

Células germinativas primordiales femeninas: origen y migración hacia los primordios gonadales

Lilian Chuaire, Biol., M.Sc.¹, Magda Carolina Sánchez, Lic. Quím.²

RESUMEN

Las células germinativas primordiales femeninas (PGC), de manera semejante a como ocurre en otros mamíferos, aparecen temprano en el desarrollo, dentro de tejidos que, no sólo están alejados de las gónadas en formación, sino que, además, son de naturaleza extraembrionaria. En consecuencia, hay un proceso de translocación que las conduce hacia los primordios gonadales, donde proliferan e interactúan con células somáticas, para dar comienzo a la foliculogénesis ovárica. ¿Poseen las PGC algún tipo de "memoria" que les indique su destino? ¿Cuáles sucesos determinan la dirección de su desplazamiento desde su remoto lugar de origen, y cuál es su naturaleza? El presente artículo procura dar respuesta a estos interrogantes. Para esto se consideran temas como origen y ultraestructura de las PGC, las características de su conducta migratoria y la influencia que ejercen la matriz extracelular del mesenterio dorsal y los primordios gonadales sobre esa conducta.

Palabras clave: Células germinativas. Movimiento celular.

ORIGEN DE LAS PGC

Las células germinativas primordiales (PGC, por sus siglas en inglés) son las células germinales que, en ambos sexos, deben emigrar y establecerse en las gónadas sexualmente indiferenciadas. Aunque en la actualidad hay buenas evidencias sobre el origen extragonadal de las PGC, durante largo tiempo hubo discusiones alrededor de dos hipótesis: Según la primera, sustentada por Waldeyer¹ en 1870, en los mamíferos, las oogonias (células germinativas femeninas diferenciadas) se derivaban del epitelio superficial del ovario, llamado, por tanto, epitelio germinal; y, la segunda, propuesta por Nussbaum² en 1880, afirmaba que las PGC eran parte de una línea celular continua que se transmitía de generación en generación y se originaba, no a partir de la envoltura epitelial ovárica, sino en lugares localizados fuera de las gónadas.

Ambas hipótesis se debatieron ampliamente durante algo más de 60 años³⁻⁸, sin que se pudiera llegar a un acuerdo, porque los métodos histológicos convencionales utilizados entonces no permitían diferenciar las PGC de las células somáticas circundantes. Sin embargo, en 1948, Witschi⁹, mediante evidencia experimental incuestionable, determinó en mamíferos, la presencia de PGC en el endodermo del saco vitelino, sitio extragonadal desde donde emigraban hacia los pliegues gonadales primitivos, aproximadamente en la tercera semana de desarrollo.

La evidencia morfológica indica entonces que, en los mamíferos, las PGC se localizan, hacia la tercera semana postfertilización, en el endodermo de la pared dorsal del saco vitelino, muy cerca del alantoides¹⁰ (Figura 1). Sin embargo, el origen real de las PGC no se ha aclarado completamente. ¿En qué momento del desarrollo estas células se separan de las líneas

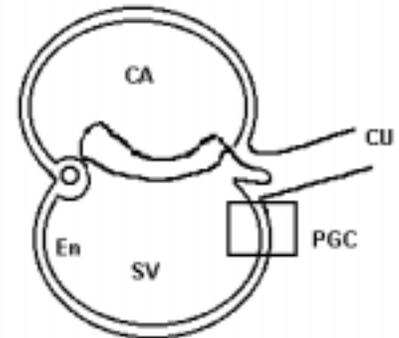


Figura 1. Sección sagital de un embrión de 3 semanas de edad. El área enmarcada muestra la localización de las PGC en el endodermo (En) de la pared posterior del saco vitelino (SV). CA (cavidad amniótica). CU (esbozo de cordón umbilical)

celulares somáticas existentes y dan origen a una línea germinal? Los experimentos efectuados con blastómeras de ratón^{11,12} y con cilindros celulares de huevos¹³, han demostrado que existe una línea celular germinal que no se segrega antes del día 6, y que, posiblemente se deriva de las células que conforman el epiblasto, es decir, de la parte de la masa celular interna del blastocisto que da origen al ectodermo embrionario. Estos hallazgos fueron corroborados por Gosden¹⁴ en 1995,

1. Profesora Asistente, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad del Rosario, Bogotá DC.

2. Instructora Asociada, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad del Rosario, Bogotá DC.

quien, al microinyectar células epiblasticas de ratón en blastocistos receptores, observó que eran capaces de producir células germinativas.

ULTRAESTRUCTURA DE LAS PGC

Las PGC son fácilmente identificables al microscopio de luz (ML), cuando se encuentran en el endodermo del saco vitelino, pues no sólo son más grandes y más claras que las células somáticas vecinas^{15,16}, sino que, además, son basófilas¹⁷ y exhiben actividad de la enzima fosfatasa alcalina en su citoplasma periférico¹⁸.

