

03466

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



EL INICIO DE LA FOLICULOGENESIS
EN EL OVARIO DEL RATON: ESTUDIO
IN VIVO E IN VITRO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

JESUS CHIMAL MONROY

MEXICO D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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
INTRODUCCION	3
Componente germinal de la gónada	3
Componente somático de la gónada	7
Diferenciación del ovario	12
El inicio de la meiosis	12
Foliculogénesis	15
Diferenciación ovárica <u>in vitro</u>	17
Modelos matemáticos en biología	19
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Protocolo experimental 1	24
Protocolo experimental 2	24
Protocolo experimental 3	26
RESULTADOS	27
Foliculogénesis <u>in vivo</u>	27
Foliculogénesis <u>in vitro</u>	34
Efecto del suero sobre el desarrollo del ovario	35
Inhibición de la foliculogénesis con diferentes	

tipos de suero	37
Naturaleza del factor inhibidor de la foliculogénesis	37
Inducción de la foliculogénesis	41
Modelo matemático para el inicio de la foliculogénesis	42
DISCUSION	60
Desarrollo del ovario <u>in vivo</u>	60
Un modelo matemático para el inicio de la foliculogénesis en el ovario de mamíferos	62
Desarrollo del ovario <u>in vitro</u>	65
Determinación de un periodo crítico para la formación de los folículos	68
CONCLUSION	71
APENDICE	72
REFERENCIAS	77

RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio morfométrico y experimental con ovarios de ratón. Se identificaron tres estados que preceden a la formación de los folículos primordiales. El estado I se refiere a los ovocitos que se encuentran en contacto muy estrecho entre sí dentro de los cordones sexuales. El estado II, también dentro de los cordones sexuales, se refiere a los ovocitos que están separados por prolongaciones citoplasmáticas de las células epiteliales. Y el estado III, se refiere a la individualización de los ovocitos en folículos, cuando el estroma se interpone entre los ovocitos y las células epiteliales de los cordones sexuales. Estos tres estados fueron cuantificados durante varias etapas, que van desde edades fetales hasta edades prepúberes.

Por otra parte, el estudio experimental consistió en cultivar ovarios de ratón fetal en diferentes condiciones, como son diversos tipos de suero y polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona (PVP). Observamos que en todas estas condiciones hubo inhibición de la foliculogénesis. Esto fue evaluado con la cuantificación de los tres estados celulares identificados *in vivo*. Los resultados sugieren que la inhibición no parece depender de algún factor específico del suero sino que tal vez dependa de condiciones fisicoquímicas como la osmolaridad del medio de cultivo.

Se encontró una edad crítica comprendida entre los 13 y 14 días de gestación, a partir de la cual, la formación de folículos no se lleva a cabo *in vitro*. Sin embargo, cuando los ovarios en la edad crítica fueron cocultivados con placenta, riñón e hígado la foliculogénesis sí ocurrió. Mientras que los cocultivos con glándula adrenal, corazón o testículos no facilitaron la foliculogénesis.

La tercera parte del presente estudio, se refiere a la presentación de un modelo matemático que describe el inicio de la foliculogénesis en ovarios de mamíferos. El estudio se realizó con los datos obtenidos para el desarrollo *in vivo* de los ovarios en ratón (*Mus musculus*) y en hamster (*Mesocricetus auratus*). Con las ecuaciones obtenidas para cada uno de los estados se predijo la dinámica de la foliculogénesis en los ovarios embrionarios de rata (*Rattus norvegicus*), humano y mono (*Macaca mulata*). Las predicciones sugieren que el modelo tal vez pueda extrapolarse a todos los mamíferos.

INTRODUCCION

La gónada de los vertebrados tiene una doble función; una reproductora y una endócrina. Estas funciones dependen en gran medida de las interacciones celulares entre los componentes germinal y somático durante la morfogénesis de la gónada indiferenciada y su posterior diferenciación sexual. Se sabe que el componente germinal tiene su origen en regiones extragonadales y el componente somático en la región del mesodermo intermedio.

Una vez establecidas las interacciones celulares entre los dos componentes se forma la gónada indiferenciada, la cual es común para ambos sexos. Está formada por cordones sexuales, precursores de los cordones testiculares y células foliculares, en el testículo y en el ovario respectivamente. Los cordones sexuales están separados del mesénquima por una lámina basal. Las interacciones entre el componente epitelial (cordones sexuales) y el componente estromático durante la morfogénesis gonadal, son factores muy importantes que llevan a la diferenciación sexual de la gónada.

COMPONENTE GERMINAL DE LA GONADA.

El componente germinal está representado por las células germinales primordiales (CGP), precursoras de los ovocitos y los

espermatozoides en el ovario y el testículo respectivamente.

Los estudios realizados por Witschi (1948), Chiquoine (1954) muestran que las CGP tienen un origen extragonadal. La primera localización de las CGP en mamíferos es en el endodermo del saco vitelino cerca del alantoides. Witschi (1948) sugiere que las CGP migran activamente desde esta zona hasta la cresta gonadal, a través del intestino y el mesenterio dorsal. Los estudios realizados por Clark y Eddy (1975) y Zamboni y Merchant (1973), sugieren que las CGP presentan dos tipos de movimiento; uno pasivo y uno activo. Donde el pasivo se realiza por arreglos morfogénéticos del saco vitelino y el alantoides, que llevan a la formación del intestino. Como consecuencia de esta morfogénesis, las CGP se establecen en el intestino. El movimiento activo se inicia en el momento en que las CGP salen del intestino, al romper la membrana basal, hacia el mesenterio, para luego establecerse en la cresta gonadal, donde la migración termina. Durante el periodo migratorio, las CGP forman una gran cantidad de prolongaciones celulares como lo demuestran la presencia de filopodios, lobopodios y pseudópodos vistos a microscopia electrónica. Al establecerse en la cresta gonadal, las CGP, son rodeadas por células somáticas. Esta interacción entre las CGP y las células somáticas de la cresta gonadal, induce a las primeras a dejar de migrar, y sólo ocasionalmente se observan algunos pseudópodos en las CGP.

Con base en observaciones al microscopio electrónico de barrido, se ha sugerido, que las CGP se establecen en la cresta gonadal por una guía de contacto. Esta hipótesis señala, primeramente, que las CGP son dirigidas a su destino final, por una orientación de las células somáticas (Heasman y Wylie, 1981). Se ha observado que en la región del mesenterio dorsal que colinda con la futura gónada, existen células mesenquimatosas orientadas hacia la gónada, lo que sugiere que las CGP se establecen en la gónada por la orientación de estas células (Heasman y Wylie, 1981).

También se ha observado, que durante la ruta de migración, las CGP interactúan con la matriz extracelular en forma directa (Fujimoto y cols, 1985, Alvarez y Merchant, 1986, Merchant y Álvarez, 1986). En estos estudios se observa que la fibronectina se deposita en el mesenterio dorsal y aorta dorsal principalmente. En la cresta gonadal se observa el depósito de fibronectina en menor proporción que en las dos zonas anteriores (Fujimoto y cols, 1985, Merchant y Álvarez, 1986, Álvarez y Merchant, 1986). Por otra parte, Heasman y cols (1981), muestran que los anticuerpos antifibronectina, inhiben la adhesión de las CGP a una monocapa de células de mesenterio, que sintetizan gran cantidad de fibronectina. Además, Yamada y Kennedy (1984), inhibieron la adhesión de las células BHK a una matriz de fibronectina mediante experimentos de inhibición competitiva, con fragmentos de fibronectina. Estos resultados sugieren, por

un lado, que las CGP en migración necesitan de la fibronectina como sustrato de adhesión. Por otro lado, que el reconocimiento de las células en migración requieren de un receptor a la fibronectina. Por lo que estos estudios demuestran el efecto permisivo de la fibronectina sobre la migración de las CGP, ya que si indujera la migración, entonces las CGP también se encontrarían alrededor de la aorta dorsal, zona positiva a la fibronectina, durante la etapa migratoria de las CGP.

Se ha sugerido que la migración de las CGP requiere de un factor quimiotáctico. En aves, Kuwana y cols, (1986) sugirieron mediante estudios *in vitro*, la presencia de factores quimiotácticos liberados por el corazón y la gónada, que inducen la migración de las CGP. Cabe mencionar, que la migración de las CGP en aves es a través del torrente sanguíneo, desde la creciente germinal de la parte anterior del blastodisco hasta la cresta gonadal. El factor quimiotáctico liberado por el corazón, tal vez induce a las CGP a entrar en el torrente sanguíneo y, al llegar a la zona de la cresta gonadal, ésta libera un factor quimiotáctico que atrae las CGP hacia ella.

Por otra parte los estudios *in vivo* e *in vitro* con CGP, sugirieron que la presencia de antígenos estado específicos es importante para la migración de estas células (Donovan y cols, 1986 y 1987, Fazel y cols, 1987). Estos estudios muestran que la inhibición competitiva con anticuerpos para estos antígenos,

evitan la adhesión de las CGP *in vitro*. Lo que sugiere, que los antígenos estado-específicos son moléculas que están directamente relacionadas con la migración celular de las CGP.

En resumen podemos decir que la migración de las CGP *in vivo* es un proceso muy complejo, que incluye la interacción de las células somáticas con las CGP y la interacción de las CGP con la matriz extracelular, lo que lleva a la expresión diferencial de algunos antígenos durante la migración, y éstos se pierden en la fase de establecimiento de la gónada.

COMPONENTE SOMÁTICO DE LA GONADA.

En esta parte de la introducción hará una breve descripción de las diferentes proposiciones que hay en la literatura para explicar el origen y formación de la gónada. Así tenemos que está bien establecido que la gónada es de origen mesodérmico. Sin embargo, hay controversia respecto al origen específico de las células que forman el blastema gonadal. Una de las hipótesis más populares que explican el origen de la gónada es la propuesta por Witschi (1951, 1956, 1963). Este autor sugirió que la gónada indiferenciada estaba formada por dos primordios: un primordio cortical, proveniente de la proliferación del epitelio celómico y un primordio medular, originario del blastema mesonéfrico. La corteza da origen al ovario, mientras la médula al testículo. Witschi (1942, 1965, 1967) y Witschi y Dale

(1962) sugirió que la diferenciación sexual de la gónada era el resultado del antagonismo de los dos primordios. Si el individuo se diferenciaba en hembra, la corteza liberaba unas sustancias llamadas cortecina⁺ y cortecina⁻. La cortecina⁺ actuaba a nivel de la corteza e inducía la diferenciación de un ovario. La cortecina⁻ no permitía la diferenciación de la médula. Por el contrario si el individuo se diferenciaba en macho, entonces la médula secretaba dos sustancias; medularina⁺ y medularina⁻ con un efecto contrario a las cortecinas.

Otra Hipótesis aceptada en algún tiempo fue la propuesta por Burns (1961). Él sugirió que la gónada se formaba por una doble proliferación del epitelio celómico. La primera proliferación forma los cordones sexuales primarios, precursores de los cordones seminíferos en el testículo. En el caso de que la gónada se diferenciara en ovario, entonces el epitelio celómico proliferaba por segunda ocasión, y formaba los cordones sexuales secundarios, precursores de los cordones ováricos.

Una tercera hipótesis que intenta explicar la formación de la gónada plantea un origen mesonefrico. Esta propuesta no fue replanteada desde los trabajos de Witschi, hasta que Byskov y Lintern-Moore (1973) sugirieron que el mesonefros contribuía con células para la formación de las células foliculares en el ovario de ratón. Ellos llamaron al mesonefros rete ovarii en el ovario en homología al rete testis en el testículo (Wilson,

1926). La rete ovarii fue dividida en tres regiones: rete extraovárica, constituida por tubos y cordones mesonéfricos, que se extienden desde la región periovárica hasta el conducto de Wolff. Rete intraovárica, cuyas células se encuentran sólo dentro del ovario. Y la rete conectante, parte del mesonefros que une la rete extraovárica con la rete intraovárica. Estas mismas estructuras fueron identificadas en el ovario de otras especies (Byskov 1975). Asimismo la contribución mesonéfrica hacia la gónada fue identificada durante la formación del primordio gonadal por lo que, el mesonefros contribuye con células para la formación del testículo y del ovario (Byskov, 1978, Zamboni y col, 1979, 1981, 1982, Upadhyay y cols, 1979, 1981, Shato 1985 y McKay y Smith, 1989).

Stein y Anderson (1979) realizaron un estudio autorradiográfico en la rata, en la que observaron migración de las células de la rete extraovárica hasta la rete intraovárica. Byskov (1979) sugirió que la migración de las células de la rete varía según las especies y el sexo: en especies de meiosis inmediata* y en especies de meiosis retardada**, la

*Se refiere a todas aquellas especies que inician la meiosis antes de la síntesis de esteroides en el ovario. En éstas se incluyen a la rata, el ratón y el hamster.

**Se refiere a todas aquellas especies que inician la meiosis después de la síntesis de esteroides en el ovario, como el conejo, el curo y el cerdo.

penetración de las células mesonefricas al ovario es diferente. En especies con meiosis retardada la penetración celular al ovario es total, y envuelve a las ovogonias y forma los cordones, mientras en especies con meiosis inmediata las células de la rete no envuelven a las ovogonias en cordones por lo que ovario permanece compacto, es decir, las células somáticas intermezcladas libremente con los ovocitos. En resumen la propuesta de Byskov y su grupo da un papel importantísimo al mesonefros en la formación gonadal. Por lo que, en ausencia de mesonefros la formación de la gónada es anormal. Sin embargo. Merchant-Larios y cols, (1984) han observado la formación gonadal en ausencia de mesonefros, en pollos con agénesis mesonefrica experimental *in vivo*.

Lo anterior nos sirve de antecedente para plantear uno de los objetivos de este trabajo, referente al papel del mesonefros en la formación del ovario *in vitro*. Por lo cual se realizó un estudio comparativo del desarrollo del ovario *in vitro* en presencia y ausencia de mesonefros.

Por otro lado, los trabajos clásicos de Allen (1904) y Brambell (1927), sugieren que el epitelio celómico es el contribuyente celular para la formación de la gónada.

