

94
24



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL 17B-ESTRADIOL SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES DEL OVARIO EMBRIONARIO DE Gallus Domesticus

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

Pablo Gerardo Hoffmann Salcedo



MEXICO. D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



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.

INDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	3
	II.1 Origen y migracion de las celulas germinales	3
	II.2 Formacion de la cresta Urogenital	5
	II.3 Ovogenesis y Foliculogenesis	14
	II.4 Actividad hormonal en el ovario en desarrollo	18
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV	MATERIAL Y METODO	21
V	RESULTADOS	25
VI	DISCUSION	27
VII	CONCLUSION	31
VIII	APENDICE (Tablas y graficas)	32
IX	BIBLIOGRAFIA	36

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar los cambios en las diferentes poblaciones celulares del ovario embrionario de Gallus domesticus durante su desarrollo y el efecto del 17 β -Estradiol sobre estas poblaciones. Se administraron 200 ng. de 17 β -Estradiol y vehículo a embriones de Leghorn (Babcock B-100) sobre la membrana corioalantoidea a los 11, 13 y 15 días de desarrollo. Los ovarios izquierdos se extrajeron y estudiaron después de ser disgregados con tripsina a los 13, 15 y 17 días de incubación y a las 14 y 24 horas posteclosión. Las células en suspensión se clasificaron en a) células germinales, b) células somáticas sin inclusiones lipídicas y c) células somáticas con inclusiones lipídicas. El número máximo de células germinales se obtuvo a los 17 días de desarrollo (1.31 \pm 0.04 millones de células por ovario a modo) y este valor es menor para los pollos de 24 hrs. posteclosión (0.19 \pm 0.14 modo). Los datos obtenidos para células germinales de ovarios tratados con estradiol no difieren significativamente de los controles. El número del total de células somáticas (b+c) en ovarios control a los 17 días de desarrollo fue 6.32 \pm 0.35 modo. Se obtuvo un valor similar para los ovarios tratados de la misma edad (5.66 \pm 0.35 modo) y para ovarios no tratados a las 24 horas después del nacimiento (6.69 \pm 0.35). El tratamiento con 17 β -Estradiol induce un incremento en el número de células somáticas en ovarios de pollo de 24 hrs. posteclosión (7.66 \pm 0.35 modo).

Edn: que el número de células somáticas con inclusiones
 lipídicas no cambia de manera significativa en ambos grupos a
 las 24 hrs. posteriores (0.49±0.14 y 0.33±0.04 resp.
 controles y tratados respectivamente). La diferencia en el
 número total de células somáticas se observa en las que no
 presentan inclusiones lipídicas (1146.19±0.37 y 7.36±0.36
 para controles y tratados respectivamente). Estos resultados
 sugieren que el efecto proliferativo del 17 β -Estradiol en el
 ovario embrionario de Gallicia dimorpha se observa en una
 subpoblación de células somáticas.

INTRODUCCION

5

Se sabe que las células germinales primordiales (CGP) originaran el unico tipo de células que sufre meiosis. Mediante este proceso, se forman los gametos del individuo adulto que, dependiendo del complemento cromosómico, serán ovulos o espermatozoides. Estas células germinales primordiales pueden distinguirse desde las etapas iniciales del desarrollo embrionario de los vertebrados debido a su tamaño y a su posición bien definida.

II.1 ORIGEN Y MIGRACION DE LAS CGP

En las aves, de manera similar al resto de los vertebrados, el origen de las CGP a esta asociado con la región extraembrionaria en la parte caudal del embrión.

Durante la gastrulación, esta zona da origen al hipoblasto y posteriormente a la pared del saco vitelino. Desde esta posición, las células germinales son acarreadas o desplazadas hacia la parte cefálica del embrión de manera pasiva, a consecuencia de la formación y crecimiento de la cavidad del saco vitelino.

A las 18.00 horas de incubación, las células germinales están situadas en el endoblasto extraembrionario en la parte anterior al embrión, formando un arco o media luna que se extiende lateralmente hacia la parte posterior. Dicho arco de células germinales, se encuentra entre el área

pelucida y la membrana del saco vitelino. Desde esta porción, las CGP's migran hacia las crestas urogenitales en formación.

A las 25.00 horas de haberse iniciado la incubación, los islotes sanguíneos comienzan a formarse en el mesodermo que rodea al embrión, en lo que será el área vascular. Una vez que se ha establecido la circulación sanguínea, el número de células germinales se incrementa rápidamente en el mesodermo intraembrionario, alcanzando un máximo entre las 50.00 y 55.00 horas de incubación (Clawson y Down, 1968; Singh y Meyer, 1967; Fujimoto *et al.*, 1975, 1976). Sin embargo, algunas células germinales han sido observadas en tejidos intraembrionarios antes de que se inicie la circulación (Schwartz y Down, 1973).

Alrededor de las 48.00 horas, las células germinales primordiales comienzan a llegar al mesenterio dorsal y a las crestas urogenitales por medio del torrente circulatorio, completándose la migración entre las 90.00 y 120.00 horas de haberse iniciado la incubación.

Tanto en aves como en los reptiles con migración pasiva vascular de las células germinales, dicho fenómeno se encuentra precedido y seguido por intervalos de migración activa y comportamiento ameboide de las CGP's. El primero de estos episodios ocurre cuando las células germinales dejan el embrión y pasan a los islotes sanguíneos del mesodermo extraembrionario. Es durante esta etapa que algunas de las células germinales migran a tejidos mesodérmicos

intraembrionarios antes de que se establezca la circulación sanguínea. El segundo de estos episodios de comportamiento amebocida, se lleva a cabo cuando las células germinales dejan el sistema vascular, atravesando las paredes de los vasos capilares, donde la reducción del flujo sanguíneo facilita la emigración.

