estructura tradicional, donde se observan las regiones típicas de los mamíferos. Se observan las tres túnicas, donde la mucosa está formada por un epitelio cilíndrico con cilios y células secretoras, en las que no se observa grandes cambios a medida que se avanza hacia el útero. En la túnica muscular, sí se puede observar un aumento de fibras musculares lisas a medida que se avanza hacia el cuerno uterino. A diferencia de lo reportado para algunas especies, en donde se observan diferencias en el epitelio tubárico entre el lado izquierdo y derecho. Se puede distinguir un epitelio de la mucosa de la ampolla con una hipertrofia de sus células y mayor vacuolización de las

células secretoras del oviducto correspondiente al ovario que ovuló, como se describe para *Carollia perspicillata* (Rasweiler IV y Badwaik, 2000), en *E. patagónicus* no se observaron diferencias notables.

La morfología uterina dentro del orden Chiroptera es muy variada (Crichton & Krutzsch, 2000; Mssman, 1977) encontrándose tres tipos principales: dúplex, bicorne y simple. Sin embargo, dentro de la Familia Molossidae, todas las especies reportadas hasta el momento poseen un útero bicorne donde se observa que la gestación ocurre en el cuerno uterino derecho. Este adquiere mayor tamaño en hembras gestantes o que ya han estado preñadas. Los cuernos uterinos constan de una histología clásica observables en otros mamíferos y semejante a la descripta para otros murciélagos, como *Molossus rufus* (Rasweiler IV, 1990) y *Tadarida brasiliensis* (Sthepens, 1962). En *E. patagónicus*, se mantiene el esquema general de las túnicas uterinas, reconociéndose al endometrio, miometrio con 3 capas de musculatura lisas y una serosa.

Una característica destacable en hembras en fase lútea con ausencia de preñez, es la presencia de un endometrio en estado de regresión, mostrando signos de hemorragias por desprendimiento de la capa funcional de este. Esta característica había sido reportada anteriormente para otras especies de quirópteros, principalmente dentro de la Familia Phyllostomidae como uno de los pocos grupos con la capacidad de presentar una menstruación verdadera (Hamlett, 1934; Rasweiler, 1970, 1974, 1979 a, b; Quintero and Rasweiler, 1973, 1974; Bonilla and Rasweiler, 1974). Posteriormente se realizó un estudio con animales mantenidos en cautiverio donde se seleccionaron grupos de hembras sin presencia de machos para poder controlar la introducción del mismo y evaluar los cambios en el endometrio en *Molossus rufus* (Rasweiler IV, 1991). Este estudio pudo detallar los cambios en el endometrio causados por la reacción decidual que tiene lugar en ambos cuernos uterinos y que en hembras no gestantes se observa como una posterior menstruación por pérdida de la capa funcional del endometrio. En la presente tesis se determinó que *E. patagonicus* es la primera especie en su género (*Eumops*) en reportar

esta característica de menstruación verdadera, un carácter que lo posiciona como un buen modelo de estudio en biología reproductiva. anteriormente se detectó menstruación en *C. perspicillata* en donde a diferencia de *M. rufus*, en esta no se observa reacción decidual clara en la decidua (Rasweiler IV, 1992). Rasweiler VI, (1992) ha propuesto además que esta característica de presencias de reacción decidual en determinados primates, humanos y *M. rufus* estaría relacionado con la futura formación de una placenta invasiva hemocorial, siendo esta una compartida en dos linajes diferentes.

5.3. Asimetría funcional

En los chiropteros se han observado asimetrías en cuanto a la morfología y a la funcionalidad del ovario, como del oviducto observándose una dominancia completa de uno de ellos. Generalmente se observa que el lado en el que el ovario es responsable de la ovulación, también ese cuerno uterino presenta el embrión durante la gestación, aunque existen casos donde se encuentran embriones en ambos cuernos (Gopalakrishna and Ramakrishna, 1977). La asimetría reproductiva funcional dextral, es decir dominancia del ovario derecho y gestación en el cuerno uterino derecho es el tipo de asimetría más común en los quirópteros y parece ser una característica de la familia Rhinolophidae (Matthews, 1937; Wimsatt, 1979 y Bernard, 1985). Este es el tipo de dominancia que se presenta en la familia Molossidae (Badwaik and Rasweiler IV, 2002) y es la que corroboramos en este estudio y que se demuestra para *E. patagónicus*, en donde se observó una total dominancia del ovario derecho. Este ovario funcional derecho fue el único que contenía en su corteza todos los estadios de desarrolló folicular incluyendo al cuerpo lúteo, mientras que el izquierdo nunca presentó estadios avanzados de la foliculogénesis. Rasweiler IV (1988), al observar esta asimetría en *M. rufus*, propuso que esta diferencia podría deberse a una escasa vascularización en el ovario izquierdo, lo que limitaría el crecimiento folicular. Sin embargo Crichton and Krutzsch (1985) al estudiar la asimetría en *M. californicus*, propusieron que esa asimetría podría estar relacionada con la diferencia de expresión de receptores de gonadotrofinas. Un estudio realizado por Jerret

(1978) en *T. brasiliensis*, luego de la ovariotomía del ovario derecho y el tratamiento con gonadotrofinas observó, un aumento de tamaño del ovario izquierdo.

Al realizar la inmunodetección de la hormona FSH en ambos ovarios de *E. patagonicus* se pudo evidenciar una localización diferencial. Mientras que en ovario derecho se la detectabó en las células de la granulosa de los folículos primarios avanzados y secundarios, en el izquierdo se encontraba en el tejido conectivo del hilario. Esto sugiere que esta diferencia funcional de los ovarios está relacionada a la acción de la FSH, al no poder actuar sobre sus células blancas en el tejido ovárico del ovario izquierdo. En este sentido se podría proponer que esto se debería a una ausencia de los receptores de la hormona en los folículos de este ovario, concordando con lo planteado por Crichtin y Krutzsch (1985), y a que esta ausencia podría deberse a la falta de expresión de receptores de la hormona FSH solo en el ovario izquierdo.

La comprensión del funcionamiento fisiológico de especies modelos no convencionales nos aporta información para una mejor comprensión de la fisiología y enfermedades humanas, como lo han hecho los modelos murinos (Mitchell et al., 2009; Keightley, 1996).

Otra característica notable en el ovario izquierdo de *E. patagonicus* es que a pesar de que en la foliculogénesis los folículos avanzan hasta un estadio de folículo primario, en la granulosa y en el ovocito existe actividad proliferativa. Una proteína celular muy importante involucrada en la proliferación celular es el antígeno nuclear de proliferación celular: PCNA, el cual se acumula progresivamente durante la interfase y desaparece al final de la mitosis (Hall y Levinson, 1990). Se sabe que esta proteína es componente de la ADN polimerasa delta y es necesaria para el desarrollo del ciclo celular (Brabo, et al 1987; Perlich et al, 1987). Por este motivo la inmunodetección de PCNA es un buen marcador de proliferación celular y se ha utilizado en diferentes estudios para observar células en proliferación en tejidos ante diferentes condiciones. En estudios recientes se ha utilizado la inmunodetección de la proteína PCNA en ovarios de *Scotophilus heati*, un murciélago vespertilionido, para evaluar si la resistina (hormona producida por el tejido adiposo)

aumenta la proliferación en el ovario de esta especie (Singh et al., 2014). Otro estudio, que se enfocaba en evaluar la acción de la diamina putrecina en el útero de *Cynopterus sphinx*, un murciélagos perteneciente al suborden Yinpterochiroptera (*Cynopterus sphinx*), utiliza la inmunomarcación de PCNA para evaluar la proliferación celular en el útero de este murciélagos (Anuradha y Krishna, 2019).

Estos resultados acerca del estado proliferativo de ambos ovarios, mediante la utilización de PCNA como inmunomarcador, demuestran que no existen diferencias en la actividad proliferativa entre ambos ovarios. Se observó que en ovario izquierdo existe actividad proliferativa en las células de la granulosa de los folículos primarios, como en algunos ovocitos de folículos primordiales. Además, esta actividad proliferativa también se observa en ambos cuernos uterinos, los que nos indica que la reacción decidual ocurre en ambos, por lo que en el tracto reproductor de *E. patagonicus* no existiría diferencia en cuanto este aspecto entre el lado derecho e izquierdo.

Por otra parte también se obtuvieron resultados al evaluar que rol juega el proceso de la apoptosis en ambos ovarios, tanto con el método indirecto mediante inmunomarcación de proteínas pro y anti apoptóticas y por el método directo a través de la técnica de TUNEL. La existencia de un equilibrio o balance entre inductores de la apoptosis como las proteínas Bax o Bcl-xLs e inhibidores de la apoptosis como Bcl-2 y Bcl-xL determina la muerte o supervivencias de la célula (Tilly, 1996; Boise et al., 1993; Oltvai et al., 1993).

Como regla general se ha observado que en el ovario de los mamíferos, la expresión de Bax se encuentra aumentada, mientras que la expresión de la proteína Bcl-2 se encuentra en niveles bajos o indetectables (Kim y Tilly, 2004). Esto soporta las observaciones de la alta tasa de muerte celular programada en el ovario de los mamíferos (Albamonte et al., 2008). Nuestros resultados no muestran diferencias en cuanto a la inmunomarcación de las proteínas Bax y Bcl-xL entre ovario izquierdo y derecho, pero al igual que los autores antes mencionados, si se observa una marcación positiva más evidente hacia la proteína Bax principalmente en células intersticiales, células de la granulosa de folículos primarios

avanzados y secundarios, mientras que Bcl-xl se observaba presente en los ovocitos de los folículos primordiales. Esto nos indica que en los ovarios de *E. patagonicus* se mantiene esa tasa de muerte celular en ambos ovarios a pesar de que solo el derecho es el que ovula. Esta mayor marca positiva de Bax se presenta principalmente en las células de la teca, y en células intersticiales, así como en células de la granulosa. Esto concuerda con lo que ocurre en el ovario adulto humano, donde las células en las que mayormente se observa apoptosis, son las de la granulosa (Billig et al., 1996; Albamonte et al., 2005). Por otra parte, en el cuerpo lúteo la inmunodetección para Bax y Bcl-xl se observó equilibrada.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el ensayo de TUNEL, se observan células túnel positivas principalmente en las células de la granulosa de folículos antrales, en el ovario derecho, mientras que en el izquierdo se lo ve en folículos morfológicamente atrésicos. A pesar de la elevada inmunomarcación de la proteína pro apoptótica Bax, la detección de apoptosis por el ensayo de TUNEL no fue tan elevada y se restringía a células morfológicamente visibles en apoptosis. Por lo que, la detección de Bax por inmunohistoquímica no necesariamente indica que la apoptosis esté activa ya que la actividad de Bax es dependiente de la localización intracelular (Hsu et al., 1997; Zamzami et al., 1998), Albamonte et al., (2008) sostiene que además otros antiapoptóticos miembros de la familia Bcl-2, como Bcl-2 o Mcl-1 (Hsu et al., 1998), pueden estar interactuando con Bax para inhibir su efecto proapoptótico funcional. Estos resultados nos muestran que el tejido ovárico se encuentra en un balance constante, los eventos apoptóticos y de supervivencia celular trabajan en la remodelación, mantenimiento y dinámica de ambos ovarios en *E. patagonicus*.