La observación de las PGC al microscopio electrónico de transmisión (MET) y microscopio electrónico de barrido (MEB), permite apreciar su forma redondeada, y un diámetro que oscila entre 15 y 20 μm ¹⁶. El núcleo, esférico, ocupa una posición excéntrica y contiene una cromatina granular muy fina y un número variable de nucléolos^{16,19}. El retículo endoplásmico rugoso es abundante, al igual que los polirribosomas y los ribosomas libres. Cerca del núcleo se observan mitocondrias esféricas con crestas lamelares, así como un complejo de Golgi pequeño^{16,20}.

Asociada con el núcleo y con las mitocondrias, se encuentra una inclusión citoplasmática muy particular, propia de las PGC -tanto femeninas como masculinas- llamada nuage (del francés: nube). La nuage está constituida por masas electrodensas esféricas formadas por material fibroso o granular, muy semejantes a los gránulos polares ricos en ARN, característicos del plasma de las PGC en invertebrados y vertebrados no mamíferos²¹. El significado funcional de esta inclusión se relaciona con aumento en la actividad mitótica de las PGC y con la determinación de la línea celular ger-

minial a partir de las células somáticas del epiblasto²².

Las reservas energéticas de las PGC están representadas por depósitos de glicógeno y gotas de lípidos, necesarios para la migración hacia los pliegues gonadales^{15,23}. También se encuentran unos pocos microfilamentos, centríolos y microtúbulos^{16,24}, así como áreas focales de contacto estrecho con las células somáticas vecinas²⁵.

MIGRACIÓN DE LAS PGC HACIA LOS PRIMORDIOS GONADALES

Migración pasiva. Aproximadamente hacia la cuarta semana de desarrollo, las PGC inician un proceso de translocación que las lleva desde el endodermo del saco vitelino, a través de la matriz extracelular del mesénquima del mesenterio dorsal, hasta su localización definitiva en los pliegues o primordios gonadales^{15,19}. Este proceso ocurre simultáneamente con una metamorfosis en la conformación del embrión, que cambia de un aspecto inicial discoide, a una configuración tubular. La nueva forma permite que el endodermo del saco vitelino sea incorporado al intestino posterior y que, las PGC, por tanto, ocupen una posición intraembrionaria^{16,24} (Figura 2). Una vez dentro del embrión, las PGC abandonan el epitelio del intestino posterior a través de brechas en la lámina basal epitelial^{24,26}, y se desplazan hacia el mesénquima subyacente. Hasta este momento (quinta semana de desarrollo), el proceso de translocación de las PGC es de tipo pasivo, como se puede comprobar por sus características ultraestructurales y por su aspecto metabólico quiescente^{16,26}.

Migración activa. Usualmente a la motilidad de las células embrionarias la acompañan modificaciones en sus características ultraestructurales. Así,

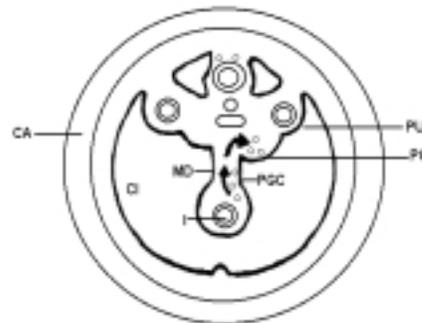


Figura 2. Sección transversal de un embrión de 5 semanas de edad. Se indica con flechas la ruta migratoria descrita por las PGC desde el endodermo del intestino posterior (I) hasta los pliegues gonadales (PG). PU (pliegues urinarios). MD (mesenterio dorsal). CI (celoma intraembrionario) CA (cavidad amniótica)

el patrón cinético de una célula se puede alterar, cuando sobre ella actúan factores de crecimiento²⁷ capaces de inducir la expresión de ciertos tipos de moléculas reguladoras de la motilidad, como las proteínas del citoesqueleto y las proteínas de adhesión^{28,29}, que determinan la aparición de un nuevo patrón ultraestructural. Durante el proceso migratorio, no sólo intervienen factores endógenos, propios de las células, si no también la matriz extracelular, gracias a interacciones de diferente índole entre sus componentes y las células migratorias^{25,26,29}.

Una vez las PGC alcanzan el mesénquima del mesenterio dorsal, adquieren un nuevo patrón ultraestructural que las capacita para desplazarse activamente hacia los pliegues gonadales, mediante movimientos de tipo ameboide^{16,19,24,29}.

Así, pues, las PGC, al iniciar la fase activa de su trayecto migratorio, modifican sus características, pues adquieren una forma alargada²³, aumentan de modo marcado la actividad de la fosfatasa alcalina²⁴, también aumenta el número de membranas de retículo endoplásmico rugoso, la envoltura nuclear se torna irregular¹⁶, y comienzan a aparecer protrusiones de tipo lamelipo-

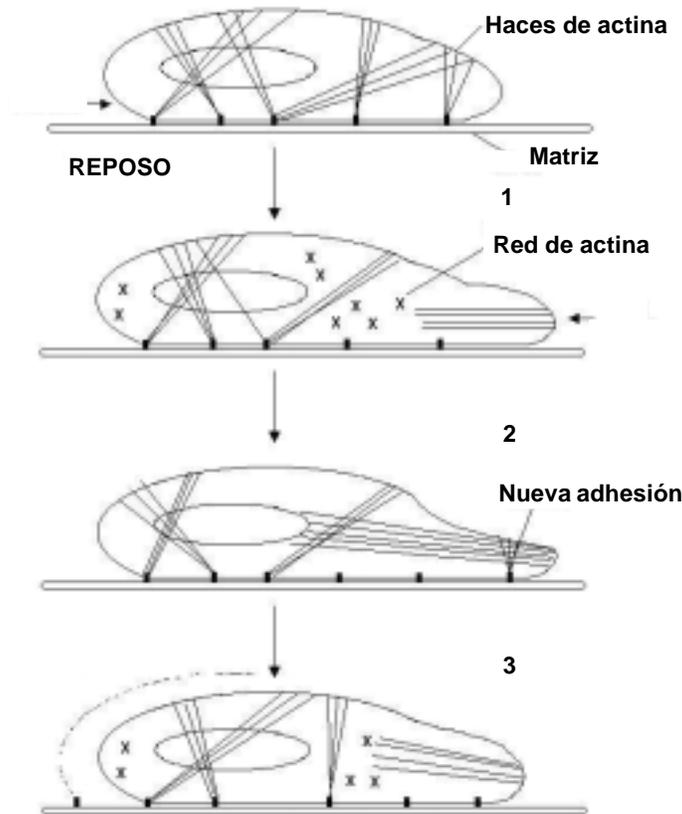


Figura 3. Arrastre celular. El movimiento de arrastre celular a través de la matriz puede diagramarse en tres pasos. Observamos la célula en reposo en la cual se ven los filamentos de actina formando haces al unirse en las adhesiones focales. 1. Al iniciarse el movimiento hay una transformación de los haces de filamentos de actina en redes y se observa la emisión de la protrusión en la cual se empieza a polimerizar la actina. 2. Una vez formada la protrusión, la actina polimerizada forma haces y redes, apareciendo la formación de una nueva adhesión. 3. Hay retracción en la parte posterior de la célula hacia el cuerpo celular, produciéndose la translocación de la célula.

dio^{20,24,27}. Estos cambios indican que las PGC, una vez que alcanzan una posición intraembrionaria, adquieren capacidad de invasión tisular, que les permite dirigirse por sí mismas, de forma activa²⁷, hacia los primordios gonadales^{23,26}.

Tanto las protrusiones como el borde o parte posterior (Figura 3) son estructuras de gran importancia en la cinética de las células migratorias. Las protrusiones se encuentran recubiertas por una fina capa fibrilar o glicocálix, de 30 nm de espesor, asociada con el reconocimiento de componentes

macromoleculares específicos de la matriz extracelular²⁵. En su interior hay elementos del citoesqueleto, como los microfilamentos^{16,24,26}, que interactúan de tal manera, que dan origen a movimientos coordinados de extensión y de retracción, determinantes en el proceso de arrastre celular.

El arrastre celular comprende tres pasos:

1. En el llamado borde delantero o director de la célula, aparecen prolongaciones o protrusiones que se extienden hacia delante.
2. Las protrusiones se anclan al

sustrato mediante proteínas transmembranales de tipo integrina, de modo que se crean adhesiones focales.

3. El borde o parte posterior de la célula se disocia del sustrato, mediante la ruptura de las adhesiones focales y, posteriormente se retrae, a consecuencia de lo cual se produce la translocación^{30,31} (Figura 3).

Se ha observado que la formación de las protrusiones se encuentra asociada con un proceso de polimerización de los filamentos de actina en el extremo (+) de la célula, gracias a la acción estimuladora de una proteína citosólica llamada profilina. En la dirección del ensamblaje o nucleación, también pueden participar otras proteínas, como *Vasp* y *Arp 2/3*, mientras que, en la pérdida de subunidades desde los extremos (-) de los filamentos de actina, participa la cofilina. Simultáneamente, los filamentos de actina se estabilizan como resultado de la formación de enlaces cruzados de tipo proteico, de modo que se forman retículos y haces^{30,32-34}. Aparentemente, en el proceso se hallan comprometidas también moléculas de miosina I y II. Se ha propuesto que las moléculas de miosina I se deslizan a lo largo de los filamentos de actina en el borde director, mientras que las moléculas de miosina II se encontrarían en la parte posterior haciendo lo propio para permitir así la retracción de la célula^{35,36}.