Estos autores observaron conexión directa entre el epitelio celómico y los cordones sexuales, y sugirieron que tanto los cordones testiculares como los cordones ováricos tienen su origen en el epitelio celómico. Rossen-Runge (1961) dio el nombre de canales genitales a la conexión del epitelio celómico con los cordones sexuales. Gondos (1969), Jeepensen (1975) y Peters (1976), confirman la contribución del epitelio celómico en la formación de los cordones sexuales.

Finalmente, Gruenwald (1942) y Pinkerton y cols, (1962) Merchant (1975), Merchant-Larios (1979, 1980), Pelliniemi (1975a, b, 1976), Pelliniemi y Lautela (1981) sugieren que la gónada se forma a partir del blastema gonadal que tiene su origen de la proliferación y condensación del epitelio celómico y del mesénquima circundante. Posteriormente ocurre una segregación epitelio-mesénquima que forma dos compartimentos en la gónada; cordones sexuales y estroma, lo que origina la gónada indiferenciada (Merchant 1975). La diferenciación posterior de la gónada ocurre de acuerdo al sexo genético del individuo. En el testículo, desde muy temprana edad, hay una segregación total de los cordones sexuales y el estroma mientras en el ovario la segregación total de estos dos compartimentos es retardada (Paranko, 1987).

Otros estudios con un enfoque histoquímico confirman el origen no mesonéfrico de las células de Sertoli y foliculares en

el testículo y ovario respectivamente. Paranko (1986, 1987), y Paranko y cols (1983 y 1986), muestran al epitelio celómico como precursor de los cordones sexuales en ambas gónadas. Mientras que Franke y cols (1979), sugieren un origen mesenquimático. Finalmente Czernobilsky y cols (1985), sugieren un origen múltiple (epitelio celómico, rete ovarii y mesénquima), para las células foliculares.

DIFERENCIACION DEL OVARIO.

Durante el desarrollo embrionario de los mamíferos la diferenciación sexual de la gónada se inicia primero en los machos genéticos, y posteriormente en las hembras genéticas. El ovario se considera como tal, sólo porque no es testículo. Estrictamente el ovario inicia su diferenciación cuando las células germinales inician la meiosis y continua con la formación de los folículos primordiales.

EL INICIO DE LA MEIOSIS.

Los mecanismos celulares que regulan la proliferación de las células germinales y el inicio de la meiosis son desconocidos. Byskov (1974), postuló que el mesonefros era capaz de inducir a las ovogonias a iniciar la meiosis. Ella plantea que el mesonefros libera dos sustancias que actúan sobre las ovogonias

y regulan la meiosis. La primera llamada MIS (meiosis inducing substance) y la segunda MPS (meiosis preventing substance). La primera actúa en el ovario en etapas tempranas y en el testículo en etapas tardías. Por el contrario, la MPS actúa en el testículo en etapas tempranas (Byskov y Saxén, 1976 y Evans y col 1982). Esto se sugiere a partir de cocultivos de gónadas de diferentes edades, los ovarios con células germinales en meiosis fueron capaces de inducir la meiosis en testículos indiferenciados (Byskov y Saxén, 1976), esto llevó a los autores a sugerir la presencia de una sustancia (MIS) capaz de inducir la meiosis. En cocultivos de testículos ya diferenciados con ovarios indiferenciados se observó inhibición de la meiosis en estos, probablemente debido a la presencia de la MPS liberada por el testículo (Byskov y Saxén, 1976 y Evans y cols, 1982). La presencia de la MIS y la MPS ha sido detectada en otras especies (Byskov, 1975, Grinsted y Byskov, 1981 y Grinsted y col. 1979).

De acuerdo al momento en que se inicia la meiosis, Byskov (1979) divide a los mamíferos en dos grupos: 1) mamíferos con meiosis inmediata y 2) mamíferos con meiosis retardada. En el primer caso se refiere a las especies con ovarios "compactos" en donde las ovogonias y las células somáticas están mezcladas libremente. En los ovarios de este grupo de mamíferos la meiosis precede a la formación de esteroides por la propia gónada. En el caso de los ovarios de mamíferos con meiosis retardada, las ovogonias están envueltas por células somáticas, y forman los

cordones sexuales. En este caso, la síntesis de esteroides por parte de la gónada precede al inicio de la meiosis. La síntesis de la MPS y la MIS depende de la relación entre las células somáticas y las células germinales. En los ovarios con meiosis retardada existen cordones sexuales homólogos a los cordones testiculares, en estas condiciones se libera la MPS. Mientras que en los ovarios con meiosis inmediata, la MIS se libera al no existir cordones sexuales homólogos a los cordones testiculares. El hecho de que la síntesis de esteroides por parte de la gónada difiera del inicio de la meiosis, sugiere que los esteroides no intervienen como inductores de la meiosis (Grinstead y cols, 1982, Grinstead 1982). Sin embargo, Andersen y cols (1981) y Byskov (1985), sugieren que la MIS es una molécula de naturaleza parecida a la progesterona. Esta interpretación fue corroborada por Angelova y Jordanov (1986-87), quienes inducen la meiosis en ovarios de hamster. Ellos encuentran una etapa crítica en la que la meiosis no se inicia *in vitro*, ya sea en cultivos en presencia o ausencia de mesonefros. Esta misma etapa fue observada por Challoner, 1975a en hamster y Mauleón y cols, 1976 en borrego. La presencia de estradiol indujo el inicio de la meiosis, mientras la testosterona lo inhibió.

Otra interpretación para el inicio de la meiosis está basada en los trabajos de Upadhyay y Zamboni (1982), Zamboni y Upadhyay (1983) y Francavilla y Zamboni (1985), sobre células germinales ectópicas. Estos autores sugieren que las células germinales

fuera de la gónada siguen un programa de diferenciación femenino, en lo que a la meiosis se refiere. Esta sugerencia está basada en la observación de que las células germinales de machos genéticos inician la meiosis en etapas embrionarias, cuando se encuentran en las regiones de la glándula suprarrenal y del mesonefros.

FOLICULOGENESIS

La diferenciación del ovario una vez que ha iniciado la meiosis, continua con la formación de los folículos primordiales. Se ha observado que la formación de los folículos coincide con la presencia de ovocitos en la fase de diploteno de la profase de la primera división meiótica (Borum 1961 y Peters 1978). Un folículo primordial se considera como tal cuando un ovocito está rodeado por una capa de células foliculares y que entre ésta y el estroma exista una membrana basal (Peters 1978). La explicación a la formación de los folículos primordiales es muy diferente entre los diferentes autores. Así tenemos que, Ohno y Smith (1964) sugieren que las ovogonias al entrar en meiosis son rodeadas por células, y forman un epitelio folicular. Witschi (1951) sugiere que estas células son de origen mesotelial, y que rodean individualmente a cada ovocito. Por otra parte, Peters (1969), sugiere un origen mesenquimático de las células foliculares. Byskov y cols, (1977) y Byskov y Lintern-Moore (1973) sugirieron un origen mesonefrico de las

células foliculares. Las células de la rete extraovárica migran activamente hasta el ovario, y forman la rete intraovárica, cuyas células rodean a cada ovocito, y forman los folículos primordiales. Peters (1978) por su parte, sugirió una explicación alternativa para la formación folicular, en la que los ovocitos formaban un sincicio celular, antes de integrarse los primeros folículos. Posterior a la formación del sincicio los ovocitos constituyen colonias de ovocitos, que son rodeados por células foliculares, y dan origen a los primeros folículos. Por último, Merchant (1975) y Merchant-Larios (1984), Chimal-Monroy (1987) Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989) y el presente trabajo sugieren que el ovario tiene cordones sexuales, homólogos a los cordones testiculares en el macho. La formación de folículos está precedida por tres fases. En la primera los ovocitos están en estrecha interrelación dentro de los cordones sexuales. En la segunda las colonias de ovocitos están separados por prolongaciones celulares de las células epiteliales de los cordones sexuales. Y finalmente para la formación de los folículos, los cordones sexuales son fragmentados por el mesénquima, que se interpone entre las unidades de células epiteliales y ovocitos.

Con base en lo anterior, uno de los objetivos de esta tesis fue describir, de manera sistemática, el inicio de la foliculogénesis y realizar un estudio morfométrico de la misma. Entiéndase por estudio morfométrico a la cuantificación de los

tres estados de la foliculogénesis.

DIFERENCIACION OVARICA IN VITRO

La diferenciación sexual de la gónada es la primera manifestación morfológica de la diferenciación sexual del individuo. El proceso de diferenciación gonadal está directamente relacionado con la manifestación de los genes específicos del sexo. El comprender los factores que conllevan a la diferenciación sexual de la gónada y la subsecuente expresión de los genes es una de las metas principales en el área de la Biología de la Reproducción.

El cultivo de gónadas *in vitro* permite estudiar en forma más definida los procesos celulares, que llevan a la diferenciación sexual de la gónada. Desde el trabajo clásico de Martinovich (1938), se ha establecido que la diferenciación del ovario puede realizarse *in vitro*. Los estudios realizados por Odor y Blandau (1971), Baker y Neal (1973, 1974), Challoner (1975b), McKay y Smith (1985, 1986 y 1989), mostraron que una vez iniciado el proceso de diferenciación del ovario y el testículo (Taketo y Koide 1981) *in vivo*, el proceso continúa en cultivo. Sin embargo, cuando se estudian etapas muy tempranas de diferenciación, el proceso no se realiza *in vitro*. Taketo y Koide (1981) mostraron que en el ratón existe una edad crítica en la que la gónada explantada no se diferencia sexualmente *in vitro*. Después de esta

edad crítica la gónada se diferencia sexualmente in vitro de acuerdo a su sexo genético. Angelova y Jordanov (1986-87), Mauleón y cols, (1976) y Challoner (1975a), encontraron una etapa crítica en el desarrollo fetal para el inicio de la meiosis en el ovario del hamster. Sólo Angelova y Jordanov (1986-87) lograron librar esta etapa crítica cuando cultivaron los ovarios en presencia de 17β estradiol.

Con base en lo anterior, se observa la importancia que tiene el sistema de cultivo in vitro. Este permite modular al experimentador los posibles factores que intervienen en el desarrollo del órgano en estudio. Entre los componentes más importantes para un cultivo in vitro óptimo, está el suero, que permite un crecimiento celular adecuado. Saxén y Lehtonen (1987) observaron que el desarrollo del riñón no era del todo adecuado en ausencia de suero. Sin embargo, por otra parte, Angelopoulou y cols (1984), Chartrain y cols (1984), Magre y cols (1981 y 1984), Magre y Jost (1984), Angelopoulou y Magre (1987), Jost y Magre (1988) y Patsavoudi y cols (1985), observaron que la morfogénesis testicular in vitro seguía un curso semejante al desarrollo in vivo en ausencia de suero. En presencia de suero el desarrollo testicular era anormal. La alteración se observó como desorganización de los cordones testiculares. Esto debido probablemente a la desaparición de la lámina basal alrededor de aquéllos. En estas condiciones de morfogénesis anormal el proceso de diferenciación celular de las

células de Sertoli (Magre y Jost 1984) y células de Leydig (Patsavoudi y cols, 1985) se lleva a cabo. El efecto del suero en la desorganización de los cordones testiculares fue emulado con derivados del AMP₂ (Taketo y col 1984). Chartrain y cols (1984), identificaron a el (los) componente(s) activo(s) del suero, que desorganizan los cordones testiculares en la región de la α -globina, con un peso molecular de entre 60 y 100 Kd y un pH de 4.5 a 5.0. Por otro lado, se encontró que una fracción de suero rica en LDL (low-density lipoproteins) permitió el desarrollo *in vitro* de las células germinales del testículo fetal cuando el cultivo se inició en etapas indiferenciadas de la gónada (Taketo y cols, 1986). McKay y Smith (1985, 1986 y 1989) no encontraron diferencia alguna en el desarrollo de la gónada en presencia y ausencia de suero.

Con base en lo anterior se plantea como otro objetivo de la presente tesis, el estudio comparativo de la morfogénesis ovárica *in vitro*, en presencia y ausencia de suero.

MODELOS MATEMATICOS EN BIOLOGIA

Un modelo de un sistema biológico es la representación material o simbólica que se comporta de manera similar al sistema real (Picones, 1982). El desarrollo de un modelo consta de varias etapas: primeramente la observación del mundo real (en este caso la descripción de la foliculogénesis), a partir de

ésta se hace una idealización o aproximación del fenómeno para desarrollar un modelo real. Se le llama modelo real porque incluye elementos materiales para su elaboración, por ejemplo, las bombas hidráulicas que simulan el corazón.

En el siguiente paso que consiste en la elaboración de un modelo matemático se necesitan datos cuantificables representativos del mundo real. A partir de éstos se identifican las características esenciales del fenómeno y se expresa la información en términos simbólicos. En este modelo las cantidades, los elementos y los procesos reales se reemplazan por símbolos y operaciones.

Una vez constituido el modelo matemático (una ecuación algebraica o diferencial, una matriz, etc), éste se encuentra a merced de las reglas y de las operaciones propias de la matemática. Mediante ellas es posible obtener predicciones prácticas sobre el sistema real bajo determinadas condiciones. Por otro lado, el manejo matemático del modelo podría incluso proporcionar otros modelos teóricos que, en principio, deben resultar válidos también.

Finalmente, la comparación del modelo con el sistema real es el paso más importante, puesto que así es como se averigua la eficiencia y validez del modelo y la fidelidad con que éste reproduce al sistema vivo. Aunque se pueden obtener varios

modelos que representen a un mismo sistema real, algunos de ellos pueden reproducir mejor que otros ciertos aspectos del sistema original. Sin embargo, los mejores modelos no son únicamente los que describen mejor el fenómeno, sino que, además sean los más sencillos de interpretar, donde los parámetros, coeficientes, operaciones, suposiciones, etc, que forman parte del modelo puedan ser identificados con procesos reales que intervengan en el sistema original.