Otro de los objetivos de esta tesis, además de la caracterización histológica del oviducto de *E. patagónico*, fue detectar mediante inmunomarcación la existencia de sitios propicios para el almacenamiento de esperma en el tracto reproductor de la hembra. El almacenamiento de esperma por varios días en vertebrados es inusual. En el tracto reproductor femenino, la esperanza de vida “normal” del espermatozoide es

aproximadamente la duración del estro, generalmente unos días. En muchas especies de murciélagos, el estro se acentúa (16 a 200 días: Racey, 1979) y, como resultado, los espermatozoides fértiles se retienen dentro de sus tractos durante períodos que superan ampliamente los normales de los mamíferos (Crichton, 2000). La retención de esperma en el tracto reproductor en murciélagos que habitan en regiones templadas está asociada con el retardo (o Delay) en la ovulación y la fertilización y es una de las tantas estrategias que les permite a los murciélagos interrumpir su ciclo reproductivo durante la hibernación (Wimsatt, 1960 y 1969). En *Molossus rufus*, Rasweiler (1987) ha descrito la persistencia de espermatozoides en el aparato reproductor femenino durante un tiempo después del parto. Sin embargo, Crichton (2000) sostiene que parece más probable que esto esté relacionado con el celo prolongado e inseminación continua, en lugar de un caso de almacenamiento de esperma. Dado que los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal están condenados a la destrucción, Krutzsch et al. (1982) propusieron que el almacenamiento prolongado de esperma en murciélagos debe implicar un retraso en la capacitación; por lo tanto, los eventos que retrasan la capacitación en los murciélagos probablemente sean una de las causas de la longevidad de los espermatozoides.

Los espermatozoides de mamíferos eyaculados no pueden fertilizar al ovocito; esta habilidad se adquiere luego de una serie de cambios moleculares y fisiológicos, conocidos colectivamente como capacitación, que se logran durante el tránsito de los espermatozoides a través del tracto genital femenino. Además de la adquisición de competencia para la fertilización, el tracto materno promueve una dramática selección espermática resultado de la diferencia existente entre número de espermatozoides por ovocito en el sitio de fertilización (Hino et al., 2016). Un paso crucial que precede a la fertilización es la interacción del espermatozoide con el tracto femenino y las células epiteliales que tapizan el lumen y con los fluidos de este (Saint-Dizier et al., 2020). La migración de los espermatozoides a través del útero está asociada con las interacciones de los espermatozoides con el fluido uterino y con las células epiteliales, cada una

mediada por componentes específicos, desencadenando diferentes efectos en los espermatozoides. Una de las proteínas componente del fluido oviductal es OVGP-1 (oviductina) y es una de las más abundantes durante el estro (Aviles et al., 2010). Varios estudios demuestran que esta glicoproteína se localiza a lo largo del espermatozoide, y se ha observado que si bien el espermatozoide interacciona con varias proteínas que forman el fluido oviductal luego de la ovulación, la más abundante previo a la ovulación es OVGP-1, por lo que se sugiere su presencia y funcionalidad en la liberación del esperma del reservorio espermático (Saint-Dizier et al., 2020). En un estudio realizado en ganado, los espermatozoides incubados con OVGP-1 purificada, muestran una mayor motilidad y viabilidad, integridad de membrana y estado de capacitación en comparación con los no tratados (Abe et al., 1995; Choudhary et al., 2017). La presencia de OVGP-1 y su rol como indicadora de reservorio espermático y capacitante de espermatozoides nos llevó a utilizarla como un marcador en la caracterización del oviducto de *E. patagónicus*. Nuestros resultados para la inmunodetección de OVGP-1 muestran la presencia de la misma en el oviducto del lado derecho así como en el útero de hembras capturadas en invierno, época en dónde se produce la ovulación y la fecundación, no así en otoño. Tampoco se observó marcación positiva en el lado izquierdo del tracto reproductor. Estos resultados nos estarían indicando la expresión de esta proteína en la época de estro, y en esta especie coincide con la fecundación. Esta glicoproteína podría estar actuando como un capacitador de los espermatozoides y asegurar la fertilización del ovocito, siendo esta otra estrategia evolutiva para asegurar este proceso. Asimismo, al no observarse su expresión en los meses previos al estro, nos llevaría a pensar que no podríamos considerarla como marcador de reservorio espermático en *E. patagónicus*.

5.4 Ciclo ovárico y uterino

Los murciélagos se caracterizan por ser longevos y por ello tener múltiples eventos reproductivos con la producción generalmente de una sola cría (Gaisler, 1989; Racey, 1982). Los mamíferos más pequeños tienden a producir crías relativamente más grandes

(Harvey, 1986), en los murciélagos se ha observado que la cría puede llegar a pesar hasta el 43% de la masa materna al nacer (Kurta y Kunz, 1987).

Dentro de los Chiropteros existen varios patrones de ciclos reproductivos, los primeros estudios en cuanto a ciclo reproductivos se realizaron en especies de zonas tropicales que se caracterizan por ciclos anuales, por el contrario los murciélagos de zonas templadas poseen diversidad de ciclos reproductivos (Krishna y Batnagar, 2011). En general los murciélagos de zonas templadas generalmente son monoéstrios (Racey, 1982), estos generalmente son especies que hibernan y presentan como estrategia el “delay” o retardo en la fertilización o el desarrollo embrionario. Debido a sus inusuales ciclos, se clasifican en dos tipos de patrones: los de patrón reproductivo de tipo I, se caracterizan porque el proestro ocurre a principios del verano, y la copula ocurre a fines del verano y principios de otoño, posteriormente entran en hibernación. El esperma se almacena y la fecundación ocurre en la primavera. Este ciclo es característico de muchos murciélagos vespertilionidos (Wimsatt, 1945; Sluiter & Bels, 1951; Pearson, Koford, & Pearson, 1952; Uchida & Mori, 1977; Oh, Mori, & Uchida, 1985; Son, Yoon, Mori, & Uchida, 1987). Por otra parte, en el patrón reproductivo de tipo II: se observa en algunos vespertilionidos y algunas especies de la familia Rhinolophidae. Se caracteriza por una recrudescencia gonadal durante el verano; el estro y la cópula ocurren durante el otoño, seguida inmediatamente de la ovulación, fertilización e inicio de la gestación. Estas especies son las que poseen retardo en la gestación al entrar en hibernación durante el invierno (Planel, Guilhem y Soleilhavoup, 1961; Bradshaw, 1961; Dwyer, 1963).

Por otra parte, existe poca información acerca de las especies tropicales, en ellos la ovulación y fertilización ocurre después de la cópula. Sus ciclos reproductivos son variados y numerosos y se pueden clasificar en 4 grandes categorías: monoestrica estacional, poliestrica bimodal, poliestrica estacional y poliestrica no estacional. Según Krishna y Batnagar (2011) el ciclo monoéstrico estacional se caracteriza por un solo periodo de cría y pueden reconocerse 3 variantes. La primera variante, la copula se realiza en otoño

seguida de la fertilización, preñez y nacimiento en la primavera. La segunda, la cópula fertilización y preñez ocurren en el verano. La tercera variante, el proestro ocurre a mediados de otoño seguido por un retardo en la ovulación y fertilización a fines de otoño o principio de invierno. Un estudio realizado en la ecorregión tropical de Argentina (las yungas), para *Artibeus planirostris*, *Sturnira erythromos* y *S. lilium*, las describe como especies poliestricas bimodal, en donde se observa un retraso en la gestación en las dos especies de *Sturnira* (Miotti, 2020).

Según nuestros resultados, *E. patagonicus*, podría considerarse una especie de climas templados, por su distribución geográfica y se clasificaría dentro de un ciclo monoestrico estacional, pero a diferencia de las tres variantes antes descriptas y de los ciclos propuestos para murciélagos de clima templado, este presenta ciertas características. Por el estado en el que se encuentran los ovarios y la época en la que aparece el primer cuerpo lúteo, así como el estado reproductivo de los machos, se puede inferir que en esta especie el estro junto con la ovulación e inmediata fertilización ocurre a fines del invierno. En esta época se puede observar la presencia del cuerpo lúteo en el ovario derecho y la presencia de embriones tempranos en el cuerno uterino derecho. En finales de la primavera y principios del verano se observan las hembras con embriones a término próximos al parto. Mientras que en otoño se observa el proestro donde los ovarios comienzan a reclutar nuevos folículos. Asimismo, en el útero se observan cambios atribuibles a la fase proliferativa, durante otoño y principio de invierno, mientras que se observa un útero en fase secretoria de acuerdo con el estado de las glándulas endometriales, durante fines de invierno y principio de primavera.

En esta especie al igual que en la mayoría de los murciélagos, solo se obtiene una cría por periodo reproductivo. Asimismo, a pesar de no poder realizar un seguimiento continuo a un grupo de hembras, el muestreo de individuos cada 15 días nos permitió estimar que el tiempo de gestación de esta especie oscila en 90 días.

Así mediante el estudio de esta especie de regiones templadas, pero en donde no se registran fríos extremos, podemos ampliar el patrón reproductivo en chirópteros con la

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Discusión de resultados
descripción de un ciclo monoestrico estacional que comienza en el invierno y que no
presenta “delay” o retardo en la gestación/ fertilización.

5.5. Glándula gular como carácter de dimorfismo sexual

En esta tesis se obtuvieron resultados a nivel macroscópico e histológico en la descripción de la glándula gular de *E. patagonicus* similares a los estudios realizados para individuos de la misma familia como *M. rufus* y *M. molossus*, (Werner y Lay, 1963; Dourado, 2001). El estudio de las secciones histológica nos muestra que el parénquima glandular se encuentra rodeado por un estroma de tejido conectivo que forma una cápsula, semejante a lo descripto para *M. rufus* (Werner y Lay, 1963).