La Figura 4 muestra un modelo hipotético que explica los eventos moleculares que tienen lugar en el borde director de las células migratorias, cuyos principios se podrían aplicar al comportamiento cinético de las PGC^{34,35}.

El resultado final de los eventos descritos, sería un ciclo coordinado con una fase inicial de extensión o alargamiento de las protrusiones, seguida por una fase de retracción, que

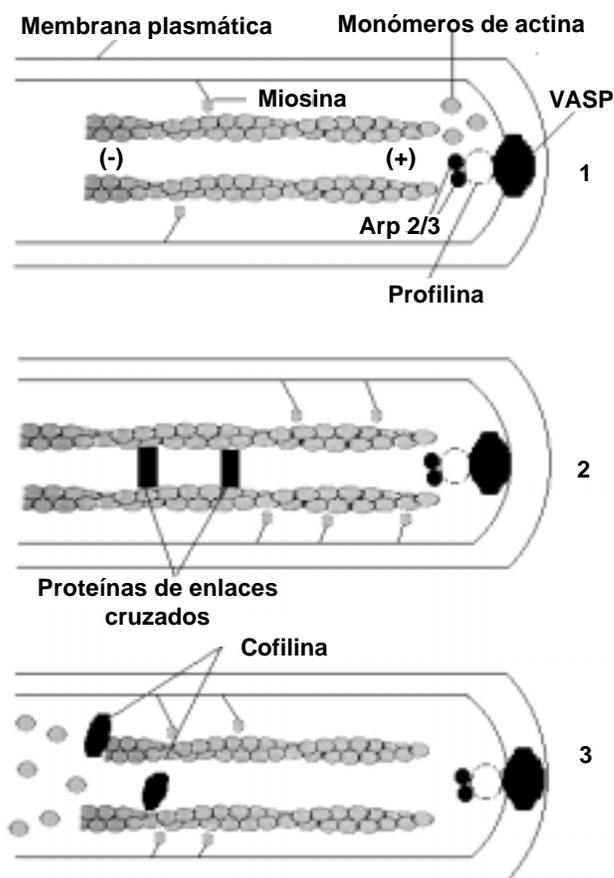


Figura 4. Procesos moleculares en el borde director. 1. La polimerización de los filamentos de actina en el extremo (+), estimulados por la profilina y las proteínas Vasp y Arp 2/3 como centros de nucleación. 2. Formación de redes y haces de actina con la ayuda de proteínas formadoras de enlaces cruzados. 3. Despolimerización en el extremo (-) de actina por la cofilina.

facilitaría el desplazamiento de las PGC a través del sustrato, en este caso, la matriz extracelular^{35,36}.

Es interesante notar que, entre el borde director de las protrusiones y la parte posterior de células migratorias estudiadas, existe un gradiente de concentración de calcio, que determina el orden en el que ambas regiones permiten la interacción entre la actina y la miosina, esto, en últimas, incide en la coordinación de las fases de extensión y retracción del ciclo de motilidad celular³⁷.

Si bien la ruta migratoria descrita por las PGC desde el endodermo del

saco vitelino hasta los pliegues gonadales, se ha identificado plenamente mediante métodos histoquímicos convencionales, ultracitoquímicos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales^{9,24,38-42}, los procesos principales a través de los que las células migratorias generan las fuerzas necesarias para desplazarse, han sido objeto de debate. Sin embargo, se acepta que el principal mecanismo generador de fuerzas para la locomoción corresponde al ensamblaje de los haces y retículos de actina en el borde director, seguido por la interacción entre la miosina y la actina tanto en dicho borde, como en la

parte posterior³¹.

Interacción entre las PGC y la matriz extracelular. Se ha determinado que la motilidad de las células embrionarias es también el resultado de interacciones locales, tanto entre dichas células, como entre ellas y la matriz extracelular vecina. Para que las PGC puedan iniciar su desplazamiento, es necesario que primero pierdan sus complejos de unión con las células somáticas del endodermo del saco vitelino, y que, además haya un sustrato idóneo que facilite la locomoción. Tal sustrato está constituido por los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular, principalmente hialuronano, condroitín-sulfato y dermatán-sulfato^{25,26} y por glicoproteínas estructurales o de adhesión, como la fibronectina^{26,42}, que se caracteriza por trazar rutas migratorias celulares durante la vida embrionaria, debido a que proporciona lugares de adhesión que facilitan el avance de la célula. Es también necesario que para que las células migratorias se puedan desplazar, posean no solamente la capacidad de degradar la matriz extracelular, sino que también la puedan secretar, una vez que se establezcan en su residencia definitiva⁴³.

En la membrana plasmática de otras células migratorias estudiadas, se han encontrado proteínas receptoras de hialuronano, como CD44 u homólogas³⁰, lo cual permite que el hialuronano recubra las células migratorias con un manto de naturaleza hidrofílica. Esta interacción es fundamental, pues confiere a las células ligadas libertad para desplazarse y para proliferar. A menudo, el cese del movimiento celular y el establecimiento de uniones intercelulares, se correlacionan con un descenso en la concentración de hialuronano presente en el tejido y con una disminución en el número de moléculas receptoras del mismo. Al mismo

tiempo se ha observado un aumento en la concentración de hialuronidasa, enzima de tipo proteinasa, cuya función consiste en degradar precisamente al hialuronano⁴³.

Muchas de las enzimas de tipo proteinasa pertenecen a una de las dos clases generales: Algunas son metaloproteinasas, cuya actividad depende de la unión con el calcio o con el zinc, mientras que otras son serinaproteinasas. Ambas, metaloproteinasas y serinaproteinasas cooperan en la degradación de proteínas de la matriz, como colágena, laminina y fibronectina. Algunas de las metaloproteinasas, como las colagenasas, son muy específicas, de manera que la integridad estructural de la matriz estaría alterada por una proteólisis limitada. De esta manera, la migración celular se facilitaría por una actividad proteolítica relativamente reducida⁴⁴.

Existen algunos mecanismos que aseguran que la degradación de los componentes de la matriz se encuentre rigurosamente controlada:

- En primer lugar, muchas proteinasas se secretan como precursores inactivos, que tienen la capacidad de activarse localmente.
- En segundo lugar, la acción de las proteinasas está restringida a áreas específicas, mediante la secreción de diversos inhibidores de las enzimas proteinasas, como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) y los inhibidores de serinaproteinasa, conocidos como *serpins*⁴⁵. Así, estos inhibidores pueden proteger las proteínas de superficie celular necesarias para la adhesión o la migración celular.
- En tercer lugar, muchas células migratorias tienen en su superficie receptores que se unen a proteinasas, de modo que restringen el radio de acción de la enzima solamente a los lugares donde se necesita⁴⁶.

Por otro lado, la degradación de la molécula receptora de hialuronano, se atribuye a la acción de enzimas de tipo metaloproteinasa, que se unen a las membranas de las células migratorias. Estas enzimas, denominadas MT1-MMP, no solamente separan de la superficie celular a la proteína receptora de hialuronano CD44 o a sus homólogas, sino que también estimulan el desplazamiento celular, pues poseen la capacidad de degradar la matriz extracelular. Las enzimas metaloproteinasas se han encontrado en células tumorales, donde promueven también fenómenos migratorios^{29,44,47}.

Influencia de los tejidos somáticos gonadales sobre la migración de PGC.

Hacia la cuarta semana de desarrollo, aparecen en el embrión un par de salientes longitudinales llamados pliegues o primordios gonadales, que se sitúan a cada lado, entre el mesonefros y la raíz del mesenterio dorsal⁴⁸. Al disminuir rápidamente en longitud, adquieren el aspecto de extrusiones redondeadas que se proyectan hacia el interior de la cavidad celómica²⁶. En este momento del desarrollo las PGC comienzan a hacer su arribo a los pliegues o primordios gonadales, proceso que continúa hasta la quinta semana postfertilización (Figura 2).

Los pliegues o primordios gonadales son las estructuras precursoras de la corteza ovárica. Están revestidos por un epitelio celómico en proliferación, debajo de él se encuentra un compartimiento que comprende células mesenquimáticas, vasos sanguíneos y células derivadas de los glomérulos y los túbulos mesonéfricos^{19,26} (Figura 2).

¿Cuál es el papel inductor que desempeñan las gónadas en formación sobre la migración de las PGC? Cuando Witschi⁹, demostró en 1948 el origen extragonadal de las PGC, también propuso que a estas células las guiaban

y las atraían sustancias quimiotácticas producidas por los pliegues gonadales, afirmación que más tarde corroboraron Rogulska *et al.*⁴⁹, quienes, al transplantar intestino posterior de embriones de ratón dentro de embriones de pollo, observaron que las PGC de ratón eran capaces de invadir las gónadas del receptor.

Estos resultados determinaron la generación de una línea de pensamiento, pues en la actualidad, se acepta ampliamente la hipótesis de la atracción de las PGC, mediante señales específicas originadas en las gónadas en formación. Esa hipótesis se ha confirmado en especies como ratón⁵⁰, donde se demostró, *in vitro*, que secciones de tejido gonadal podían atraer a las PGC. Igualmente, en pollos, se informó la acumulación de las PGC en regiones ectópicas, como resultado de la acción del tejido gonadal transplantado⁵¹. Por otra parte, en *Drosophila*, se determinó que el mesodermo gonadal expresa genes como *columbus*, que produce señales que atraen a las PGC⁵², o como *wunen*, comprometido en la producción de señales que repelen a las PGC, desde ciertas regiones del intestino⁵³.

Observaciones efectuadas en pez cebra⁵⁴, muestran que las PGC no se desplazan directamente hacia los primordios gonadales, sino que inicialmente se dirigen hacia destinos somáticos intermedios, constituidos por células que se caracterizan por expresar el factor de transcripción *wt1*. Estas células somáticas producen señales que atraen a las PGC durante la somitogénesis temprana. En etapas tardías, cesa, tanto la emisión de señales, como la capacidad de respuesta por parte de las PGC, de modo que estas células migratorias pueden continuar el desplazamiento hacia su destino final.

Durante el proceso de migración hacia los primordios gonadales, las PGC parecen ser guiadas por señales

emitidas por células líderes que dirigen al resto de las PGC hacia su destino gonadal, como se ha observado en **Drosophila**⁵⁵⁻⁵⁷ y en ratones⁵⁸. Mientras que en especies como el pez cebra, las PGC migran de forma individual⁵⁴, en ratones, lo hacen en grupos⁵⁸, debido posiblemente a que se interconectan con las células pioneras mediante extensas prolongaciones de tipo filopodial⁵⁹.

Aunque la migración de las PGC hacia los tejidos somáticos gonadales, depende en gran parte del mecanismo de atracción descrito, no se debe perder de vista que se trata de un proceso en el que intervienen también otros factores: Así, en **Drosophila**, el factor determinante en el comienzo de la migración no parece ser la atracción ejercida por el mesodermo gonadal^{60,61}, sino, más bien la repulsión de las PGC desde regiones específicas del intestino^{53,55}.

En cuanto al mecanismo molecular que regula la migración de las PGC, se piensa que el factor de transcripción *wtl*, podría actuar como represor o como activador⁶², aunque no se ha demostrado que su acción sea indispensable en el proceso. No ocurre lo mismo con el factor *steel*, encontrado a todo lo largo de la ruta migratoria, cuya acción no es de naturaleza quimiotáctica, sino inductora de la motilidad, pues, unido al receptor *kit* de las PGC, permite la adhesión de estas células a sustratos celulares^{50,63}. En cuanto al papel que tienen los factores de desarrollo TGF en el desplazamiento de las PGC, se ha observado que éstas son atraídas *in vitro* por TGF- β 1. En el mismo sentido, se informó que el uso de anticuerpos anti-TGF- β 1 inhibe la migración de las PGC hacia los tejidos somáticos gonadales⁶⁴.

CONCLUSIONES

Hacia la tercera semana de desarrollo, aparecen las PGC en el endodermo de la pared posterior del saco vitelino, desde donde inician, aproximadamente hacia la cuarta semana, un trayecto migratorio que las conduce a su residencia definitiva, localizada en los pliegues o primordios gonadales. Este viaje comprende dos fases:

- En la primera, las PGC se desplazan de forma pasiva, debido al plegamiento sufrido por el embrión durante esta etapa del desarrollo.
- En la segunda, el movimiento de las PGC corresponde a un proceso de tipo activo, que se llevaría a cabo debido, sobre todo, a un mecanismo generador de fuerzas originado en el ensamblaje de haces y de retículos de actina en el borde director de la protrusiones celulares, seguido por interacciones entre moléculas de actina y de miosina del borde director y del borde posterior. Como resultado final, un ciclo coordinado de extensión y de retracción, posibilitaría el desplazamiento de las PGC a través de la matriz extracelular.

Otros factores para tener en cuenta, que inciden en la migración de las PGC hacia los pliegues o primordios gonadales, son las interacciones entre ellas y la matriz extracelular circundante, así como el efecto inductor ejercido por el mesodermo gonadal.

La composición de la matriz extracelular, en cuanto al contenido de glicosaminoglicanos como hialuronano, que facilita el desplazamiento celular, la presencia de glicoproteínas como la fibronectina, que se caracteriza por trazar rutas migratorias, y la acción de las metaloproteinasas, que

degradan no sólo componentes de la matriz como el hialuronano, sino que también separan de la membrana en las células migratorias las moléculas CD44 receptoras de hialuronano, constituyen mecanismos reguladores del movimiento celular, que pueden afectar el comportamiento cinético descrito por las PGC.

La evidencia del efecto ejercido en otras especies por parte de factores quimiotácticos secretados por posibles destinos somáticos intermedios, por las gónadas en formación, y, aun por las propias PGC que actúan como pioneras en el desplazamiento, se deben tener en cuenta dentro del contexto del proceso migratorio de las PGC en el ser humano.

Otros mecanismos inductores de la motilidad, como el acoplamiento del factor *steel* a su receptor *kit*, la acción del factor de transcripción *wtl* y del factor de crecimiento TGF- β 1, podrían también intervenir en la regulación del movimiento de las PGC hacia los pliegues o primordios gonadales.

SUMMARY

Female primordial germ cells (PGC), as in other mammals, appear early in the development, inside tissues that not only are far from the gonadal anlage, but also are of extra embryonic nature. Therefore, they make a translocation process that leads them to the gonad primordium, where they proliferate and interact with somatic cells in order to initiate the ovarian folliculogenesis. Do PGC possess a kind of "memory" that shows their target? What events determine the direction to which they should migrate from their place of origin? Which is the nature of these events? In this paper, we'll try to touch

topics as the origin and the ultra-structure of the PGC, its migratory behaviour characteristics and the influence that the extracellular matrix of the dorsal mesentery and the developing gonad have on that behaviour. With these subjects we'll try to answer the stated questions as deep as possible.

Key words: Germ cells. Cell movement.

REFERENCIAS

- Waldeyer W. Eierstock und Ei. 1870. Citado por: Anderson E, Letourneau R, Albertini DF, Meller SM. Cytological observations of the ovarian epithelium in mammals during the reproductive cycle. *J Morphol* 1976; 150: 135-166.
- Nussbaum M. Die Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. 1880. Citado por: Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Phys Rev* 1986; 86: 71-117.
- Weissmann A. Das Kleimplasm. Eine Theorie der Veerbung. 1892. Citado por: Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 1986; 86: 71-117.
- Allen E. Oogenesis during sexual maturity. 1923. Citado por: Wordinger R, Sutton J, Brun-Zinkernagel AM. Ultrastructure of oocyte migration through the mouse ovarian surface epithelium during neonatal development. *Anat Rec* 1990; 227: 187-198.
- Evans HM, Swezy O. Ovogenesis and the normal follicular cycle in adult mammalia. 1931. Citado por: Wordinger R, Sutton J, Brun-Zinkernagel AM. Ultrastructure of oocyte migration through the mouse ovarian surface epithelium during neonatal development. *Anat Rec* 1990; 227: 187-198.
- Swezy O. Ovogenesis and its relation to the hypophysis: The effects of pregnancy hypophysectomy, thyroidectomy and hormone administration on the ovary of the rat. 1933. Citado por: Anderson E, Letourneau R, Albertini DF, Meller SM. Cytological observations of the ovarian epithelium in mammals during the reproductive cycle. *J Morph* 1976; 150: 135-166.
- Everett NB. Observational and experimental evidences relating to the origin and differentiation of the definitive germ cells in mice. *J Exp Zool* 1943; 92: 49-91.
- Everett NB. The present status of the germ cell problem in vertebrates. *Biol Rev* 1945; 20: 45-55.
- Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1948; 32: 67-80.
- Eddy EM, Clark JM, Gong D, Fenderson BA. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Res* 1981; 4: 333-362.
- Gardner RL. Developmental potency of normal and neoplastic cells of the early mouse embryo. *En: Littlefield JW, De Grouchy J (eds.). Birth defects*. Amsterdam: Excerpta Med; 1977. p. 154-166.
- Kelly SJ. Studies of the developmental potential of 4- and 8- cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* 1977; 200: 365-376.
- Snow MHL. Autonomous development of parts isolated from primitive streak stage mouse embryos. Is development clonal? *J Embryol Exp Morphol* 1981; 65 Supl: 269-287.
- Gosden RE. Ovulation 1: Oocyte development throughout life. *En: Grudzinkas JG, Yovich JL (eds.). Gametes. The oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 119-149.
- Byskov AG. Primordial germ cells and regulation of meiosis. *En: Austin CR, Short RV (eds.). Reproduction in mammals. I. Germ cells and fertilization*. 2nd ed. London: Cambridge University Press. 1982. p. 1-16.
- Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reprod Update* 1997; 3: 281-295.
- Zamboni L, Merchant H. The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. *Am J Anat* 1973; 137: 299-335.
- McKay DC, Hertig AT, Adams EC, Danziger S. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec* 1953; 117: 201-219.
- Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 1986; 86: 71-117.
- Jeon UW, Kennedy JR. The primordial germ cells in early mouse embryos; light and electron microscopic studies. *Dev Biol* 1973; 31: 275-284.
- Eddy EM. Fine structural observations on the form and distribution of nuage in the germ cells of the rat. *Anat Rec* 1974; 178: 731-758.
- Kellokumpu-Lehtinen P, Söderström K. Occurrence of nuage in fetal human germ cells. *Cell Tissue Res* 1978; 194: 171-177.
- Fukuda O. Ultrastructure of primordial germ cells in human embryo. *Virchows Arch* 1976; 20: 85-89.
- Fujimoto T, Miyayama T, Fujita M. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec* 1977; 188: 315-330.
- Pereda J, Motta PM. A unique fibrillar coat on the surface of migrating human primordial germ cells. *Arch Histol Cytol* 1991; 54: 419-425.
- Motta PM, Nottola SA, Makabe S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 75: 5-10.
- Schilling B, Yeh J. Expression of transforming growth factor TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 and of type I and II TGF- β receptors during the development of the human fetal ovary. *Fertil Steril* 1999; 72: 147-153.
- Cooper GM. *La célula*. 2ª ed. Madrid: Marbán; 2002. p. 421-452.
- Kuwana T, Fujimoto T. Active locomotion of human primordial germ cells *in vitro*. *Anat Rec* 1983; 205: 21-26.
- Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF. Differential dynamics of α 5 integrin, paxillin, and α -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* 2001; 153: 1427-1440.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología celular y molecular*. 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2002. p. 751-768, 787-792.
- Furukawa R, Fehheimer M. The structure, function and assembly of actin filament bundles. *Int Rev Cytol* 1997; 175: 29-90.
- Beckerle MC. Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. *Cell* 1998; 95: 741-748.
- Welch MD, Mallavarapu A, Rosenblatt J, Mitchison TJ. Actin dynamics *in vivo*. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 54-61.
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysiol J* 2000; 79: 144-152.
- Mermall V, Post PL, Mooseker MS. Unconventional myosin in cell movement, membrane traffic and signal transduction. *Science* 1998; 279: 527-533.
- Pettit EJ, Fay FS. Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev* 1998; 78: 949-967.
- Chiquoine AD. The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 1954; 118: 135-145.
- Mintz B, Russell ES. Gene induced embryological modification of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 1957; 134: 207-230.
- Heath JK. Characterization of a xenogeneic antiserum raised against the fetal germ cells of the mouse; cross reactivity with embryonal carcinoma cells. *Cell* 1978; 15: 299-306.
- Blandau RJ, White BJ, Rumery RE. Observations on the movement of the living primordial germ cells in the mouse. *Fertil Steril* 1963; 14: 482-489.
- Fujimoto T, Yoshinaga K, Kono I. Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat Rec* 1985; 211: 271-288.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type I matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; 153: 893-904.
- Curry TE, Osteen KG. Cyclic changes in the

- matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 2001; 64: 1285-1296.
45. Okamoto I, Kawano Y, Tsuiki H, Sasaki J, Nakao M, Matsumoto M, *et al*. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* 1999; 18: 1435-1446.
46. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; 91: 439-442.
47. Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada H, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 34260-34266.
48. Wischnitzer S. The ultrastructure of the germinal epithelium of the mouse ovary. *J Morphol* 1965; 117: 387-400.
49. Rogulska R, Ozdzanski W, Komar A. Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1971; 25: 115-164.
50. Godin I, Wylie C, Heasman J. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 1990, 108: 357-363.
51. Kuwana T, Rogulska T. Migratory mechanism of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell Mol Biol* 1999; 45: 725-736.
52. Van Doren M, Broihier HT, Moore LA, Lehmann R. HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 1998; 396: 466-469.
53. Zhang N, Zhang J, Purcell KJ, Cheng Y, Howard K. The *Drosophila* protein wunen repels migrating germ cells. *Nature* 1997; 385: 64-67.
54. Weidinger G, Wolke U, Köprunner M, Thisse C, Thisse B, Raz E. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Development* 2002; 129: 25-36.
55. Starz-Gaiano M, Cho NK, Forbes A, Lehman R. Spatially restricted activity of a **Drosophila** lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development* 2001; 128: 983-991.
56. Niewiadomska P, Godt D, Tepass U. DE-Cadherin is required for intercellular motility during **Drosophila** oogenesis. *J Cell Biol* 1999; 144: 533-547.
57. Duchek P, Rorth P. Guidance of cell migration by EGF receptor signalling during **Drosophila** oogenesis. *Science* 2001; 291: 131-133.
58. García-Castro ML, Anderson R, Heasman J, Wylie C. Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J Cell Biol* 1997; 138: 471-480.
59. Gomperts M, García-Castro M, Wylie C, Heasman J. Interactions between primordial germ cells play a role in the migration in mouse embryos. *Development* 1994; 120: 135-141.
60. Jaglarz MK, Howard KR. Primordial germ cell migration in **Drosophila melanogaster** is controlled by somatic tissue. *Development* 1994; 120: 83-89.
61. Warrior R. Primordial germ cell migration and the assembly of the **Drosophila** embryonic gonad. *Dev Biol* 1994; 166: 180-194.
62. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74: 679-691.
63. Pesce M, Di Carlo A, De Felici M. The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech Dev* 1997; 68: 37-44.
64. Godin I, Wylie CC. TGF- β 1 inhibits proliferation and has a chemotrophic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 1991; 113: 1451-1457.