Este comportamiento persiste hasta el octavo día del desarrollo en las hembras, y por un periodo un poco mayor en los machos.

Dado que las células germinales tienen un origen extraembrionario, debe reconocerse la importancia de la atracción que ejerce sobre estas el epitelio celómico que recubre los primordios de las crestas urogenitales.

Por su morfología, las células germinales primordiales son fácilmente distinguibles del resto de células del embrión en desarrollo. Algunas de las principales diferencias son su relativo gran tamaño y el hecho de que presentan contornos bien definidos a diferencia de los contornos más difusos de las células somáticas que las rodean. En la mayoría de los vertebrados las CGP's poseen diámetros que varían entre 10 y 20 micras, y usualmente tienden a disminuir en tamaño a consecuencia de las divisiones mitóticas que sufren al multiplicarse. Sin embargo, las células germinales de mamíferos pueden ser la excepción, ya que se ha observado que en embriones de ratón, estas aumentan de tamaño entre el periodo de migración y su establecimiento en las crestas genitales (Spiegelman y

Bennett, 1975; Clark y Eddy, 1975).

En las especies de aves y reptiles el diametro promedio de estas celulas varia entre 10 y 18 micras.

Aunque la forma de las CGP's no es la misma durante todas las etapas por las que atraviesan, son practicamente esfericas o ligeramente elipsoidales al principio de la gestacion y despues de su establecimiento en la cresta genital, con superficies lisas y carentes de protuberancias o proyecciones. Al dejar el endocelato, donde se encuentran formando una media luna anterior al embrión, y pasar a los tejidos mesodermicos en formacion, iniciando su migracion, desarrollan pseudopodos rudimentarios, que les confieren mayor movilidad y adquieren un comportamiento ameboides. Es tambien durante esta etapa, que se ha observado actividad fagocitica y pinocitica en celulas germinales de embrión de pollo.

A los 18.5 dias de incubacion, una vez que las celulas germinales han alcanzado el epitelio germinal en la gonada indiferenciada, adquieren nuevamente una forma esferica, voluminosa y presentan un nucleo excéntrico, grande y bien definido, que se caracteriza por presentar cromatina granular dispersa, y poseer algunos nucleolos pequeños (Kopp y Stahl, 1975).

Las reservas energeticas de las CGP's, en forma de inclusiones de lipidos y glucogeno, se encuentran con gran

7
abundancia en la mayoría de los vertebrados. Sin embargo en mamíferos, las inclusiones lipídicas son escasas, o pueden encontrarse completamente ausentes (Spiegelman y Bennett, 1973; Clark y Eddy, 1975). Por lo que respecta al contenido de glucógeno en células germinales de mamíferos, la información es conflictiva.

Las células germinales de aves se caracterizan por su gran contenido de glucógeno, el principio disperso en el citoplasma, y posteriormente concentrándose hacia uno de los polos de la célula, adquiriendo una apariencia granular.

Al igual que el glucógeno, el número de inclusiones lipídicas se reduce durante la migración y establecimiento en la gónada indiferenciada. En los embriones de pollo hembra, estas inclusiones desaparecen por completo alrededor del octavo día de incubación, aunque en los machos persisten por un lapso mayor (Lawson y Donn, 1963; Dubois, 1965; Dubois y Cuminge, 1968).

La presencia de inclusiones como reservas de energía, está íntimamente relacionada con el comportamiento ameboides y la migración activa, desde su lugar de origen hasta llegar a la cresta genital. Mientras que dichas reservas energéticas se reducen durante la migración, entre el cuarto y el octavo día de incubación, tanto el retículo endoplásmico como el número de ribosomas se incrementan.

Una vez que las células germinales han entrado en el torrente sanguíneo, el aparato de Golgi se hace prominente

a consecuencia del incremento en la síntesis de proteínas en el retículo endoplasmico (Simon, 1964).

8

Aunque el desarrollo de la gónada indiferenciada sufre los mismos procesos morfogenéticos que cualquier otro órgano en formación (división celular, muerte celular programada, movimientos morfogenéticos...etc.), la principal diferencia es que su desarrollo se encuentra fuertemente influenciado por células de origen externo, como son las células germinales primordiales. Una vez completada la formación, las gónadas se encuentran constituidas por dos tipos celulares, células somáticas y células germinales.

II.2 FORMACION DE LA CRESTA UROGENITAL

La íntima relación entre células somáticas y germinales, se inicia con la atracción que ejerce sobre estas últimas el epitelio celómico de la cresta urogenital, que se diferencia tempranamente. Por medio de los estudios de la ultraestructura de dicho epitelio en embrión de pollo, se ha mostrado que la superficie apical presenta proyecciones con inclusiones que parecen descargar su contenido hacia la cavidad celómica (Cuminge y Dubois, 1971).

Durante las etapas iniciales del desarrollo de vertebrados, las crestas urogenitales comienzan su formación como engrosamientos a ambos lados del mesenterio dorsal, dispuestos de manera longitudinal y paralelos al eje central del embrión. La gónada a su vez se desarrolla a lo largo de

la superficie ventral de dicha cresta, en la region que se encuentra entre las somitas 23 y 27.

Existen tres teorias basicas sobre la diferenciacion no sexual de la gonada a partir de la cresta urogenital.

La primera de ellas propone que la gonada se forma por una proliferacion celular temprana del epitelio celomico que recubre al mesonefros, que dara origen a la corteza gonadal, y una proliferacion a partir de la superficie del mesenquima del mesonefros, que proporcionara las celulas de la medula de la gonada (Witschi, 1931).

Burns (1961) en sus trabajos sobre el papel de las hormonas en la diferenciacion sexual, propone que el epitelio celomico contribuye tanto a la formacion de la medula de la gonada, por una primera proliferacion que proporciona las celulas de los cordones medulares en testiculo, como a la formacion de la corteza por una segunda proliferacion, que originara los cordones corticales en el caso del ovario. Considera que el mesenquima del mesonefros no se encuentra relacionado con la formacion de la gonada indiferenciada.