En el presente trabajo proponemos un modelo matemático general que explica el proceso del inicio de la foliculogénesis en mamíferos. Este modelo está basado en el punto de vista del inicio de la foliculogénesis propuesto por Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989) y el presente trabajo. Los datos fueron obtenidos de ovarios de ratón de 15 y 17 días postcoito y 1, 3, 5, 10, 13 y 24 días postparto y de ovarios de hamster de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, y 20 días de nacido. En ambos casos el material biológico se procesó de acuerdo a la técnica descrita por Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989) y el presente trabajo. Brevemente, se obtuvieron de 5 a 10 cortes por gónada y 10 gónadas de diferentes individuos por edad para el ratón y 5 gónadas para el hamster. En cada corte de todos los ovarios y edades se evaluaron los tres estados del inicio de la foliculogénesis.

El objetivo principal de desarrollar un modelo matemático

para explicar el inicio de la foliculogénesis, es el presentar un juego de ecuaciones que describan los tres estados de la foliculogénesis en mamíferos. Puesto que la descripción del establecimiento de los folículos primordiales descrita por Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989) en el ratón se ha confirmado en otras especies como son la rata y el hamster (datos no mostrados) y en fotografías de trabajos de otros autores en *Macaca mulata* y humano (van Wagenen y Simpson, 1965). Por lo tanto si la descripción histológica del inicio de la foliculogénesis es común en los mamíferos, podríamos esperar que el mismo juego de ecuaciones se aplicara a todos los mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objeto de describir de manera sistemática el inicio de la foliculogénesis y efectuar un estudio morfométrico del mismo (entiéndase como morfometría a la cuantificación de los tres estados identificados en este estudio), se realizó el estudio in vivo de fetos de 15 y 17 días postcoito (dpc) y de ratones de 1, 3, 5, y 13 días postparto (dpp). Las gónadas fueron procesadas para microscopia de alta resolución y microscopia electrónica, como se describió anteriormente (Chimal-Monroy, 1987 y Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989). El estudio morfométrico se realizó con la evaluación de diez ovarios de cada edad, a partir de cortes a tres niveles de la gónada, que fueron caudal, medio y cefálico. Los cortes más representativos se tiñeron con azul de toluidina o se impregnaron con metenamina y plata. Los ovocitos fueron clasificados en tres estados; ovocito epitelial y estromático (fig. 1, pág 27): y se calculó el porcentaje de éstos.

Para el estudio in vitro se trabajó con ovarios de fetos de 13, 14 y 15 dpc y se cultivaron en medio con suero y sin suero durante 8, 7 y 6 días respectivamente, de acuerdo a la técnica seguida por (Chimal-Monroy, 1987). A continuación se describen los tres protocolos experimentales seguidos durante este trabajo.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

Para determinar el papel del mesonefros y del suero durante la morfogénesis ovárica *in vitro* se plantearon los siguientes experimentos:

Se aislaron ovarios de 13, 14 y 15 dpc con mesonefros y sin mesonefros y se cultivaron ambos durante 8, 7 y 6 días respectivamente en medio suplementado con suero (10%) y en medio libre de suero. Al término del cultivo los ovarios se procesaron para su estudio histológico y ultraestructural. El estudio morfométrico se realizó como se menciona líneas arriba.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

Para determinar la naturaleza del factor inhibidor de la foliculogénesis, se aislaron ovarios de 15 dpc sin mesonefros y se cultivaron durante 6 días en las siguientes condiciones:

- 1) Suero de ratón hembra y macho infantil y adulto. El suero se aisló de sangre obtenida por punción cardíaca de 10 a 15 ratones para cada edad y sexo. La sangre se depositó suavemente en un tubo de ensaye. Después de algún tiempo se separó el suero del coágulo. El suero fué centrifugado durante 10 minutos a 1500 rpm. El procedimiento se repitió 2 veces. Al suero obtenido se le agregaron 9 partes de medio de cultivo (McCoy 5ª modificación, Microlab) para obtener una concentración del 10% de suero.

2) Extractos de placenta y de embrión; las placentas y los embriones (ambos de 15 dpc), por separado, fueron homogenizados completamente y se les añadió 1ml de medio de cultivo fresco. Se realizó una segunda homogenización al final de ésta se transfirieron los homogenizados a tubos de ensaye y se centrifugaron durante 10 minutos a 1,500 rpm. El proceso se repitió 2 veces. A los extractos se les añadieron 9 partes de medio de cultivo fresco.

3) Suero de bovino fetal (Gibco) sin esteroides. éste se obtuvo al filtrar el suero en carbón activado.

4) Proteínas del suero; se obtuvieron de acuerdo al procedimiento de Rothblat y cols (1976). Las proteínas fueron redisueltas en medio de cultivo y separadas en dos partes. La primera fue inactivada a 56°C durante 20 minutos. La segunda fue inactivada a ebullición durante 40 minutos. Para el cultivo las concentraciones finales fueron del 10%.

5) Otras condiciones de cultivo incluyeron tripsina (0.25 mg/ml) autodigerida a 37°C durante 2 semanas, y con polivinilpirrolidona (PVP) a concentraciones de 0.1, 0.05 y 0.01 mg/ml. Para cada una de las condiciones de cultivo señaladas se realizó el estudio morfológico mencionado líneas arriba.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3

Con el objeto de establecer que órganos inducían la foliculogénesis se planteó este protocolo experimental.

Se cocultivaron ovarios con mesonefros de 13 dpc con: testículos, glándula suprarrenal, corazón, riñón, placenta e hígado, todos de 13 dpc, durante 10 días. Los experimentos se realizaron entre las 8 y las 10 horas de la mañana, pues en este horario el control nunca presentó folículos. Por el contrario de las 13 horas en adelante el control generalmente presentaba folículos. Al término de los cultivos fueron evaluados los tres estados de la foliculogénesis.

RESULTADOS

FOLICULOGÉNESIS *in vivo*

En la figura 1 se muestran los tres estados del inicio de la foliculogénesis identificados durante este estudio. El estado I o de ovocito se caracterizó por presentar dentro de los cordones sexuales, colonias de ovocitos en contacto directo. Las colonias de ovocitos están rodeadas por células epiteliales, separados del estroma por una lámina basal. El estado II o

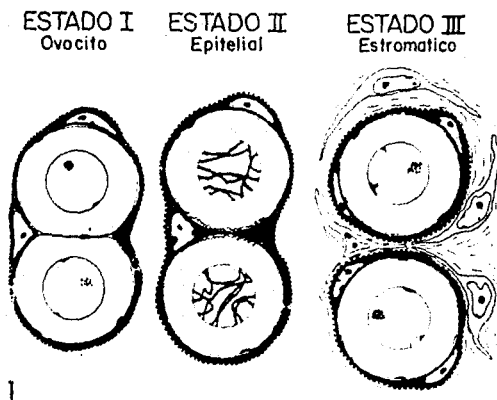
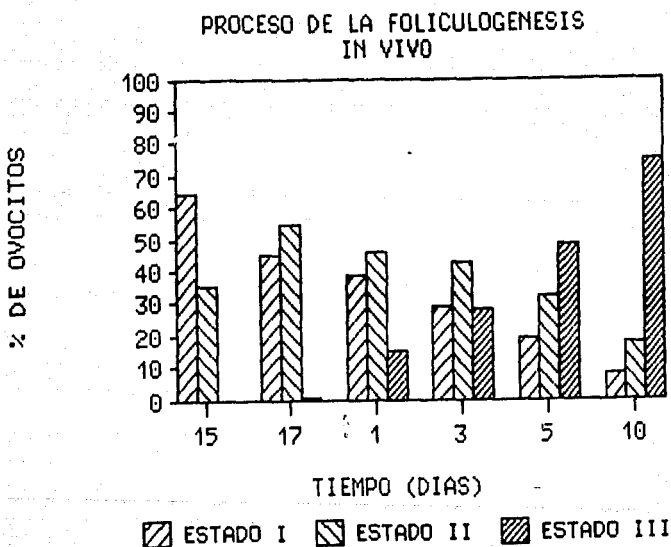


Figura 1.- Este diagrama muestra el inicio de la foliculogénesis en mamíferos. Estado I o de ovocito; dentro de los cordones gonadales existen grupos de ovocitos que están en contacto directo entre ellos mismos. Alrededor de estos grupos de ovocitos hay células epiteliales (negro), separadas del estroma por una delgada lámina basal (rayas). Estado II o epitelial; en éste las células epiteliales separan a los ovocitos, dentro de los cordones sexuales. Estado III o estromático; los ovocitos con sus células epiteliales adosadas y la lámina basal que los envuelve son individualizados por tejido estromático.

epitelial se distinguió por presentar, dentro de los cordones sexuales, ovocitos en proceso de separación por prolongaciones celulares de las células epiteliales. El estado III o de estroma se caracterizó por la formación de los folículos primordiales. Este proceso se realizó por acción del mesénquima que se interpuso entre los ovocitos rodeados de células prefoliculares, lo que fragmentó los cordones sexuales. Durante este proceso se conservó la lámina basal entre el compartimento estromático y el compartimento epitelial.



1

Gráfica 1.- En esta gráfica se muestra el estudio morfológico de la foliculogénesis del ratón *in vivo*. Los días 15 y 17 representan en la gráfica días postcoito, y los días 1, 3, 5 y 10, días postparto.

En la gráfica 1 se resume el estudio morfométrico del ovario. En ésta se indica la dinámica de los tres estados de la foliculogénesis. Así tenemos que, los estados I y II fueron los únicos presentes en ovarios de 15 dpc. El estado III se inició a los 17 dpc en una proporción baja. Y se incrementó al avanzar la edad. Por el contrario el estado II después de un máximo en los 17 dpc disminuyó en los siguientes días, hasta un mínimo en los 13 dpp. En el estado I se observó un descenso gradual desde los 15 dpc hasta los 13 dpp. Es importante

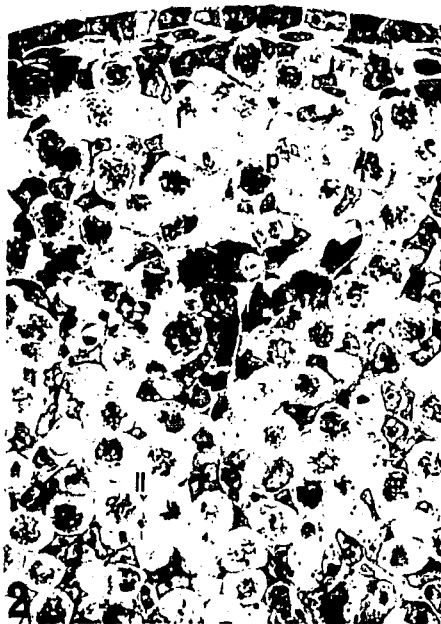


Figura 2.- Ovario de ratón fetal de 15 dpc. Se observa una gran mayoría de células germinales en paquiteno (p) de la primera división meiótica. A esta edad sólo el estado I y II están presentes.

señalar que el descenso del estado I coincidió con el incremento del estado III, la conexión entre ambos fue el estado II. Esto es, antes de la formación de folículos (estado III) en una proporción evidente (1 dpp), hubo un descenso en el estado I y un incremento en el estado II. Iniciada la formación de folículos el estado II descendió. Esto debido a que, los ovocitos correspondientes a este estado, son individualizados para dar origen a los folículos primordiales.

Histológicamente se observó que el ovario a los 15 dpc, presentaba ovocitos en las fases de cigoteno y paquiteno de la profase de la primera división meiótica (Fig. 2). A esta edad la mayoría de los ovocitos se encontraban en estado I. Éstos daban la apariencia de ser un sincicio celular. Sin embargo, al microscopio electrónico se observó que las membranas de los ovocitos estaban individualizadas (Fig. 3). El estado II fue más evidente conforme avanzó la meiosis en los ovocitos. El estado II se inicia con la penetración de prolongaciones citoplasmáticas de las células epiteliales que rodean las colonias de ovocitos (Fig. 4). Este proceso coincide con la formación de abundantes microvellosidades por parte de los ovocitos (Fig. 4), proceso que tal vez facilitó la penetración de las prolongaciones de las células epiteliales. Una vez concluida la separación de los ovocitos, se inició el proceso de fragmentación de los cordones sexuales, que llevó a la formación de los folículos primordiales.

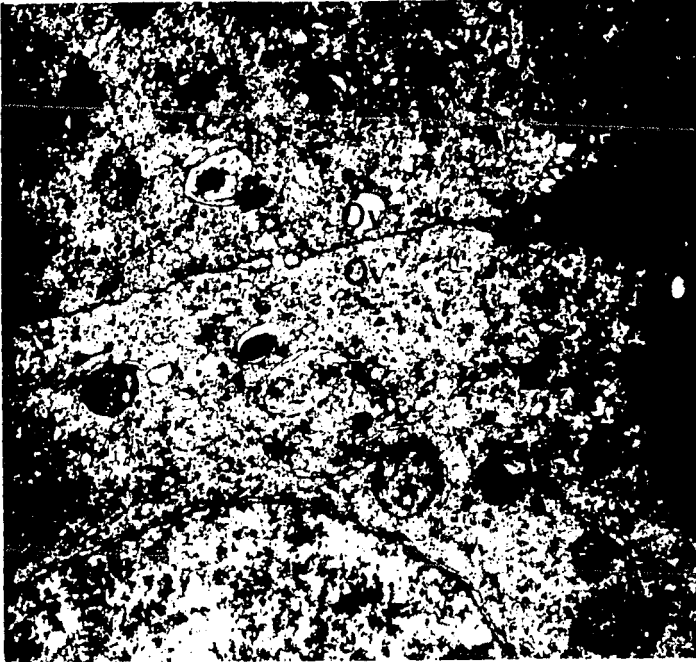


Figura 3.- Micrografía electrónica de dos ovocitos (Ov) en estado I, se observa las membranas individualizadas de ambos ovocitos.

Los folículos se formaron primeramente en la región medular de la gónada (Fig. 5). En esta región se observó que el mesénquima se interpuso entre los ovocitos en estado II, lo que inicia el proceso de fragmentación de los cordones sexuales (Fig. 6). Este proceso da origen a los folículos primordiales y con él culmina el inicio de la foliculogénesis.



Figura 4.- Los ovocitos A, B y C se encuentran en estado II. Entre los ovocitos A y B se observa abundantes microvellosidades (*), que tal vez faciliten la penetración de los procesos epiteliales (flecha entre los ovocitos B y C).

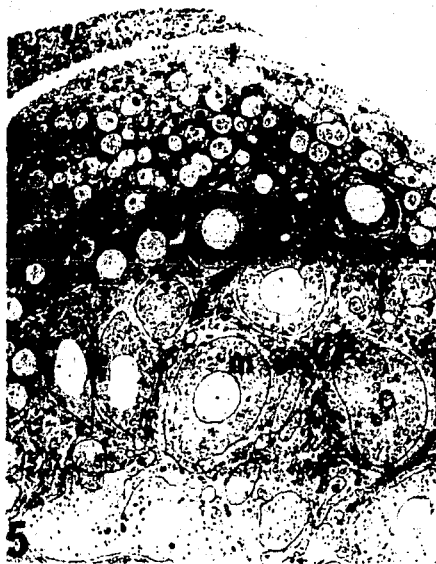


Figura 5.- Ovario de ratón de 5 días de nacido, en el que se observa la distribución gradual de los tres estados de la foliculogénesis, donde el estado III es el más abundante a esta edad. El estado de ovocito (I) se encuentra en la región cortical del ovario. El estado estromático (III) se localiza en la región medular del ovario. Mientras el estado epitelial (II) está en posición intermedia entre el estado I y III.

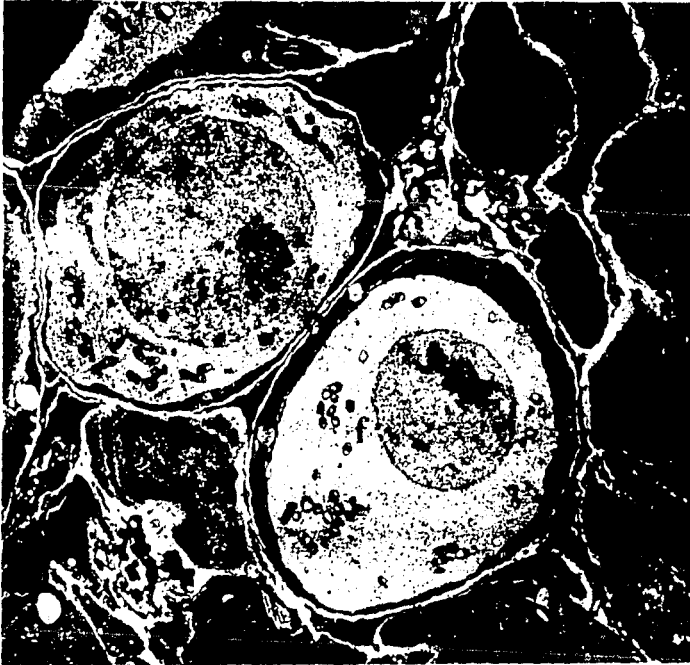


Figura 6.- Esta micrografía muestra el proceso morfológico final de la foliculogénesis. Esto es, la separación de los folículos primordiales, por la penetración de prolongaciones citoplasmáticas (*) de origen estromático entre las láminas basales de los folículos (f) individualizados.

FOLICULOGENESIS in vitro

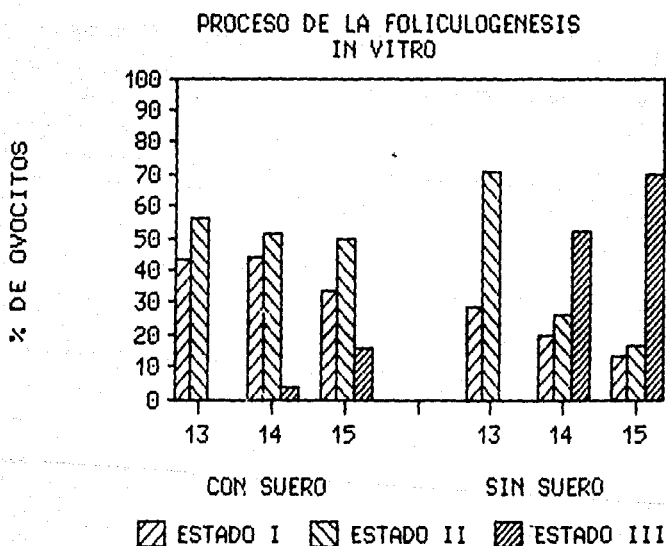
En esta parte del trabajo se muestran los resultados comparativos del papel del mesonefros y del suero sobre el proceso de la foliculogénesis in vitro. Así como la determinación de los factores que inhiben e inducen la foliculogénesis.

EFFECTO DEL MESONEFROS Y DEL SUERO SOBRE EL DESARROLLO DEL OVARIO.

Los tres estados del inicio de la foliculogénesis identificados durante el estudio *in vivo*, también fueron identificados durante el estudio *in vitro*.

La primera parte del estudio *in vitro* consistió en comparar el proceso de la foliculogénesis de ovarios con mesonefros y sin mesonefros adyacente, en medio de cultivo suplementado con suero de bovino fetal (SBF) y en ausencia de éste (Gráfica 2). Sin embargo, la gráfica sólo muestra los resultados de ovario sin mesonefros, ya que, en los ovarios con mesonefros no hay diferencia alguna en la morfogénesis general del ovario, con respecto a los ovarios sin mesonefros. En la gráfica se observa que los ovarios de 13 dpc cultivados durante 8 días en medio suplementado con suero o en ausencia de éste, no fueron capaces de formar folículos. Cuando los ovarios se cultivaron a los 14 dpc durante 7 días, en medio suplementado con suero o en ausencia de suero hubo formación de folículos. Sin embargo, la proporción de folículos fue mucho mayor en cultivos libres de suero (49%), que en cultivos suplementados con suero (4%). Los ovarios a los 15 dpc cultivados durante 6 días presentaron mayor proporción de folículos en ausencia de suero (65%) que en presencia de suero (17%).

Con base en estos resultados, se observaron dos puntos interesantes para abordar durante este estudio. En primer lugar se observó la inhibición de la foliculogénesis por parte del suero. En segundo lugar se determinó una edad crítica en la que se induce la foliculogénesis, esto es, entre los 13 y 14 días postcoito. Además un punto importante para mencionar, fue que la presencia de mesonefros no parece intervenir en el proceso del inicio de la foliculogénesis.



2

Gráfica 2.- Esta gráfica muestra el estudio morfométrico del ovario in vitro. Los ovarios de 13,14 y 15 dpc con o sin mesonefros adyacente fueron cultivados en presencia o ausencia de suero.

INHIBICIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS CON DIFERENTES TIPOS DE SUERO.

En la gráfica 3 se muestran los resultados de ovarios de 15 dpc cultivados durante 6 días en medios suplementados con diferentes tipos de suero, (barras del 1 al 6). Estos resultados muestran un comportamiento muy diferente al obtenido en ovarios cultivados en medio control, es decir, libre de suero (12 en la gráfica 3). Esto es, en las primeras condiciones de cultivo se observa inhibición de la foliculogénesis, mientras que en los ovarios cultivados en medio control no existe la inhibición.

Con estos resultados se plantean dos interrogantes respecto a la inhibición de la foliculogénesis. En primer lugar, ¿es específico el factor del suero que inhibe la foliculogénesis? y ¿se encuentra en diferentes especies (bovino, ratón y humano)? O bien, la inhibición es inespecífica.

NATURALEZA DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA FOLICULOGÉNESIS.

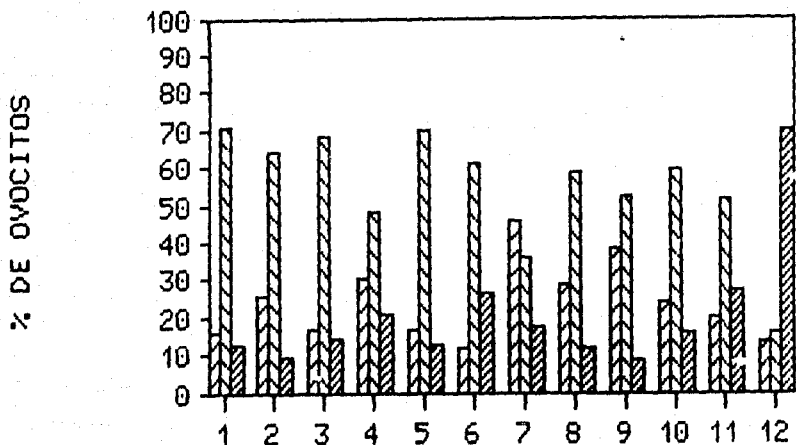
Para determinar la naturaleza del factor inhibidor de la foliculogénesis, se trabajó con ovarios de 15 dpc cultivados durante 6 días, en medio suplementado con suero de bovino fetal sin esteroides (7 en la gráfica 3). En estas condiciones se observó que la inhibición de la

foliculogénesis persiste (compárese con 12 en la gráfica 3). Estos resultados plantearon entonces, que la naturaleza del inhibidor pudo ser proteica o del tipo de moléculas no proteicas presentes en el suero, como son lípidos, carbohidratos, etc., ya que estas moléculas no fueron eliminadas del suero durante la filtración con carbón activado.

Para investigar si el inhibidor era de naturaleza proteica, se aislaron las proteínas del suero de bovino fetal y se dividieron en dos grupos; 1) proteínas de suero inactivadas a 56°C durante 20 minutos. 2) proteínas de suero inactivadas a ebullición durante 40 minutos. Este segundo grupo se utilizó como control. Además del control sin suero. Si el inhibidor es una proteína, entonces en las condiciones de inactivación total de proteínas, no debe inhibirse la foliculogénesis. Sin embargo, como se muestra en 8 y 9 de la gráfica 3, hay inhibición de la foliculogénesis (compárese con 12 en la gráfica 3).

Con base en los resultados anteriores y se supuso que cualquier substancia al 10% en medio de cultivo inhibe la foliculogénesis. Se cultivaron ovarios de 15 dpc durante 6 días en medio de cultivo suplementado con tripsina autodigerida durante 2 semanas a 37°C. Como se observa en 10 de la gráfica 3 también hubo inhibición de la foliculogénesis.

INHIBICION DE LA FOLICULOGENESIS



ESTADO I
 ESTADO II
 ESTADO III

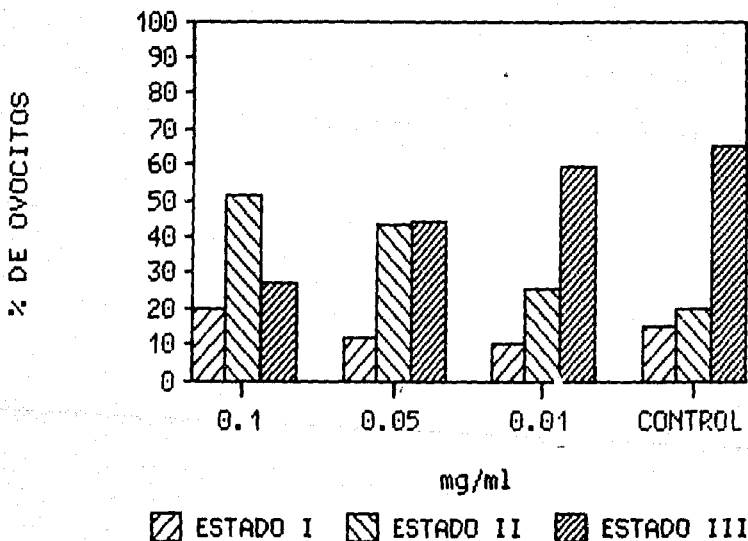
3

Gráfica 3.- Esta gráfica muestra la inhibición de los folículos primordiales en ovarios de 15 dpc con o sin mesonefros con 10% de: 1) suero de ratón hembra juvenil, 2) suero de ratón hembra adulta, 3) suero de ratón macho juvenil, 4) suero de ratón macho adulto, 5) extracto embrionario, 6) extracto de placenta, 7) suero de bovino fetal libre de esteroides, 8) proteínas de suero inactivadas a 56°C, 9) proteínas de suero inactivadas a ebullición, 10) péptidos de tripsina, y 11) 0.1mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP), todos comparados con el control sin suero (12).

Por último, para comprobar la inhibición inespecífica de la foliculogénesis se cultivaron ovarios de 15 dpc durante 6 días con polivinilpirrolidona (PVP) al 0.1 mg/ml. La PVP es una

molécula sintética que no se encuentra en los seres vivos. En estas condiciones de cultivo también se inhibió la foliculogénesis (11 en la gráfica 3). Por otra parte, para comprobar que la inhibición de la foliculogénesis podía ser dependiente de la concentración de alguna sustancia en el medio de cultivo. Se cultivaron ovarios de 15 dpc durante 6 días en PVP a diferentes concentraciones. Como se observa en la gráfica 4 la inhibición de la foliculogénesis disminuyó al reducirse la concentración de PVP en el medio de cultivo.

INHIBICION DE LA FOLICULOGENESIS CON PVP



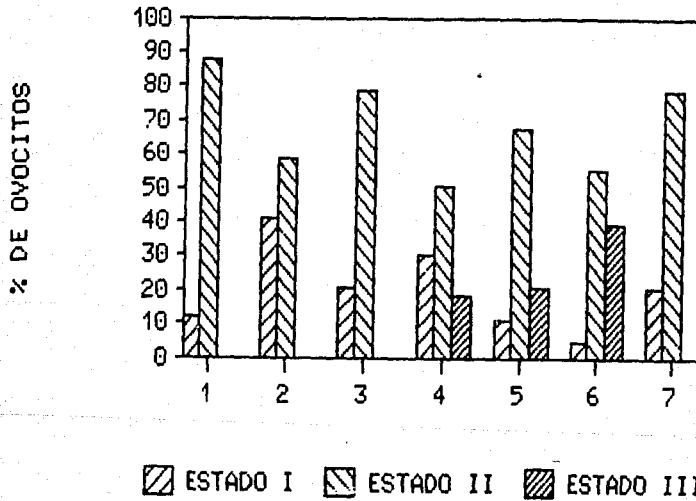
4

Gráfica 4.- Inhibición de los folículos primordiales por un polímero sintético (PVP). La formación de los folículos fue dependiente de la concentración de PVP en el medio.

INDUCCION DE LA FOLICULOGENESIS.

El segundo planteamiento que surgió de los resultados que se muestran en la gráfica 2 fue la aparente existencia de una edad crítica para la inducción de la foliculogénesis. En dicha gráfica se mostró que los ovarios cultivados con suero o sin suero a los 13 dpc durante 8 días, no formaron folículos. Los ovarios de 13 dpc cultivados con mesonefros tampoco formaron folículos (datos que no se muestran).

INDUCCION DE LA FOLICULOGENESIS



5

Gráfica 5.- En esta gráfica se muestra la inducción de la foliculogénesis en ovarios de 13 dpc cocultivos con: 1) testículo, 2) glándula suprarrenal, 3) corazón, 4) placenta, 5) hígado y 6) riñón. Todos comparados con el control 7).

La forma de abordar la inducción de la foliculogénesis fue la siguiente: se cultivaron ovarios de 13 dpc cocultivados con glándulas suprarrenales, corazón, riñón, hígado y placenta, todos los órganos de 13 dpc y de sexo femenino, y de testículos de la misma edad. El tiempo de cocultivo fue de 10 días para todas las condiciones. En la gráfica 5 se observa que los órganos que inducen la formación de folículos son la placenta, el hígado, y el riñón. Mientras que las glándulas suprarrenales, el corazón, y el testículo no fueron capaces de inducir la formación de los folículos.

MODELO MATEMÁTICO PARA EL INICIO DE LA FOLICULOGENESIS

En la figura 1 se muestran los tres estados del inicio de la foliculogénesis en los que se basa el modelo matemático propuesto por nosotros.

Las gráficas 6 y 7 muestran la dinámica del proceso del inicio de la foliculogénesis del ratón y del hamster respectivamente. En ambas gráficas se muestran las interrelaciones entre los tres estados; ovocito, epitelial y estromático. Esto es, mientras el estado I disminuye el estado II se incrementa. Posteriormente, con la formación e incremento de los folículos primordiales (estado III) tanto el estado I como el II disminuyen. La diferencia obvia que se observa en las gráficas de ambas especies (gráficas 6 y 7) es que la

formación de los folículos es más temprana en el ovario del ratón, 17 días postcoito, mientras en el ovario de hamster es a los 7 días postparto. En ambas especies la diferenciación sexual del ovario es a los 13 días postcoito y el nacimiento a los 18 y 16 días respectivamente. De este modo se observa que la formación de los folículos es 4 y 10 días después de la diferenciación sexual del ovario en el ratón y hamster respectivamente. Esto probablemente explica la lenta caída del estado I en el ovario de hamster. Una vez iniciada la formación de los folículos primordiales, el estado I disminuye rápidamente al igual que en el ratón. A partir de los 9 días postparto la homología en la dinámica de los tres estados del inicio de la foliculogénesis en ambas especies es más aparente.

ESTADO I

En la gráficas 6 y 7 se observa que el estado I es decreciente. En el ratón decese en forma exponencial y la ecuación que describe este comportamiento es:

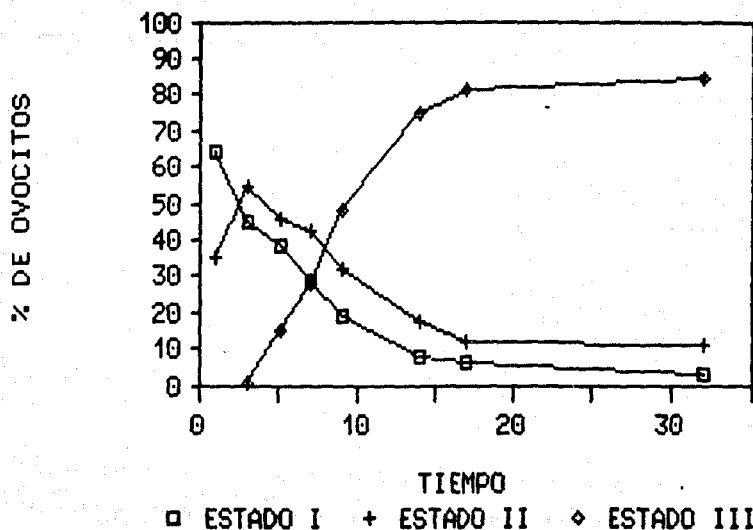
$$A(t) = A_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde A es la proporción de ovocitos en estado I en función del tiempo. La gráfica teórica calculada por esta ecuación es comparada con la curva *in vivo* (gráfica 8). Para un análisis matemático de esta ecuación ver el apéndice.

Gráfica 6.- Esta gráfica muestra la dinámica de los tres estados de la foliculogénesis durante el desarrollo in vivo del ovario de ratón desde los 15 dpc hasta el mes de nacido. Para fines de manejo de datos la escala se modificó, donde el tiempo 1 corresponde a los 15 dpc, el tiempo 3 a los 17 dpc, el tiempo 3 a 1 día de nacido y así subsecuentemente.

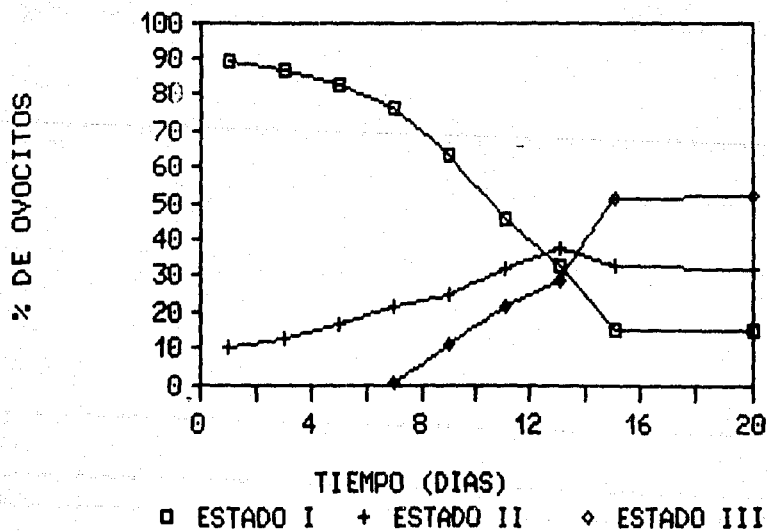
Gráfica 7.- Esta gráfica muestra la dinámica de los tres estados de la foliculogénesis durante el desarrollo in vivo del ovario de hamster, desde 1 día de nacido hasta los 20 días. En este caso no se cambió la escala. El tiempo es en días postparto (dpp)

RATON IN VIVO



6

HAMSTER IN VIVO



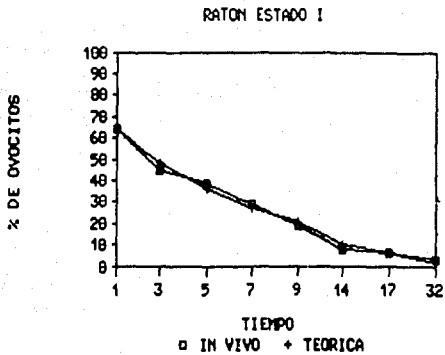
Gráfica 8.- Gráfica correspondiente al estado I del ratón.

Observe la gran sobreposición de la curva teórica y la curva in vivo. Nótese el cambio de escala en el eje de X.

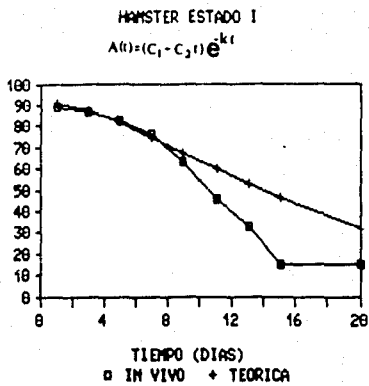
Gráfica 9.- Gráfica que muestra una primera aproximación del estado I del hamster. Obsérvese la gran similitud entre ambas curvas antes de los 9 dpp

Gráfica 10.- Esta gráfica muestra una segunda aproximación del estado I del hamster. En este caso la similitud de las dos curvas es más aparente después de los 9 dpp.

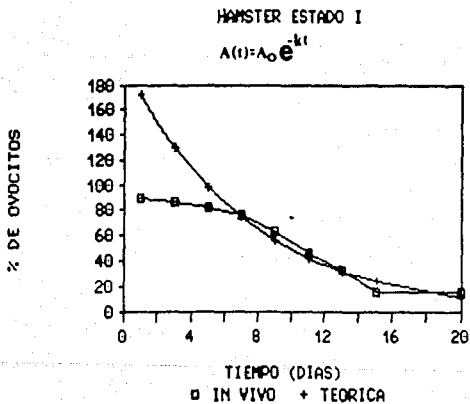
Gráfica 11.- Esta gráfica muestra la curva final del estado I del hamster. La primera parte (hasta los 9 dpp) es descrita por la ecuación 2, mientras la segunda parte es descrita por la ecuación 1.



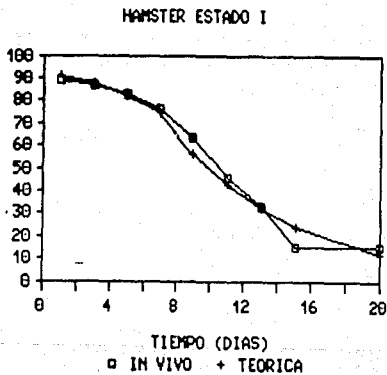
8



9



10



11

En el hamster el estado I es decreciente, aunque no exponencial como en el ratón. Una primera aproximación teórica de la curva *in vivo* está descrita por la ecuación

$$A(t) = (C_1 + C_2 t) e^{-kt} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde **A** es la proporción de ovocitos en estado I en función del tiempo. Para un análisis matemático de esta ecuación ver el apéndice.

Sin embargo, con esta ecuación no hay predicción para valores mayores a los 15 días postparto (gráfica 9). Si la observación la iniciamos a los 9 días postparto, entonces la curva es semejante a la del ratón para el estado I (gráfica 8). Por lo que la ecuación 1 es aplicable también para el hamster. Pero ahora con esta ecuación no se predicen los valores menores a los 9 días postparto (gráfica 10). Por lo que sugerimos una fusión de ambas ecuaciones, donde la ecuación 2 predice los valores menores a los 9 días y la ecuación 1 los valores mayores a los 9 días. La curva fusionada con los valores obtenidos de ambas ecuaciones se muestra en la gráfica 11.

ESTADO II.

En las gráficas 6 y 7 se muestra que el estado II presenta un incremento y posteriormente un descenso. La ecuación matemática que predice esta curva es:

$$B(t) = C_1 t e^{-kt} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde B es la proporción de ovocitos en estado II en función del tiempo. Para un análisis matemático de esta ecuación ver el apéndice. La curva teórica comparada con la curva in vivo se muestra en la gráfica 12 para el ratón y gráfica 13 para el hamster.

ESTADO III

La curva del estado III en ambas especies está descrita por la ecuación

$$C(t) = N_{\infty} e^{-Ae^{-kt}} \quad \text{Ecuación 4}$$

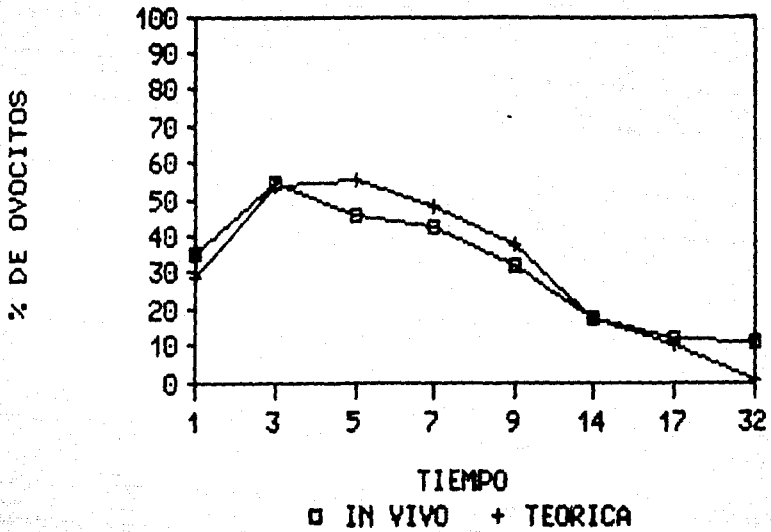
donde C es la proporción de ovocitos en estado III en función del tiempo, N_{∞} es la proporción máxima de ovocitos en estado III. Las gráficas 14 y 15 muestran la comparación de las curvas teóricas con la curvas in vivo en el ratón y hamster

Gráfica 12.- Esta gráfica muestra el estado II del ratón. Se observa una gran semejanza entre las dos curvas.

Gráfica 13.- Esta gráfica muestra el estado II del hamster. Nótese la semejanza entre las dos curvas.

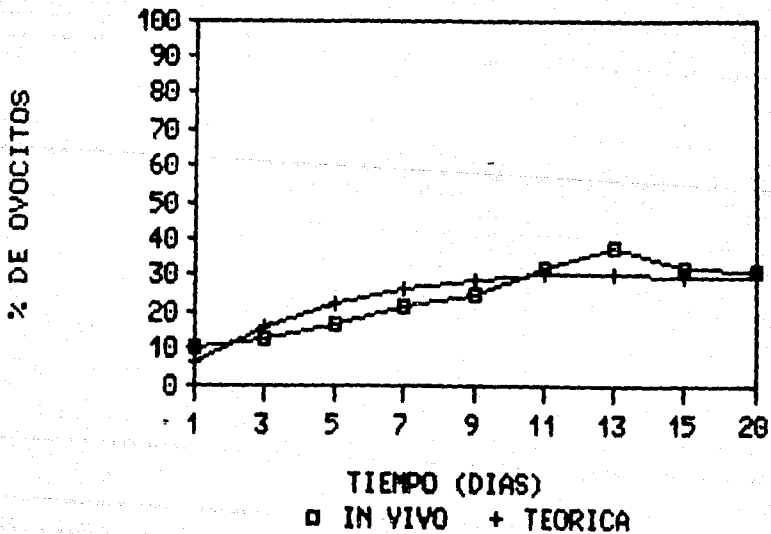
RATON ESTADO II

51



12

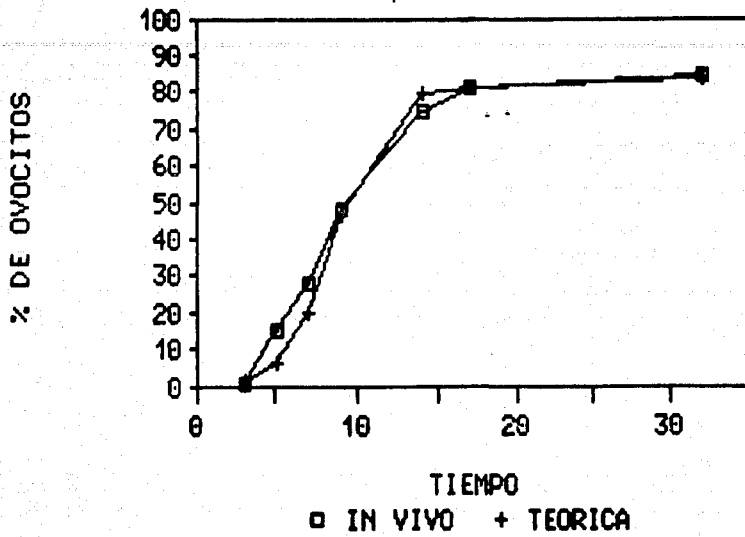
HAMSTER ESTADO II



Gráfica 14.- Esta gráfica muestra el estado III del ratón. En ésta se observa que la curva in vivo está descrita por la curva teórica.

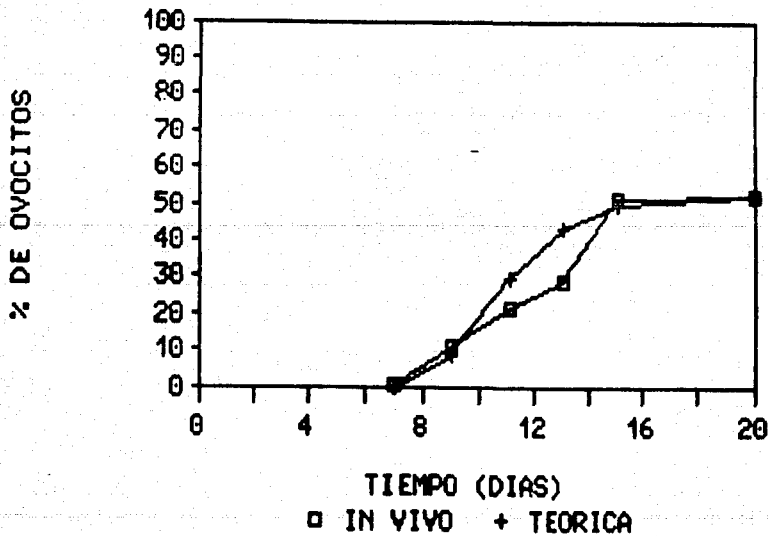
Gráfica 15.- En está gráfica se observa el estado III del hamster, donde la similitud de ambas curvas es aceptable.

RATON ESTADO III



14

HAMSTER ESTADO III



15

respectivamente. Para un análisis matemático ver el apéndice.

COMPROBACION DEL MODELO EN LA RATA, EL MONO (Macaca mulata) Y EL HUMANO.

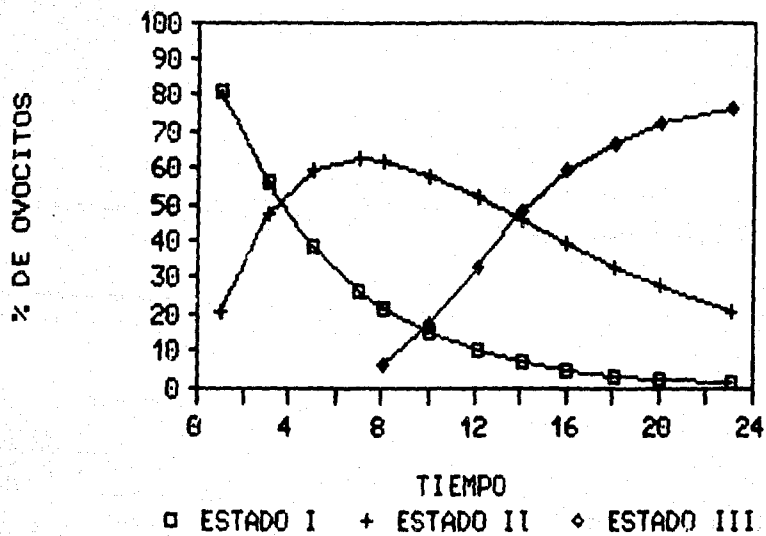
En la gráfica 16 se muestran las curvas teóricas de los tres estados del inicio de la foliculogénesis para la rata. Los parámetros en consideración para realizar la comprobación del modelo fueron los siguientes: en primer lugar se trabajó con ovarios de las edades de 15, 17, 21 días postcoito y recién nacida y de 15 días postparto. Se tomó sólo un ovario y un corte de la región media de éste para cada una de las edades antes señaladas, y se contó la proporción de ovocitos en cada uno de los tres estados. Con los datos obtenidos del estudio morfométrico del ovario de la rata se realizó la comprobación del modelo, se tomaron como criterios importantes; para el estado I el valor máximo de ovocitos (NI) en ese estado y su pendiente. Para el estado II, la proporción inicial de ovocitos (NII) y la edad (t^*) en la que se encuentra el valor máximo de ovocitos en ese estado. La pendiente se calculó como $1/t^*$. Para el estado III, se tomó en cuenta la edad en la que se formaron los primeros folículos y la proporción máxima de éstos $N\alpha$. Los valores intermedios se obtuvieron de restar al 100% la suma de los dos estados anteriores en cada una de las edades

Otro de los criterios importantes que se tomó en cuenta para la comprobación del modelo y el establecimiento del mismo fue que para cada uno de los cálculos se consideró a la edad mínima de estudio como tiempo 1 y sus valores se incrementaron progresivamente.

En las gráficas 17 y 19 se muestran las curvas in vivo del inicio de la foliculogénesis para *M. mulatta* y humano respectivamente. Los datos se obtuvieron de las fotografías del trabajo de van Wagenen y Simpson (1967), pues estos autores presentan un desarrollo embrionario y fetal completo del desarrollo de la gónada, tanto en el mono como en el humano. Compárese estas curvas con las curvas obtenidas después del ajuste matemático para cada uno de los tres estados (gráficas 18 y 20). Como se observa la predicción de la dinámica del inicio de la foliculogénesis es razonablemente aceptable para ambas especies, sobre todo, al comparar cualitativamente la dinámica de la foliculogénesis de estas dos especies con las dinámicas de la foliculogénesis en el ratón (gráfica 6), en el hamster (gráfica 7) y en la rata (gráfica 16).

Gráfica 16.- Esta gráfica muestra la comprobación del modelo en la rata. Obsérvese que la dinámica de los tres estados es muy parecida a la observada en el ratón (gráfica 6).

RATA TEORICA



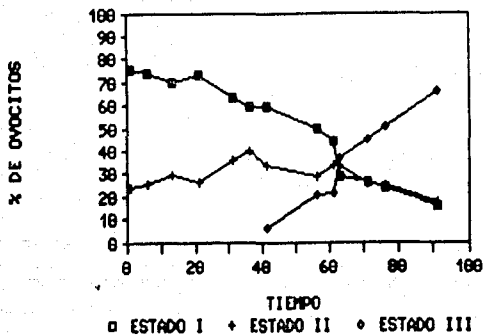
Gráfica 17.- Esta gráfica muestra la dinámica de la foliculogénesis en el ovario de Macaca mulatta. Los datos se obtuvieron de las fotografías del trabajo de van Wagenen y Simpson (1965).

Gráfica 18.- En esta gráfica se observa la comprobación del modelo para Macaca mulatta. Comparese esta gráfica con las de hamster, humano y con la de Macaca mulatta in vivo.

Gráfica 19.- Esta gráfica muestra el desarrollo in vivo del inicio de la foliculogénesis para el humano. Los datos se obtuvieron del trabajo de van Wagenen y Simpson (1965).

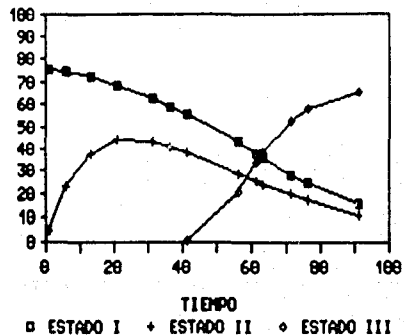
Gráfica 20.- En esta gráfica se observa la comprobación del modelo para el humano. Obsérvese que la dinámica de los tres estados es muy semejante a la observada para el hamster y para Macaca mulatta. Además nótese la semejanza que hay con la curva in vivo del humano (gráfica 19).

Macaca mulata IN VIVO



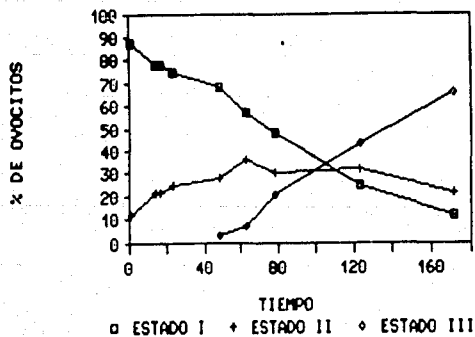
17

Macaca mulata TEORICA



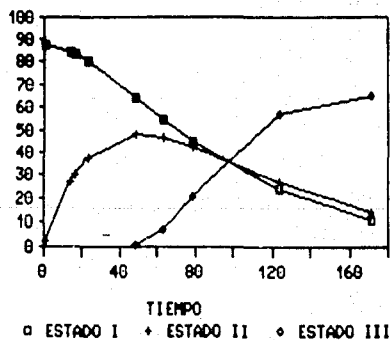
18

HUMANO IN VIVO



19

HUMANO TEORICO



20

DISCUSION.

DESARROLLO DEL OVARIO IN VIVO.

Desde los estudios clásicos de Forbes (1942), Burns (1961), Gruenwald (1942) y Torrey (1947), y más recientemente los de Merchant (1975) y Merchant-Larios (1976), Pelliniemi (1975 a y b), y Paranko (1986 y 1987) se ha establecido que la gónada de los mamíferos, desde la etapa indiferenciada, está formada por cordones sexuales. Los estudios realizados por Merchant (1975), Merchant-Larios (1976) y Merchant-Larios y Centeno (1981), muestran que los ovarios de rata tratados con busulfan no forman folículos, quedando únicamente con cordones sexuales estériles, ya que, el busulfan destruye la línea germinal. Sin embargo, autores como Byskov (1979) aceptan la presencia de cordones sólo en especies con meiosis retardada, como el cerdo, cuyo y conejo. No obstante, en este estudio identificamos la presencia de cordones sexuales en el ovario de ratón, que de acuerdo a Byskov, es una especie que carece de cordones sexuales. Paranko (1987), sugiere que la segregación total de los cordones sexuales del estroma es retardada en las hembras en comparación con los machos. El proceso de la foliculogénesis descrita en este trabajo y publicada recientemente por Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989) se inicia cuando los cordones sexuales están completamente segregados del estroma, y las células germinales empiezan la

meiosis. Además, es claro que en la formación de los folículos hay una participación activa de las células epiteliales dentro de los cordones sexuales y del estroma, fuera de éstos. La primera es evidente cuando las prolongaciones de las células epiteliales se interponen entre las células germinales en meiosis. Y la segunda cuando el estroma individualiza los folículos. Contrariamente a esta descripción del inicio de la foliculogénesis Peters (1969 y 1978), sugiere que los ovocitos se encuentran embebidos en el mesénquima ovárico, y que éste los rodea individualmente para formar los folículos. Por otro lado, Byskov y Lintern-Moore (1973) y Byskov y cols (1977), proponen que el mesonefros participa activamente en la formación de los folículos. Sin embargo, en el presente trabajo no se observa contribución de células de origen mesonéfrico en la formación de los folículos.

Asimismo, el proceso del inicio de la foliculogénesis, identificado en nuestro estudio, también se observó en otras especies de mamíferos como el hamster y la rata (observaciones no publicadas) y en las fotografías de trabajos de otros autores, como van Wagenen y Simpson (1967) y Konishi y cols (1986) en *Macaca mulata* y humanos, Byskov (1975) en gato, mink y hurón, en conejo, Ullman (1989) en marsupiales y finalmente en *Xenopus laevis* (Tanimura e Iwasawa, 1988). La observación de que varias especies de mamíferos compartan el mismo patrón morfo genético de formación de folículos, sugirió que los tres

estados de la foliculogénesis puedan ser descritos por un mismo juego de ecuaciones. Y por lo tanto, establecer un modelo matemático general para la foliculogénesis en el ovario de mamíferos.

UN MODELO MATEMATICO PARA EL INICIO DE LA FOLICULOGENESIS EN EL OVARIO DE MAMIFEROS

La importancia de desarrollar un modelo matemático para describir un fenómeno biológico es que permite extrapolar e interpolar el fenómeno biológico con muy pocos datos de éste. El modelo se basó en los datos de ovarios de ratón y hamster. Para ambas especies, los estados II y III se describen por ecuaciones idénticas. Sin embargo, para el estado I parece que existen dos comportamientos, representados por el ratón y el hamster. En el ratón, el comportamiento de la curva está descrita por la misma ecuación, que para el hamster en su segunda fase. Esto nos lleva a preguntarnos, ¿por qué hay este desfase en el tiempo del estado I en hamster? Si observamos el momento en que se inicia la primera formación de folículos en ambas especies y, la comparamos con el momento en que la gónada se forma, notamos que el intervalo de tiempo entre ambos procesos es más grande en el hamster que en el ratón. Por lo tanto, si esta observación para el desfase del estado I en hamster es aceptada, entonces en aquellas especies que inicien la formación de folículos con un intervalo de tiempo muy

corto entre ésta y la formación de la gónada, su estado I será descrito por la misma ecuación que describe al estado I del ratón. Por el contrario en especies con un retraso en la formación de los folículos con respecto a la formación de la gónada, será descrito por un juego de dos ecuaciones, como en el hamster. La comprobación del modelo en la rata, el humano y *M. mulata* apoya las aseveraciones anteriores. La rata pertenece al mismo grupo del ratón, mientras el humano y *M. mulata* pertenecen al grupo del hamster. Estudios en otros mamíferos nos ayudarían a confirmar o eliminar estas predicciones. Es importante señalar, que aunque es bastante prematuro hacerlo, que el modelo muy probablemente sea extrapolado a todos los mamíferos, como lo sugieren las observaciones histológicas en ovarios de otros mamíferos, como lo son el cayo, el cerdo y el conejo.

Por otra parte, las cuantificaciones del estado III en el ovario de ratón y hamster incluyen folículos en crecimiento. Sin embargo, esto no afecta el modelo, ya que, los folículos en crecimiento tienen su origen en los folículos primordiales. Faddy y col (1976) muestran un modelo analítico para la dinámica del crecimiento de los folículos, en el que se observa fluctuaciones entre los diferentes tipos de folículos en crecimiento en función del tiempo. La proporción de folículos primordiales disminuye con la edad y la proporción total de folículos se mantiene constante, aunque su número absoluto disminuye con la edad (Zuckerman, 1951). Por lo tanto, es

aceptable la idea de que la proporción del estado III es asintótico. Por otra parte si aceptamos esta predicción, entonces ¿cómo explicar histológicamente el comportamiento asintótico del estado I y II?

Algunas especies presentan folículos poliovulares, entre las que está incluida el hamster. Los folículos poliovulares son dos o más ovocitos rodeados por la misma capa de células de la granulosa y una membrana basal comunes a todos los ovocitos. Por lo tanto los ovocitos en estado I y II explican el origen de los folículos poliovulares y su comportamiento asintótico. La suma de los folículos poliovulares y de los folículos "monoovulares" es el 100%.

Una interrogante que surge de este trabajo es la siguiente: ¿cuál es la filogenia de este proceso morfogenético? Es decir, si este proceso de la foliculogénesis es observado en mamíferos, entonces es muy probable encontrar una descripción idéntica del mismo proceso en otros grupos de vertebrados. En Aves (Carlson y Sthal, 1985) observamos los mismos tres estados. En las especies de reptiles *Ctenosaura pectinata* y *Sceloporus torquatus torquatus* (María del Carmen Uribe, comunicación personal) se observan nichos germinales en ovarios adultos. Los nichos están constituidos por grupos de ovogonias, rodeados por células de apariencia epitelial. En cada etapa reproductiva las ovogonias inician la meiosis y posteriormente se inicia la formación folicular, de

forma semejante a lo sugerido por nosotros. Este proceso, aunque se desarrolla en etapas adultas, no hay por qué pensar que sea diferente al desarrollado en etapas fetales. Y finalmente en un trabajo de Tanimura e Iwasawa (1988) sobre la diferenciación sexual del ovario de *X. laevis* observamos los tres estados de la foliculogénesis descritos para mamíferos. En peces no tenemos referencias sobre este proceso.

DESARROLLO DEL OVARIO IN VITRO.

Byskov (1974 y 1977) propone al mesonefros como órgano primordial en el desarrollo del ovario, donde el mesonefros libera una sustancia inductora de la meiosis y contribuye con células para la formación de folículos. Sin embargo, los experimentos realizados durante el presente trabajo descartan al mesonefros como donador de células prefoliculares. La discrepancia entre los resultados de Byskov y los nuestros, podría deberse primeramente a que Byskov realizó sus experimentos con implantes de ovarios con mesonefros y sin mesonefros en la región subepidérmica de ratones adultos. Y los experimentos desarrollados en este trabajo fueron *in vitro*. En segundo lugar Byskov cortó los ovarios a la mitad para eliminar la región mesoneférica y en este trabajo se eliminó el mesonefros tratando de dañar lo menos posible el ovario. Por lo tanto, el hecho de implantar ovarios cortados a la mitad en un medio que no es controlable, en lo que respecta a factores

conocidos, puede llevar a interpretaciones incorrectas. Y más aún si se compara con ovarios intactos. Pues la no formación de folículos podría deberse entonces al daño en la gónada y no a la falta de mesonefros que contribuya con células para la formación de folículos. Por lo que el sistema de cultivo utilizado en este estudio tiene sus ventajas sobre el de Byskov, ya que, por un lado la gónada permanece intacta y por otro el medio de cultivo es controlable y conocido.

Por otra parte, los resultados de ovarios cultivados con suero y en ausencia de éste muestran claramente que el proceso de la foliculogénesis es inhibido en presencia del suero. El suero generalmente se usa en medios de cultivo por presentar una gran cantidad de factores de crecimiento. Sin embargo, Jost y Magre (1988) mostraron un efecto teratogénico del suero sobre el testículo fetal, donde la membrana basal de los cordones testiculares desaparece. En el ovario la comparación de su desarrollo en presencia y ausencia de suero sólo se ha hecho en dos trabajos, el presente y el publicado por McKay y Smith (1989). Este último no muestra diferencias entre el desarrollo del ovario en presencia y ausencia de suero. El parámetro usado por McKay y Smith para observar diferencias en el desarrollo del ovario, fue la presencia o ausencia de membrana basal alrededor de los folículos, es decir, el mismo parámetro usado por Jost y su grupo en el testículo. Mientras que el parámetro usado en los

experimentos del presente trabajo, fue la cuantificación de los tres estados del inicio de la foliculogénesis observados *in vivo*.

Chartrain y cols (1984) identificaron una molécula proteica de entre 60 y 100 Kd que muy probablemente interviene en la inhibición de la membrana basal de los cordones testiculares. En el presente trabajo, en un intento por determinar qué tipo de molécula o moléculas inhibían la foliculogénesis, se cultivaron ovarios con suero sin esteroides, proteínas de suero inactivadas a 56°C e inactivadas a ebullición. Los resultados mostraron que en las tres condiciones anteriores hubo inhibición de la foliculogénesis. El hecho de que haya inhibición de la foliculogénesis con proteínas totalmente inactivadas (ebullición) sugiere que muy probablemente la inhibición no fuera debido a un factor específico del suero. Esto es apoyado al existir inhibición de la foliculogénesis en los cultivos de ovarios con tripsina autodigerida. Y fue confirmado al existir inhibición del mismo proceso con polivinilpirrolidona (PVP), donde además la inhibición fue dependiente de la concentración de PVP en el medio (Gráfica 4). Estos resultados sugieren un posible efecto fisicoquímico en la inhibición de la foliculogénesis.

El nivel al que se realiza la inhibición no se conoce, pero podría sugerirse como blanco de la inhibición al mesénquima.

— Esto se sugiere por que para la formación de folículos es necesaria la participación del mesénquima (Estado III del inicio de la foliculogénesis). El efecto de la inhibición podría ser a nivel de movimiento celular. En este sentido Kondo y cols (1989), muestran que la migración de los fibroblastos *in vitro* es inhibida con altas concentraciones de suero. Aunque estos autores no mencionan un posible efecto fisicoquímico para la inhibición, sus resultados podrían sugerir que las altas concentraciones de suero inhiben la migración del mesénquima y por lo tanto la formación de los folículos. Aunque también es especulativo, podría sugerirse que las altas concentraciones de solutos en el medio afectan la osmolaridad del medio y que alteren las moléculas de la matriz extracelular (MEC) y el reconocimiento celular.

DETERMINACION DE UN PERIODO CRITICO PARA LA FORMACION DE LOS FOLICULOS

En este estudio observamos un periodo crítico de desarrollo del ovario, el cual está comprendido entre los 13 y los 14 días postcoito. Jacobson y Sater (1988), muestran tres resultados en el estudio de formación de órganos. 1) En el momento de aislar el órgano y cultivarlo *in vitro* se puede encontrar que el órgano se diferencia *in vitro*. Pues los factores que llevan a la diferenciación fueron suministrados antes del explante. 2) Puede suceder que el órgano aislado no se diferencie *in vitro* porque le hace falta el suministro de

los factores de diferenciación. 3) O bien que el órgano se diferencie *in vitro* en algunos casos y en otros no, según la edad. Esto sugiere a los autores que el explante del órgano se está haciendo en un periodo crítico de diferenciación. Este es el caso para los ovarios de ratón comprendidos entre los 13 y 14 días postcoito, etapa en la que sólo después de 10 días de cultivo forman folículos.

Los resultados muestran claramente que algunos órganos como la placenta, el riñón y el hígado, liberan un factor inductor de la foliculogénesis (FIF). Aunque los resultados no muestran ningún mecanismo de acción de dicho factor, se podría entrar al terreno de la especulación. El FIF activaría al mesénquima ovárico a migrar y por lo tanto, a fragmentar los cordones sexuales para la formación de los folículos. Los ovarios no inducidos muestran el mesénquima muy compacto alrededor de los cordones sexuales, esto sugiere que el mesénquima no migra. Aquí es importante señalar que el FIF únicamente actuaría a nivel del Estado III durante el proceso de la foliculogénesis. Si no existieran los ovocitos, entonces aunque exista el FIF no hay formación de folículos, como lo muestran los resultados de Merchant (1975), Merchant-Larios (1976) y Merchant-Larios y Centeno (1981) sobre ovarios de rata tratados con busulfán. Por otra parte, el FIF seguramente tendría que regular la síntesis de la MEC para que permita la interacción epitelio-mesénquima que lleva a la formación folicular. Entre los

factores conocidos que regulan la síntesis de la MEC, tenemos como candidato muy fuerte al factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Si la hipótesis de que el FIF regula la síntesis de la MEC es aceptada, entonces el FIF y el TGF- β podrían ser la misma molécula. Al revisar en la literatura la ontogenia del TGF- β en ratón (Heine y col 1987) encontramos que el TGF- β se libera en la placenta en varias edades (incluso los 13 y 14 días postcoito). En el hígado y riñón entre los 12 y 14 días postcoito. En el corazón a los 15 días postcoito y en el testículo y suprarrenal en edades muy avanzadas. Estas observaciones son coincidentes, aunque no dejan de ser interesantes. Por lo que los experimentos para resolver este problema serán realizados en estudios posteriores.

Es importante señalar que estos resultados son preliminares y que se completaran en forma más concreta y sistemática en un estudio posterior.

CONCLUSION

Como conclusión podemos sugerir la siguiente hipótesis sobre la diferenciación del ovario.

El ovario presenta desde la etapa indiferenciada cordones sexuales que rodean a las ovogonias, que se encuentran en constante proliferación. La diferenciación del ovario se inicia en el momento en que las ovogonias entran en meiosis. Estas probablemente inducen la penetración de prolongaciones de células epiteliales entre los ovocitos. La formación de los primeros folículos, que es siempre coincidente con la fase de diploteno de la meiosis en los ovocitos, se inicia cuando el estroma se interpone entre las células epiteliales que previamente separaron a los ovocitos. Esto sugiere, entonces, que los ovocitos en diploteno rodeados de células epiteliales inducen a éstas a señalar al mesénquima el sitio de fragmentación de los cordones sexuales (Estado III). El mesénquima ha sido previamente inducido a migrar por el FIF, de origen extragonadal.

APENDICE *

Es frecuente encontrar en las ciencias naturales fenómenos cuya dinámica está descrita por la ecuación diferencial autónoma

$$\dot{X}(t) = f [X(t); \mu] \quad (1)$$

donde μ es un vector de parámetros que caracterizan al sistema en estudio. La tarea de un investigador no termina con la obtención de la solución a la ecuación [1], pues para fines de interpolación y extrapolaciones necesario además determinar el vector de parámetros μ a partir de una colección de observaciones $X_i=f(t_i)$; $i=1, 2, \dots, n$ de campo o de laboratorio. Para el caso general este es un problema no resuelto por métodos elementales. Sin embargo, para el caso escalar como la ecuación [1] se puede dar un procedimiento simple.

Aquí sucintamente se considerarán casos particulares de la ecuación [1] y un sistema de dos ecuaciones diferenciales que describe la dinámica de un oscilador amortiguado.

1. La ecuación

$$\dot{X} = k X(t)$$

La solución general de ésta es

$$X(t) = C e^{kt}; \quad C \in \mathbb{R}$$

Los parámetros C y k se determinan a partir de la regresión lineal.

$$\ln X(t) = \ln C + kt$$

2. La ecuación de Gompertz.

$$\dot{X}(t) = k X(t) [\ln X_{\infty} - \ln X(t)] \quad [2]$$

La solución de ésta es

$$X(t) = X_{\infty} e^{-A} e^{-kt} \quad [3]$$

La terna de parámetros A , X y k se determinan a través del siguiente procedimiento.

$$\ln X(t+1) = M \ln X(t) + B$$

donde $M = e^{-k}$ y $B = (1 - e^{-k}) \ln X_{\infty}$

El parámetro restante (A) se determina usando [3], por medio de la regresión.

$$\ln [\ln X_{\infty} - \ln X(t)] = B_1 + M_1 t$$

donde $M_1 = -k$ y $B_1 = \ln A$

3. La ecuación del Oscilador Armónico Amortiguado

El caso

$$\ddot{X}(t) + 2p\dot{X}(t) + W^2 X(t) = 0$$

La solución general de ésta para el caso que se considera es

$$X(t) = (C_1 + C_2 t) e^{-kt} \quad [4]$$

donde la terna de parámetros C_1 , C_2 y k se determinan así. Los primeros dos (C_1 y C_2) frecuentemente pueden evaluarse si se tiene suficiente información del fenómeno en algún momento (el inicial). Por ejemplo si se saben

$$X(t_0) = X_0 \quad \text{y} \quad \dot{X}(t_0) = V_0$$

C_1 y C_2 se determinan resolviendo un sistema de dos ecuaciones algebraicas con dos incógnitas.

Para el que falta (k), suele usarse la información experimental de que se dispone, por ejemplo, el punto t^* de inflexión de la gráfica de [4]. En algunos casos, por ejemplo, si $V_0=0$ y $X_0 > 0$ resulta que

$$k = \frac{1}{t^*}$$

5. Combinaciones

Frecuentemente se encuentra que una fase de los datos experimentales queda razonablemente descrita por una cierta función. Es decir que

$$X_1(t); \quad 0 < t < t^*$$

$$X_2(t); \quad t > t^*$$

Entonces si el fenómeno en cuestión se describe por una variable que no presenta discontinuidades la siguiente relación de continuidad

$$\dot{X}_1(t^*) = X_2(t^*)$$

aunada a la relación de suavidad

$$\dot{X}_1(t^*) = X_2(t^*)$$

que a su vez correspondería a considerar que la variable relevante no tiene cambios bruscos, permite determinar parámetros implícitos. Esto, desde luego, no invalida que en cada fase puedan hacerse ajustes mediante los cuales algunos otros parámetros logren ser evaluados.

* Este apéndice fue redactado en su totalidad por el Fis. Faustino Sánchez Garduño del Departamento de Matemáticas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

REFERENCIAS.

1. Miramontes VP y Sánchez GF (1988) Variables elegantes y la determinación de parámetros en modelos biológicos.
2. Sánchez GF Matemáticas para las Ciencias Naturales. 2ª parte. Serie Textos. Vinculos Matemáticos del Departamento de Matemáticas. Facultad de Ciencias, UNAM.

REFERENCIAS

- Allen EM (1904) The embryonic development of the ovary and the testis of the mammals. Am. J. Anat. 3: 89-153.
- Andersen CY, Byskov AG y Grinsted J (1981) Partial purification of the meiosis inducing substance (MIS). En Development and Function of Reproductive Organs (Byskov AG and Peters H eds) Excerpta Medica Amsterdam 73-80.
- Angelopoulou A, Magre S y Jost A (1984) Initial phases of the rat testis differentiation in vitro. J. Embryol. Exp. Morphol. 83:15-31.
- _____ y Magre S (1987) Expression of fibronectin and laminin in fetal male gonads in vivo and in vitro with and without testicular morphogenesis. Cell Differ. 21: 31-36.
- Angelova P y Jordanov (1986-87) Meiosis-inducing and meiosis-preventing effects of sex steroid hormones on hamster fetal ovaries in organ culture. Arch. Anat. micr. Morphol. exper 75(3): 149-159.
- Alvarez AB y Merchant LH (1986) Mouse primordial germ cell use fibronectin as substrate for migration. Expl. Cell Res. 165: 362-368.
- Baker TG y Neal P (1973) Initiation and control of meiosis and follicular growth in ovaries of the mouse. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys. 13: 137-144
- _____ (1974) Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture J. Anat 117(3); 591-604
- Borum K (1961) Oogenesis in the mouse: a study of meiotic prophase. Expl Cell Res 24:495-507.
- 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.
- Burns BK (1961) Role of hormones in the differentiation of sex. En Sex and Internal Secretions Vol. I (Young WC ed) The Williams and Williams Co. 76-158.
- Byskov AG (1974) Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? Mature 252: 396-397
- 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.
- _____ (1978) The anatomy and ultrastructure of the rete system of the fetal mouse ovary. Biol. Reprod. 19: 720- 735.
- _____ (1979) Regulation of meiosis in mammals. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1251-1261.
- _____ (1985) Control of Meiosis Arch. Anat. micr. Morphol. exper 74(1):17-18.
- _____ y Lintern-Moore S (1973) Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovary. J. Anat. 116: 207-217.

- _____ y Saxén L (1976) Induction of Meiosis in the Fetal Mouse Testis in vitro. Dev. Biol. 52: 193-200
- _____ Skakkebaek NE, Stafanger G y Peters H (1977) Influence of the ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. J. Anat. 123: 77-86.
- Carlson W y Sthal A (1985) Origins of the somatic components in chick embryos gonads Arch. Anat. micr Morphol. expér 74(1):52-59.
- Challoner S (1975a) Studies of oogenesis and follicular development the golden hamster. 2 Initiation and control of meiosis in vitro. J. Anat. 119:149-156.
- _____ (1975b) Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 3. The initiation of follicular growth in vitro. J. Anat. 119: 157-162.
- Chartrain I, Magre S, Maingard M y Jost A (1984) Effect of serum on organogenesis of the rat testis in vitro. IN VITRO 20(2): 919-922.
- Chinal-Monroy (1987) El proceso de la foliculogénesis en el ovario del ratón (Mus musculus): Estudio experimental in vitro Tesis Profesional. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Chiquoine AD (1954) The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. Anat. Rec. 118: 135-146.
- 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.
- Czernobilsky B, Moll R, Levy R Franke WW (1985) Coexpression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cell of the human ovary. European J cell Biol 37:175-190.
- Donovan FJ, Stott D, Godin F y col (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. Cell 44:831-838.
- _____ (1987) Studies on the migration of mouse germ cells. J.Cell Sci Suppl 8:359-367
- Evans CE, Robb DI, Tuckelt F y Challoner S (1982) Regulation of meiosis in the fetal mouse gonad. J. Embry Exper Morphol 68: 59-67
- Faddy MJ, Jones EC y Edwards RG (1976) An analytical model for ovarian follicle dynamics. J. Exp. Zool 197:173-186.
- Fazel AR, Schulte BA, Thompson RP y Splicer SS (1987) Presence of an unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. Cell Differ. 21: 199-211
- Forbes TE (1942) On the fate of the medullary cords of the human ovary. Contr. Embryol. 30: 11-15.
- Francoavilla S y Zamboni I. (1985) Differentiation of mouse ectopic germinal cells in intra- and perigonadal location J. Exp. Zool 233: 101-119.

- Franko WM Grund C y Schmid E (1979) Intermediate-sized filaments present in Sertoli Cells are of the vimentin type. Eur J cell Biol 19: 269-275.
- Fujimoto T, Yoshinaga K y Kono I (1985) Distribution of fibronectin on the migratory pathway of the primordial germ cells in mice. Anat. Rec. 211: 271-278.
- Gondos B (1969) Ultrastructure of the germinal epithelium during oogenesis in the rabbit J Exp Zool 172(4): 465-480.
- Grinstad J (1982) Influence of mesonephros on fetal and neonatal rabbit gonads. II. Sex steroid release by the ovary in vitro. Acta endocrin 99: 281-287.
- _____ y Byskov AG (1981) Meiosis-inducing and meiosis-preventing substances in human male reproductive organs Vert. Ster 35(2):199-204.
- _____, Byskov AG y Andersen MP (1979) Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro by rete testis tissue from pubertal mice and bulls J. Reprod. Vert 56653-656.
- _____, Byskov AG, Christensen IJ y Jenseniv JC (1982) Influence of mesonephros on fetal and neonatal rabbit gonads. I. Sex-steroid release by testis in vitro. Acta endocrin 99:272-280.
- Gruenwald P (1942) the development of the sex cords in the gonads of man and mammals. Amer. J. Anat. 70: 359-397
- Heasman J y Wylie CC (1981) Contact relations and guidance of primordial germ cells on their route migratory in embryos of Xenopus laevis. Proc. R. Soc. London, B 213: 41-58
- Heine UI, Muñoz EF, Flanders KC y col (1987) Role of the transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo
- Jacobson AG y Sater AK (1968) Features of embryonic induction. Development 104:341-359
- Jeepensen TH (1975) Surface epithelium of the fetal guinea pig ovary: A light and electron microscopic study. Anat Rec 183(4): 499-516.
- Jost A y Magre S (1968) Control Mechanisms of Testicular Differentiation. Phil. Trans R Soc Lon. B 322:55-61.
- Konishi I, Fuji S y Okamura H (1966) Development of interstitial cells and ovogerous cords in human fetal ovary: an ultrastructural study. J. Anat. 148: 121-135.
- Kondo H, Momaguchi TA y Yonezawa Y (1989) Effect of serum from human subjects of different ages on migration in vitro of human fibroblast. Mechan. of Ageing and Develop 47: 25-37
- Kuwana T, Maeda-Suga y Fujimoto T (1966) Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro. Anat. Rec 215: 403-406.
- Magre S, Angelopoulou A y 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.

- _____ Patsavoudi R Jost A Castanier M Scholler R (1984) Dissociation entre organogénèse et différenciation endocrine du testicule de rat in vitro. INSERM. 123: 407-412.
- Magre S y Jost A (1984) Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 7831-7834.
- Martinovich PM (1938) The development in vitro of the mammalian gonad, ovary and oogenesis Proc R Soc B 125: 232-249.
- Bauléon P, DeVictor-Vuillet y Luciani JM (1976) The Preleptotene chromosome condensation and descondensation in the ovary of the sheep embryo. Ann Biol anim Biochem Biophys 16(3):293-296.
- McKay D y Smith R (1985) Ultrastructural studies on the mouse gonads in vitro. J. Anat 140: 539.
- _____ (1986) The differentiation of mouse gonad in vitro a light and electron microscopy study. JEMM. 97: 189-199
- _____ (1989) Mouse gonadal differentiation in vitro in the presence of fetal calf serum. Cell Differ. and Develop. 27: 19-28.
- Merchant LH (1975) Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. Develop. Biol. 41: 1-21.
- Merchant-Larios H (1976) The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. En: Progress in differentiation research. (Ed. Müller-Hérat M) Elsevier New York. 453-462.
- _____ (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. Blerkow J Motta PM) Martinus Nijhoff Publishers Boston. 19-30.
- _____ 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 Ysafriri) 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 Chimal-Monroy J (1989) The Ontogeny of Primordial Follicles in the mouse ovary. En: Developments in Ultrastructure of Reproduction (P. Motta ed). Alan R Liss Inc. 55-63.
- _____ Popova L yReyga-Brion M (1984) Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. Develop. Growth and Differ. 26:403-417.

- Odor L y Blandau R (1971) Organ cultures of fetal mouse ovaries. I Ligth microscopic structure. Am. J. Anat. 131: 387-414.
- Ohno S y Smith JB (1964) Role of the fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. Cytogenetics 3: 324-333
- Paranko J (1986) Extracellular matrix and intermediate filaments in the morphogenesis of fetal rat genitalia. Doctoral Thesis. Turku, Finland.
- _____ (1987) Expression of type I and III collagen during morphogenesis of fetal rat testis and ovary. Anat. Rec. 219:91-101.
- _____ Pelliniemi L y Vaheri A (1983) Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads. Differentiation S23: 572-581.
- _____ Kallajoki M, Pelliniemi L (1986) Transient coexpression of citokeratin and vimentin in differentiation rat Sertoli cells. Develop. Biol. 117: 35-44.
- Patsavoadi 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 (1975a) Ultrastructure of gonadal ridge in male and female pig embryos. Anat. Embryol. 147: 19-34.
- _____ (1975b) Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. Amer. J. Anat. 147: 89-112.
- _____ (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 (1969) The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrin. 62: 98-116.
- _____ (1976) Intrauterine gonadal development. Fert. Ster. 27(5): 493-500.
- _____ (1978) Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrate ovary. (Ed. Jones EE) Plenum New York. 121-144.
- Picones MA (1982) Modelos matemáticos para la Biología. Naturaleza 13(6): 292-297.
- Pinkerton JHM McKay D Adams E Hertig A (1962) Development of the human ovary. A study using histochemical techniques. Obstet. Gynec. 18: 152-181.
- Rossen-Runge BC (1961) Rudimental genital canals of the gonad in the rat embryos. Acta Anat. 44(1): 1-11.

- Rothbaldt GH, Arbogast LY, Ovellet L y Howard BV (1976) Preparation of delipidized serum proteins for use in cell culture systems. In Vitro 12 (8): 554-557. Sarén L y Lehtonen K (1987) Embryonic kidney in organ culture. Differentiation 36: 2-11.
- Shato M (1985) The histogenesis of the gonad in the rat embryos. J. Anat. 143: 17-37.
- Stein LE y Anderson E (1979) A qualitative a quantitative study of rete ovarii development in the fetal rat correlation with the onset of meiosis and follicle cell appearance. Anat. Rec. 193(2): 197-211.
- 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 orgaization of fetal mouse gonads in vitro. Biol. Reprod. 30: 189-196.
- ____ Seen C Koide SS (1986) Requieriment 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.
- Tanimura A e Iwasawa H (1988) Ultrastructural observations on the origin and differentiation of somatic cells during gonadal development in the frog Rana nigromaculata. Develop. Growth and Differ. 30 (6): 681-691.
- Torrey TW (1945) The development of the urogenital system of the albino rat. II. The gonads. Am. J. Anat. 76: 375-397.
- Ullman SL (1989) Ovary development in bandicoots: sexual differentiation to follicle formation. J. Anat. 165:45-60
- 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. En: 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.
- van Wagenen G y Simpson R (1965) Embryology of the ovary and testis. Homo sapiens and Macaca mulatta. Yale University Press, New Haven.
- Wilson RH (1926) Origin and development of the rete ovarii and the rete testis in the human embryo. Contrib. Embryol. 17: 69-88.
- Witschi E (1942) Hormonal regulation of development in lower vertebrates. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. vol X: 145-151
- ____ (1948) Migration of the germ cells of human embryos from yolk sac to the primitive gonadal fold. Contrib. Embryol. 32: 67-80.

- _____ (1951) Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. Recent Progr. Horm. Res. 6: 1-23.
- _____ (1956) Development of Vertebrates. Saunders, Philadelphia.
- _____ (1963) Embryology of the ovary. En The ovary. Grady HG y Smith DE, (Eds). The Williams Co. 1-10.
- _____ (1965) Hormones and embryonic induction. Arch. Anat. Micr. Morph. Exp. 54(1):601-611.
- _____ (1967) Biochemistry of sex differentiation in vertebrate embryos. En The Biochemistry of Animal Development (Weber R Ed.) Vol II: 193-225.
- _____ y Dale E (1962) Steroid hormones at early development stages of vertebrates. Gen. and Comp. End. Suppl. 1: 356-361.
- Yanada 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, 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.
- _____ y Upadhyay S (1983) Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. J. Exp. Zool. 228: 173-193.
- Zuckerman S (1951) The number of oocytes in the mature ovary. Recent Progr. Horm. Res. 6: 63-109.