El parénquima contiene porciones sebáceas y sudoríparas aisladas por tabiques de tejido conjuntivo que las rodean. De acuerdo con los autores mencionados anteriormente, encontramos estas características en la glándula gular de especímenes de *M. rufus* y *M. molossus*. Sin embargo, nuestros resultados en *E. patagonicus* indican que esta glándula estaba compuesta casi en su totalidad por porciones sebáceas. Además, nuestras observaciones revelan que la porción sebácea es del tipo sacular de secreción holócrina. Los adenómeros exhibieron células cúbicas basales indiferenciadas con funciones proliferativas, actuando como células madre del adenómero. Este hecho se confirmó con la marca PCNA positiva en sus núcleos. Por el contrario, las células luminales ya se encuentran diferenciadas. Estos resultados confirman la hipótesis formulada por Dourado (2001) para *M. molossus* en donde se postula el rol de células madre para aquellas células que se localizan en la base del adenómero, también reportada para *M. rufus* (Warner y Lay, 1963). Este estudio confirma los informes anteriores y amplía la descripción del mecanismo holócrino de la secreción sebácea para *E. patagonicus*. Varios estudios anteriores informaron el tipo de secreciones de las glándulas gulares y asignaron términos obsoletos de clasificación a las estructuras sebáceas. Así, se los describió como acinos sebáceos asociados a una secreción de tipo holocrino y porciones enrolladas de túbulos sudoríparos ligados a un tipo de secreción apocrina. Esto fue reportado para *Saccopteryx bilineata* (Caspers et al 2009); *Tadarida cynocephala* (Werner et al. 1950), *Molossus bondae* (Dapson et al. 1977) y *Taphozous longimanus* (Pandey y Dominic, 1987). Sin embargo, en este estudio adoptamos una clasificación diferente la de adenómero sebáceo

siguiendo los criterios actuales (Maynard y Downes, 2019). Estudios previos para *M. rufus* (Warner y Lay, 1963) y *M. molossus* (Dourado et al., 2001) reportaron que la secreción de la glándula gular es lipídica, con base en la morfología de las células. En este estudio, se verifica la naturaleza lipídica de la secreción en la especie estudiada mediante la tinción positiva con Oil red y rojo Nilo y posteriormente confirmado con un análisis de lipidómica para identificar los diferentes tipos de ácidos grasos que conforman la secreción. Adicionalmente, se confirmó la presencia de carbohidratos y proteínas en la secreción de los adenómeros sebáceos mediante la reacción histoquímica de PAS y azul de Coomassie. Por lo tanto, este trabajo establece que la secreción glandular está formada por contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos conjugados. Nuestros resultados concuerdan con los informados para la secreción gular de *Tadarida brasiliensis* y *Molossus bondae*. Sin embargo, la secreción de la glándula de *Eptesicus fuscus* no mostró contenido de carbohidratos (Dapson et al. 1977). La inmunodetección de S 100 en células mioepiteliales que rodean los adenómeros sebáceos y en las células de Merkel de la epidermis podría indicar la presencia de células que tienen conexión con terminales neuronales, ya que las proteínas S100 están relacionadas con las proteínas de unión a Ca²⁺. Es bien sabido que el Ca²⁺ es un ion muy importante en la traducción de señales (Fritz et al. 2010). Estas células positivas para S-100 podrían estar involucradas en la secreción glandular mediante estimulación mecánica. Por otro lado, también se observó la expresión de S-100 en células de Merkel cercanas al poro epidérmico, lo que se describió como un mecanorreceptor que podría funcionar en el mecanismo de secreción glandular. Estudios previos proponen que estas células estarían involucradas en el mecanismo secretor de glándulas en otros vertebrados (Germana et al., 2007; Olea et al., 2019). Probablemente, un estímulo mecánico en la glándula por parte de la hembra activa la glándula en machos durante la cópula. Heideman et al., (1990) han propuesto una hipótesis similar al estudiar machos de *M. sinaloae* con glándulas activas. Observaron que los ejemplares presionaban con el pecho el lomo de las hembras y dejaban sus marcas

durante los apareamientos. Además, estos autores notaron un pico de actividad glandular y que la aparición de las hembras marcadas coincidía con el final de la gestación y duraba hasta dos meses después del parto. Nuestros resultados mostraron la máxima actividad glandular entre invierno y verano, época en que las glándulas alcanzaron el mayor valor de peso y contenido secretorio. En los quirópteros, al igual que en otros mamíferos de pequeño tamaño, machos y hembras no presentaban un dimorfismo sexual notable. Sin embargo, la glándula gular presente en la familia Molossidae es un rasgo de dimorfismo sexual porque solo está presente en los machos. Esta glándula gular es una glándula cutánea hipertrofiada, y suele observarse en algunos representantes de diferentes familias de quirópteros como Molossidae, Mystacinidae, Phyllostomidae, Emballonuridae y Craseinnycteridae. Además, existen glándulas cutáneas con diferente localización en otras familias (Moñoz-Romo et al. 2021). Esto podría indicar que la secreción juega un papel importante en la atracción sexual o el reconocimiento intraespecífico y el apareamiento, probablemente como las secreciones odoríferas de otros mamíferos (Eisenberg y Kleiman, 1972; Blaustein, 1981; Penn y Potts, 1998; Brennan y Kendrick, 2006). Además, se ha planteado la hipótesis de que la secreción *M. sinaloae* podría ser utilizada para marcaje de territorio y hembras (Heideman et al., 1990). Asimismo, se ha comprobado que las hembras de *Leptonycteris curasoae* eligen machos con desarrollo de parches dorsales odoríferos de mayor tamaño, sobre los que no lo desarrollan (Muñoz-Romo et al., 2012).

Por medio del análisis de la composición de ácidos grasos de la glándula gular de *E. patagónicus* se pudo evidenciar diferencias en la composición dependiendo de si se trataba de glándulas activas en época reproductiva o si no se encontraba activa/ época no reproductiva. Entre los ácidos grasos más abundantes en la época reproductiva se destaca el EPA o ácido eicosapentanoico, perteneciente a la familia de los omega 3, mientras que en época no reproductiva su presencia disminuye, destacándose el ácido elaídico. El cambio en la combinación de los ácidos grasos que componen a la secreción nos estaría mostrando que sí, existen variaciones en cuanto a la época reproductiva y que estos

ácidos grasos estarían jugando un papel importante en la transmisión de señales odoríferas como se ha reportado para otros murciélagos y mamíferos estudiados (Muñoz-Romo et al., 2012; Harris et al., 2012).

El estudio de la actividad de la glándula gular puede ser importante para establecer su función principal; teniendo en cuenta que las señales químicas son fundamentales para su comunicación intraespecífica e interespecífica en quirópteros (Bloss, 1999; Altringham y Fenton, 2003; Dechmann y Safi, 2005). Los resultados obtenidos para esta especie sudamericana de la Familia Molossidae, nos proporcionan datos importantes sobre la morfología e histología de la glándula gular, así como la identificación de los ácidos grasos que la componen, pudiendo así inferir su implicancia funcional en el marcaje tanto territorial, como el de las hembras de su especie durante la época reproductiva.

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Conclusiones

Biología reproductiva de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)
Conclusiones

Conclusiones

Los estudios realizados en esta tesis sobre los aspectos reproductivos de *Eumops patagonicus* permitieron evidenciar varios aspectos relacionados con su biología reproductiva, como así también su desarrollo prenatal.

En *E. patagonicus* el estadio 13 de desarrollo embrionario es en el que se evidencia la cresta gonadal formada y es en este estadio donde se pueden identificar las CGP en migración. Por otra parte se observó que el estadio 17 se encuentra formada la gónada bipotente pero que comienza a diferenciarse. Una vez diferenciada las gónadas en ovarios y testículos es posible distinguir la acción de proteínas pro y anti apoptóticas las cuales estarían actuando en la remodelación del tejido embrionario.

En cuanto a la morfología ovárica y uterina se estableció la existencia de una morfología ovárica típica de los mamíferos en donde se distingue fácilmente una corteza de una médula. Por otra parte, en cuanto al tracto reproductor femenino, estamos en presencia de un útero bicorne donde las trompas uterinas rodean al ovario además de formar una bursa ovárica que los envuelve.

Sobre la histología de las diferentes secciones, se distinguió el ovario izquierdo del derecho, tanto por su diferencia de tamaño como por su funcionalidad. El ovario derecho presenta todos los estadios de la foliculogénesis típica de mamífero, mientras que el izquierdo no avanza hasta la maduración folicular.

La histología uterina es semejante a lo observado en otros mamíferos, con la característica que esta es una especie en donde a lo largo del ciclo uterino se observa la existencia de una pérdida del tejido endometrial con abundante hemorragia comparable con una menstruación verdadera.

Asimismo, se comprobó la asimetría funcional y no solo morfológica de los ovarios en cuanto a la diferencia en la localización de la hormona FSH, la cual sería la responsable de la falta de ovulación del ovario izquierdo. Por otra parte la actividad proliferativa y la actividad apoptótica en ambos ovarios es semejante, siendo estas responsables del mantenimiento y remodelación del tejido ovárico.

En el oviducto se detectó la presencia de una glicoproteína muy abundante en el fluido oviductal la que podría estar actuando como capacitante de los espermatozoides, coincidente con mayor expresión en la época reproductiva de esta especie. Esto nos indica que no estamos en presencia de reservorios espermáticos de tiempos prolongados ya que al poco tiempo se produce la fecundación.

Se identificó además el tipo de ciclo reproductivo que poseen las hembras de esta especie, clasificándolas como monoestrico estacional, donde el estro con la consiguiente cópula y ovulación ocurre a finales de invierno, mientras que los recién nacidos se observan en fines de primavera y principio de verano. En el otoño los ovarios exhiben el reclutamiento y crecimiento folicular.

Se constató que la glándula gular de *E. patagonicus* es una glándula es de tipo sebácea con secreción holocrina cuya secreción se activa mediante estímulos mecánicos.

Agradecimientos

Aunque esta tesis me tiene como autora, nunca hubiese podido llegar a terminarla sin el apoyo y ayuda de muchísimas personas a quienes les debo mucho. Personas que a pesar de que hubo tiempos difíciles siguieron apostando en que sí se podía y creyeron en que podíamos terminar un lindo trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores que el Dr. Daniel Lombardo y la Dra. Victoria Aguirre, por aceptarme como su tesista y becaria, y guiarme durante estos años que llevó la realización de esta tesis. Que a pesar de que existieron veces que me sentía perdida o no sabía cómo seguir supieron encaminarme para que no me desvío de los objetivos. Además de todos sus conocimientos que me ayudaron a dar forma a este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Gaby Olea, por sus enseñanzas tanto técnicas como por su apoyo como amiga, por su compañía durante los dos años de muestreos. Horas de mates en el frío y tereré en el calor con mosquitos. Por los viajes a la Cátedra de Histología en la Facultad de Veterinaria en la UBA y por las salidas recreativas y los afteres office y paseos en CABA. Por las charlas necesarias cuando las cosas se ponían difíciles y los festejos cuando se lograban los objetivos.

No puedo olvidarme de agradecer a mis compañeros de laboratorio del LIBIM, al cual me tuve que incorporar siendo que mi temática de trabajo era muy distinta a la del grupo. A Tami que se convirtió en amiga, a Juampi, Lean, Juan, Juampa, Nare y Neri (aunque ya no está) que hicieron con las charlas del medio día y los cafecitos, que los días de trabajo se hicieran amenos y que siempre esperara esos cafés.

Por otra parte, también tengo que agradecer a la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Veterinaria de la UBA y al INITRA, en donde se llevaron a cabo muchos de los

cortes y coloraciones histológicas especiales, así como la toma de fotografías digitales. Al Dr. Juan Bovies por su guía para la realización de coloraciones como tinción argéntica, tricrómica de Masson y tinción de lípidos con Oil red y por sus charlas de tarde en la cátedra y los cafés junto al Dr Marcelo. Al Dr. Juan Claver quien me ayudó con los cortes en el criostato y por las charlas sobre las aves que visitaban la cátedra. A Pablo Gazzaneo por prestarme siempre su espacio de trabajo, su micrótomo para realizar los cortes, a pesar de que en un principio arruinaba algunas de sus muestras.

De esta cátedra también tengo que agradecer a las personas que hacían que los viajes siempre tengan lindos recuerdos, como a Moni, que me hospedaba en su casa sin ningún problema y me volvió parte de su familia (Junto con Nacho su hijo, mi hermanito postizo), a Adri, Lau y Nati, que junto a Moni hacen que la cátedra funcione y con quienes pasaba mis almuerzos y recreos. A la Dra. Clara Carou, por sus asesorías con las inmunos, a Sole, Caro, Pau, Patri y Maxi que siempre tuvieron una muy buena predisposición para ayudarme cuando lo necesitaba.

Otra cátedra que me abrió las puertas cuando más la necesitaba (luego de la cuarentena estricta) fue la catedra de Histología y embriología de la Facultad de Cs Veterinarias de la UNNE, a la Dra. Carolina Flores Quintana. Porque cuando todo el trabajo parecía parado y cuando no podía procesar muestras porque no se podía viajar, ella me permitió continuar con mi trabajo abriendo las puertas de su laboratorio. De esta cátedra también agradezco a mucho de sus integrantes, docentes y ayudantes que estuvieron presentes en el último tramo de esta tesis, pero no así menos importantes: Dr. Trujillo, mi compañero en el dictado de clases, siempre tan amable, Tania, Dante y Sabri, Sofi, Mauri, Fran y Eduen, con quienes pasamos tardes y algunos afteres office, gracias por la muy buena compañía. No me quiero olvidar de Vanesa que sin ella las últimas muestras no se hubiesen procesado.

También quiero agradecer a una compañera y amiga que junto con la Dra. Olea estuvieron ayudándome en los muestreos, a la Lic. Antonella Argoitia. Por guiarme en las primeras capturas cuando no tenía el conocimiento sobre como manipular e identificar a los

Murcis, por prestarme las redes de niebla y las bolsas de tela cuando no tenía las mías y quién se convirtió en mi Batiamiga. También al Lic Jorge Céspedes que me brindó espacio en su oficina en FaCENA para poder guardar las herramientas necesarias para realizar los muestreos y cada vez que podía se sumaba a ellos.

También tengo que agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de una beca doctoral con la cual pude realizar esta tesis, así como a la Universidad Nacional del Nordeste quién figura como contraparte en la Financiación de dicha beca. Asimismo, agradecen a la UNNE, por el otorgamiento adicional de un subsidio para la realización de estudios de posgrado, con la cual se solventaros pagos de cursos de posgrado. Además, agradecer a la Dirección de Recursos Naturales por el otorgamiento de un permiso de colecta para la realización de los muestreos y colecta biológica.

Por último y más importante agradecer a mi familia y amigos, en especial a mi Mamá, Papá y Hermana, que siempre me apoyaron en esta carrera poco usual que elegí. Que siempre se sintieron orgullosos por cualquier pequeño logro que conseguía y brindarme siempre su cariño, el cual fue indispensable para seguir. A mis Abuelos y a mi abuela Yaya que me brindaron su cariño y apoyo, aunque les costara entender de qué se trata realizar un doctorado. A mis amigas Ailín, Belén y Mariela que demás de colegas, son esas amigas que te deja esta carrera, que por más que estemos separadas por la vida que nos lleva por caminos distintos, siempre son un soporte anímico muy importante.

A todos ellos, porque solo no se logra nada, y sin ellos no estaría acá escribiendo. Las palabras no alcanzan para describir lo que me aportaron sobre todo a mí, que me cuesta tanto expresar con palabras los sentimientos. Espero se pueda apreciar en esta tesis todo el tiempo y el esfuerzo invertido por todos y disculpas si me olvidé de alguien, pero gracias de todo corazón.



Muchas Gracias!

Bibliografía

- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., & Hoshi, H. (1995). Bovine oviduct-specific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Molecular reproduction and development*, 42(2), 226-232.
- Abhilasha and Krishna, A. (1996). High androgen production by ovarian thecal interstitial cells: A mechanism for delayed ovulation in a tropical vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Journal of Reproduction and Fertility* 106, 207–211
- Adams, R. A. (1992). Stages of development and sequence of bone formation in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 73(1), 160-167.
- Aeshra, L. A., Moustafa, M., Elmallah, M. I., Salih, S. A., & Kader, I. Y. A. (2020). The role of epithelial–mesenchymal transition (EMT)-associated genes during gonadogenesis of albino rat. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), 1-5.
- Albamonte, M. S., Elizondo, K., Albamonte, M. I., Willis, M. A., Espinosa, M. B., & Vitullo, A. D. (2005). Expresión de BCL-2/BAX y apoptosis en ovario humano adulto. *Medicina*, 65(Supplement II), 126.
- Albamonte, M. S., Willis, M. A., Albamonte, M. I., Jensen, F., Espinosa, M. B., & Vitullo, A. D. (2008). The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Human reproduction*, 23(8), 1895-1901.
- Albrecht, K. H., & Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental biology*, 240(1), 92-107.
- Altringham, J. D., & Fenton M. B. (2003). Sensory ecology and communication in the Chiroptera. *Bat ecology*, 90–127.
- Altringham, J. D. (2011). *Bats: from evolution to conservation*. Oxford University Press.

- Amador LI, Arévalo RLM, Almeida FC, et al. (2016) Bat systematics in the light of unconstrained analyses of a comprehensive molecular supermatrix. *J Mamm Evol* 25, 37– 70.
- Anthony, E. L. (2000). Endocrinology of reproduction in bats: central control. *Reproductive biology of bats*, 1-26.
- Anthony, E. L., Wu, P., Bruhn, T. O., & Jackson, I. M. (1987). Characterization of LH-RH immunoreactivity in mammalian pituitary neural lobe by HPLC. *Brain research*, 424(2), 258-263.
- Antonio-Rubio, N. R., Porras-Gómez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. (2013). Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(5), 825-836.
- Anuradha, B. A. and Krishna A. (2019). Role of putrescine in ovary and embryo development in fruit bat *Cynopterus sphinx* during embryonic diapause. *Mol Reprod Dev*.1–18 <https://doi.org/10.1002/mrd.23281>
- Arthur, G. (1991). Reproducción y obstetricia en veterinaria. p 125-128. Ed.
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs?. *Molecular human reproduction*, 16(12), 896-906.
- Balmori, A. (1999). La reproducción en los quirópteros. *Galemys*, 11(2), 17-34.
- Barquez, R. M., & Díaz, M. M. (2009). Los murciélagos de Argentina: clave de identificación.
- Barquez, R. M., Díaz, M. M., Montani, M. E., & Pérez, M. J. (2020). Nueva guía de los murciélagos de Argentina. Publicación especial, 3.
- Barquez, R. M., Mares, M. A., & Braun, J. K. (1999). Bats of Argentina. Museum of Texas Tech University.
- Bernard, P., Fleming, A., Lacombe, A., Harley, V. R., & Vilain, E. (2008). Wnt4 inhibits β -catenin/TCF signalling by redirecting β -catenin to the cell membrane. *Biology of the Cell*, 100(3), 167-177.

- Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D. P., Sinclair, A. H., Koopman, P., & Harley, V. R. (2012). Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology*, 153(2), 901-912.
- Bernard, R. T. F. (1980). Female reproductive anatomy and development of ovarian follicles in *Miniopterus fraterculus*. *African Zoology*, 15(2), 111-116.
- Bernard, R. T. F. (1982). Female reproductive cycle of *Nycteris thebaica* (Microchiroptera) from Natal, South Africa.
- Bernard, R. T. F., Bojarski, C., & Millar, R. P. (1991a). Patterns of Leydig cell and LH gonadotroph activity, and plasma testosterone concentrations in the seasonally reproducing Schreibers' long-fingered bat (*Miniopterus schreibersii*). *Reproduction*, 91(2), 479-492.
- Bernard, R. T. F., Bojarski, C., & Millar, R. P. (1991b). Plasma progesterone and luteinizing hormone concentrations and the role of the corpus luteum and LH gonadotrophs in the control of delayed implantation in Schreibers' long-fingered bat (*Miniopterus schreibersii*). *Reproduction*, 93(1), 31-42.
- Bernard, RTF* & Meester, J. (1982). Female reproduction and the female reproductive cycle of *Hipposideros caffer caffer* (Sundevall, 1846) in Natal, South Africa. *Annals of the Transvaal Museum*, 33(8), 131-144.
- Biason-Lauber, A. (2010). Control of sex development. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 24(2), 163-186.
- Billig, H., Chun, S. Y., Eisenhauer, K., & Hsueh, A. J. (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. Human reproduction update, 2(2), 103-117.
- Birchmeier, C., & Birchmeier, W. (1993). Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. Annual review of cell biology, 9(1), 511-540.
- Blaustein, A., (1981). Sexual selection and mammalian olfaction. *American Naturalist*, 117: 1006–1010

- Bloss, J., (1999). Olfaction and the use of chemical signals in bats. *Acta Chiropterologica*, 1: 31–45.
- Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., ... & Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *cell*, 74(4), 597-608.
- Bojarski, C. (1990). Immunolocalisation of, and ultrastructural changes in the LH gonadotropes of *Miniopterus schreibersii* and *Rhinolophus capensis* (Mammalia: Chiroptera) in relation to their reproductive cycles.
- Bojarski, C. (1993). Seasonal changes in pituitary and plasma prolactin concentrations, and the role of prolactin in the control of delayed implantation in female *Miniopterus schreibersii*. PhD Thesis, Rhodes University, South Africa
- Bonilla, H. de and Rasweiler, J.J., IV (1974). Breeding activity, preimplantation development, and oviduct histology of the short-tailed fruit bat, *Carollia*, in captivity. *The Anatomical Record* 179, 385–404.
- Bowles, J., & Koopman, P. (2010). Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction*, 139(6), 943-958.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., ... & Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 312(5773), 596-600.
- BRADSHAW, G. V. (1961). Le cycle de reproduction de *Macrotus californicus* (Chiroptera, Phyllostomatidae). *Mammalia*, 25, 117-119.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. CyclinjPCNA is the auxilliary protein of DNA polymerase o. *Nature* 1987;326:515-17.
- Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reproduction*, 109(1), 165-171.
- Brennan, P. A., & Kendrick, K. M. (2006). Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 361B: 2061–2078

- Bristol-Gould, S., & Woodruff, T. K. (2006). Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66(1), 5-13.
- Brosset, A., & Delamare Deboutteville, C. (1966). Le régime alimentaire du vespertilion de Daubenton *Myotis daubentonii*.
- Buchanan, G. D., & YoungLai, E. V. (1988). Plasma progesterone concentrations in female little brown bats (*Myotis lucifugus*) during hibernation. *Reproduction*, 83(1), 59-65.
- Buehr, M., Gu, S., & McLaren, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, 117(1), 273-281.
- Bueno LM, Caun DL, Comelis MT, Beguelini MR, Taboga SR, MorielleVersute E. Ovarian morphology and foliculogénesis and ovulation process in the flat-faced fruit-eating bat *Artibeus planirostris* and the Argentine brown bat *Eptesicus furinalis*: A comparative analysis. *Acta Zool.* 2018; 00:1–12.
<https://doi.org/10.1111/azo.12247>
- Canney, D.H. and Butler, W.R. (1987). Plasma and pituitary luteinizing hormone concentrations during delayed ovulation in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *Biology of Reproduction Supplement* 36, 121 (abstr).
- Caspers, B., Wibbelt, G., & Voigt, C.C. (2009). Histological examinations of facial glands in *Saccopteryx bilineata* (Chiroptera, Emballonuridae) and their potential use in territorial marking. *Zoomorphology*, 128(1), 37-43.
- Chaboissier, . C., Kobayashi, A., Vidal, V. ., L tzkendorf, S., van de Kant, H. J., Wegner, M., ... & Schedl, A. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse.
- Chassot, A. A., Gregoire, E. P., Magliano, M., Lavery, R., & Chaboissier, M. C. (2008). Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player. *Sexual Development*, 2(4-5), 219-227.
- Choudhary, S., Kumaresan, A., Kumar, M., Chhillar, S., Malik, H., Kumar, S., ... & Mohanty, A. K. (2017). Effect of recombinant and native buffalo OVGPI on sperm

functions and in vitro embryo development: a comparative study. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1), 1-12.

- Christante, C. M., Beguelini, M. R., Puga, C. C., Negrin, A. C., Morielle-Versute, E., Vilamaior, P. S., & Taboga, S. R. (2015). Structure, histochemistry and seasonal variations of the male reproductive accessory glands in the Pallas's mastiff bat, *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Reproduction, Fertility and Development*, 27(2), 313-322.
- Codón, S. M., Estecondo, S. G., Galíndez, E. J., & Casanave, E. B. (2001). Ultrastructure and morphometry of ovarian follicles in the armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). *Brazilian Journal of Biology*, 61, 485-496.
- Courrier R (1927). Etude sur le determinisme caracteres sexuels secondaires chez quelques mammifères et activités testiculaire périodique. *Archs. Biol.* 37: 173-334
- Couse, J. F., Hewitt, S. C., Bunch, D. O., Sar, M., Walker, V. R., Davis, B. J., & Korach, K. S. (1999). Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors α and β . *Science*, 286(5448), 2328-2331.
- Cretekos, C. J., Weatherbee, S. D., Chen, C. H., Badwaik, N. K., Niswander, L., Behringer, R. R., & Rasweiler IV, J. J. (2005). Embryonic staging system for the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*, a model organism for the mammalian order Chiroptera, based upon timed pregnancies in captive-bred animals. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 233(3), 721-738.
- Crichton, E. G. (2000). Sperm storage and fertilization. In Reproductive biology of bats (pp. 295-320). Academic press.
- Crichton, E. G., & Krutzsch, P. H. (1985). Reproductive biology of the female leaf-nosed bat, *Macrotus californicus*, in southwestern United States: I. A morphometric analysis of the annual ovarian cycle. *American journal of anatomy*, 173(2), 69-87.

- Crichton, E. G., & Krutzsch, P. H. (1987). Reproductive biology of the female little mastiff bat, *Mormopterus planiceps* (Chiroptera: Molossidae) in southeast Australia. *American journal of anatomy*, 178(4), 369-386.
- Crichton, E. G., Hoyer, P. B., & Krutzsch, P. H. (1990). Cellular composition and steroidogenic capacity of the ovary of *Macrotus californicus* (Chiroptera: Phyllostomatidae) during and after delayed embryonic development. *Cell and tissue research*, 260(2), 355-366.
- Crichton, E. G., Seamark, R. F., & Krutzsch, P. H. (1989). The status of the corpus luteum during pregnancy in *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae) with emphasis on its role in developmental delay. *Cell and tissue research*, 258(1), 183-201.
- Curlewis, J.D. (1992). Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction:A review. *Reproduction, Fertility and Development* 4, 1–23.
- Dapson, R.W., Studier, E.H., Buckingham, M.J. & Studier A.L. (1977). Histochemistry Of Odoriferous Secretions From Integumentary Glands In Three Species Of Bats. *Journal of Mammalogy*. 58(4) ,531-535
- Darwin, C. (1871). The origin of species and the descent of man in relation to sex. *J. Murray, London*.
- Da Silva-Buttkus, P., Jayasooriya, G. S., Mora, J. M., Mobberley, M., Ryder, T. A., Baithun, M., ... & Hardy, K. (2008). Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *Journal of cell science*, 121(23), 3890-3900.
- Dechmann, D. K. N., & K. SAFI. (2005). Studying communication in bats. *Cognitie, Creier, Comportament*, 9: 479–496.
- DeFalco, T., & Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annual review of cell and developmental biology*, 25, 457.

- Díaz, M. M., Aguirre, L. F., & Barquez, R. M. (2011). Clave de identificación de los murciélagos del cono sur de Sudamérica.
- Dorfman, V. B., Inserra, P. I. F., Leopardi, N. P., Halperin, J., & Vitullo, A. D. (2016). The South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*, as a valuable animal model for reproductive studies.
- Dourado, D.M., Jardim Affonseca, M.I.D., Buccini, D.F., Taddei, V.A., Puchério, A., Meneguelli, M., & Souza, H.A.D. (2001). Estudo histológico e histoquímico da glândula gular da espécie de morcego *Molossus molossus*. *Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 5(2).
- Dunham, A.E. 1983. Realized niche overlap, resource abundance and intensity of interspecific competition. 261-280 in R. D. Huey, E.R. Pianka, and T.W. Schoener (eds), *Lizard Ecology*. Harvard.
- Dwyer, P. D. (1963). Reproduction and distribution in *Miniopterus* (Chiroptera). *Australian Journal of Science*, 25(10), 435-436.
- Eisenberg, J. F., & D. G. Kleiman. (1972). Olfactory communication in mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3: 1–32
- Eisenberg, J. F., and D. G. Kleiman. 1972. Olfactory communication in mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3: 1–32
- Felipe, A., Cabodevila, J., & Callejas, S. (1999). Anatomicohistological characteristics of the ovary of the coypu (*Myocastor coypus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 28(2), 89-96.
- Feranil, J. B., Isobe, N., & Nakao, T. (2005). Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reproduction in domestic animals*, 40(2), 111-116.

- Fernández, A. M., Muniz, E., Gragera, R. R., & Martínez-Rodríguez, R. (1992). Immunocytochemical localization of GnRH in the hypothalamus of the bat *Miniopterus schreibersii schreibersii*. *Journal fur Hirnforschung*, 33(2), 195-202.
- Fernández-Vargas, M., Z. Tang-Martínez, & S. M. Phelps. (2008). Olfactory responses of Neotropical short-tailed sing - ing mice, *Scotinomys teguina*, to odours of the mid-ventral sebaceous gland: discrimination of conspecifics, gender, and female reproductive condition. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 429–437.
- Freeman, P. W. (1979). Specialized insectivory: beetle-eating and moth-eating molossid bats. *Journal of Mammalogy*, 60(3), 467-479.
- Gaisler, J. (1966). Reproduction in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros* hipposideros Bechstein, 1800). *Bijdragen tot de Dierkunde*, 36(1), 45-62.
- GARDNER AL. 2007. Order Chiroptera Blumenbach, 1779. Pp. 187-484, in: Mammals of South America Volume 1 Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats (AL Gardner ed.) The University of Chicago Press, Chicago.
- Germanà, A, Paruta, S., Germanà, G. P., Ochoa-Erena, F. J., Montalbano, G., Cobo, J., & Vega, J. A. (2007). Differential distribution of S100 protein and calretinin in mechanosensory and chemosensory cells of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Brain research*, 1162, 48-55.
- Giannini, N., Goswami, A., & Sánchez-Villagra, M. R. (2006). Development of integumentary structures in *Rousettus amplexicaudatus* (Mammalia: Chiroptera: Pteropodidae) during late embryonic and fetal stages. *Journal of Mammalogy*, 87(5), 993-1001.
- Glucksmann, A. (1974). Sexual dimorphism in mammals. *Biological Reviews*, 49(4), 423-475.
- Porras-Gómez, T. J., Martínez-Juárez, A., & Moreno-Mendoza, N. (2017). Gonadal morphogenesis and establishment of the germline in the phyllostomid bat *Sturnira lilium*. *Acta Histochemica*, 119(7), 671-679.

- GONZÁLEZ JC. 1989. Guía para la identificación de los murciélagos del Uruguay. Serie de divulgación Nº 2. Museo Dámasco Antonio Larrañaga.
- Gopalakrishna, A. (1969). Unusual persistence of the corpus luteum in the Indian fruit-bat, *Rousettus leschenaulti* (Desmaret). *Current Science*, 38(16), 388-389.
- Gopalakrishna, A., & Badwaik, N. (1988). Growth of the corpus luteum in relation to gestation in some Indian bats. *Current science*, 883-886.
- Gopalakrishna, A., & Badwaik, N. (1989). The corpus luteum of the bat, *Hipposideros lankadiva* (Kelaart). *Current Science*, 58(1), 41-43.
- Gopalakrishna, A., Badwaik, N., & Nagarajan, R. (1986). The corpus luteum of the Indian fruit bat, *Rousettus leschenaulti* Desmarest. *Current Science*, 1227-1231.
- Gopalakrishna, A., Karim, K. B., & CHARI, G. (1979). Pregnancy record of some Indian bats. *Current Science*, 716-718.
- Gopalakrishna, A., Sandhu, S.K., Badwaik, N. and Pendharkar, Y.D. (1991). Early development, implantation of the blastocyst and amniogenesis in the Indian molossid bat, *Tadarida aegyptiaca* (Geoffroy). Proceedings of the Indian National Science Academy 57B, 47–58
- Goto T, Adjaye J, Rodeck CH and Monk M (1999) Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol Hum Reprod* 5,851–860
- Gray, J. E. 1821. On the natural arrangement of vertebrose animals. *Lond. Med. Reposit.* 15: 296 –310.
- Guraya, S. S. (1978). Recent advances in the morphology, histochemistry, biochemistry, and physiology of interstitial gland cells of mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 55, 171-245.
- Guraya, S. S., & Greenwald, G. S. (1964). A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *The Anatomical Record*, 149(3), 411-433.

- Guthrie, M. J., & Jeffers, K. R. (1938). A cytological study of the ovaries of the bats *Myotis lucifugus* *lucifugus* and *Myotis grisescens*. *Journal of Morphology*, 62(3), 523-557.
- Hamlett, G.W.D. (1939). Reproduction in American monkeys. I. Estrous cycle, ovulation and menstruation in *Cebus*. *The Anatomical Record* 73, 171–187.
- Hansis C, Grifo JA and Krey LC (2000) Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 6,999–1004.
- Harris, R. L., Davies, N. W., & Nicol, S. C. (2012). Chemical composition of odorous secretions in the Tasmanian short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus setosus*). *Chemical Senses*, 37(9), 819-836.
- Harrison, D. L., & Davies, D. V. (1949, August). A note on some epithelial structures in Microchiroptera. In *Proceedings of the Zoological Society of London* (Vol. 119, No. 2, pp. 351-357). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Harvey, P.H. (1986). Energetic costs of reproduction. *Nature* 321, 648–649.
- Heideman, P.D., Erickson, K.R., & Bowles, J.B. (1990). Notes on the breeding biology, gular gland and roost habits of *Molossus sinaloae* (Chiroptera, Molossidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 55(5), 303-307.
- Hino, T., Muro, Y., Tamura-Nakano, M., Okabe, M., Tateno, H., & Yanagimachi, R. (2016). The behavior and acrosomal status of mouse spermatozoa in vitro, and within the oviduct during fertilization after natural mating. *Biology of reproduction*, 95(3), 50-1.
- Hockman, D., Mason, M. K., Jacobs, D. S., & Illing, N. (2009). The role of early development in mammalian limb diversification: A descriptive comparison of early limb development between the natal long-fingered bat (*inopterus natalensis*) and the mouse (*Mus musculus*). *Developmental Dynamics*, 238(4), 965-979.
- Hogan, B. L. (1999). Morphogenesis. *Cell*, 96(2), 225-233.

- Hood, C. S., & Smith, J. D. (1983). Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomoid bats.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., & Hsueh, A. J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12401-12406.
- Hsu, S. Y., Lin, P., & Hsueh, A. J. (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Molecular Endocrinology*, 12(9), 1432-1440.
- Ito, M., Yokouchi, K., Yoshida, K., Kano, K., Naito, K., Miyazaki, J. I., & Tojo, H. (2006). Investigation of the fate of Sry-expressing cells using an in vivo Cre/loxP system. *Development, growth & differentiation*, 48(1), 41-47.
- Owen J. A. Jr. 1975. Physiology of the menstrual cycle, The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 28, Issue 4, April, Pages 333–338, <https://doi.org/10.1093/ajcn/28.4.333>
- Jääskeläinen, M., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Naillat, F., Parviainen, H., Anttonen, M., Heikinheimo, M., ... & Tapanainen, J. S. (2010). WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Molecular and cellular endocrinology*, 317(1-2), 106-111.
- Jaroli, D. P. (1980). *Seasonal histoenzymological and histochemical changes in the ovary and uterus of Indian micro-and mega-chiroptera (Mammalia)* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, University of Udaipur, Udaipur (Raj.), India).
- Jerrett, D. P. (1978). UNILATERAL OVULATION IN THE MEXICAN FREE-TAILED BAT, TADARIDA BRASILIENSIS MEXICANA. The University of Arizona.
- Jerrett, D. P. (1979). Female reproductive patterns in nonhibernating bats. *Reproduction*, 56(1), 369-378.

- Karim, K. B., & Fazil, M. (1987). Early embryonic development and preimplantation changes in the uterus of the bat Rhinopoma hardwickei hardwickei (Gray)(Rhinopomatidae). *American journal of anatomy*, 178(4), 341-351.
- Karl J, Capel B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev.Biol.* 203:323–33
- Kayanja, F.I.B. and Mutere, F.A. (1975). The ovary of the insectivorous bat *Otomops martiensseni*. *Anatomischer Anzeiger* 137, 166–175
- Keightley, M. C., & Fuller, P. J. (1996). Anomalies in the endocrine axes of the guinea pig: relevance to human physiology and disease. *Endocrine reviews*, 17(1), 30-44.
- Khaparde, M. S. (1976). Notes on the breeding habits of the Indian sheath-tailed bat, Taphozous melanopogon melanopogon Temminck. *J. Bombay. Nat. Hist. Soc.*, 73, 3210-3216.
- Kim, M. R., & Tilly, J. L. (2004). Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1644(2-3), 205-210.
- Kiernan, J. A., (1999). Histological and histochemical methods: theory and practice. *Shock*, 12(6), 479.
- King, J. A., Steneveld, A. A., Curlewis, J. D., Rissman, E. F., & Millar, R. P. (1994). Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. *Regulatory peptides*, 54(2-3), 467-477.
- King, J. C., Anthony, E. L., Gustafson, A. W., & Damassa, D. A. (1984). Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) cells and their projections in the forebrain of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*. *Brain research*, 298(2), 289-301.
- King, J.C., Ronsheim, P.M. and Rubin, B.S. (1995). Dynamic relationships between LHRH neuronal terminals and the end-feet of tanycytes in cycling rats revealed by confocal microscopy. *Society for Neuroscience Abstracts* 21, 265 (abstr)

- Kitchener, D. J., & Coster, P. (1981). Reproduction in female *Chalinolobus morio* (Gray)(Vespertilionidae) in south-western Australia. *Australian Journal of Zoology*, 29(3), 305-320.
- Kitchener, D. J., & Halse, S. A. (1978). Reproduction in female *Eptesicus regulus* (Thomas)(Vespertilionidae), in south-western Australia. *Australian Journal of Zoology*, 26(2), 257-267.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., & Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74(4), 679-691.
- Krishna, A. (1985). Reproduction in the Indian pygmy pipistrelle bat, *Pipistrellus mimus*. *Journal of Zoology*, 206(1), 41-51.
- Krishna, A. (1996). High androgen production by ovarian thecal interstitial cells: a mechanism for delayed ovulation in a tropical vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Reproduction*, 106(2), 207-211.
- Krishna, A. and Dominic, C.J. (1981). Reproduction in the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. Horsefield. *Archives de Biologie (Bruxelles)* 92, 247–258.
- Krishna, A., & Bhatnagar, K. P. (2011). Hormones and reproductive cycles in bats. In *Hormones and reproduction of vertebrates* (pp. 241-289). Academic Press.
- Kurta, A., & Kunz, T. H. (1987). Size of bats at birth and maternal investment during pregnancy. In *Symposia of the Zoological Society of London* (Vol. 57, No. 1, pp. 79-106).
- Lamothe, S., Bernard, V., & Christin-Maitre, S. (2020, June). Gonad differentiation toward ovary. In *Annales d'Endocrinologie* (Vol. 81, No. 2-3, pp. 83-88). Elsevier Masson.
- Lechowska, A., Bilinski, S. M., Rasweiler IV, J. J., Cretekos, C. J., Behringer, R. R., & Kloc, . (2012). Early oogenesis in the short-tailed fruit bat *Carollia perspicillata*: Transient germ cell cysts and noncanonical intercellular bridges. *genesis*, 50(1), 18-27.

- Lei, M., & Dong, D. (2016). Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. *Scientific Reports*, 6(1), 1-8.
- LOLAR A y B SCHMIDT-FRENCH. 1998. Captive care and Medical Reference for the Rehabilitation of Insectivorous Bats. Bat World Publications. Mineral Wells, Texas.
- Looijenga LHJ, Stoop H, De Leeuw PJC, De Gouveia Brazao CA, Gillis AJM, Van Roozendaal KEP, Van Zoelen EJJ, Weber RFA, Wolffenbuttel KP, Van Dekken H et al. (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 63,2244–2250.
- Mahoney, M. M., Rossi, B. V., Hagenauer, M. H., & Lee, T. M. (2011). Characterization of the estrous cycle in Octodon degus. *Biology of Reproduction*, 84(4), 664-671.
- Martin, L., & Bernard, R. T. (2000). Endocrine regulation of reproduction in bats: the role of circulating gonadal hormones. In *Reproductive biology of bats* (pp. 27-64). Academic Press.
- Matson, J. P., & Cook, J. G. (2017). Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *The FEBS journal*, 284(3), 362-375.
- Matthews LH (1941). Notes on the genitalia and reproduction of some African bats. *Proc.Zool. Soc. Lond. B* 111: 289-342.
- Matthews, L. (1937). The female sexual cycle in the British horseshoe bats *Rhinolophus ferrume-quinum insulanus* Barrett-Hamilton and *R. hippo-sideros minutus* Montagu. *Trans. Zool. Soc. Lond*, 23, 224-267.
- Matthews, L. H. (1942, May). Notes on the genitalia and reproduction of some African rats. In *Proceedings of the Zoological Society of London* (Vol. 111, No. 3-4, pp. 289-342). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Maynard, R. L., & Downes, N. (2019). Anatomy and Histology of the Laboratory rat in Toxicology and Biomedical Research. Academic Press.
- McPherson, F. J., & Chenoweth, P. J. (2012). Mammalian sexual dimorphism. *Animal reproduction science*, 131(3-4), 109-122.

- McWilliam, A. N. (1982). Adaptive responses to seasonality in four species of Microchiroptera in coastal Kenya. University of Aberdeen (United Kingdom).
- Medway L (1971). Observations of social and reproductive biology of the bent-winged bat *Miniopterus australis* in northern Borneo. *J. Zool. London* 165: 261-273.
- Medway, L. (1972). Reproductive cycles of the flat-headed bats *Tylonycteris pachypus* and *T. robustula* (Chiroptera: Vespertilioninae) in a humid equatorial environment. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 51(1), 33-61.
- Mikami, S. I., Chiba, S., Hojo, H., Taniguchi, K., Kubokawa, K., & Ishii, S. (1988a). Immunocytochemical studies on the pituitary pars distalis of the Japanese long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii fuliginosus*. *Cell and tissue research*, 251(2), 291-299.
- Mikami, S. I., Chiba, S., Taniguchi, K., Kubokawa, K., & Ishii, S. (1988b). Immunocytochemical localization of neuropeptides in the hypothalamus of the Japanese long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii fuliginosus*. *Cell and tissue research*, 254(1), 49-57.
- Miller, G. S. 1907. The families and genera of bats. *US Natl. Mus. Bull.* 57 :1–282.
- Mitchell, B. F., & Taggart, M. J. (2009). Are animal models relevant to key aspects of human parturition?. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
- Miotti, M. D. 2020. Variaciones latitudinales en los patrones reproductivos de cuatro especies de murciélagos frugívoros de las yungas argentinas. Publicaciones Especiales N° 5, PIDBA (Programa de Investigaciones de Biodiversidad Argentina), 121 pp.
- Mongelli, M. S., Tavares, I. C., & Ferrante, M. (2021). Evolução e premissas dos protocolos hormonais de inseminação artificial em tempo fixo na pecuária. *Time artifici. n.*
- Monniaux, D., Clément, F., Dalbies-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., & Monget, P. (2014). The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biology of reproduction*, 90(4),

- Montero, R., & Autino, A. G. (2018). Sistemática y filogenia de los vertebrados, con énfasis en la fauna argentina. Tercera edición. Editorial independiente, San Miguel de Tucuman Argentina. 627pp. ISBN: 978-987-42-9556-9.
- Morais, D. B., Cupertino, M. C., Goulart, L. S., Freitas, K. M., Freitas, M. B., Paula, T. A., & Matta, S. L. (2013). Histomorphometric evaluation of the Molossus molossus (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. *Animal Reproduction Science*, 140(3-4), 268-278.
- Morel, Y., Roucher, F., Mallet, D., & Plotton, I. (2014, May). Genetic of gonadal determination. In Annales d'endocrinologie (Vol. 75, No. 2, pp. 32-39). Elsevier Masson.
- Mori, T., Sont, S. W., Yoon, M. H., & Uchida, T. (1989). Prolonged survival of the Graafian follicle accompanied with sperm storage and the subsequent early development in the female greater tube-nosed bat, *Murina leucogaster*.
- Morriss-Kay, G. ., & Sokolova, N. (1996). Embryonic development and pattern formation. *The FASEB journal*, 10(9), 961-968.
- Morten Vejlsted, 2010. Cellular and molecular Mechanism in Embryonic development: Essential of Domestics Animal Embryology. Pp: 13 – 24.
- Mossman, H. W., & Duke, K. L. (1973). *Comparative morphology of the mammalian ovary*. Wisconsin University Press..
- Muñoz-Romo, ., Page, R. A., & Kunz, T. H. (2021). Redefining the study of sexual dimorphism in bats: following the odour trail. *Mammal Review*, 51(2), 155-177.
- Muñoz-Romo, M., Nielsen, L. T., Nassar, J. M., & Kunz, T. H. (2012). Chemical composition of the substances from dorsal patches of males of the Curaçaoan long-nosed bat, *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae: Glossophaginae). *Acta Chiropterologica*, 14(1), 213-224.
- Myers, P. (1977). *Patterns of reproduction of four species of vespertilionid bats in Paraguay* (Vol. 107). Univ of California Press.

- Myktytowycz, R., (1970). Role of skin glands in mammalian communication.
- Myktytowycz, R., (1972). The behavioural role of the mammalian skin glands. *Naturwissenschaften*, 59(4), 133-139.
- Nassar, J. M., Salazar, M. V., Quintero, A., Stoner, K. E., Gómez, M., Cabrera, A., & Jaffé, K. (2008). Seasonal sebaceous patch in the nectar-feeding bats Leptonycteris curasoae and L. yerbabuenae (Phyllostomidae: Glossophaginae): phenological, histological, and preliminary chemical characterization. *Zoology*, 111(5), 363-376.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scho"ler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the pou transcription factor oct4. *Cell* 95, 379–391. doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9
- Nojiri, T., Fukui, D., Werneburg, I., Saitoh, T., Endo, H., & Koyabu, D. (2021). Embryonic staging of bats with special reference to *Vespertilio sinensis* and its cochlear development. *Developmental Dynamics*, 250(8), 1140-1159.
- Nolte, M. J., Hockman, D., Cretkos, C. J., Behringer, R. R., & Rasweiler IV, J. J. (2009). Embryonic staging system for the black mastiff bat, *Molossus rufus* (Molossidae), correlated with structure-function relationships in the adult. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(2), 155-168.
- NOVAK RM. 1994. Walker 's Bats of the World. First edition The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA.
- Oelschläger, H. A., & Northcutt, R. G. (1992). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis and brain of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *Journal of Comparative Neurology*, 315(3), 344-363.

- Oh, Y. K., ōri, T., & Uchida, T. A. (1985). Prolonged survival of the Graafian follicle and fertilization in the Japanese greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum nippon*. *Reproduction*, 73(1), 121-126.
- Olea, G. B., Cheij, E. O., Curi, L. M., Boccioni, A. P. C., Céspedes, J. A., & Lombardo, D. M. (2019). Histological and immunohistochemical characterization of the integument and parotoids glands *Rhinella bergi* (Anura: Bufsonidae): Development and differentiation. *Acta histochemica*, 121(3), 277-283.
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell*, 74(4), 609-619.
- O'Rahilly, R., & Müller, F. (2010). Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs*, 192(2), 73-84.
- O'Rahilly, R., & Müller, F. (2002). The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*, 65(4), 162-170.
- Oxberry, B. A. (1979). Female reproductive patterns in hibernating bats. *Reproduction*, 56(1), 359-367.
- Paksuz, E. P., Hayretdağ, S., & Olgun, K. (2017). Prenatal development in greater mouse-eared bat, *myotis yotis* (Borkhausen, 1797) (Chiroptera, Vespertilionidae). *Anatomia, histologia, embryologia*, 46(6), 563-571.
- Palmer, M. S., Sinclair, A. H., Berta, P., Ellis, N. A., Goodfellow, P. N., Abbas, N. E., & Fellous, M. (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*, 342(6252), 937-939.
- Pandey S.D. & Dominic C.J. (1987). Gular Gland of the Indian Sheath-tailed Bat. *Acta Theriologica*. 32, (6). 83—93.
- Pannetier, M., & Pailhoux, E. (2010). FOXL2, the gatekeeper of ovarian identity.

- Parkes, A. S. (1926). On the occurrence of the oestrous cycle after X-ray sterilisation. —Part I. Irradiation of mice at three weeks old. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 100(702), 172-199.
- Pearson, O. P., Koford, M. R., & Pearson, A. K. (1952). Reproduction of the lumpy-nosed bat (*Corynorhinus rafinesquei*) in California. *Journal of Mammalogy*, 33(3), 273-320.
- Pedersen, T., & Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Reproduction*, 17(3), 555-557.
- Penn, D., & Potts, W.K. (1998). Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 391–396.
- Penn, D., and W.K. Potts. 1998. Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 391–396.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ and Schøler H (1998) Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71,89–98.
- Peters, H., & McNatty, K. P. (1980). The ovary. Berkeley and Los Angeles.
- Picton, H. M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, 55(6), 1193-1210.
- Pillai, S. B. (2004). *Histo-Enzymological Changes In The Ovary Of A Microchiropteran Bat Hipposideros Speoris (Schneider) During Reproductive Cycle* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, Nagpur University, Nagpur).
- Pillai, S. B., & Sastry, M. S. (2012). A mini review of female reproductive asymmetry in microchiropteran bats with a special approach to the leaf-nosed bat, *Hipposideros speoris* Int. J. Curr. Sci. (USA), 4, 96-111.

- Planel, H., Guilhem, A., & Soleihavoup, J. P. (1961). Le cycle annuel du cortex surrenal d'un semihibernant *Miniopterus schreibersii*. *C. r. Assoc. Anat*, 47, 620-633.
- Polgar, K., Striker, G., Elliott, J., Hyink, D., Weber, O., Fehling, H. J., ... & Wilson, P. (2007). Mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies generate progenitors that integrate long term into renal proximal tubules in vivo. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(6), 1709-1720.
- Prelich G, Tan C-K, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase s auxilliary protein. *Nature* 1987;326:517-20.
- Quintero H.F. and Rasweiler, J.J., IV (1974). Ovulation and early embryonic development in the captive vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 41, 265–273
- Quintero, H.F. and Rasweiler, J.J., IV (1973). The reproductive biology of the female vampire bat, *Desmodus rotundus*. *American Zoologist* 13, 1284.
- Racey, P. A. (1979). The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *Reproduction*, 56(1), 391-402.
- Racey, P. A. (1982). Ecology of Bat reproduction. In T. H. Kunz (Ed.), *Ecology of bats* (pp. 57e104). New York and London: Plenum Press.
- Rasweiler V, J. J. (1974). Reproduction in the long-tongued bat, *Glossophaga soricina*. II. Implantation and early embryonic development. *American Journal of Anatomy*, 139(1), 1-35.
- Rasweiler IV, J. J. (1990). Implantation, development of the fetal membranes, and placentation in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *American journal of anatomy*, 187(2), 109-136.
- Rasweiler IV, J. J. (1990). The black mastiff bat (*Molossus ater*): a novel, mammalian model for studies of ovarian, uterine, and placental biology. *Journal of Experimental Zoology*, 256(S4), 210-212.

- Rasweiler IV, J. J., & Badwaik, N. K. (1999 a). Relationships Between Orientation of the Blastocyst During Implantation, Position of the Chorioallantoic Placenta, and Vascularization of the Uterus in the Noctilionoid Bats *Carollia perspicillata* and *Noctilio*. *Placenta*, 20(2-3), 241-255.
- Rasweiler IV, J. J., & Badwaik, N. K. (2000). Anatomy and physiology of the female reproductive tract. In *Reproductive biology of bats* (pp. 157-219). Academic Press.
- Rasweiler, J. J. (1988). Ovarian function in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *Reproduction*, 82(1), 97-111.
- Rasweiler, J.J., IV (1990b). Implantation, development of the fetal membranes and lacentation in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *The American Journal of Anatomy* 187, 109–136.
- Rasweiler, J.J., IV (1991). Development of the discoidal hemochorial placenta in the black mastiff bat, *Molossus ater*: evidence for a role of maternal endothelial cells in the control of trophoblastic growth. *The American Journal of Anatomy* 191, 185–207
- Rasweiler, J.J., IV (1992). Reproductive biology of the female black mastiff bat, *Molossus ater*. In *Reproductive Biology of South American Vertebrates* (W.C. Hamlett, ed.), pp. 262–282. Springer-Verlag, New York
- REECE, W. Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos. 13^a ed., Roca, p.1465-1500. 2017
- Richardson EG (1977). The biology and evolution of the reproductive cycle of *Miniopterus schreibersii* and *M. australis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Zool.* London 183: 353-375
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*, 139(2), 309.
- Rodrigues, A. F., Santiago, C. S., Orielle-Versute, E., Taboga, S. R., & Beguelini, R. (2019). Morphological variation of the female reproductive organs of the bat

Artibeus lituratus during its different reproductive phases. *Journal of Morphology*, 280(8), 1141-1155.

- Rodríguez, F. E., Sandoval, M. T., Álvarez, B. B., & Lombardo, D. M. (2018). Comparative study of prenatal development between *Myotis albescens* (Chiroptera: Vespertilionidae) and *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae): the chorionic vesicle and extraembryonic membranes considerations. *The Anatomical Record*, 301(9), 1527-1543.
- Ross, M. H., Pawlina, W., & Barnash, T. A. (2016). *Atlas de histologia descriptiva*. Artmed Editora.
- SANTOS, G.J.K.; SANTOS, P.PA; COSTA, A.M; MONTESINOS, S.I. 2012. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. Pubvet, Londrina, v.6, n.36, p.1-23.
- Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L., & Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*, 127(1), 65-73.
- Sekido R, Lovell-Badge R. 2007. Mechanisms of gonadal morphogenesis are not conserved between chick and mouse. *Dev. Biol.* 302:132–42
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., & Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental biology*, 274(2), 271-279.
- Simmons, N. B., & A. L. Cirranello.2020. Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... & Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244.
- Singh, A., Suragani, M., & Krishna, A. (2014). Effects of resistin on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis in the vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *General and Comparative Endocrinology*, 208, 73-84.

- Sluiter, J. W., & Bels, L. (1951). Follicular growth and spontaneous ovulation in captive bats during the hibernation period. In Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C (Vol. 54, pp. 585-593).
- Smith, M. S. R. (1970). Histochemical observations on the mouse uterus during the oestrous cycle. *Reproduction*, 22(3), 461-467.
- Soares, E. M., Ferraz, J. F., Oliveira, R. S., Dias, L. I., Morielle-Versute, E., Taboga, S. R., ... & Beguelini, M. R. (2020). Annual reproductive cycle of males of the bat *Molossus molossus*: Seasonal bimodal polyestry, testicular regression, and some aspects of the hormonal control. *Theriogenology*, 158, 297-308.
- Son, S. W., YOON, M. H., MORI, T., & UCHIDA, T. A. (1987). Sperm storage in the reproductive tract and prolonged survival of the Graafian follicle in the female orange whiskered bat, *Myotis formosus tsuensis*, of Korea. *Journal of the Mammalogical Society of Japan*, 12(1-2), 1-14.
- Soto-Suazo, M., & Zorn, T. M. (2018). Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Animal Reproduction (AR)*, 2(3), 147-160.
- Spanel-Borowski, K. (2012). *Atlas of the Mammalian Ovary*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Stephens, R. J. (1962). Histology and histochemistry of the placenta and fetal membranes in the bat, *Tadarida brasiliensis cynocephala* (with notes on maintaining pregnant bats in captivity). *American Journal of Anatomy*, 111(3), 259-285.
- Stévant, I., & Nef, S. (2019). Genetic control of gonadal sex determination and development. *Trends in Genetics*, 35(5), 346-358.
- Stoop, H., Honecker, F., Cools, M., de Krijger, R., Bokemeyer, C., & Looijenga, L. H. J. (2005). Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Human Reproduction*, 20(6), 1466-1476.

- Streeter, G. L. (1942). Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites, and age group XII, 21 to 29 somites. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.*, 30, 211-245.
- Thiessen, D., & Rice, M. (1976). Mammalian scent gland marking and social behavior. *Psychological bulletin*, 83(4), 505.
- Tilly, J. L. (1996). Apoptosis and ovarian function. *Reviews of reproduction*, 1(3), 162-172.
- Tokita, M. (2006). Normal embryonic development of the Japanese pipistrelle, *Pipistrellus abramus*. *Zoology*, 109(2), 137-147.
- Towers, P.A. and Martin, L. (1995). Peripheral plasma progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant Greyheaded flying-foxes (*Pteropus poliocephalus*) and Little red flying-foxes (*P. scapulatus*). *Reproduction, Fertility and Development* 7, 1163–1176.
- Trivedi, S., & Lall, S. B. (1987). Histological and histochemical alterations in the ovary of nulliparous and parous bat *Megaderma lyra lyra* exhibiting absolute sinistral dominance of genitalia. Pp.: 153-160. *European Bat Research*.
- Urquiza, J. H., Díaz, M. M., & Barquez, R. M. (2017). Una nueva especie de *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) para la Argentina. *Mastozoología neotropical*, 24(1), 257-261.
- Usui, K., & Tokita, M. (2019). Normal embryonic development of the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*, with special reference to nose leaf formation. *Journal of Morphology*, 280(9), 1309-1322.
- Van Aarde, R. J., Van Der Merwe, M., & Skinner, D. C. (1994). Progesterone concentrations and contents in the plasma, ovary, adrenal gland and placenta of the pregnant Natal clinging bat *Miniopterus schreibersii natalensis*. *Journal of Zoology*, 232(3), 457-464.

- Van Der Merwe, M. (1979). Growth of ovarian follicles in the Natal clinging bat. *African Zoology*, 14(3), 111-117.
- Ventura, A., Nogueira, M. R., Peracchi, A. L., do Nascimento, A. A., Vieira-Lopes, D. A., & Pinheiro, N. L. (2018). Comparative prenatal development and embryonic staging of neotropical fruit bats (genus Artibeus). *Zoologischer Anzeiger*, 274, 131-146.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28:216–17
- Wallace, G. I. (1978). A histological study of the early stages of pregnancy in the bent-winged bat (*iniopterus schreibersii*) in north-eastern New South Wales, Australia (30° 27'S). *Journal of Zoology*, 185(4), 519-537.
- Wang, Z., Han, N., Racey, P. A., Ru, B., & He, G. (2010). A comparative study of prenatal development in *Miniopterus schreibersii fuliginosus*, *Hipposideros armiger* and *H. pratti*. *BMC Developmental Biology*, 10(1), 1-17.
- Werner, H J. & Dalquest W.W. (1952). Facial glands of the tree bats, *Lasiurus* and *Dasypterus*. *Journal of Mammalogy*, 33: 77-80.
- Werner, H.J., Dalquest W. W. & Roberts J. H. (1950). Histological Aspects of the Glands of the Bat, *Tadarida cynocephala* (LeConte). *Journal of Mammalogy*. Vol. 31: 395 -399.
- Werner, H. J., & Lay, D. M. (1963). Morphologic aspects of the chest gland of the bat, *Molossus ater*. *Journal of Mammalogy*, 44(4), 552-555.
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87(1), 1–28.
- Wimsatt, W. A. (1944). Growth of the ovarian follicle and ovulation in *Myotis lucifugus lucifugus*. *American Journal of Anatomy*, 74(2), 129-173.

- Wimsatt, W. A. (1945). Notes on breeding behavior, pregnancy, and parturition in some vespertilionid bats of the eastern United States. *Journal of Mammalogy*, 26(1), 23-33.
- Wimsatt, W. A. (1960). Some problems of reproduction in relation to hibernation in bats. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 124, 259-270.
- WIMSATT, W. A. (1966). Ultrastructure of the surviving follicle of hibernation and the ovum follicle cell relationship in vespertilionid bat, *Myotis lucifugus*. In *Symp Zool Soc Lond* (Vol. 15, pp. 419-454).
- Wimsatt, W. A. (1969). Some interrelations of reproduction and hibernation in mammals. In *Symposium of the Society for Experimental Biology* (Vol. 23, pp. 511-549).
- Wimsatt, W. A. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *Reproduction*, 56(1), 345-357.
- Wimsatt, W. A., & Enders, A. C. (1980). Structure and morphogenesis of the uterus, placenta, and paraplacental organs of the neotropical disc-winged bat *Thyroptera tricolor* spix (Microchiroptera: Thyropteridae). *American Journal of Anatomy*, 159(2), 209-243.
- Wimsatt, W. A., & Kallen, F. C. (1957). The unique maturation response of the Graafian follicles of hibernating vespertilionid bats and the question of its significance. *The Anatomical Record*, 129(1), 115-131.
- Yao, H. H., Matzuk, M. M., Jorgez, C. J., Menke, D. B., Page, D. C., Swain, A., & Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 230(2), 210-215.
- Yasuda, Y., Kihara, T., & Tanimura, T. (1985). Effect of ethinyl estradiol on the differentiation of mouse fetal testis. *Teratology*, 32(1), 113-118.

- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., & Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16(17), 2265-2282.

Producción científica

Los resultados parciales derivados de esta tesis fueron presentados en diferentes reuniones de comunicaciones científicas realizadas en durante el desarrollo de la misma.

- Rodríguez, F.E. Olea, G.B., Argoitia, M.A., Aguirre M.V., Lombardo, D.M. Tema: “Estudio Preliminar De La Histología Ovárica De *Eumops patagónicus* (Chiroptera: olossidae)”. V Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. 18 y 19 de mayo de 2017. Buenos Aires Argentina.
- Rodríguez, F.E. Olea, G.B., Aguirre .V., Lombardo, D. . Tema: “Estudio Preliminar De La Histología Ovárica De *Eumops patagónicus* (Chiroptera: olossidae)”. XX Reunión de Comunicaciones Científica y Tecnológicas de la UNNE. Junio 2017. Resistencia, Chaco Argentina.
- Rodríguez, F.E. Olea, G.B., Aguirre M.V., Lombardo, D. . Tema: “EUMOPS PATAGONICUS (CHIROPTERA: MOLOSSIDAE) UN MURCIÉLAGO SUDAMERICANO COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA D NÁ CA OVÁR CA (estudio preliminar)”. X JORNADAS DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS EN CIENCIAS DE LA SALUD Facultad de Medicina UNNE. 14 y 15 septiembre de 2017. Corrientes, Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre .V.; Lombardo D. . “Estudio preliminar de los aspectos reproductivos e histológicos en hembras de *Eumops patagónicus* (Chiroptera: olossidae)”. Resumen. Jornada. JORNADA DE JOVENES INVESTIGADORES. FACULTAD DE VETERINARIA. Junio 2018. Buenos Aires. Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre .V.; Lombardo D. . “Estudio preliminar de los aspectos reproductivos e histológicos en hembras de *Eumops patagónicus* (Chiroptera: olossidae).” XX V 5 Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Junio 2018. Corrientes. Argentina.

- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre .V.; Lombardo D. . "DIFFERENT AL ACT V TY AND EVALUATION OF PROLIFERATION IN THE OVARY OF A SUDAMERICAN BAT, EUMOPS PATAGONICUS (CHIROPTERA: OLOSSIDAEE): PRELIMINARY RESULTS." Jornadas Anuales Sociedad Argentina de Biología. Sociedad Argentina de Biología. Diciembre 2018. Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre .V.; Lombardo D. . "La glándula gular de *Eumops patagonicus* (Chiroptera olossidae): estudio histológico e histoquímico". XXV Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Junio 2019. Chaco. Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre M.V.; Lombardo D. . "ACT V DAD D FERENC EN OVARIOS Y EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACION DE OVOCITOS Y CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE UN MURCIELAGO SUDAMERICANO, EUMOPS PATAGONICUS (CHIROPTERA: OLOSSIDAEE)". X JORNADA DE JOVENES INVESTIGADORES. FACULTAD DE VETERINARIA. Junio 2019. Buenos Aires. Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre .V.; Lombardo D. . "Análisis histológico e histoquímico de la glándula gular en *Eumops patagonicus* (Chiroptera olossidae)". XXX Jornadas Argentinas de Mastozoología. Noviembre 2019. Puerto Madryn. Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre M.V.; Lombardo D.M. Estudio preliminar de la glándula gular del murcielago "Molosso gris de orejas anchas": *Eumops patagonicus* (Chiroptera Molossidae). XIV Jornada de Comunicaciones Científicas en Ciencias de la Salud. Noviembre 2020. Corrientes Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre M.V.; Lombardo D.M. Variaciones de Morfología e Histología uterina de *Eumops patagonicus*. XXVI REUNIÓN DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS. Junio 2021. Chaco, Argentina.
- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre M.V.; Lombardo D.M. ESTUDIO PRELIMINAR DEL DESARROLLO OVÁRICO EN *EUMOPS PATAGÓNICUS* (CHIROPTERA: MOLOSSIDAE). X Jornada de Jóvenes Investigadores. Junio 2021. Buenos Aires. Argentina.

- Rodríguez F.E.; Olea G.B; Aguirre M.V.; Lombardo D.M. Migración y proliferación de células germinales primordiales (CGP) en ovarios de *Eumops patagonicus* (Chiroptera Molossidae). VI Jornadas Internacionales Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Agosto 2021. Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez F.E.; Aguirre M.V.; Lombardo D.M. Efecto de la secreción de la glándula gular de *Eumops patagonicus* sobre el sistema respiratorio del ratón (*Mus musculus*). XXVII Comunicaciones científicas y Tecnológicas. 9 y 10 de Junio 2022. Corrientes, Argentina.

Resultados obtenidos de esta tesis fueron enviados para su publicación bajo la siguiente denominación:

Rodriguez, F. E., Olea, G. B., Aguirre, M. V., Argoitia, M. A., Claver, J., & Lombardo, D. M. (2023). Comparative study of the gular gland of three species of Molossidae bats (Mammalia: Chiroptera) from South America. *The Anatomical Record*. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.25277>