La tercera de estas teorias (Zamboni et al., 1979; Byskov, 1981; Upadhyay et al., 1981; Wartenberg, 1991) propone que aunque el epitelio celomico se encuentra relacionado con el desarrollo de la cresta genital, carece de importancia, ya que es el mesenquima del mesonefros el que aporta las celulas que formaran la gonada, sin existir necesariamente una primera y una segunda proliferaciones celulares.

De acuerdo con Merchant-Larios (1964), si el origen de las células somáticas que forman la gónada indiferenciada es a partir del blastema mesonefrico, debe suponerse que dichas células sufren una dediferenciación y rediferenciación, dado que cuando se habla de células del mesonefros, se presupone que estas ya tendrían una asignificación futura, antes de migrar a otro órgano y adquirir una determinación que implica una función completamente distinta. Hasta la fecha no se ha comprobado que durante el desarrollo embrionario normal ocurra este fenómeno.

El blastema mesonefrico se refiere entonces únicamente al grupo de células que son el origen embriológico del mesonefros, y blastema renal, es el grupo de células a partir de las cuales se desarrolla la corteza renal. Por lo tanto, la mayor parte del mesénquima urogenital que no se encuentra asociado con la formación del mesonefros, se encuentra disponible para formar la gónada indiferenciada.

Sin embargo el hecho de que algunas células mesenquimatosas, precursoras de las células somáticas de la gónada procedan de la región mesonefrica, no significa que sean células mesonefricas. Estas proceden del mesénquima urogenital que es pluripotencial, y su diferenciación ocurre durante, o después de la diferenciación de las estructuras del mesonefros (Merchant-Larios, 1964).

Una característica notable en el caso de la morfogénesis gonadal de aves, es la asimetría que existe entre ovario derecho e izquierdo.

Sin tomar en cuenta el origen exacto de los elementos somáticos que componen las diferentes regiones de la gónada del embrión de pollo, el desarrollo de la gónada puede resumirse de la siguiente manera:

Aproximadamente a las 72 horas el epitelio celómico que recubre la cresta urogenital, sufre un engrosamiento y diferenciación temprana, adquiriendo la capacidad de atraer a las células germinales primordiales que se encuentran fuera del embrión.

Una vez que las OGF e llegan hasta este epitelio, migran hacia partes más internas de la cresta y se establecen en la región de la cresta urogenital, que posteriormente se divide en dos regiones, la zona cortical y la zona medular.

Al cuarto día de incubación, todavía no existe diferencia entre machos y hembras, ni se ha hecho evidente la asimetría entre la gónada izquierda y la gónada derecha. La médula primitiva, que se diferencia en la parte más interna de la cresta urogenital, está constituida por cordones celulares rodeados por una lámina basal y presenta invasión de vasos sanguíneos que provienen del mesodermo de la región del mesonefros. A partir del sexto día, la diferencia entre las gónadas izquierda y derecha se hace evidente, la región cortical de la gónada derecha sufre una regresión y se muestra aplastada, mientras que la corteza primitiva de la gónada izquierda mantiene su composición por células

columnares y contiene a las células germinales.

Después de las 125 horas, se puede observar la diferencia entre testículos y ovarios. En el primer caso los cordones medulares se hacen más conspicuos y se desarrollan desde la parte interna hacia la región cortical, existiendo entre estos un estrato bien definido. Dentro de estos cordones medulares se encuentra un gran número de células germinales, que llegan hasta esta zona acarreadas de manera pasiva por la invasión de células epiteliales hacia partes más internas de la gónada en formación.

Por lo que respecta al ovario, la corteza primitiva izquierda aumenta su espesor y mantiene un gran número de células germinales. En este momento comienza la proliferación, y después de múltiples divisiones mitóticas, las OGP's dan origen a las ovogonias. Estas forman grupos o acumulos, a los que se denomina nidos de ovogonias.

Una lamina basal separa a la zona cortical de la zona medular primitiva. Esta última, se encuentra formada por cordones medulares pobremente definidos y no presenta un estrato bien desarrollado, a diferencia del testículo.

Posteriormente, a los ocho días de desarrollo, solo la gónada izquierda se ha diferenciado hacia ovario, mientras que la gónada derecha se hace vestigial. La corteza de la gónada izquierda continúa su crecimiento, y las células somáticas comienzan a organizarse en cordones corticales o cordones sexuales secundarios, en los cuales se encuentran los nidos de ovogonias.

Estas células de ovogonias, poseen una conformación sinuoidal debido a la presencia de un gran número de puentes intercelulares que resultan de la citocinesis incompleta durante las divisiones mitóticas, y a través de los cuales existe estrecha comunicación citoplásmica. La función específica de estas interconexiones no está definida, aunque parece estar relacionada con la sincronización de las divisiones mitóticas, su entrada y paso por los diferentes estados de la griffe de la metema.

Mediante estudios sobre los procesos inductivos de la ovogénesis gonadal en anfibios y aves, se ha demostrado la necesidad de la existencia de los conductos preterrestres, para que el desarrollo tanto del mesonefros como de la gónada se lleve a cabo (Waddington, 1938; O'Connor, 1939; Hovatta, 1960). Sin embargo, Bishop-Galante (1966) ha demostrado que el desarrollo y diferenciación de la gónada tanto en machos como hembras, es independiente de la existencia del mesonefros, ya que cuando es eliminado experimentalmente, la formación y diferenciación gonadal se lleva a cabo de manera normal.

Se sabe que aunque la presencia de células germinales no es esencial para el inicio de la formación de la cresta urogenital y la diferenciación no sexual de la gónada (Merchant-Larios, 1975, 1976), la diferenciación hacia ovario no se realiza en ausencia de células germinales. Estudios en ovarios esterilizados experimentalmente durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, en distintos especies

de vertebrados, muestran que la carencia de ovocitos inhibe la formación de folículos, y sin éstos, la citodiferenciación de las células esteroidogénicas no se efectúa.

II.3 OVOGENESIS Y FOLICULOGENESIS

Las ovogonias de aves se distinguen por su forma esférica, y su gran tamaño, aunque son más pequeñas que las células germinales primordiales. Su núcleo en interfase es de relativo gran tamaño, con dos masas de cromatina, y presenta un solo nucleolo. Estas células se encuentran formando los nidos de ovogonias anteriormente mencionados. La actividad mitótica se incrementa, y se hace exponencial entre el noveno y decimotercer día de incubación (Hughes, 1963; Wylie, 1972), y como resultado de esta proliferación, el número de células germinales se ha multiplicado aproximadamente 25 veces su valor original alrededor del día 17 de incubación. Esta explosión en la actividad divisoria, comienza en los nidos que se encuentran en la parte central de la corteza de la gónada, y se extiende hacia los extremos de la misma.

La meiosis consiste en dos divisiones celulares, por medio de las cuales se reduce a la mitad el número cromosómico de las células que dan origen a los gametos. Cada una de estas divisiones celulares presenta cuatro diferentes etapas o fases: profase, metafase, anafase y telofase.

La profase de la primera división meiótica (profase I), se encuentra subdividida en leptoteno, zigoteno, paquíteno y diploteno, de acuerdo a los cambios y ajustes que

entran los ovocitos como preparación para la primera división meiótica.

El momento en el que se inicia la ovogénesis es cuando, después de la proliferación, las ovogonias dejan de multiplicarse, y entran en el estado de síntesis (S) o proleptoteno, antes de la profase meiótica I. Callebaut y Dubois (1965) definen como el inicio de la ovogénesis, cuando se incrementa la incorporación de timidina triciada por parte de las células de la línea germinal, en estudios autorradiográficos del ovario embrionario de pollo. La incorporación de esta base marcada retrospectivamente, es máxima alrededor del día 14 de incubación, intermedia entre los días 15 y 16 y máxima al día 17. Esto quiere decir que el número de células que comienzan la síntesis de ácido nucleico anterior a la profase de la meiosis, se incrementa exponencialmente a partir del día 14 y alcanza un máximo al decimoséptimo día de gestación.

Las células germinales que se encuentran agrupadas en un mismo nido, entran en profase, y pasan por las diferentes subfases de esta, de manera sincronizada. Cuando estas células se encuentran en leptoteno, se caracterizan por la condensación de los cromosomas en filamentos dentro de la matriz nuclear, que además presenta un cuerpo heteroploidico, probablemente el cromosoma "Z". Es a partir de este momento que se les denomina ovocitos, y dejan de ser ovogonias. Los primeros ovocitos en leptoteno se observan en los nidos de la zona central de la corteza gonadal, y posterior-

mente en las zonas de la periferia, que en este momento aún se encuentran en la etapa de proliferación.

Durante el migrado, los cromosomas homólogos se polarizan y aparecen formando estructuras sin apariencia de ramilletes (Hughes, 1963). Más tarde, en el periodo del equívoco, los cromosomas homólogos se desduplican, y presentan brotes cortos y gruesos, y ocupan en su totalidad la región del núcleo. Es también durante esta etapa, que se observa el complejo sinaptotómico como filamentos de material electrodenso que unen a los cromosomas (Kylie, 1972). Mientras tanto, en el citoplasma de la región perinuclear, el aparato de Golgi da origen al núcleo del círculo. Este consiste de una subestructura hemifila rica en RNA, y se observa en forma de hebras finas e ligeramente curvadas, entorquidas al núcleo de la célula y rodeadas por un gran número de mitocondrias (Guraya, 1962).

Cuando los ovocitos se encuentran en la fase de diploteno de la profase de la meiosis, los cromosomas se separan adquiriendo una apariencia más tenue y es durante esta etapa que se lleva a cabo el intercambio de material genético (crossing over) entre cromosomas homólogos.

Posteriormente, dentro de la misma subfase de la profase I, las células epiteliales (provenientes del epitelio relictivo) que acompañan a las células germinales en su migración hacia la parte gonadal de la cresta urogenital, son las que dan origen a las células prefolliculares (D Hollander, 1964; Swift, 1915; Callebaut, 1976). Las células prefollicu-

liras establecen contacto con los ovocitos, adquieren una configuración aplanada y se extienden sobre la superficie del ovocito hasta que lo envuelven completamente, formando alrededor de este el epitelio folicular. El epitelio folicular presenta una sola capa de células a las que se denominan células de la granulosa. En las zonas donde las células foliculares adyacentes se superponen le confieren al epitelio folicular características de epitelio pseudo-estratificado (Greenfield, 1966).

Una vez que las células foliculares van envuelto completamente al ovocito, la sincronización en la maduración de estos se pierde, quizá debido a la desaparición de los puentes citoplasmáticos que los comunican. A partir de este período, las células de la granulosa comienzan a desarrollar interdigitaciones con la superficie del ovocito.

Las funciones principales de las células foliculares, en el ovario de las aves, parecen ser la secreción de lípidos, glucógenos y proteínas, para la maduración del ovocito y la preparación de este para la formación de la yema en etapa reproductiva.

El modo de transferencia de las secreciones de las células de la granulosa hasta el interior del ovocito, parece ser por medio de fagocitosis, pinocitosis y difusión a través de las membranas celulares de ambas, ya que no se ha observado comunicación directa entre el citoplasma de las células foliculares y los ovocitos (Guraya, 1976-b).

11.4 ACTIVIDAD HORMONAL EN EL OVARIO EN DESARROLLO

En cuanto a la función del ovario como glándula, una de sus tareas principales, es la producción de hormonas sexuales femeninas : estrógenos, por medio de la aromatización de andrógeno por tres hidroxilaciones consecutivas.

El 17 β -Estradiol es la hormona femenina más importante de origen ovariano, y estimula el desarrollo de los tejidos en órganos que intervienen en la reproducción, en etapa adulta, a consecuencia del incremento en la velocidad de la síntesis proteica, actuando directamente sobre el material genético de las células (Malley, 1976).

Alrededor del día 6.5 de desarrollo, cuando la gónada comienza a diferenciarse, Weniger y Lenz (1971) han observado la producción de 17 β -Estradiol y Estrona. Woods y Eylon (1978), sin embargo, han podido detectar producción de hormonas esteroides por parte del mesenquima urogenital a los 3.5 días de incubación, tanto en machos como hembras. A partir de los 18 días de desarrollo Teng (1981), encontró diferencias en la producción hormonal en ovarios izquierdo y derecho.

Al octavo día del desarrollo embrionario, existen células de origen epitelial formando cordones celulares con capacidad esteroidogénica, en la región subcortical del ovario en formación. En el interior de la médula, las células esteroidogénicas son de mayor tamaño y corresponden a las células intersticiales del ovario diferenciado. Existen dos

teorías sobre el origen de las células esteroideogénicas del estroma ovarico. Benoit (1950), dice que estas se originan a partir de los cordones primarios en etapas tempranas del desarrollo, y Jordanov (1978) propone que estas células se originan por una protrusion de las células de la granulosa del folículo.

Gonzalez del Riego (1991), describe a la medula ovarica postovulatoria, dividida en dos regiones. La zona medular inmediata a la corteza gonadal o zona subcortical, y la medula profunda. La primera region contiene tres poblaciones de células sin actividad de síntesis de esteroides, organizadas en cordones epiteliales irregulares en la zona mas cercana a la corteza, células poco diferenciadas, y canales lacunares formados por células parecidas a las células poco diferenciadas.

Woods (1987) en sus trabajos sobre el eje Hipotalamo-Adenohipofisis-Gonada, ha encontrado que en las etapas iniciales del desarrollo de embriones de pollo, los factores reguladores de la producción hormonal y la formación y crecimiento de las gonadas, se encuentran funcionando independientemente. Posteriormente, el desarrollo y diferenciación de la gonada depende de las hormonas gonadotropicas de la hipófisis, y sin esta, se presenta una atrofia gonadal. Sin los factores secretados por el hipotálamo, la hipófisis sufre modificaciones y la diferenciación gonadal se retrasa, además de que en adultos los factores hipofisarios desencadenan la ovulación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cómo ya se mencionó el ovario es un órgano con gran actividad endocrina, en especial esteroideogénica, desde etapas muy tempranas en su evolución ontogenética. Sabiendo que la adquisición de los caracteres sexuales secundarios, así como la diferenciación, crecimiento y maduración de los órganos reproductivos, dependen de las hormonas esteroideas o estrogénicas. Woods y Ertan (1979), han podido detectar Estrona y 17 β -Estradiol en las células intersticiales de gonadas de embrión de pollo a los 3.5 días del desarrollo, aun antes de la diferenciación sexual. En sus experimentos, al día 3.5 de incubación han observado actividad esteroideogénica en los cordones medulares de las gonadas de ambos sexos, siendo mayor en los ovarios que en los testículos, y no es sino hasta el día 13.5 que se detecta actividad esteroideogénica en los cordones corticales y las células intersticiales en ovario izquierdo.

Al principio, la producción de hormonas esteroides gonadales es independiente, pero posteriormente la producción de estas depende de las hormonas gonadotropicas de la hipófisis y de los factores hipotalámicos, estableciéndose así el eje Hipofisis-Hipotalámico-Gonada (Woods, 1987).

Si el principal efecto de los estrógenos ovariicos es propiciar un incremento en la proliferación celular de tejidos blancos, el presente estudio plantea como objetivo determinar cuáles son las poblaciones celulares del ovario

embrionario de Gallus domesticus que presentan una respuesta al incremento de la hormona esteroide ovarica 17 β -Estradiol.

El estudio se llevo a cabo en embriones de pollo y pallas recién nacidos de Gallus domesticus. Huevos fértiles de la raza Leghorn (Babcock E-800), provenientes de la granja "La Veracruz" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., se limpiaron con solución de etanol al 70% y se manejaron en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar.

El procedimiento para poder administrar la hormona a los embriones en desarrollo, fue la técnica de cámara falsa, que se describe a continuación:

- Se hace una incisión con una aguja de disección en la cámara de aire del huevo.
- Se corta un área triangular del cascarrón en uno de los lados, y se ventosa el pequeño triángulo de cascarrón, de aproximadamente 5mm. por lado, dejando expuesta la membrana peritrácea.
- Esta membrana se humedece con agua destilada estéril, y se le practica una pequeña perforación con una aguja de disección.
- Se procede a hacer succión con bulbo latex para pipeta, sobre el orificio hecho con la aguja de disección en la cámara de aire, para hacer descender al embrión y asimismo la membrana corioalantoides debe de hacer contacto con la membrana de la cascara del huevo.

-Se retira la porcion expuesta de la membrana perforada con pinzas de punta fina, y se sella con cinta adhesiva transparente tanto el orificio en la cámara de aire como la ventana triangular, cubriendo la menor área del cascarón del huevo para no impedir el intercambio de gases.

Habiendo completado la cámara fetal, se incuban los huevos a 37.00 C. en incubadora con circulación forzada de aire y humedad controlada.

A los 11, 16 y 17 días de incubación, se practica ovoscopia para determinar la viabilidad embrionaria. Después de la ovoscopia se administran a la mitad de los embriones viables, 200 mg. de 17 β -Estradiol (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.) en solución de etanol al 1%, de acuerdo a la dosis optima de la hormona (Gottelo, 1957). El resto de los embriones viables se utilizan como control, administrándoseles únicamente la solución testigo de etanol al 1%.

A los 11, 16 y 17 días de incubación, al igual que a las 24 hrs. después de la eclosión, se sacrifican a los animales, por decapitación, para excisar el ovario izquierdo, y ponerlo en solución libre de calcio.

Posteriormente los ovarios se pisan a la solución al 0.15% de tripsina en solución libre de calcio y magnesio, y se incuban a 37°C. en agitación constante, por aproximadamente 30 minutos, hasta que quedan completamente disgregados (la tripsina se obtuvo de Grand Island Biological

Co., Grand Island, NY.). Una vez que no existen porciones de ovario detectables a simple vista, se agrega en proporción 1.5 a 1 la solución al 0.25% de inhibidor de tripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. en Dulbecco's Modified Eagle Medium con albumina de suero bovino (Sigma Chemical Co.).

Las células obtenidas por la disociación del ovario, se clasificaron en germinales y somáticas, subdividiendo a su vez a las somáticas en células con inclusiones lipídicas y las que no contienen inclusiones de lípidos. Los diferentes tipos celulares, entonces, fueron contados en cámaras Spencer Improved Nuclear de Cinn. y el número de células contadas, se extrapoló para el volumen total de medio por células en suspensión, para obtener el total de células de cada ovario.

Los datos obtenidos fueron analizados por el método de "Análisis de Varianza y Prueba T" de Student.

RESULTADOS

Al estudiar la variación del número de células del ovario ingerido a los 13, 15, 17 días del desarrollo in ovo, y a las 24 hrs. después de la eclosión, se observa que el número promedio de células germinales por ovario (expresado en millones), alcanza un máximo de 0.33 - 0.34 a los 17 días de incubación, y se reduce a 0.12 - 0.14 a las 24 hrs. posteriores. Los valores en cuanto a la cantidad de células germinales en los ovarios tratados con 17 β -Estradiol, no difieren de manera significativa de los valores obtenidos para los ovarios no tratados (Fig. 1b).

Por lo que respecta al valor promedio del número total de células somáticas por ovario, no existe diferencia significativa entre los ovarios tratados y los controles durante etapas del desarrollo in ovo. Alrededor a las 24 hrs. posteriores a la eclosión, el número promedio del total de células somáticas de ovarios tratados es 7.86 - 0.36, mientras que los ovarios control presentan un promedio de 6.92 - 0.28. (Fig. 1a).

Dentro de la población de células de la línea somática del ovario, la subpoblación de células con inclusiones lipídicas se encuentra con un valor muy similar en ovarios control y tratados (0.49 - 0.03 y 0.55 - 0.04 respectivamente). El valor promedio de células de la subpoblación que no contienen inclusiones lipídicas se

encuentra incrementado en los ovarios tratados (7.16 ± 0.36) mientras que en los no tratados el valor a los 17 días de incubación y 24 hrs postfertilización no varía significativamente $(6.32 \pm 0.35$ y $6.67 \pm 0.38)$. (Fig. 1a).

DISCUSION

En el presente trabajo se utilizó la disgregación del ovario con tripsina en solución, para poder efectuar el conteo de las diferentes poblaciones de células del ovario (McCarrey y Abbott, 1981). En este método existe la probabilidad de destrucción de algunas células por parte de la tripsina. El conteo incluye núcleos y células nucleadas para minimizar el efecto de la destrucción de las membranas citoplásmicas durante la disgregación.

Otra fuente de error en el empleo de esta técnica, es que algunas células tienden a adherirse a la superficie del vial donde se efectúa la disgregación con tripsina, y la superficie de la pipeta pasteur con la que se ayuda a la agitación del medio. Una forma de reducir el efecto de este fenómeno, es la utilización de viales nuevos, carentes de rayaduras, además del uso de pipetas pasteur siliconizadas para evitar al máximo la adherencia de las células a las paredes de vidrio.

Aunque el método por disociación con tripsina presenta las dos fuentes principales de error antes mencionadas, y solo se pueden distinguir dos o tres diferentes poblaciones celulares, este presenta ventajas sobre el método por cortes histológicos seriados, ya que facilita el análisis y conteo de un número mayor de muestras.

Para el método por cortes histológicos seriados, debe muestrarse el ovario completo y hacerse correcciones matemáticas de acuerdo al espesor del corte y la probabilidad que existe en contar un mismo núcleo en dos cortes diferentes. Con este método, sin embargo, se puede encontrar una mayor cantidad de información acerca de las características de las células de cada una de las poblaciones celulares (Hughes, 1963).

Con respecto a las células de la línea germinal, se observó que el número celular se incrementa rápidamente, alcanzando un máximo al día 17 del desarrollo embrionario, y posteriormente declina. Esto concuerda con los datos obtenidos por Hughes en cortes seriados (1963). El decremento de la población de células germinales sucede cuando al haber terminado la proliferación y darse inicio la profase de la meiosis, la población de células germinales comienza a sufrir estrés. El mecanismo por el cual sucede la estrés no está bien conocido, sin embargo se especula que la falta de células prefolliculares para envolver a los ovocitos, hace que los que no se involucran en la formación de folículos degeneren (Peterson, 1978).

En los resultados obtenidos, se observó que durante el desarrollo embrionario, el número de células somáticas del ovario, aumenta de una manera continua hasta el día 17 de incubación. A partir de este momento, la población

de células somáticas se mantiene estable, concordando con el fin del crecimiento del embrión y el inicio de la maduración del resto de los órganos del embrión antes de la eclosión, para asegurar de este con desarrollo de tipo precoz (Hoyt, 1987).

La población de células somáticas en ovarios tratados con 17 β -Estradiol, se incrementa de manera similar a la de ovarios no tratados, sin que el estrógeno administrado produzca una respuesta aparente. Después del decimosegundo día de incubación, esta población continúa su incremento hasta las 14 horas después de la eclosión, sin que se observe la misma estabilización que en ovarios no tratados. Esto es debido por el efecto proliferativo del 17 β -Estradiol administrado.

Dentro de la población de células somáticas, se observó que las células que contienen inclusiones lipídicas, no parecen presentar una respuesta al estímulo con el estradiol. Sin embargo, las células somáticas que no poseen dichas inclusiones, aunque parecen no estar incrementándose al día 17 de incubación, 14 horas después del nacimiento se encuentran por encima del valor obtenido para las mismas células somáticas en ovarios no tratados.

Los datos obtenidos para las células de la línea germinal de ovarios tratados con 17 β -Estradiol, parecen indicar que la disminución de esta población celular, entre el día 17 de incubación y las 14 horas después de la eclosión

es menor, ya que el número total de ODF es a las 14 horas postcoleción, es un poco mayor para los ovarios tratados con respecto a los controles. Aunque los datos obtenidos durante este experimento con respecto a la disminución de la actividad de las células germinales no son estadísticamente significativos, cabe mencionar que esta tendencia, a una mayor sobrevivencia de las células germinales, puede estar relacionada con el aumento de células estrómicas, posiblemente prefolliculares, y que de alguna manera estas últimas, al formarse los folículos, impiden la actividad de los ovocitos. Es necesario hacer estudios más a fondo para poder elucidar los mecanismos de relación entre células estrómicas y germinales antes de que se inicie la foliulogénesis, así como definir la migración de células estrómicas entre los cuales ejerce su influencia el 17 β -Estradiol, y la función específica de este grupo de células en etapas posteriores.

CONCLUSION

31

El efecto del 17 β -Estradiol, se hizo notable en la población de células somáticas del ovario en pollos de 24 hrs. postecisión, ya que el número de células de esta población esta incrementado para los ovarios tratados con 200ng. de 17 β -Estradiol a los 11, 13 y 15 días de desarrollo.

No se observó ningún efecto de esta hormona sobre las células germinales, tanto durante el desarrollo embrionario como posterior al nacimiento, ya que el número de estas células es similar a los 17 días de incubación y 24 hrs. posterior al nacimiento.

Dado que la subpoblación de células somáticas con inclusiones lipídicas fue similar en ovarios tratados y controles, la diferencia en la cantidad total de células somáticas entre controles y tratados, se observa en la subpoblación de células somáticas que no contenían inclusiones lipídicas.

Figuras 1a. y 1b.
TABLAS DE RESULTADOS:

EDAD (días)	CONTROLES				TRATADOS			
	No. DE CELULAS (en millones):		s/i	c/i	No. DE CELULAS (en millones):		s/i	c/i
	Total	Somáticas			Total	Somáticas		
13	2.36±0.62	2.32±0.56			1.65±0.32	1.59±0.30		
15	4.67±0.57	4.35±0.54			5.13±0.50	4.79±0.50		
17	6.64±0.33	6.22±0.15			6.15±0.39	5.96±0.36		
RN	5.98±0.28	5.65±0.28	5.19±0.27	5.89±0.22	6.15±0.24	7.85±0.28	7.26±0.26	6.55±0.04

CELULAS GERMINALES

EDAD (días)	No. DE CELULAS (en millones):	
	Controles	Tratados
13	0.12±0.05	0.26±0.02
15	0.32±0.06	0.34±0.06
17	0.32±0.04	0.28±0.05
RN	0.19±0.04	0.29±0.03

Número de células para cada población celular (somáticas "s/i" = sin inclusiones lipídicas, "c/i" con inclusiones lipídicas y germinales) en ovarios de collos de diferentes edades gestacionales (13, 15 y 17 días) y recién nacidos (RN = 24.0 hrs. postcoleción), tratados a los 11, 13 y 15 días de desarrollo "in vivo".

Figura 2.
CELULAS GERMINALES

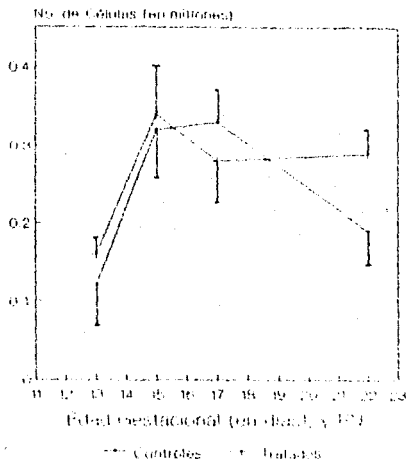


Figura 3.
CELULAS GERMINALES

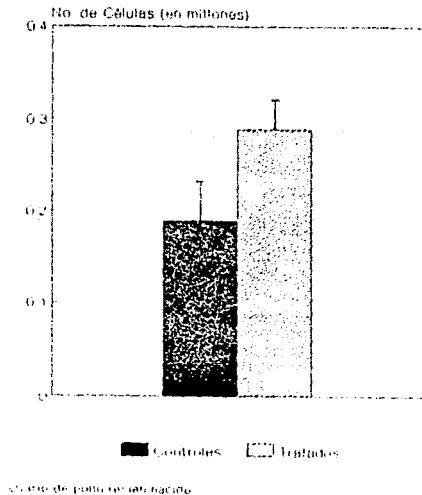


Figura 4.
CELULAS SOMATICAS TOTALES

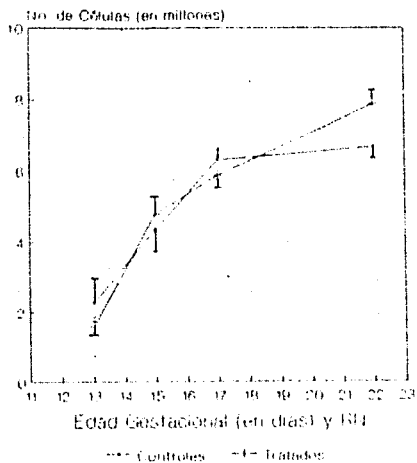
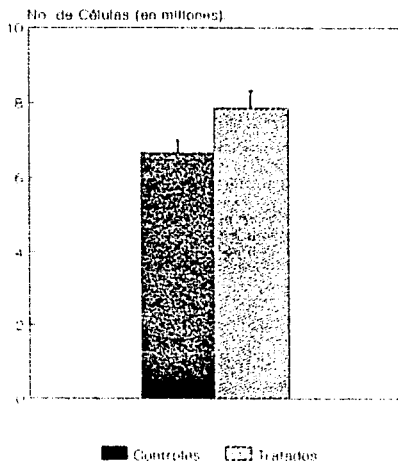
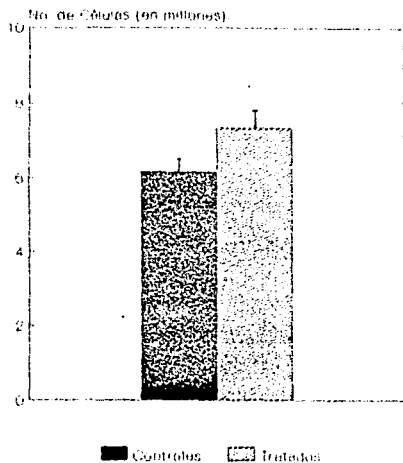


Figura 5.
CELULAS SOMATICAS TOTALES



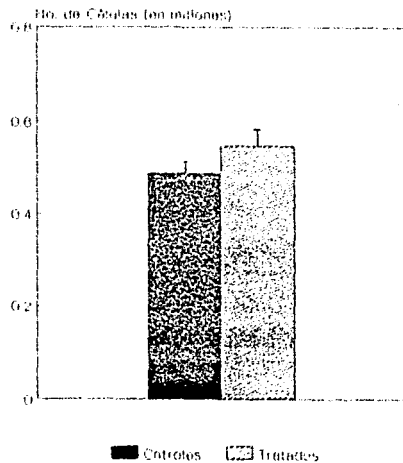
Charte de pullo recién nacido

Figura 6.
CELULAS SOMATICAS SIN LIPIDOS



Osario de pollo recién nacido.

Figura 7.
CELULAS SOMATICAS CON LIPIDOS



Osario de pollo recién nacido.

BIBLIOGRAFIA

- Benoit, J. (1950). Organes Uro-Genitaux.
Traite de Zoologie. Vol. XV Oiseaux.
P. P. Grassé Ed. Paris. Masson.
- Bishop-Calame, S. (1956). Etude Expérimentale de L'Organo-
génése du Système Uro-génitale de L'Embryon de
Poulet.
Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 55:215-309.
- Burns, R. K. (1961). Role of Hormones in the Differentiation of
Sex.
Sex and Internal Secretions. W.C. Young. Ed.
Williams and Wilkins. Baltimore MD. pp.76-160.
- Syskov, A. G. (1981). Primordial Germ Cells and Regulation of
Meiosis.
Reproduction in Mammals. Germ Cells and Fertiliza-
tion. Ed. Austin, C.R. & R.V. Short.
Cambridge University Press. Cambridge. UK. 1:1-16.
- Syskov, A. G. (1986). Differentiation of Mammalian Embryonic
Gonad.
Physiological Reviews. Vol.66(1).
- Callebaut, M. (1975). Origin of Ovarian Follicle Cells in
Birds.
Experientia 32:1337-1339.
- Callebaut, M. and R. Dubois (1965). Sur L'Incorporation de
Thymidine Tritiée par les Cellules Germinal de
L'Ovaire Embryonnaire de Poulet. *in vitro* .
C. R. Acad. Sci. 261:5215-5218.
- Carlson, N. & S. Stahl (1985). Origin of the Somatic Components
in Chick Embryonic Gonads.
Archiv. Anat. Micr. Morphol. Exper. Tomé 74(1).
- Clark, J.M. & E.M. Eddy (1975). Fine Structural Observations
on the Origin and Associations of Primordial Germ
Cells of the Mouse.
Dev. Biol. 47:136-155.
- Clawson, R. C. & L. V. Deam (1963). Developmental Changes in
Glycogen Content of Primordial Germ Cells in Chick
Embryos.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112:533-537.

- Cuminge, D. & R. Dubois (1971):- **étude Ultrastructurale et Autoradiographique et L'Organogénèse Sexuelle précoce chez L'Embryon de Poulet.**
Exp. Cell Res. 64:243-258.
- D'Hollander, F. (1904). **Recherches sur L'Oogenèse et sur la Structure et la Signification du Noyau Vitellin de Salbiani chez les Oiseaux.**
Arch. Anat. Microsc. 7:117-180.
- Dubois, R. (1965) **Sur l'Attraction exercée par le jeune épithélium germinatif sur les gonocytes primaires de l'embryon de poulet en culture in vitro; demonstration à l'aide de la thymidine tritiée**
C.R. Acad. Sci. Paris 260:5865-5867.
- Dubois, R. Cuminge D. (1966) **Sur l'aspect ultrastructural et histochimique des cellules germinales de l'embryon de poulet.**
Ann. Histochem. 13:33-50.
- Dubois, R. (1966). **La Colonisation des Ébauches Gonadiques par les Cellules Germinales de L'Embryon de Poulet, en culture in vitro**
J. Embryol. Exp. Morphol. 20:189-213.
- Fujimoto, T., A. