



44
2ej.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PROCESO DE FOLICULOGENESIS EN EL OVARIO DE
RATON (Mus musculus): ESTUDIO EXPERIMENTAL
IN VITRO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

Jesús Chimal Monroy

Asesor: Dr. Horacio Merchant Larios

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO.

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 1. Migración de las Células Germinales..... | 3 |
| 2. Modelos de Diferenciación Gonadal..... | 9 |
| 3. Origen de las Células Somáticas en el Establecimiento del Primordio Gonadal..... | 11 |
| 4. Diferenciación Sexual de la Gónada..... | 15 |
| 4.1. Diferenciación del Testículo..... | 15 |
| 4.2. Diferenciación del Ovario..... | 18 |
| 4.2.1. Inducción de la Meiosis..... | 19 |
| 4.2.2. Foliculogénesis..... | 20 |
| 5. Foliculogénesis <u>in vitro</u> | 23 |
| 6. Objetivos..... | 25 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 26 |
| 1. Obtención del Material..... | 26 |
| 2. Cultivo de Organos..... | 27 |
| 3. Procesamiento del Material Biológico..... | 28 |
| 4. Conteo de Ovocitos..... | 31 |
| III. RESULTADOS..... | 32 |
| 1. Foliculogénesis <u>in vivo</u> | 32 |
| 2. Foliculogénesis <u>in vitro</u> | 36 |
| 3. Estudio Ultraestructural..... | 39 |

| | |
|---|----|
| IV. DISCUSIÓN..... | 42 |
| 1. Desarrollo del Ovario <u>in vivo</u> | 42 |
| 2. Desarrollo del Ovario <u>in vitro</u> | 44 |
| 2.1. Efecto del Mesonefros en la Morfogénesis del Ovario y en la Supervivencia de las CGP..... | 44 |
| 2.2. Efecto del SCUH en la Morfogénesis del Ovario... | 47 |
| 2.3. Citodiferenciación y Foliculogénesis..... | 51 |
| V. CONCLUSIONES..... | 58 |
| VI. REFERENCIAS..... | 59 |

RESUMEN.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos que tiene el mesonefros y el suero contenido en el cordón umbilical humano (SCUH) sobre el proceso de la foliculogénesis en ovarios de ratón mantenidos in vitro.

Los ovarios de ratón fetal de 15 y 17 días con mesonefros y sin mesonefros fueron cultivados durante 6 días con y sin SCUH. Se observó que en general el proceso de la foliculogénesis in vitro es semejante al que se lleva a cabo en ovarios in vivo. Este proceso se inicia con la fragmentación de los cordones ovigeros y culmina con la formación de los folículos primordiales. Durante todo este fenómeno se observa una estrecha interacción entre los diversos componentes celulares involucrados en este proceso, como lo demuestran la presencia de desmosomas y uniones de comunicación.

El estudio indica que la presencia o la ausencia del mesonefros no tiene ningún efecto durante la foliculogénesis, como ha sido propuesto por otros autores. Lo mismo sucede en presencia de SCUH. Por el contrario, en ausencia de SCUH la formación de folículos se acelera con respecto a los ovarios cultivados con adición de éste. Esto nos llevó a proponer que los ovarios cultivados con SCUH siguen un desarrollo normal como si se encontraran in vivo; mientras que los ovarios cultivados sin SCUH siguen sus propios mecanismos de regulación intraovárica, sin que ningún factor del suero los regule.

I. INTRODUCCION.

Durante el desarrollo del ovario de ratón prenatal, suceden una serie de eventos morfogenéticos que llevan a la formación de los folículos primordiales en ratones postnatales, esto es, ovocitos independientes rodeados por un epitelio folicular.

La morfogénesis del ovario es una consecuencia de la interacción entre la línea celular somática y la línea celular germinal, esta interacción se inicia desde la formación de la gónada indiferenciada y se prolonga hasta la morfogénesis de la gónada ya diferenciada. Por lo tanto, la gónada lleva a cabo el proceso de interacción celular durante dos fases a través de su desarrollo; una durante la fase indiferenciada y otra durante la diferenciación sexual (Merchant 1984).

El estado indiferenciado es el que corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las células germinales de origen extraembrionario, y a la proliferación de células somáticas de la región urogenital, que darán origen a los de cordones sexuales, que constituyen los elementos histológicos precursores en la gónada indiferenciada.

La diferenciación sexual de la gónada se expresa normalmente de acuerdo a su sexo genético. En el caso del testículo la diferenciación se inicia desde la formación de

los cordones seminíferos y la túnica albugínea. En el caso del ovario la diferenciación se lleva a cabo desde el inicio de la meiosis y se continúa con la formación de los folículos.

Por lo tanto, para poder explicar la morfogénesis de la gónada y en particular la del ovario, es necesario conocer con precisión los eventos que preceden el proceso de formación de los folículos, es decir, conocer las etapas de la migración de las células germinales; el origen y la estructura de la gónada indiferenciada; y su posterior diferenciación sexual.

1. Migración de las células germinales primordiales.

La primera localización de las células germinales primordiales (CGP) en mamíferos es en el endodermo del saco vitelino cerca del alantoides. Para después localizarse en el epitelio del intestino medio. Hasta este momento la migración de las CGP es pasiva por medio de movimientos morfogenéticos del endodermo del saco vitelino como parte de la formación del intestino (Clark y Eddy. 1975).

El siguiente paso en la migración de las CGP es la salida de éstas del epitelio del intestino medio, para seguir su camino por el mesenterio dorsal hasta las crestas genitales. Todo el recorrido se realiza mediante un mecanismo activo, durante el cual las células muestran clara evidencia de formación de prolongaciones membranales como son filopodios, lobopodios, y pseudópodos, que se pierden al establecerse las CGP en la cresta gonadal (Clark y Eddy.

1975. Zamboni y Merchant. 1973. Merchant y Zamboni. 1973).

La forma en que se puede localizar e identificar a la línea celular que constituye las CGP es por su respuesta a la fosfatasa alcalina en una reacción histoquímica (Chiquoine. 1954). Esta enzima es de tipo glicoproteico cuya actividad no es muy conocida. La fosfatasa alcalina está altamente relacionada con células que presentan alta actividad mitótica como son las CGP. La reacción vista al microscopio electrónico (ME) se localiza a nivel de membrana.

Las CGP se distinguen de las células somáticas por su gran tamaño, forma esférica, núcleo grande y nucléolo muy evidente. Vistas al ME se observa que contienen gran cantidad de ribosomas libres, mitocondrias con pocas crestas y cuerpos de núcleo denso, los cuales están rodeados por una membrana vesicular, cuyo contenido es rico en azúcares, pero cuya función es desconocida (Merchant y Álvarez. 1981).

Durante la migración de las CGP se puede observar claramente una gran interacción de ellas con las células circundantes y con la matriz extracelular (Merchant y Álvarez. 1986).

La primera interacción es más evidente cuando las CGP llevan a cabo la migración de tipo activo, durante la cual, se observa la formación de prolongaciones membranales.

La segundo proceso de interacción se hace evidente al observar durante toda la ruta de migración la presencia de una glicoproteína de la matriz extracelular; la fibronectina, cuya presencia está fuertemente asociada con células

migratorias; tales como son las células que forman el tubo neural y las mismas CGP (Fujimoto. et al. 1985. Merchant y Álvarez. 1986. Álvarez y Merchant. 1986).

La fibronectina ha sido detectada por técnicas histoquímicas con anticuerpos marcados con conjugados fluorescentes, como lo es la fluoresceína.

En embriones de ratón de 9 días de gestación, la fibronectina se observa alrededor del intestino medio, aorta dorsal y tubo neural. En estados más avanzados como embriones de ratón de 10 días de gestación se puede observar que en el mesenterio dorsal, que une al intestino con la región dorsal, también existe fibronectina. En los primordios gonadales y alrededor de la aorta dorsal puede observarse cierto grado de reacción a la fibronectina (Fujimoto. et al. 1985. Merchant y Álvarez. 1986. Álvarez y Merchant. 1986).

Observaciones realizadas en ME permiten detectar que la fibronectina interacciona a nivel de membrana con las CGP. Esta interacción se debe a la presencia de receptores específicos en la membrana de la célula para la fibronectina, lo cual, permite la migración sobre ella (Yamada y Kenedy.1984. Hynes. 1986).

Al revisar el comportamiento migratorio que tienen las CGP in vitro, se encontró que también son necesarias estas dos interacciones anteriormente citadas para las células in vivo (Alvarez y Merchant. 1986).

i) Interacción célula somática-CGP.

Este tipo de interacción se hace evidente al observar

que en condiciones de cultivo la migración de las CGP se realiza sobre una monocapa de células mesenquimáticas, pues, no son capaces de unirse ni de desplazarse sobre plástico o vidrio.

ii) Interacción matriz extracelular-CGP.

Para comprobar si los estudios realizados in vitro se correlacionan con los estudios realizados in vivo, se probó la presencia de fibronectina en la monocapa de células del cultivo, en las cuales se encontró que la reacción fué positiva. Este hecho permite evidenciar que la matriz extracelular también es necesaria para el comportamiento migratorio de las CGP in vitro (Alvárez y Merchant. 1986). Aunque bien, la interacción entre la matriz extracelular y las CGP, no explica por sí sola la actividad migratoria de las CGP hacia la gónada.

Estudios recientes (Kuwana. et al. 1986) realizados in vitro con CGP de pollo han proporcionado información dirigida hacia la resolución de la incognita que representa la inducción de la migración de las CGP hacia la gónada. Estos autores al trabajar con crestas gonadales de pollo en estado 13 de desarrollo, correspondiente al pico máximo de migración de CGP y en estado 22 de desarrollo, el cual corresponde al de una gónada indiferenciada ya establecida y a una nula migración de CGP, encontraron que la cresta gonadal en estado 13 libera un factor quimiotáctico que atrae las CGP hacia ella y que el tejido del corazón también es capaz de liberar un factor quimiotáctico que atrae las CGP hacia los vasos

sanguíneos.

Estas conclusiones están basadas en una serie de experimentos en los que se comparó el comportamiento migratorio de las CGP in vitro sobre un sustrato de colágena, poniendo como tejidos inductores la cresta gonadal en estado 13 contra corazón y tubo neural. Por otra parte, gónada en estado 22 contra corazón, alantoides e hígado y finalmente cresta gonadal en estado 13 contra gónada en estado 22. Los órganos a los que las CGP tuvieron respuesta, fueron la cresta gonadal en estado 13, gónada en estado 22 y corazón, en los cuales se encontró que la primera tuvo mayor capacidad de atracción de CGP que en estado 22. Asimismo el corazón también presentaba capacidad quimiotáctica en condiciones de cultivo.

El comportamiento de las CGP mantenidas in vitro concuerda con lo que sucede a estas mismas células en condiciones naturales. En ambos casos se observa que en las aves las CGP migran principalmente por los vasos sanguíneos y posiblemente este hecho se deba a la liberación de un factor quimiotáctico por parte de los tejidos del corazón y que al pasar por la cresta gonadal ésta libere también un factor quimiotáctico que induzca la salida de las CGP de los vasos sanguíneos por diapedesis y colonicen la cresta gonadal.

Los datos presentados anteriormente permiten proponer lo siguiente: la migración de las CGP es un fenómeno en el que no sólo participan estas células, sino por el contrario, es un fenómeno que involucra dos tipos de interacciones. Una de

las cuales, son las interacciones celulares, que son evidentes desde el momento de la migración pasiva, ya que las CGP migran hacia el intestino por movimientos morfogénéticos del endodermo del saco vitelino, lo cual implica que las CGP están íntimamente asociadas a éste (Clark y Eddy. 1975). Por otro parte, al iniciar el movimiento activo, las CGP también interactúan con las células que las circundan y además con la matriz extracelular. La primera interacción se evidencia en el momento en que la cresta gonadal libera un factor quimiotáctico que provoca que las CGP migren activamente emitiendo prolongaciones membranales (Clark y Eddy. 1975. Zamboni y Merchant. 1973. Merchant y Zamboni. 1973). Es también en este momento, cuando el segundo tipo de interacción se hace evidente; debido a la presencia de fibronectina que se encuentra en el camino migratorio de las CGP, pero que no lo induce, sino que más bien da el ambiente permisivo necesario para que la migración de las CGP ocurra. Si la fibronectina tuviera un carácter inductor de la migración, las CGP permanecerían alrededor de la aorta dorsal, ya que en este gran vaso existen evidencias muy claras de presencia de fibronectina en las etapas migratorias de las CGP y la de colonización de la cresta gonadal (Alvárez y Merchant. 1986. Fujimoto et al. 1985. Merchant y Alvárez. 1986).

2. Modelos de diferenciación gonadal.

Durante los procesos de la morfogénesis de la gónada podemos observar tres etapas: 1) colonización 2) organización y 3) de diferenciación. La primera etapa corresponde al establecimiento o colonización en el primordio gonadal por las CGP así como la incorporación de células somáticas a éste. La segunda etapa corresponde a la organización del primordio gonadal como gónada indiferenciada, en donde las células del epitelio celómico, mesénquima y CGP se integran como un órgano. La tercera etapa corresponde a la diferenciación de la gónada en un testículo o en un ovario. Existen en la literatura cuatro modelos que tratan de explicar la diferenciación de la gónada hacia testículo o hacia ovario.

El primer modelo propuesto por Witschi (1951), se basa en observaciones realizadas en anfibios. El autor postula que la gónada está formada por dos componentes: a) la corteza, cuyas células se originan del epitelio celómico, y b) la médula, en la que sus células se originan a partir del mesonefros. Propone a su vez, que la diferenciación de la gónada en mamíferos está determinada por la liberación de dos factores antagónicos. Uno liberado por la médula llamado genéricamente medularina, que provoca que la gónada se diferencie hacia testículo. Y, otro liberado por la corteza, llamado cortesina que produce la diferenciación de la gónada hacia un ovario. Por lo tanto, el testículo es de origen

mesonéfrico y el ovario es de origen mesotelial.

Por otro lado, Gruenwald (1942), Forbes (1942), y Torrey (1945), proponen que el ovario y el testículo tienen su origen en células derivadas del epitelio celómico. Los autores (op cit.) postulan que la gónada indiferenciada forma cordones sexuales primarios que rodean a las CGP. Si la gónada se diferencia en un ovario, entonces, los cordones sexuales primarios llevan a cabo la regresión y el epitelio celómico lleva a cabo una segunda proliferación, la cual forma los cordones sexuales secundarios, que posteriormente darán origen a los epitelios foliculares que recubren los ovocitos. Por el contrario si la gónada se diferencia en un testículo, los cordones sexuales primarios se desarrollan en cordones seminíferos.

Byskov (1978a), Upadhyay, et al. (1979, 1981), Zamboni, et al. (1979, 1981), Shato (1985), proponen un tercer modelo en el que tanto el ovario como el testículo tienen su origen a partir de células derivadas del mesonefros. Estos autores indican que las células del epitelio que forman los túbulos mesonéfricos se desdiferencian y migran (Byskov, 1981) hacia la futura gónada para formar los cordones sexuales que darán origen a los cordones seminíferos en el caso testículo y a los folículos en el caso del ovario.

Por su parte, Allen (1904), Wilson (1926), Brambell (1927), Pinkerton (1962), Merchant (1975a, 1979, 1980), Pelliniemi (1975, 1976), Pelliniemi y Lauteala, (1981), Dang y Fouquet (1979), proponen que el epitelio celómico es el

principal contribuyente celular hacia la formación de los cordones sexuales que darán origen a los cordones seminíferos en el testículo y al epitelio folicular en el ovario. Merchant (1979) propone que la gónada indiferenciada está formada por cuatro tipos celulares: CGP, mesénquima circundante; epitelio celómico; y epitelio celular interno, derivado del mesotelio.

3. Origen de las células somáticas en el establecimiento del primordio gonadal.

En la proposición de los diferentes modelos de diferenciación gonadal, se puede observar que existen dos orígenes para las células somáticas que contribuyen a la formación del primordio gonadal: células de origen mesonéfrico y células de origen mesotelial.

- Origen mesonéfrico del primordio gonadal.

Byskov (1978a), Upadhyay, et al. (1979, 1981), Zamboni, et al. (1979, 1981), son los principales defensores del origen mesonéfrico del primordio gonadal. Los autores proponen que al formarse el mesonefros las células epiteliales de los túbulos mesonéfricos se desdiferencian, y contribuyen de esta manera a la formación del primordio gonadal. Este sistema es lo que va a formar la parte que ellos llaman la rete intragonadal. Existen otros dos sistemas reticulares derivados del mesonefros que tienen una unión anatómica con la gónada pero que no contribuyen a su formación, estos sistemas son el sistema conectante, formado

por los túbulos mesonéfricos en el caso del ratón, y el sistema extragonadal, integrado por el conducto de Wolff en el caso del macho y el conducto de Müller en la hembra.

ii) Origen mesotelial del primordio gonadal.

Merchant (1975a, 1979). Merchant et al.(1984) en sus estudios realizados en rata y ratón principalmente y sus evidencias experimentales en pollo apoya fuertemente el origen mesotelial del primordio gonadal.

En un estudio autorradiográfico con timidina tritiada realizado en 1979 por Merchant, encontró que cuando la inyección de timidina tritiada se realizaba 24 horas antes de la observación, las células del epitelio interno de gónadas de embriones de rata de 12 días de gestación presentaban la marca de timidina tritiada en un 35%, mientras que solamente se marcaban el 15% de las células del epitelio celómico y el 20% de las células del mesénquima.

Cuando la inyección se realizó a los 12 días de gestación, se encontró que el marcaje variaba en el tiempo tanto en el epitelio celómico, como en el epitelio interno, y el mesénquima desde los 30 minutos hasta las 48 horas postinyección, mientras que el mesonefros se encuentra en proceso de degeneración celular.

A los 30 minutos se puede observar que el primordio gonadal se encuentra pobremente marcado estando en menor proporción el epitelio interno que el epitelio celómico y el mesénquima, que se encuentran en mayor proporción. A las 3 horas postinyección se observa que tanto el epitelio celómico

vez que éste se ha formado se encuentra directamente relacionado con la diferenciación temprana de la gónada, es decir, el epitelio interno en el testículo se separa del epitelio celómico, por lo que en vez de proliferar se diferencia en células de preSertoli que rodean a las CGP en los cordones seminíferos o testiculares.

Por el contrario, en el ovario la incorporación de células del epitelio celómico hacia el epitelio interno es continua, ya que, el ovario lleva a cabo una diferenciación más tardía, hasta que se forman los folículos primarios.

Estos resultados a primera vista parecen apoyar el modelo de diferenciación gonadal propuesto por Gruenwald (1942), Forbes (1942), Torrey, (1945), ya que, en el ovario parece presumible que existe una segunda proliferación del epitelio celómico. Pero en realidad lo que sucede es que el epitelio interno sigue en proliferación y el epitelio celómico sigue con la contribución de células al primero. En el ovario no existe una segunda proliferación sino que ésta es continua.

En el caso del testículo la diferenciación temprana lleva consigo que la proliferación mesotelial termine pronto.

En lo que se refiere al inicio del primordio gonadal con la contribución de células de origen mesonefrico, no es muy clara, ya que mientras la gónada se desarrolla, el mesonefros lleva a cabo procesos de degeneración masiva en las células que componen los túbulos mesonefricos. Evidencias experimentales por parte de Merchant et al (1984) en pollo

como el mesénquima se encuentran mucho más marcados, mientras que el epitelio interno se encuentra con una marca muy pobre. A las 6 horas del marcaje se observa que tanto el epitelio celómico como el mesénquima siguen siendo evidentes en su marca. Mientras que en el epitelio interno aumenta ligeramente la marca de timidina tritiada. Al observar la gónada a las 24 horas, ésta ya se ha diferenciado en el testículo, las células del epitelio interno están dispersamente marcadas, mientras que en el epitelio celómico y en el mesénquima la marca es muy clara. En el ovario, a las 30 horas postinyección se encuentra gran incorporación de timidina tritiada en células del epitelio interno, principalmente cerca del epitelio celómico, aunque en las células más profundas el marcaje es pobre.

La primera evidencia que resalta de estos resultados es que los distintos tipos celulares presentan un ciclo celular diferente. Así tenemos, que en el epitelio celómico y el mesénquima el ciclo celular es corto; mientras que el epitelio interno tiene un ciclo celular más largo.

Otras conclusiones que se pueden sacar de estos resultados son que tanto el epitelio celómico y el mesénquima, contribuyen a la formación del blastema gonadal, éste lleva a cabo una diferenciación temprana, formando después el epitelio interno, que dará origen a los cordones sexuales presentes en la gonada indiferenciada.

El hecho de que el testículo presente menor incorporación de timidina tritiada en el epitelio interno una

contradicen el origen mesonéfrico del primordio gonadal. Estos autores inhibieron el desarrollo del mesonefros, para determinar el efecto que tiene éste en la formación del primordio gonadal. El estudio indica que la gónada se establece en ausencia del mesonefros. Por lo tanto, al menos en aves es muy claro que el blastema gonadal se origina de la proliferación y condensación de las células mesoteliales y mesenquimáticas, sin ninguna contribución celular por parte del mesonefros.

4. Diferenciación sexual de la gónada.

La diferenciación sexual de la gónada se expresa de acuerdo al sexo genético del individuo, que en el caso de los mamíferos corresponde a un sexo cromosómico. Así tenemos, que si el individuo es XY, la gónada se diferencia hacia un testículo. Mientras que si el individuo es XX, entonces la gónada se diferencia hacia un ovario (Kofman, et al., 1984).

4.1. Diferenciación del testículo.

La diferenciación del testículo se inicia cuando los cordones seminíferos se separan del epitelio celómico por acción del mesénquima, dando como resultado la formación de la túnica albugínea. Por lo tanto, los cordones seminíferos, se dice, que se ubican en la médula de la gónada. Los cordones están formados por dos tipos celulares; las células de Sertoli y las CGP, éstas últimas se diferenciarán a espermatozoides en la gónada adulta. Las células de Sertoli se diferencian estructuralmente en el testículo fetal, esta

diferenciación se inicia cuando las células de Sertoli presentan una gran adhesión entre ellas con la subsecuente formación de zonas adherentes, característica de los cordones seminíferos bien formados, con una membrana basal rodeándolos (Magre y Jost, 1980). Las células de Sertoli presentan otro tipo de diferenciación, además de la estructural; diferenciación fisiológica, ésta a nivel ultraestructural se determina por la presencia de un retículo endoplasmático rugoso característico de las células secretoras de polipéptidos. En este caso el polipéptido que secreta la célula de Sertoli es la hormona inhibidora del conducto de Müller (HIM) (Merchant, 1975b., Magre y Jost, 1980). Algunos trabajos realizados con gónadas de rata cultivadas in vitro con suero de bovino fetal (SBF) sugieren que la diferenciación estructural y fisiológica de las células de Sertoli son procesos independientes. Estos resultados están basados en el hecho de que los testículos cultivados con SBF no presentan cordones seminíferos bien formados, por la ausencia de una membrana basal que los rodee. Las gónadas que presentan este tipo de desarrollo in vitro, tienen la capacidad de secretar la HIM (Magre, et al., 1980, 1981, 1984., Magre y Jost, 1984).

Un tercer tipo celular presente en el testículo fetal es la célula secretora de esteroides; célula de Leydig. Este tipo celular se puede distinguir ultraestructuralmente por la presencia de mitocondrias tubulares y un retículo endoplasmático liso, características de las células

secretoras de esteroides. El esteroide característico de esta célula es la testosterona (Magre y Jost. 1980. George y Wilson. 1979). Al igual que las células de Sertoli la diferenciación fisiológica de las células de Leydig es independiente de la diferenciación estructural (Patsuadi. et al. 1984).

La diferenciación fisiológica del testículo está fuertemente relacionado con la diferenciación fenotípica del macho. Así tenemos, que las células de Sertoli secretan la HIM que tiene como función el inhibir el desarrollo del conducto de Müller característico de la hembra. Este fenómeno está relacionado con la desintegración de la membrana basal que separa al epitelio del conducto del mesénquima que lo rodea. El conducto se desorganiza y las células empiezan a autofagocitarse hasta que se desaparecen por completo (Josso y Picard. 1986).

Las células de Leydig secretan testosterona que tiene como órganos blanco al conducto de Wolff y a los genitales externos indiferenciados. En el caso del conducto de Wolff, la testosterona tiene como efecto que se diferencie hacia el epididimo, vaso deferente, vesícula seminal y conducto eyaculador. En los genitales externos indiferenciados es necesario que el mesénquima que los conforma, presente la enzima 5 α reductasa que es capaz de transformar la testosterona en dihidrotestosterona. Este esteroide tiene su mecanismo de acción en el epitelio de los genitales externos trayendo consigo la virilización de éstos. Así tenemos, que

el tubérculo genital dá origen al glande, el pliege genital al rafe, y la prominencia genital al escroto. En ausencia de las tres hormonas anteriores el tracto genital y los genitales externos se diferencian en dirección femenina (Wilson et al. 1981).

4.2. Diferenciación del Ovario.

La diferenciación y morfogénesis del ovario se inicia más tardiamente con respecto a la diferenciación y morfogénesis del testículo. Así tenemos, que las CGP llevan a cabo una diferenciación fisiológica al iniciar la meiosis (McLaren, 1985). En este estado se ha determinado la síntesis de glicoconjugados en CGP de hembra en la vida fetal que están ausentes en las CGP de macho a la misma edad, y que sólo se presentan en ellas hasta el inicio de la espermatogénesis en la pubertad (de Fellici et al. 1985).

Por otro lado, los ovocitos ahora formados inician el proceso de formación de folículos. Se propone que éstos sintetizan una molécula que se une a la membrana plasmática que es capaz de inducir la formación de folículos (Müller y Urban. 1981), es decir, inducen la morfogénesis del ovario.

Merchant (1975a) Merchant y Centeno (1981) al estudiar la morfogénesis del ovario en ausencia de CGP, encuentran que en estas condiciones la fragmentación de los cordones ovigeros no se lleva a cabo, es decir, no hay formación de folículos en ausencia de CGP. Estas células además de inducir la formación de folículos en el ovario, permite también la citodiferenciación de las células secretoras de esteroides,

ya que, también en ovarios estériles no hay indicios de actividad endocrina en ausencia de CGP (Merchant. 1976).

4.2.1. Inducción de la Meiosis.

Según Wilkins (1986), "la meiosis son dos divisiones nucleares sucesivas que acompañan la formación de gametos en organismos diploides y que reducen el estado diploide en las células precursoras de los gametos al estado haploide en los gametos"

En el ovario las CGP entran en meiosis durante la vida fetal y permanecen en diploteno de la profase de la primera división meiótica hasta la pubertad en que los ovocitos maduran completando la meiosis.

Byskov (1978b, 1979) propone que en las gónadas de ambos sexos se liberan dos sustancias; una sustancia que induce la meiosis (SIM) y otra sustancia que evita la meiosis (SEN). El autor (op cit.) propone que tanto en el testículo como en el ovario el inicio de la meiosis es por la acción de una sustancia liberada por el mesonefros que induce a las CGP a entrar a la profase de la primera división meiótica.

En el caso del testículo fetal donde las CGP no entran en meiosis, se supone que los cordones seminíferos liberan la SEM y en el caso de que algunas CGP queden fuera de los cordones seminíferos la SIM originaria del mesonefros actúa. Algunos experimentos recientes de disgregación reagregación de gónadas fetales han demostrado que las CGP que quedan fuera de los cordones seminíferos entran en meiosis en ausencia del mesonefros, y por lo tanto de la SIM (Escalante,

comunicación personal)

En el caso del ovario, Byskov (1978b, 1979) propone que las CGP que entran en meiosis por efecto de la SIM se quedan bloqueadas en diploteno de la profase de la primera división meiótica, por efecto de la SEM liberada por las células prefoliculares, que empiezan a rodear a los ovocitos para formar los folículos.

Recientemente Upadhyay y Zamboni, (1982) al estudiar la glándula suprarrenal en ratón fetal encuentran en ella la presencia de CGP ectópicas que iniciaron la meiosis en ambos sexos. La meiosis la detectaron como tal por la presencia del complejo sinaptonémico. En ratones postnatales el número de CGP ectópicas disminuyeron con respecto a las encontradas en animales de vida intrauterina. Las CGP después de entrar en meiosis tuvieron la capacidad de formar folículos unilaminares en ambos sexos donde las presuntas células foliculares son células de la corteza o células de la médula según la posición de las CGP en la glándula suprarrenal.

4.2.2. Foliculogénesis.

Durante la diferenciación del ovario, un evento directamente relacionado con la meiosis, es la formación de los folículos. Los cuales los podemos definir como ovocitos independientes rodeados por un epitelio folicular y una lámina basal. La foliculogénesis la podemos definir como el mecanismo por el cual los ovocitos que se encuentran en contacto muy íntimo terminan por separarse hasta formar folículos. Así tenemos, que la interpretación de este

mecanismo depende del autor que lo proponga y del origen que se suponga de las células que forman el epitelio folicular.

Gropp y Onho (1966) y Odor y Blandau (1969a) suponen que el bastema gonadal tiene su origen en células derivadas del mesénquima. Este tipo celular cuando el ovario ya se ha establecido rodea a los ovocitos que se encuentran en la profase de la primera división meiótica, formando unas estructuras en forma de cordón llamados cordones ovigeros. Durante el desarrollo del ovario los cordones ovigeros se van fragmentando hasta que los ovocitos se van individualizando formando los primeros folículos en la zona medular del ovario, es decir, cercana al rete ovarii. Los últimos folículos se forman en la corteza ovárica.

Peters y Pedersen (1967) también proponen un origen mesenquimático de las células foliculares. Estos autores suponen que los ovocitos no están rodeados por cordones ovigeros, sino que los ovocitos se encuentran embebidos en el mesénquima siendo rodeados en forma individual, formando así los folículos.

Byskov y Lintern-Moore (1973) y Byskov (1975) proponen un origen mesonéfrico de las células foliculares, parten de que los primeros folículos se empiezan a individualizar en la médula, cerca del rete ovarii.

Según sus observaciones el rete ovarii es el contribuyente de las células que formarán el epitelio folicular. El mecanismo que suponen es que estas células por movimiento ameboideo empiezan a penetrar hacia el ovario.

(Byskov, 1981), y a rodear a los ovocitos en forma individual hasta formar los folículos; mientras que los ovocitos que se localizan en la corteza del ovario se integran a los folículos sólo cuando las células ameboideas provenientes del rete ovarii los rodeen.

Upadhyay et al. (1979) proponen un origen mesonéfrico de las células foliculares, pero el mecanismo de formación de folículos es diferente al propuesto por Byskov y Lintern-Moore (1973) y Byskov (1975).

Estos autores proponen que los ovocitos se encuentran rodeados por cordones ovigeros que se fragmentan por invasión de tejido estromático y de vasos sanguíneos. Los ovocitos que en un principio estaban íntimamente unidos se individualizan cuando que son integrados en folículos, primero en la parte medular y después en la corteza.

Merchant (1978, 1984) propone que las células foliculares se originan del blastema gonadal. Las células del epitelio interno rodean en un principio a los ovocitos formando los cordones ovigeros. Estos cordones son fragmentados por invasión del tejido estromático y de los vasos sanguíneos. Los ovocitos son individualizados primeramente en la región medular siendo éstos los primeros folículos formados. La fragmentación total de los cordones en la región cortical se inicia más tardíamente, siguiendo el mismo mecanismo que en la médula.

Peters (1978) propone un origen dual de las células foliculares, es decir, de origen mesonéfrico y de origen

mesotelial.

"Las células del rete que atraviesan por movimientos ameboideos la gónada se adhieren a la superficie de los ovocitos e inician la formación de folículos. Este proceso se inicia en la médula involucrando cada vez más ovocitos. Los ovocitos que se encuentran localizados junto al epitelio celómico, inducen a éste a proliferar y diferenciarse en células foliculares"

5. Foliculogénesis in vitro

A continuación se presentan algunos antecedentes sobre los trabajos realizados en diferenciación del ovario in vitro principalmente en rata y ratón.

Odor y Blandau (1971), al trabajar con ovarios de ratón de 16 días de gestación cultivados durante 45 días encuentran que la histogénesis y la citodiferenciación del ovario se lleva a cabo normalmente a pesar del prolongado tiempo de cultivo. Esto es, hay formación de folículos unilaminares y en algunos casos multilaminares. Los ovocitos aumentaron de tamaño desde el inicio de cultivo hasta su término. Lo que corresponde al mecanismo que sucede in vivo. La formación de la zona pelúcida fué determinada después de 3 días de cultivo.

Nikitin y Byskov (1981) al trabajar con complejos urogenitales de ratón de 13, 15 y 18 de días de gestación, encontraron que el tejido mesonéfrico presenta una influencia relacionada con la edad sobre la diferenciación y crecimiento

de las gónadas y las CGP en ambos sexos in vitro. En gónadas de ratón de 13 días de gestación el mesonefros estimula el inicio de la meiosis en las CGP del testículo. Mientras que en el ovario permite la sobrevivencia de las CGP. A los 18 días de gestación el mesonefros inhibe el inicio de la meiosis de las CGP en el testículo. Mientras que en el ovario no permite la proliferación de las CGP.

Por lo que respecta a la formación de folículos, los autores (op cit.) encuentran que en los ovarios cultivados sin mesonefros no presentan muchos folículos, según ellos, lo consideran debido a la insuficiencia de células foliculares procedentes del mesonefros que permitan la sobrevivencia de las CGP y después encerrarlas en folículos.

Stein y Anderson (1981) al trabajar con ovarios de rata de 13 a 17 días de gestación cultivados in vitro, encuentran que el inicio de la diferenciación morfológica y la actividad meiótica son independientes del mesonefros. Ellos proponen que la interacción local entre las células somáticas y las CGP lleva al establecimiento de un ambiente crítico para la regulación de la meiosis en el ovario de rata fetal.

Taketo y Koide (1981) al trabajar con gónadas indiferenciadas de ratón fetal cultivadas in vitro, encuentran que las gónadas de ratón de 10 días de gestación cultivadas durante 10 días, no llevan a cabo la diferenciación en testículo o en ovario; mientras que al cultivar gónadas de ratón de 11 días de gestación, éstas sí se diferencian en un ovario o testículo de acuerdo a su sexo

genético. Por lo tanto, los autores (op cit.) proponen que los 10 días de gestación en el ratón es el periodo crítico para la diferenciación de la gónada.

MacKay y Smith (1986) al trabajar con sistemas urogenitales de ratón indiferenciado cultivados in vitro durante 6 ó 7 días, encuentran que en el ovario la diferenciación morfológica no se completa, ya que, se detiene en la fase de fragmentación de cordones ovígeros. Estos investigadores realizaron la correlación entre el desarrollo de las gónadas cultivadas con suero de ternera fetal (STF) y sin este suero. En el ovario no hubo ninguna diferencia aparente. En el testículo cultivado con STF la formación de los cordones seminíferos se vió interrumpida, cosa que no sucedió en los cultivos de testículos sin este suero.

6. Objetivos.

Con base en los antecedentes arriba mencionados, los objetivos propuestos para la realización del presente trabajo fueron los siguientes:

- 1) Describir los eventos celulares y morfogénéticos que llevan a la formación de los folículos primordiales.
- 2) Determinar si el mesonefros tiene algún efecto sobre la foliculogénesis en el ovario.
- 3) Determinar el efecto del suero sobre la foliculogénesis in vitro.

II. MATERIALES Y METODOS.

1. Obtención del Material.

El estudio se realizó con hembras preñadas de ratón de la cepa CD-1 con 15 y 17 días de gestación y con 1, 3 y 5 días postparto. La presencia del tapón vaginal fué considerado como día cero de gestación. El nacimiento de los ratones en nuestra colonia es a los 18 días de gestación, el día del nacimiento fué considerado como día cero postparto.

Se colocaron 3 ó 4 hembras con un macho en una jaula durante toda la noche, en la mañana siguiente se revisó la presencia del tapón vaginal, separando en una jaula aparte las hembras que lo presentarán.

Las hembras preñadas de 15 y 17 días de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical. Todos los procedimientos realizados después de la muerte de la madre fueron hechos en condiciones estériles, para esto el abdómen de la madre fué esterilizado con benzal. Los productos fueron aislados con el útero, cerca de la llama de un mechero y colocados en una caja de Petri. Los fetos se aislaron del útero en una campana de flujo laminar de la siguiente manera; con unas tijeras finas se cortó el útero a todo lo largo para exponer el conjunto placenta-feto. Cada feto fué separado de la placenta con unas tijeras finas y unas pinzas y transferidos a una caja de Petri con medio Leivobintz-15 (L-15) de Gibco. Cada feto fué colocado en una base de hule

para realizarle un corte diagonal desde las vértebras dorsales hasta la base de la cola, dejando expuesto el sistema urogenital, para ser observados al microscopio de disección (MD).

Se utilizaron dos criterios para distinguir un ovario de un testículo: 1) En el testículo la presencia de cordones seminíferos le dá la apariencia de tener estrias, presenta abundantes vasos sanguíneos y es de forma redondeada. Al ovario, por el contrario, penetran pocos vasos sanguíneos y no presenta estrias, su forma es parecida a la de un frijol. A los 15 días de gestación el mesonefros empieza a envolver al ovario, de los 17 días de gestación en adelante el mesonefros envuelve completamente al ovario. 2) otro criterio, es la posición anatómica de las gónadas. Los testículos han descendido a la posición inguinal a los lados de la vejiga urinaria. Los ovarios se encuentran dorsales a los riñones.

2. Cultivo de Organos.

Ya identificado el sistema urogenital de la hembra, se procedió a su aislamiento, (Hernández, 1985, Byskov, 1978 a, b) realizándose esto con unas microtijeras. De inmediato se colocó en L-15 para su lavado. El cultivo de los órganos se realizó sobre un filtro millipore de 1 μ m de abertura de poro, flotando sobre medios de cultivo con los siguientes componentes; a) Medio McCoy 5a modificación (Microlab); 10% de suero de cordón umbilical humano (SCUH); 200u/ml de penicilina; y 200 μ g/ml de estreptomycin (Microlab). Este

medio de cultivo fue codificado para el trabajo como MSA. b) Medio McCoy; 200u/ml de penicilina; y 200ug/ml de estreptomycin sin adición de suero (SCUH). Este medio se codificó como MA.

Para realizar los cultivos se llevo a cabo la siguiente estrategia; se cultivaron ovarios con mesonefros y ovarios sin mesonefros en cajas de Petri de 35 mm con los medio de cultivo MSA y MA en una estufa adicionada con humedad a saturación (100%) y 5% de dióxido de carbono en la atmósfera de la estufa, durante 6 días a 37xC.

Ovarios de 15 y 17 días de gestación y 1, 3 y 5 días postparto sirvieron como grupos controles.

3. Procesamiento del Material Biológico.

Después del tiempo de cultivo, los órganos fueron procesados para su estudio histológico y ultraestructural de la siguiente manera:

a) Fijación.

Los órganos fueron fijados en solución de Karnowsy (Karnowsy, 1965) a 4°C durante 1 hora, lavados en amortiguador de cacodilato de sodio a 4°C durante 1 hora, y postfijados en tetraóxido de osmio, (Zeterquist 1956) a 4°C durante 1 hora.

b) Deshidratación.

Los órganos postfijados en tetraóxido de osmio se lavan varias veces con agua destilada y se inicia la deshidratación;

etanol al 70% 10 minutos

etanol al 80% 10 minutos
 " " 90% 10 " "
 " " 100% 10 " " (2 veces).

Después de deshidratar en etanol absoluto los órganos se pasaron por óxido de propileno 2 veces durante 20 minutos cada uno.

c) Preinclusión e Inclusión.

El material fué preincluido en óxido de propileno-Epón 812 1:1 durante 2 horas, en óxido de propileno-Epón 812 1:2 durante 2 horas y en Epón 812 puro durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente fué incluido en Epón 812 puro durante 24 horas a 60°C.

- Cortes Para Estudio Histológico.

a) Tinción en azul de toluidina.

Se obtuvieron cortes semifinos de 150 a 240 um de grosor con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo MT-I de Sorvall.

Los cortes fueron teñidos por flotación con azul de toluidina caliente. Se lavaron en agua destilada. Se viró el color en alcohol del 96° y rápidamente se pasaron por agua destilada. Por último se montaron en un portaobjetos para su observación al microscopio de luz (ML).

b) Impregnación argentófila (Merchant, 1975a, modificado de DeMartino y Zamboni 1967).

Se obtuvieron cortes seriados de aproximadamente 150 a 190 um de grosor con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo MT-I de Sorvall.

Los cortes fueron tomados con un anillo de Narinozzi por

tensión superficial, y colocados en una caja de Petri con agua destilada.

Para la tinción, los cortes fueron procesados de la siguiente manera:

- 1) ácido peryódico al 1% durante 30 minutos.
- 2) lavar en agua destilada unos minutos.
- 3) solución preparada y filtrada de las soluciones madre de:

Borato de sodio al 2% 1.25 ml

Nitrato de plata al 10% 1.25 ml

Metenammina al 3% 10.00 ml

a 60°C hasta que los cortes adquieran un color pardo tábaco.

- 4) lavar en agua destilada unos minutos.
- 5) pasar rápidamente a tiosulfato de sodio al 3%.
- 6) lavar en agua destilada unos segundos.
- 7) montar en un portaobjetos colocando éste en una plancha caliente, para su observación al ML.

- Cortes Para Estudio Ultraestructural.

Se obtuvieron cortes finos de 90 a 150 nm con cuchillas de vidrio en un microtomo LKB III.

Los cortes obtenidos fueron colocados en una rejilla de 500 mallas para su procesamiento, siendo de la siguiente manera:

- 1) se colocaron en una gota de acetato de uranilo de 10 a 15 minutos.
- 2) se lavaron las rejillas con agua destilada unos minutos.
- 3) se eliminó el exceso de agua con un papel filtro,

posteriormente se colocaron en una gota de citrato de plomo durante 1 minuto.

- 4) se lavaron las rejillas con agua destilada por varios minutos. Después se eliminó el exceso de agua, para luego guardarse en una caja de Petri. La observación se realizó con la ayuda de un microscopio electrónico MT-I Carl Zeisz.

4. Conteo de Ovocitos.

Se realizó un conteo de ovocitos en tres etapas diferentes de la morfogénesis del ovario: A) Ovocitos agrupados íntimamente en colonias rodeadas por cordones ovigeros. B) Colonias de ovocitos que se encuentran separados por la invasión de células de los cordones ovigeros. y C) Ovocitos asociados en folículos. El conteo de células se realizó con la ayuda de un microscopio Ultraphot Carl Zeisz a un aumento de $10 \times$ por $25 \times$ con una lente intermedia de $1.25 \times$.

III. RESULTADOS.

1. Foliculogénesis in vivo.

-Embriones de 15 días.

En esta fase de desarrollo del ovario podemos observar que las CGP están entrando al proceso de ovogénesis, ya que la mayoría de ellas están en leptoteno de la profase de la primera división meiótica. En las CGP que no han llevado a cabo la meiosis se pueden distinguir claramente sus características tales como: células de gran tamaño, tienen un citoplasma muy claro rico en mitocondrias y un núcleo vesicular muy grande con uno o dos nucleólos generalmente.

Otro tipo celular del ovario es el epitelio externo que lo recubre; es de tipo monoestratificado, sus células presentan un núcleo que ocupa la mayor parte del citoplasma, con uno o más nucleólos.

Un tercer tipo celular es el epitelio interno, sus células presentan un núcleo grande basófilo generalmente con un nucleólo, la proporción entre núcleo y citoplasma es muy pequeña.

Durante esta fase, la organización que presenta el ovario se caracteriza por la presencia de CGP que en su mayoría se encuentran agrupadas íntimamente en colonias. Rodeando a estas colonias se encuentra el epitelio interno formando cordones ovigeros (fig 1). Los cordones son fragmentados por invasión de mesénquima y de vasos sanguíneos de la región

mesonéfrica, junto a la médula de la gónada. En esta región podemos observar claramente la conexión con el mesonefros formando el complejo ovario- rete ovarii (fig 2) .

Cuantitativamente se observa que existe un 71% de ovocitos unidos íntimamente, un 27% de ovocitos separados por el epitelio interno y un 2% de folículos formados (gráfica 1 y 6).

-Embriones de 17 días.

En esta fase de desarrollo el ovario empieza a ser envuelto por el mesonefros formando la cápsula ovárica. Los ovocitos han completado la profase de la primera división meiótica, quedándose en el estado dictiado, el cual se caracteriza por la descondensación de los cromosomas y la presencia del nucléolo dando la apariencia de que los ovocitos no están en meiosis. Por lo tanto, los podemos distinguir por su citoplasma claro rico en mitocondrias, núcleo grande y redondo, generalmente con uno o dos nucléolos. El epitelio externo es monoestratificado cúbico, las células con un núcleo muy grande que ocupa la mayor parte del citoplasma con uno o dos nucléolos. Las células del epitelio interno son de tipo escamoso con núcleo grande basófilo con un nucléolo muy evidente, el citoplasma no se distingue claramente por el gran tamaño del núcleo. En la parte superior de la gónada por abajo del epitelio externo se observa mesénquima proveniente del rete ovarii, además del que se encuentra fragmentando los cordones ovígeros.

Durante este tiempo la organización que presenta el

El mesénquima que separara a los folículos es de tipo compacto.

Durante esta fase la organización del ovario se caracteriza por la existencia de una gran cantidad de folículos primordiales tanto en la región cortical como en la región medular, siendo los de la región medular considerablemente mayores. Se observa claramente la separación de los folículos por efecto del mesénquima (fig 6).

Cuantitativamente hay un 22% de ovocitos unidos íntimamente, un 26% de ovocitos separados por el epitelio interno y un 52% de folículos formados (gráficas 5 y 6).

2. Foliculogénesis in vitro.

-Ovarios de embrión de 15 días cultivados durante 6 días.

Los ovocitos han aumentado ligeramente de tamaño con respecto al inicio del cultivo. Las características citológicas son las mismas que las que se observan in vivo. El epitelio folicular que rodea a los ovocitos es de tipo escamoso y en algunos de tipo cúbico. El tejido mesenquimático es el que fragmenta los cordones ovigeros y separa los folículos primordiales.

1) con suero (SCUH).

Después de 6 días de cultivo el ovario está organizado de la siguiente manera: la fragmentación de los cordones ovigeros es más evidente por la invasión del mesénquima. Dentro de los cordones observamos ovocitos en estrecho

contacto celular, mientras que la mayoría se encuentran como ovocitos separados y muy pocos folículos formados (fig 7).

Cuantitativamente se observa que hay un 34% de ovocitos unidos íntimamente, un 50% de ovocitos separados por el epitelio interno y un 18% de folículos formados (gráficas 7 y 8).

ii) sin suero (SCUH).

Los ovarios cultivados sin suero presentan una gran mayoría de ovocitos integrados en folículos, cuyas células son derivadas del epitelio interno. Cada folículo está individualizado por la invasión del mesénquima. Muy pocos ovocitos se encuentran sin formar folículos (fig 8).

Cuantitativamente existe un 14% de ovocitos unidos íntimamente y un 16% de ovocitos separados por el epitelio interno y un 70% de folículos formados (gráficas 9 y 10).

iii) con mesonefros.

Las características citológicas de los componentes tisulares de la gónada son las mismas que las encontradas in vivo. Por lo que respecta al conducto de Müller, se observa que algunas células epiteliales se han diferenciado hacia células ciliadas y secretoras, características del oviducto.

iv) sin mesonefros.

No existe diferencia alguna en la organización del ovario y en las características citológicas de los componentes celulares de la gónada con los ovarios cultivados con mesonefros.

-Ovarios de embrión de 17 días cultivados durante 6 días.

Al final del cultivo se observa que los ovocitos han aumentado ligeramente de tamaño, con respecto a la talla observada durante el inicio del cultivo.

Las características citológicas de los ovocitos son las mismas que las de ovarios cultivados a los 15 días de gestación. El epitelio folicular es de tipo cúbico y en algunos de tipo escamoso. El mesénquima separa los folículos primordiales

i) con suero (SCUH).

Se observa que el epitelio interno rodea a los ovocitos formando folículos bien definidos, éstos son individualizados por acción del mesénquima. Algunos ovocitos no se han individualizado completamente (fig 9).

Cuantitativamente existe un 11% de ovocitos unidos íntimamente, un 38% de ovocitos separados por el epitelio interno y un 51% de folículos formados (gráfica 11).

ii) sin suero.

Se observa que existen folículos formados bien definidos, rodeados por el depósito de una membrana basal. En algunas zonas se observa que los ovocitos no se han individualizado todavía; están en estrecho contacto celular, y otras zonas los ovocitos están separados (fig 10).

Cuantitativamente hay un 16% de ovocitos unidos íntimamente y un 32% de ovocitos separados por el epitelio interno y un 52% de folículos formados (gráfica 13).

iii) con mesonefros.

Se observa que en estas condiciones existe necrosis. En las regiones en las que no existe necrosis, se observa que las características citológicas de las células de la gónada y del conducto de Müller son las mismas que las encontradas in vivo y en ovarios de 15 días de gestación cultivados con mesonefros, respectivamente.

iv) sin mesonefros.

Al comparar las regiones no necrosadas del ovario cultivado con mesonefros con los ovarios sin mesonefros no se encuentra diferencia alguna.

3. Estudio Ultraestructural.

Se realizaron estudios ultraestructurales en las distintas etapas del proceso de la foliculogénesis estudiado in vitro.

A nivel ultraestructural se observa que el citoplasma de los ovocitos es rico en ribosomas libres; en algunos casos unidos entre sí formando polirribosomas y en otros unidos a el retículo endoplasmático dándole el aspecto de rugoso, el cual se encuentra muy desarrollado al igual que el complejo de Golgi. También en el citoplasma se llegan a observar algunas vesículas de núcleo denso características de las CGP. Las mitocondrias presentan crestas de tipo vesicular. El núcleo presenta un nucléolo de tipo esponjoso. En la membrana plasmática se observan algunas microvellosidades.

Las células del epitelio interno presentan en su citoplasma gran cantidad de ribosomas unidos entre sí

formando polirribosomas, dando al citoplasma un aspecto ópaco. También los ribosomas están unidos al retículo endoplasmático. Las mitocondrias son pequeñas y presentan crestas laminares. Además en el citoplasma se observan vesículas ricas en lípidos que fueron extraídos durante el proceso de deshidratación. El núcleo presenta cromatina densa enmascarándose entre ésta el nucléolo.

El citoplasma del mesénquima presenta ribosomas libres y muy pocas polirribosomas. El retículo endoplasmático rugoso se encuentra muy desarrollado al igual que el complejo de Golgi. Las mitocondrias presentan crestas de tipo laminar. El núcleo presenta uno o varios nucléolos.

-Contacto celular íntimo.

En esta fase se observa que los ovocitos se encuentran fuertemente asociados en un contacto celular muy íntimo, siendo rodeados por células del epitelio interno (fig 11), el cual se separa del mesénquima por una lámina basal. Este tipo celular se encuentra separando a los cordones ovigeros.

-Separación de ovocitos.

La separación de los ovocitos que se encuentran dentro de los cordones es realizada por prolongaciones de células del epitelio interno hasta que los ovocitos son individualizados (figs 11 y 12). Por otro lado, los cordones se siguen fragmentando por movimiento del mesénquima. Este movimiento es activo como lo demuestra la presencia de microtúbulos y microfilamentos en dirección paralela (fig 13). La fragmentación prosigue hasta que los cordones ovigeros son

reducidos a dos ovocitos rodeados por células foliculares, entre éstos y el mesénquima se observa la presencia de una lámina basal (fig 14).

-Individualización de los foliculos.

La individualización de los foliculos se lleva a cabo por acción del mesénquima. Entre éste y el folículo se observa el depósito de una lámina basal (fig 14 y 15).

Durante el proceso de la foliculogénesis se observa que existe un estrecho contacto celular entre las células epiteliales y los ovocitos y entre las mismas células foliculares, como lo demuestran la presencia de desmosomas y uniones comunicantes (fig 16).

FIGS. 1 y 2. Ovarios fetales de 15 días.

La gran mayoría de las CGP están en la profase de la primera división meiótica. Se observa claramente a los ovocitos en dos fases de la foliculogénesis. En A se observa a los ovocitos unidos íntimamente. En B se observa a los ovocitos separados por las células del epitelio interno que forman parte de los cordones ovigeros. En la figura 2 se observa la conexión del ovario con el rete ovarii (ro), en esa misma región se nota la invasión del mesénquima (m) hacia el ovario. El * indica la presencia de vasos sanguíneos. 312X

FIG. 3. Ovario fetal de 17 días.

Se observa a la cápsula ovárica (co) cubriendo al ovario. Las fases A y B de la foliculogénesis se notan claramente. La conexión del ovario con el rete ovarii (ro) así como la invasión de vasos sanguíneos (*) y de mesénquima (m) hacia el ovario es muy evidente. 160X

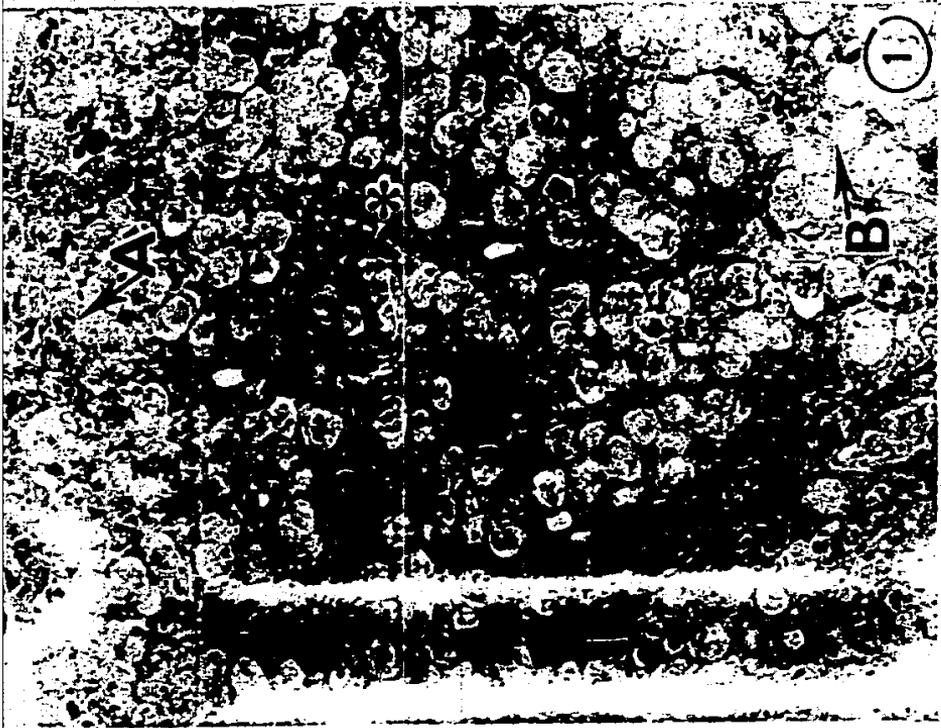




FIG. 4. Ovario de ratón de 1 día de nacido.

A esta edad se observa más claramente la presencia de la tercera etapa de la foliculogénesis (C). A y B también son evidentes. se observa una parte de la cápsula ovárica (co).
312X

FIG. 5. Ovario de ratón de 3 días de nacido.

En la fase A de la foliculogénesis se observa una reducción del número de ovocitos integrados en cordones ovigeros. Al igual que la segunda fase de la foliculogénesis (B). Por el contrario, el número de ovocitos integrados en folículos ha aumentado (C). Nótese la gran cantidad de mesénquima que separa a los folículos. 312X

FIG. 6. Ovario de ratón de 5 días de nacido.

Las fases A y B se observan en menor proporción que la fase C. Los folículos que se encuentran más crecidos corresponden a los de la zona medular. La cápsula ovárica (co) es evidente. 312X

CO

4



A

B

C

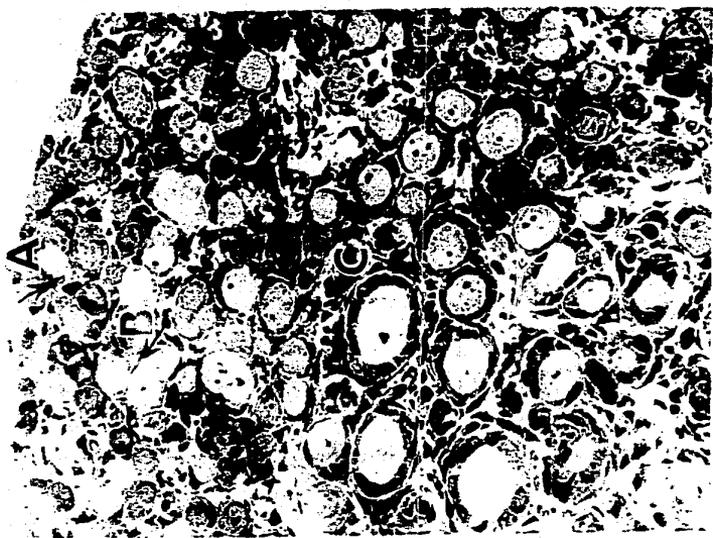
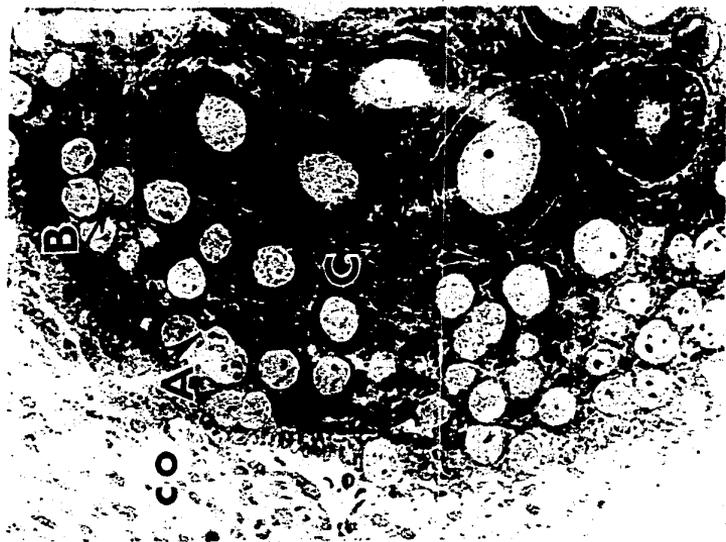


FIG. 7. Ovario fetal de 15 días, cultivado durante 6 días con suero.

La presencia de cordones ovigeros es muy evidente. Las fases A y B de la foliculogénesis predominan sobre la fase C. El * indica la presencia de vasos sanguíneos. 312X

FIG. 8. Ovario fetal de 15 días, cultivado durante 6 días sin suero.

En este caso se observa que la fase C prevalece sobre las fases A y B de la foliculogénesis. 312X

FIG. 9. Ovario fetal de 17 días, cultivado durante 6 días con suero.

Las fases B y C prevalecen sobre la fase A de la foliculogénesis. Obsérvese la gran cantidad de mesénquima compacto que separa a los folículos. 312X

FIG 10. Ovario fetal de 17 días, cultivados durante 6 días sin suero.

En este caso se observa, además de las tres etapas de la foliculogénesis, el depósito de la membrana basal (líneas negras rodeando a los folículos), la cual se hace evidente con la impregnación en plata. 312X

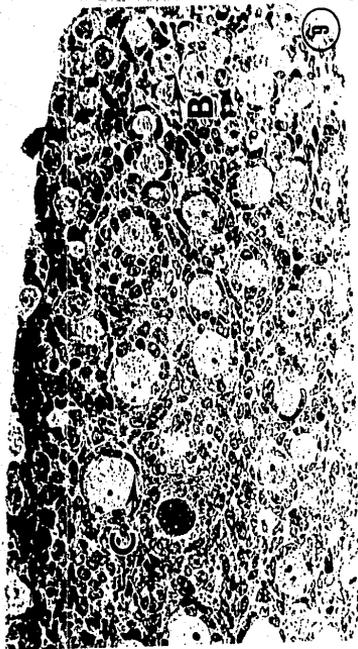
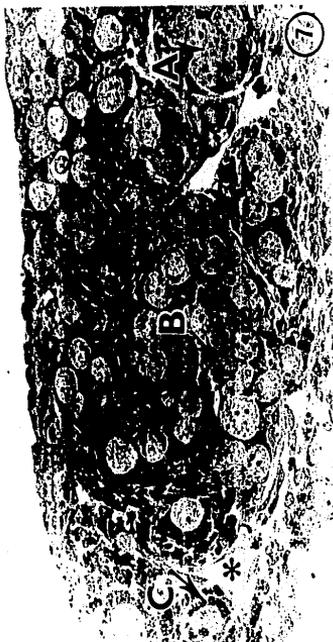
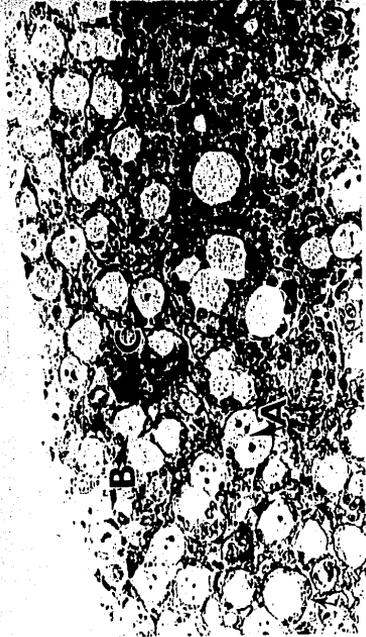


FIG. 11. Ovocitos integrados en cordones ovigeros.

Se observa claramente que los ovocitos unidos intimamente tienen sus membranas individualizadas. Por otro lado, también se observa la invasión de las células del epitelio interno (cei) entre los ovocitos. 1950X

FIG. 12. Se observa a dos ovocitos separados por prolongaciones (*) de células del epitelio interno. La flecha indica la presencia de un desmosoma entre una prolongación de una célula del epitelio interno y un ovocito. Obsérvese el complejo de Golgi bien desarrollado en el ovocito de la derecha. 7500X





FIG. 13. se observa a las células mesenquimáticas (cm) entre los cordones ovigeros, formados por ovocitos (ov) y células del epitelio interno (cei). Las flechas con asterisco nos indica una zona rica en reticulo endoplasmático rugoso y en complejo de Golgi en las células mesenquimáticas. Las puntas de flecha indican la presencia de la lámina basal, que separa a los cordones ovigeros del mesénquima. El círculo muestra una zona rica en microtúbulos y en microfilamentos (indicados en el recuadro). 1950X, el recuadro 28300X

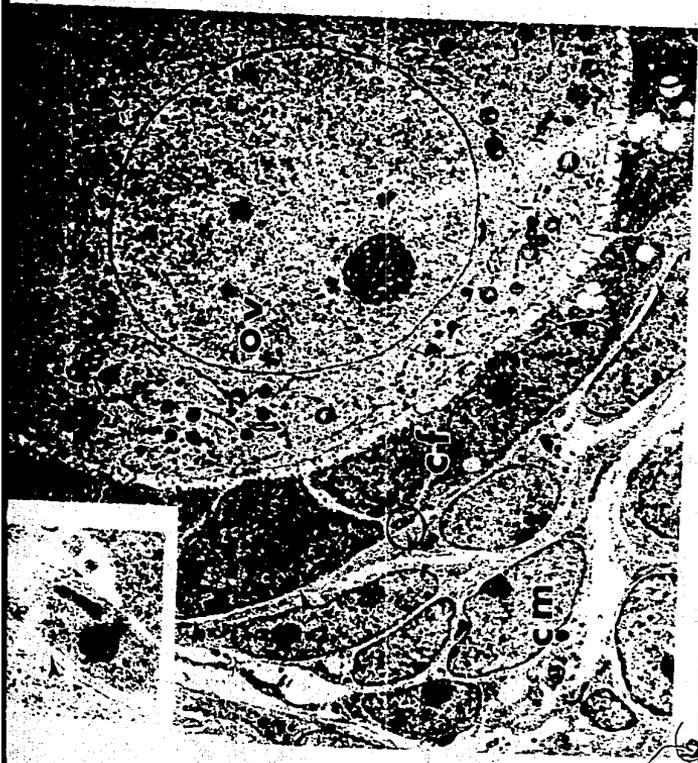
FIG. 14. Esta micrografia nos muestra la fragmentación de dos prefoliculos por efecto del mesénquima (cm). Las puntas de flecha nos indican la presencia de la lámina basal, que separa a las células foliculares (cf) del mesénquima. Los * nos muestran la presencia de la zona pelúcida. La flecha nos indica la presencia de un desmosoma entre una célula folicular y un ovocito. 7500X





FIG. 15. Esta micrografía nos muestra la presencia de un folículo individualizado. El círculo nos indica la presencia de la lámina basal (flecha recuadro) que separa a las células foliculares (cf) de las células mesenquimáticas (cm). 1950X, el recuadro 7500X

FIG. 16. Se observa la presencia de dos tipos de uniones celulares. Las flechas nos indican la presencia de desmosomas entre los ovocitos (ov) y las células foliculares (cf). La punta de flecha nos indica la presencia de una unión de comunicación entre dos células foliculares. 7500X

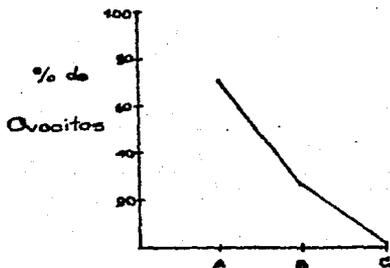




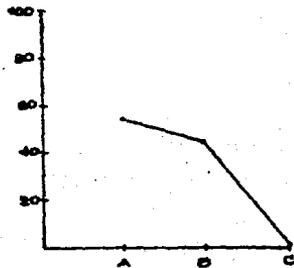
Gráficas 1-6. Ovarios controles.

Graf. 1; ovarios de 15 días de gestación. Graf. 2; ovarios de 17 días de gestación. graf. 3; ovarios de 1 día postparto. Graf. 4; ovarios de 3 días postparto. graf. 5; ovarios de 5 días postparto. A= ovocitos unidos intimamente. B= ovocitos separados por el epitelio interno. C= folículos formados. En la ordenada se encuentra el porcentaje de los ovocitos. En el caso de la gráfica 6, la absisa corresponde a la edad de los ovarios. i= 15 días de gestación. ii= 17 días de gestación. iii= 1 día postparto. iv= 3 días postparto. v= 5 días postparto.

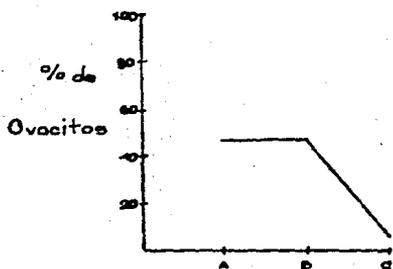
OVARIOS CONTROLES.



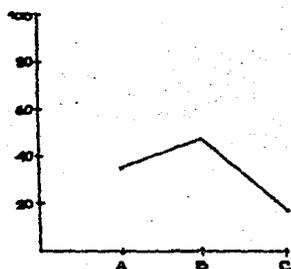
Gráfica 1



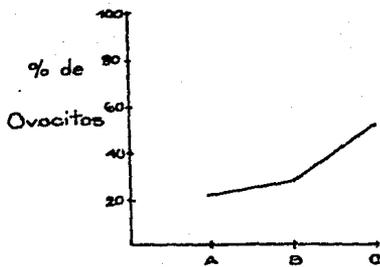
Gráfica 2



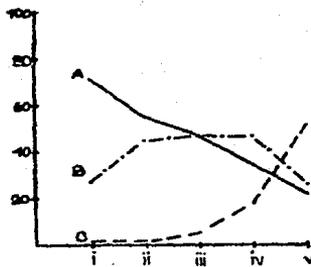
Gráfica 3



Gráfica 4



Gráfica 5



Gráfica 6

Gráficas 7-10. Ovarios de 15 días de gestación cultivados durante 6 días.

Graf. 7; ovarios sin mesonefros cultivados con SCUH. Graf.8; ovarios con mesonefros cultivados con SCUH. Graf. 9; ovarios sin mesonefros cultivados sin SCUH. Graf. 10; ovarios con mesonefros sin SCUH. A= ovocitos unidos intimamente. B= ovocitos separados por el epitelio interno. C= folículos formados. En la ordenada se encuentra el porcentaje de los ovocitos.

OVARIOS DE 15 DÍAS DE GESTACIÓN

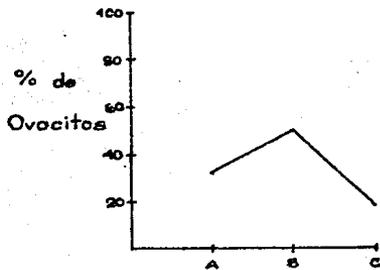


Gráfico 7

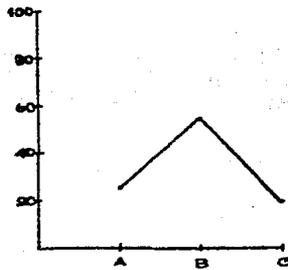


Gráfico 8

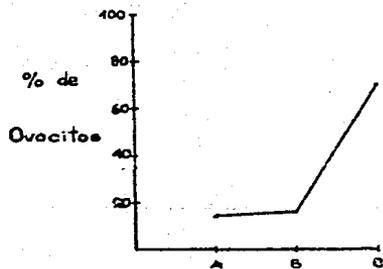


Gráfico 9

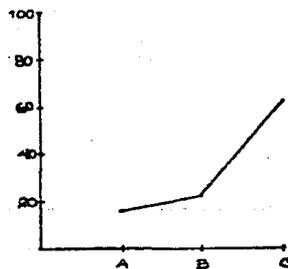


Gráfico 10

Gráficas 11-14. Ovarios de 17 días de gestación cultivados durante 6 días.

Graf. 11; ovarios sin mesonefros cultivados con SCUH. Graf. 12; ovarios con mesonefros cultivados con SCUH. Graf. 13; ovarios sin mesonefros cultivados sin SCUH. Graf. 14; ovarios con mesonefros cultivados sin SCUH. A= ovocitos unidos íntimamente. B= ovocitos separados por el epitelio interno. C= folículos formados. En la ordenada se encuentra el porcentaje de ovocitos. El * indica que esos órganos presentan mucha necrosis celular.

OVARIOS DE 17 DÍAS DE GESTACIÓN

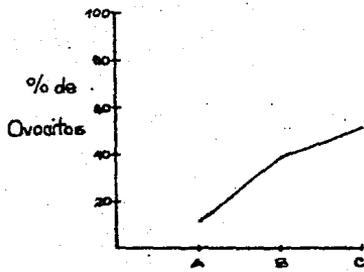


Gráfico 11

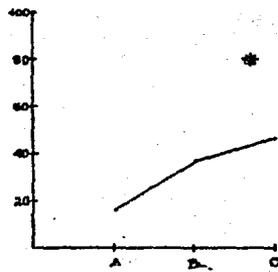


Gráfico 12

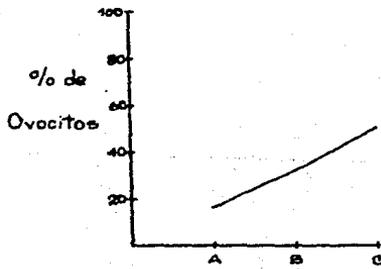


Gráfico 13

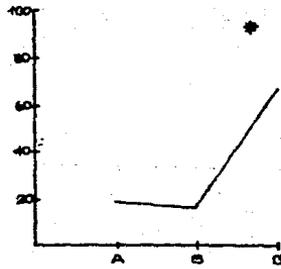


Gráfico 14

IV. DISCUSION.

1. Desarrollo del ovario in vivo.

Odor y Blandau (1969a) al trabajar con ratones encuentran que en ovarios fetales de 14 a 16 días de gestación, las CGP se encuentran agrupadas en colonias rodeadas por células foliculares. Estas al día 14 empiezan a formar prolongaciones membranales separando a las CGP. A los 15 días de gestación la mayoría de las CGP han iniciado la meiosis. La colonia de ovocitos rodeados por células foliculares empieza a tomar un aspecto como de cordón, esto debido a la invasión de vasos sanguíneos de la región hilar del ovario. A los 16 y 17 días de gestación la invasión de vasos sanguíneos se hace más acentuada. El número de ovocitos se reduce en las colonias de ovocitos rodeadas por células foliculares.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se correlacionan con los de Odor y Blandau (1969a). Pero, a diferencia de ellos que proponen que las células foliculares se originan del mesénquima. Merchant (1975a y 1979), Pelliniemi (1975 y 1976), Pelliniemi y Lautesala (1981) y Dang y Fouquet (1979) y el presente trabajo proponen que las células foliculares o del epitelio interno son de origen mesotelial.

Durante el desarrollo del ovario se observa que hay una serie de eventos morfogénéticos que involucra a todos los tipos celulares presentes en él. Así tenemos que a los 15

días de gestación los ovocitos se encuentran unidos íntimamente, todos ellos rodeados por células del epitelio interno. Con la invasión del mesénquima y de los vasos sanguíneos los grupos de ovocitos rodeados por el epitelio interno se fragmentan dando origen a los cordones ovígeros. Mientras que las células epiteliales internas separan a los ovocitos en la médula del ovario. En esta misma región, el mesénquima sigue fragmentando los cordones ovígeros. En estados más avanzados como son 1, 3 y en especial en 5 días postparto, los primeros folículos se forman en la región medular del ovario cercana al rete ovarii, y los últimos folículos se forman en la región de la corteza. Este proceso nos lleva a suponer que la foliculogénesis se lleva a cabo en forma gradual de la médula a la corteza.

Byskov y Lintern-Moore (1973) y Byskov (1975) partiendo del hecho de que los primeros folículos se forman en la región medular del ovario cercana al rete ovarii, suponen que el mesonefros contribuye con sus células para la formación de folículos primordiales. Los autores (op cit.) basan sus resultados en estudios de ovarios que ya han iniciado la fase morfogénica que conlleva a la formación de los folículos. Así tenemos, que Byskov y Lintern-Moore (1973) trabajaron con ratones de 1 hasta 14 días postparto. Ellos consideran que las células de la red extraovárica migran hacia el ovario formando la red intraovárica que rodea a los ovocitos en forma individual iniciando la formación de los folículos. Byskov (1975) al trabajar con gato, mink y hurón (ferret en

inglés) llega a las mismas condiciones que Byskov y Lintern-⁴⁴
Moore (1973) sobre la diferenciación ovárica.

Tomando en cuenta lo anterior, el modelo de foliculogénesis propuesto por Byskov y Lintern-Moore (1973) y Byskov (1975), no concuerda con el propuesto en este trabajo, ya que, la foliculogénesis es un evento que se inicia desde la vida fetal, en la cual se observan que desde un inicio los ovocitos que están íntimamente unidos entre sí e integrados en cordones ovigeros se empiezan a separar gradualmente por acción del epitelio interno, hasta que al momento del nacimiento se forman los primeros folículos.

Upadyhay et al. (1979), proponen también un origen mesonefrico de las células foliculares, pero a diferencia de Byskov y Lintern-Moore (1973) y Byskov (1975), el mecanismo de foliculogénesis coincide con el propuesto por Odor y Blandau, (1969a); Merchant (1978); y lo observado a través del estudio realizado durante el presente trabajo.

2. Desarrollo del ovario in vitro.

2.1. Efecto del mesonefros en la morfogénesis del ovario y en la sobrevivencia de las CGP.

La primera evidencia que sobresale del estudio de los cultivos realizados de ovarios con mesonefros y de ovarios sin mesonefros iniciados a los 15 y 17 días de gestación es que en ambos tipos de cultivo se registra un mismo patrón de desarrollo; es decir, entre los cultivos de ovario con mesonefros y los de ovarios sin mesonefros estudiados, no existe diferencia durante desarrollo.

Byskov et al. (1977) realizaron transplantes subcutáneos

de ovarios de ratón fetal de 13 y 16 días en hembras adultas de ratones mutantes de la cepa BALB/c/Nu/Nu, dividiendo el ovario en una parte craneal, con el rete ovarii, y en una parte caudal, sin el rete ovarii, y ovarios completos con el mesonefros. Sus resultados expresan que en los transplantes de la parte craneal del ovario se desarrollaron folículos, pero en un número muy reducido. En el caso de los transplantes de la parte caudal del ovario no se formó ningún folículo, además de que el número de ovocitos es más reducido y en gran proporción presentan atresia. Los ovarios completos desarrollaron folículos.

Estos resultados al compararlos con los nuestros no correlacionan, ya que, obtenemos folículos en ovarios cultivados con mesonefros como también en ovarios cultivados sin mesonefros.

Existe una diferencia fundamental al abordar el problema por parte de Byskov et al. (1977) y en el presente trabajo. Ellos aislaron el mesonefros dividiendo el ovario en dos partes; donde la parte caudal es la que se encuentra sin mesonefros, y la parte craneal con el mesonefros. En este trabajo se aisló el ovario completo evitando el menor daño posible a la gónada.

Al evitar cualquier daño posible a la gónada, permite estudiar los procesos morfogénéticos de forma más real que en la gónada que presenta algún daño, donde muchos procesos morfogénéticos pueden ser enmascarados, además de que algunos tipos celulares son muy sensibles. En el trabajo de Byskov

et al. (1977), sucede algo similar, ya que, tanto en la parte craneal como en la parte caudal el número de ovocitos es reducido, siendo mucho más evidente en la parte caudal, por lo que existe mayor número de folículos en esta zona.

Nikitin y Byskov (1981) realizaron cultivos de gónadas de ratón fetal con y sin mesonefros durante tiempos diferentes de cultivo, siendo 17 días el máximo tiempo de cultivo y 12 días el mínimo tiempo de cultivo. Los autores (op cit.) encuentran que en el caso del ovario de ratón fetal de 13 y 18 días respectivamente el número de ovocitos es menor cuando el cultivo se realiza sin la presencia del mesonefros. En el caso de que los cultivos de gónadas realizados con mesonefros encontraron que hay necrosis del tejido, y del conteo de ovocitos realizado obtuvieron que el número de ovocitos es mayor.

Odor y Blandau (1971) realizaron cultivos de ovarios sin mesonefros de ratón de 16 días de gestación durante un tiempo máximo de 45 días, siendo el desarrollo de los ovarios en forma más semejante a lo que sucede in vivo. Ellos reportan que durante el desarrollo del trabajo, algunos ovarios presentaban cambios degenerativos y otros se mostraban en condiciones óptimas. En los resultados preliminares a este trabajo encontramos también que algunos órganos llevaban a cabo cambios degenerativos.

Con base en estos resultados se puede proponer que el mesonefros carece de capacidad inductora para permitir la sobrevivencia de ovocitos en ovarios cultivados; y que además

existe una variabilidad natural que hace a cada organismo distinto de otro y que en este caso se refleja en el desarrollo del ovario in vitro.

El problema del origen de las células foliculares planteado en el desarrollo del ovario in vivo, tampoco es resuelto en los estudios realizados in vitro. Al partir de lo propuesto por Byskov y Lintern-Moore (1973), Byskov (1975) y Byskov et al. (1977), y compararlo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que el mesonefros no contribuye con células para la formación del epitelio folicular. Pero, Upadhyay et al. (1979), Zamboni, et al. (1979) y Byskov (1978) proponen que la contribución de células epiteliales del mesonefros tiene su inicio desde la etapa de primordio gonadal, por lo tanto, los resultados obtenidos a través de este estudio no son indicadores del origen de las células foliculares.

2.2. Efecto del SCUH en la morfogénesis del ovario.

Durante el desarrollo del presente trabajo encontramos diferencias de los cultivos hechos con la adición de suero (SCUH) respecto a los realizados sin este suero.

La discusión a este aspecto será hecha por una parte para cultivos de ovario iniciado a los 15 días de gestación y por otra para cultivo de ovarios de 17 días de gestación

Así tenemos, que en cultivos de ovarios de 15 días de gestación con SCUH, el desarrollo de la gónada después de 6 días de cultivo se encuentra en la etapa de fragmentación de los cordones ovigeros. Mientras que en los ovarios

cultivados sin SCUH, una gran mayoría de los ovocitos se encuentran rodeados de células foliculares. Estos resultados a primera vista parecen indicar que en los ovarios cultivados con SCUH se retrasan en su desarrollo. Si comparamos las gráficas que muestran el desarrollo de la foliculogénesis en ovarios de 15 días de gestación cultivados con SCUH con su equivalente in vivo; 3 días postparto (15 días de gestación más 6 días de cultivo da como resultado que el ovario en cultivo tenga la edad equivalente a 3 días postparto, tomando en cuenta que el nacimiento de los ratones es a los 18 días), encontramos que parece no existir alguna diferencia durante el proceso de foliculogénesis, ya que, en ambos casos la proporción de ovocitos integrados en las tres etapas de foliculogénesis es muy semejante cuantitativamente. Si comparamos estas dos graficas con la grafica correspondiente a ovarios de 15 días de gestación cultivados sin SCUH, observamos claramente que existe un mayor porcentaje de folículos formados en los cultivos sin SCUH. Por lo tanto, se puede decir que los ovarios cultivados con SCUH llevan a cabo el desarrollo normal, como si se encontrarán in vivo. Mientras que durante el tiempo de cultivo, los ovarios sin adición de SCUH se desarrollan solamente siguiendo sus propios mecanismos de regulación intraovárica, sin que al parecer exista algún factor extraovárico que regule la foliculogénesis.

Los cultivos de ovarios de 17 días de gestación con adición de SCUH y sin este suero presentan en ambos casos la

formación de folículos en una proporción muy semejante, aunque el porcentaje de ovocitos que son separados por células epiteliales es mayor en cultivos con SCUH que en cultivos sin este suero. La proporción de los ovocitos unidos íntimamente es muy parecida tanto en cultivos con adición de SCUH como en cultivos sin adición del mismo. Esto nos indica que en cultivos con SCUH existe una reserva mayor de ovocitos que pueden ser integrados en folículos en menor tiempo que en los cultivos realizados sin suero.

Desde el punto de vista cuantitativo estos resultados indican, a priori, que el desarrollo del ovario de 17 días de gestación cultivado con SCUH está más avanzado que el realizado sin SCUH. Cualitativamente (basado en el estudio histológico) también se observa diferencia entre los cultivos realizados con adición de SCUH y aquellos realizados sin este suero. Esta diferencia radica fundamentalmente en que en ovarios cultivados sin SCUH los folículos presentan una membrana basal muy clara vista al microscopio de luz. Mientras que los ovarios cultivados con SCUH parece no formarse la membrana basal. Sin embargo, observaciones realizadas al microscopio electrónico muestra una lámina basal en los folículos presentes en ovarios cultivados con SCUH.

La diferencia entre una lámina basal y una membrana basal es su composición química y el momento ontogenético del depósito de estos componentes. La lámina basal se deposita primero y es rica en proteoglicanos, laminina y fibronectina

(Hay, 1984). La membrana basal además de los componentes presentes en la lámina basal, contiene uno o varios tipos de colágenas, glicosaminoglicanos y una gran variedad de glicoproteínas no colágenas (Linsenmayer, et al. 1984), y se deposita sobre la lámina basal. Por lo tanto, la lámina basal precede en tiempo a la membrana basal.

Con base en lo anterior, podemos suponer que en los cultivos realizados sin SCUH, en realidad no existe retraso como se planteó al observar las diferencias cuantitativas, sino que más bien hubo un adelanto en el desarrollo, ya que, el hecho de formar una lámina basal nos indica que los folículos han pasado por una serie de eventos fisiológicos por los cuales no han pasado aún los folículos presentes en los ovarios cultivados con adición de SCUH.

Cabe hacer la aclaración que la discusión realizada a los ovarios de 17 días de gestación cultivados con SCUH y sin SCUH está basada únicamente en las gónadas sin mesonefros, ya que, en los ovarios cultivados junto con el mesonefros existe un alto grado necrosis, debido principalmente a que a la edad de 17 días de gestación el sistema urogenital ya es muy grande, y ello impide una difusión correcta de los gases y nutrimentos; produciendo muerte celular en aquellas regiones alejadas de la superficie de intercambio.

Magre y Jost (1984), Magre et al. (1980, 1981, 1984) y Patsuadi et al. (1984) encontraron que el suero de bovino fetal tiene efecto en la desorganización de los cordones seminíferos en el testículo, debido a que la lámina basal no

se forma. Por otro lado, Taketo et al. (1984) trabajando con análogos del AMPc en testículos, encontraron el mismo efecto que los autores anteriores, es decir, desintegración de la lámina basal de los cordones testiculares. También se ha encontrado una fracción de suero rica en lipoproteínas de baja densidad (LDL), que promueve la sobrevivencia de las CGP en cordones testiculares (Taketo, et al. 1986). Bardin et al. (1982) indican que en ratón la diferenciación gonádica es dependiente de la presencia del suero de bovino fetal en el medio de cultivo, sólo durante los primeros estados de desarrollo. Cuando el tejido es explantado a los 12 días de gestación, inicio de la diferenciación sexual en el ratón, o después, la adición del suero en el medio de cultivo es innecesaria (Taketo et al. 1985).

Challoner (1975), Taketo, et al. (1985) reportan que la presencia del suero carece de influencia en el inicio de la meiosis de las CGP en el ovario.

2.3. Citodiferenciación y Foliculogénesis.

La diferenciación celular puede determinarse por dos métodos: 1) por el método bioquímico y 2) por el método citológico. El primero nos indica que un tipo celular es distinto de los demás debido a que sintetiza proteínas específicas que no sintetizan otros tipos celulares. El método citológico nos demuestra que un tipo celular es diferente de los demás simplemente porque sus características citológicas son distintas a los de los otros tipos celulares. Es en este método morfoestructural en el que nos basaremos

para la discusión.

Los ovocitos presentan mitocondrias con crestas de tipo vesicular, las cuales se originan de la separación de las dos membranas de una cresta. Odor y Blandau (1969b) encuentran el mismo efecto en mitocondrias de CGP y ovocitos de ovarios de ratón fetal. La función de estas mitocondrias con crestas de tipo vesicular no es aún conocida.

Por otro lado, el retículo endoplasmático rugoso (REr) y el complejo de Golgi (CG) se encuentran muy desarrollados, además de estar en estrecha relación. El REr está involucrado en producción de proteínas y el CG en la secreción de material proteico rico en carbohidratos. Cuando existe una relación muy estrecha entre ambos, la célula tiene una alta actividad de síntesis de glicoproteínas (Rothman, 1985). En el caso del ovocito observamos que la estrecha relación entre REr y CG está directamente asociada con la síntesis de la zona pelúcida, que es rica en compuestos glicosilados. Por lo tanto, el hecho de que los ovocitos presenten un CG muy desarrollado y gran cantidad de vesículas de secreción, nos lleva a suponer que los ovocitos son los que forman la zona pelúcida. Chiquoine (1960) propone que las células foliculares secretan un monómero que por acción de los ovocitos se polimeriza y da origen a la zona pelúcida. Odor y Blandau (1969b) suponen que las células foliculares son las que sintetizan la zona pelúcida sólo cuando se encuentran conformados como epitelio cúbico.

En nuestras observaciones hemos encontrado que los

ovocitos parecen sintetizar la zona pelúcida aún cuando los epitelios foliculares son de tipo escamoso. El epitelio folicular en ese estado no presenta un CG bien desarrollado como el de los ovocitos. Cuando el epitelio folicular es de tipo cúbico sus células presentan un CG bien desarrollado, lo que ha llevado a suponer a Odor y Blandau (1969b) y a Chiquoine (1960) que las células foliculares sintetizan la zona pelúcida.

Nuestras observaciones están basadas en ovarios cultivados in vitro, mientras que los de los otros autores se sustentan en resultados in vivo. Odor y Blandau (1971) determinan que la zona pelúcida se forma al tercer día de cultivo cuando el órgano es explantado a la edad de 16 días de gestación. Los autores (op cit.) proponen que las células foliculares son las que sintetizan la zona pelúcida.

Nosotros consideramos que a pesar de que las condiciones in vitro no son las mismas que las condiciones in vivo, la zona pelúcida es sintetizada por los ovocitos.

Durante el desarrollo in vitro del ovario se encontró una estrecha relación entre las células foliculares y los ovocitos, como lo muestran la presencia de desmosomas y uniones de comunicación entre ellas. La primera nos muestra la adhesividad de las células y la segunda la comunicación intercelular. Así tenemos, que los desmosomas entre los ovocitos y las células foliculares son aparentes desde la etapa en que las células foliculares empiezan a separar los ovocitos que están unidos íntimamente, hasta que los

foliculos están totalmente formados. Es entonces cuando la zona pelúcida empieza a separar a las células foliculares de los ovocitos quedando unidos únicamente por desmosomas, dando origen a las prolongaciones de células foliculares. Es en este punto en que Chiquoine (1960) se basa para proponer que las células foliculares forman la zona pelúcida por medio de las prolongaciones celulares que se forman al quedar unidos a los ovocitos, y que éstos tienen mayor superficie de contacto con la zona pelúcida por medio de sus microvellosidades. Zamboni (1974) reporta este mismo tipo de prolongaciones de células foliculares en ovarios de Macaca mulata, en donde encuentra que la zona pelúcida empieza a separar a las células foliculares (a excepción de aquellos puntos de unión desmosómica) desde la etapa de folículo unilaminar hasta la fase de folículo antral, donde las células que quedan unidos a los ovocitos por las prolongaciones celulares que conforman el cumulus oophorus.

Nuestras observaciones muestran solamente el inicio de la separación de las células foliculares de los ovocitos, por acción de la zona pelúcida, en donde se pone de manifiesto la importancia de los desmosomas.

Los desmosomas también son importantes durante la separación de los ovocitos por acción de las células de los cordones ovigeros. Nosotros proponemos que la formación de los desmosomas es un punto de fijación para las células prefoliculares de los cordones ovigeros durante la separación de los ovocitos. Cuando se llegan a encontrar dos

prolongaciones de las células prefoliculares durante el proceso de la separación, la formación de desmosomas también se hace evidente. Por lo tanto, durante el desarrollo del ovario encontramos dos tipos de unión desmosómica; 1) unión heteróloga y 2) unión homóloga. Otro tipo de unión celular visto durante el desarrollo del ovario es la llamada unión de comunicación. Mitchell y Burghardt (1986) siguieron la ontogenia de este tipo de uniones en células del ovario de ratón durante todo el proceso de foliculogénesis. Detectaron que conforme se va avanzando en el desarrollo de la foliculogénesis el número de uniones se incrementa. Este hecho sugiere que la formación de folículos es un proceso dinámico.

Existen dos tipos de comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes; uniones homólogas, entre las células foliculares, que provoca que éstas estén en un estado de sincronización óptimo. Las uniones de comunicación heterólogas, entre las células foliculares y los ovocitos, también están presentes durante la foliculogénesis, ya que, los ovocitos son regulados tanto fisiológica como nutricionalmente por las células foliculares (Schultz, 1985). Tanto las uniones de comunicación homólogas como las heterólogas propician que el folículo como unidad, se encuentre en estado de homeostasis.

La posición de los dos tipos de uniones en el folículo primordial nos llevan a suponer que el epitelio folicular se encuentra polarizado; es decir, tanto las uniones de

comunicación como los desmosomas se encuentren comunicando y uniendo respectivamente a las células foliculares con el ovocito en la parte basal del epitelio y hacia los lados de las células foliculares, sin existir ningún tipo de unión con la lámina basal localizada en la parte superior del epitelio folicular.

Un tercer tipo celular que participa en la morfogénesis del ovario es el mesénquima. Este tipo celular presenta un RER y un CG bien desarrollados, los cuales están involucrados con la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. La existencia de microtúbulos y de microfilamentos en dirección paralela nos hacen suponer que las células mesenquimáticas presentan movimiento activo, mismo que parece provocar la fragmentación de los cordones ovígeros hasta la formación de los folículos.

El proceso de foliculogénesis se inicia desde que los ovocitos son rodeados en los cordones ovígeros por células prefoliculares del blastema gonadal. Estos cordones son fragmentados por invasión del mesénquima y de vasos sanguíneos. A nivel ultraestructural se observa claramente como el mesénquima se interpone entre cada cordón ovígero, existiendo una lámina basal entre el epitelio de éstos y el mesénquima, lo cual nos señala que existe una interacción entre estos dos tipos celulares. Indica además, que fisiológicamente los dos tipos celulares son diferentes.

Mientras se realiza la fragmentación de los cordones, las células epiteliales de éstos se interponen entre los ovocitos

que están unidos íntimamente. La separación de los ovocitos se debe a la presencia de prolongaciones membranales de las células epiteliales unidas por desmosomas a la membrana de los ovocitos y a membranas de otras células foliculares. Sirven como punto de fijación para permitir que las células se interpongan completamente entre los ovocitos. Es en este momento que el segundo proceso de la foliculogénesis se lleva a cabo, siendo el primero antes de la separación de los ovocitos.

Al proseguir la separación de los ovocitos, el mesénquima prosigue con la fragmentación de los cordones ovigeros, dando como resultado que se reduzca el número de ovocitos asociados con cordones ovigeros, hasta que sólo existan dos prefoliculos, los cuales son individualizados por el mesénquima para dar origen a un folículo bien formado, rodeado por células foliculares y una lámina basal. Esta fase, es la que corresponde a la tercera etapa de la foliculogénesis.

V. CONCLUSIONES.

-El proceso de la foliculogénesis que se lleva a cabo en ovarios in vivo es semejante al que se realiza en condiciones in vitro

-El proceso de la foliculogénesis se inicia con la fragmentación de los cordones ovigeros y culmina con la formación de los folículos unilaminares.

-El mesonefros no interviene en forma directa durante el proceso de foliculogénesis, cuando menos desde las etapas en las que se iniciaron los cultivos realizados en este estudio.

-En ausencia de SCUH en el medio de cultivo el proceso de desarrollo del ovario se acelera.

-La presencia de SCUH en los cultivos de ovarios realizados durante el estudio parecen no mostrar ningún efecto durante el desarrollo de los folículos.

VI. REFERENCIAS.

- Allen BM (1904) The embryonic development of the ovary and the testis of the mammals. Am. J. Anat. 3: 89-153.
- Alvarez AB y Merchant LH (1986) Mouse primordial germ cell use fibronectin as substrate for migration. Expl. Cell Res. 165: 362-368.
- Bardin CW Taketo T Gunsalus GL Koide SS Mather JP (1982) The detection of agents that have toxic effects on the testis and male reproductive tract. Banbury Report. 11: 337-351.
- Brambell FWR (1927) The development and morphology of the gonads of the mouse. PART I. The morphogenesis of the indifferent gonad and of the ovary. Proc. R. Soc. London, Ser B 101: 391-409.
- Byskov AG (1975) The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. J. Reprod. Fert. 45:201-209.
- _____ (1978a) The anatomy and ultrastructure of the rete system of the fetal mouse ovary. Biol. Reprod. 19: 720-735.
- _____ (1978b) The meiosis inducing interaction between germ cells and rete cells in the fetal mouse gonad. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 18: 327-334.
- _____ (1979) Regulation of meiosis in mammals. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1251-1261.
- Byskov AG (1981) Gonadal sex and germ cell differentiation.

- En: Mechanisms of sex and differentiation in animals and man (Eds. Austin CR y Edwards RG) Academic Press London. 145-164.
- _____ y Lintern-Moore S (1973) Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovary. J. Anat. 116: 207-217.
- _____ Skakkebaek NE Stafanger G Peters H (1977) Influence of the ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. J. Anat. 123: 77-86.
- Challoner S (1975) Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 3. The initiation of follicular growth in vitro. J. Anat. 119: 157-162.
- Chiquoine AD (1954) The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. Anat. Rec. 118: 135-146.
- _____ (1960) The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. Am. J. Anat. 106: 149-169.
- Clark JM y Eddy EM (1975) Fine structural observations on the origins and associations of primordial germ cells in the mouse. Develop. Biol. 47: 136-155.
- Dang DC y Fouquet JP (1979) Differentiation of the fetal gonad of Macaca fascicularis with special reference to the testis. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1197-1209.

- De Felici M Boitiani C y Cossu G (1985) Synthesis of glycoconjugates in mouse primordial germ cells. Develop. Biol. 109: 375-380.
- De Martino C y Zamboni L (1967) Silver methenamine stain for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 19: 273-282.
- Forbes TR (1942) On the fate of the medullary cords of the human ovary. Contr. Embryol. 30: 11-15.
- Fujimoto T Yoshinaga K Kono I (1985) Distribution of fibronectin on the migratory pathway of the primordial germ cells in mice. Anat. Rec. 211: 271-278.
- George FW y Wilson JD. (1979) The regulation of androgen and estrogen formation in fetal gonads. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1297-1306.
- Gropp A y Ohno S (1966) Presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle, Bos taurus. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 74:505-528.
- Gruenwald P (1942) the development of the sex cords in the gonads of man and mammals. Amer. J. Anat. 70: 359-397.
- Hay E (1984) Cell-matrix interaction in the embryo: cell shape, cell surface, cell skeleton, and their role in differentiation. En: The role of extracellular matrix in development. (Ed. Trelstald RL) Academic Press London. 1-31.

- Hernández HVG (1985) Efectos de la tunicamicina sobre la morfogénesis de gónadas (testículos y ovarios) de embriones de ratón cultivados in vitro. Tesis Profesional, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Hynes RO (1986) Fibronectins. Sci. Ame. 254(6):16-26.
- Josso N y Piccard JY (1986) Anti-Müllerian hormone. Physiol. Rev. 66: 1038-1090.
- Karnowsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27: 137A.
- Kofman SA Merchant LH Pérez PG (1984) Diferenciación Sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. Rev. Invest. Clin. (Méx) 34: 349-359.
- Kuwana T Maeda SH Fujimoto T (1986) Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro. Anat. Rec. 215: 403-406.
- Linsenmayer TF Fitch JM Mayne R (1984) Basement membrane structure and assembly: inferences from immunological studies with monoclonal antibodies. En: The role of extracellular matrix in development. (Ed. Trelstald RL) Academic Press London. 145-172.
- Magre S Angelopoulou A Jost A (1980) Cellules de Sertoli et organogénesis du testicule foetal. Ann. d'Endocrinologie (Paris). 41: 531-537.

Magre S Angelopoulou A Jost A (1981) Action du sérum de foetus de veau sur la différenciation in vitro ou le maintien des cordons séminifères du testicule du foetus du rat. C. R. Acad. Sc. Paris. t 292 serie III: 85-89.

_____ Patsuadi E Jost A Castanier M Scholler R (1984) Dissociation entre organog nese et différenciation endocrine du testicule de rat in vitro. INSERM. 123: 407-412.

_____ y Jost A (1980) The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study. Arch. Anat. micr. Morph. exp. 69: 297-318.

_____ (1984) Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 7831-7834.

McKay D y Smith R (1986) The differentiation of mouse gonad in vitro a ligh and electron microscopy study. JEMM. 97: 189-199

McLaren A (1985) Relation of germ cell sex to gonadal differentiation. En: The origin and evolution of sex (Ed. Monroy A) Alan R Liss New York. 289-300.

Merchant LH (1975a) Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. Develop. Biol. 41: 1-21.

Merchant LH (1975b) The onset of testicular differentiation in the rat: an ultrastructural study. Am. J. Anat. 145: 319

_____ (1976). The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. En: Progress in differentiation research. (Ed. Müller-Bérat N) Elsevier New York. 453-462.

_____ (1978) Ovarian differentiation. En: The vertebrate ovary (Ed. Jones RE) Plenum New York. 47-81.

_____ (1979) Origin of the somatic cells in the rat gonad: An autoradiographic approach. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1219-1229.

_____ (1980) The establishment and sexual differentiation of the horse gonad. Bol. Estud. Méd., Méx. 31: 3-23.

_____ (1984) Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis. En: Ultrastructure of Reproduction. (Eds. Blerkom J Notta PM) Martinus Nijhoff Publishers Boston. 19-30.

_____ y Álvarez BA (1981) The role of the dense core granules of mammalian primordial germ cells: An in vivo and in vitro study. En: Development and function of reproductive Organs (Eds Byskov AG Peters H) Excerpta Medica Amsterdam. 119-120.

Merchant LH y Álvarez BA (1986) The role of extracellular matrix and tissue topographic arrangement in mouse primordial germ cells migration. En: Development and function of reproductive organs (Eds. Peters H Tsafiriri) 1-11.

_____ y Centeno UB (1981) Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse. En: Advances in the morphology of cells and tissues. (Ed Acosta VE) Alan R. Liss New York. 383-392.

_____ y Zamboni L (1973) Fine morphology of extragonadal germ cells of the mouse. En: Development of the ovary and its functions. (Ed Peters H) Excerpta Medica Amsterdam. 95-100.

_____ Popova L Reyss-Brion M (1984) Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonefros. Develop. Growth and Differ. 26:403-417.

Mitchell PA y Burgardt RC (1986) The ontogeny of nexuses (Gap junctions) in the ovary of the feta mouse. Anat. Rec. 214: 283-288.

Müller U y Urban E (1981) An oocyte-specific antigen and its possible role in the organization of the ovarian follicle of the rat. Differentiation. 20: 274-277.

Nikitin AI y Byskov AG (1981) Mesonephric influence on the survival of fetal mouse germ cells; preliminary results. En: Development and function of reproductive organs. (Eds Byskov AG Peters H) Excerpta Medica Amsterdam. 51-57.

- Odor LD y Blandau JR (1969a) Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. Am. J. Anat. 124: 163-186.
- _____ (1969b) Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. II. Cytodifferentiation. Am. J. Anat. 125: 177-216.
- _____ (1971) Organ cultures of fetal mouse ovaries. I Ligth microscopic structure. Am. J. Anat. 131: 387-414.
- Patsuadi E MagreS Castanier M Scholler R Jost A (1985) Dissociation between testicular morphogenesis a functional of Leydig cells. J. Endocr. 105: 235-238.
- Pelliniemi LJ (1975) Ultrastructure of gonadal ridge in male and female pig embryos. Anat. Embryol. 147: 19-34.
- _____ (1976) Ultrastructure of the indifferent gonad in male and female pig embryos. Tissue and Cell 8:163-174
- _____ y Lauteala L (1981) Development of sexual dimorphism the embryonic gonad. Human. Genet. 58: 64-67.
- Peters H (1978) Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrate ovary. (Ed. Jones RE) Plenum New York. 121-144.
- _____ y Pedersen T (1967) Origin of follicle cells in the infant mouse ovary. Fert. Ster. 18: 309-313.
- Pinkerton JHN McKay D Adams E Hertig A (1962) Development of the human ovary. A study using histochemical techniques. Obstet. Gynec. 18: 152-181.

- Rothman JE (1985) The compartmental organization of the Golgi apparatus. Sci. Ame. 253(3): 51-63.
- Schultz RM (1985) Roles of cell to cell communication in development. Biol. Reprod. 32: 27-42.
- Shato M (1985) The histogenesis of the gonad in the rat embryos. J. Anat. 143: 17-37.
- Stein LE y Anderson E (1981) In vitro analysis of ovarian differentiation and the initiation of meiosis in the rat. Acta Anatomica 110: 189-205.
- Taketo T y Koide SS (1981) In vitro development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonad. Develop. Biol. 84: 61-66.
- _____ Thau RB Adeyemo O Koide SS (1984) Influence of adenosine 3-5'-cyclic monophosphate analogues on testicular organization of fetal mouse gonads in vitro. Biol. Reprod. 30: 189-198.
- _____ Koide SS Merchant LH (1985) Gonadal sex differentiation in mammals. En: The origin and evolution of sex. (Ed. Monroy A) Alan R. Liss New York. 271-287.
- _____ Seen C Koide SS (1986) Requirement of serum components for the preservation of primordial germ cells in testis cords during early stages of testicular differentiation in vitro in the mouse. Biol. Reprod. 34: 919-924.
- Torrey TW (1945) The development of the urogenital system of the albino rat. II. The gonads. Am. J. Anat. 76: 375-397.

Upadhyay S Luciani JM Zamboni L (1979) The role of the mesonephros in the development of indifferent and ovaries of the mouse. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1179-1196.

(1981) The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In: Development and function of reproductive organs. (Eds. Byskov AG Peters H) Excerpta Medica Amsterdam. 18-27.

y Zamboni L (1982) Ectopic germ cells: Natural model for the study of germ cell sexual differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 6584-6588.

Wilson KM (1926) Origin and development of the rete ovarii and the rete testis in the human embryo. Contrib. Embryol. 17: 69-88.

Wilson JD Griffin JE Leshin M George FW (1981) Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes. Hum. Genet. 58: 78-84.

Wilkins AS (1986) Genetic analysis of animal development. Academic press New York 539pp.

Witschi E (1951) Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. Recent Prog. Horm. Res. 6: 1-23.

Yamada MK y Kenedy WD (1984) Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. J. Cell Biol. 99: 29-33.

Zamboni L (1974) Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. Biol. Reprod. 10:125-149.

_____ Bézard J Mauleón P (1979) The role of the mesonephros in the development of the sheep fetal ovary. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1153-1178.

_____ y Merchant LH (1973) The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. Am. J. Anat. 137: 299-336.

_____ Upadhyay S Bézard J Mauleón P (1981) The role of the mesonephros in the development of the sheep testis and its excurrent pathways. En: Development and function of reproductive organs. (Eds. Byskov AG Peters H) Excerpta Medica Amsterdam. 31-40.

Zeterquist H (1956) The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis Karolinska Institutet, Stockholm.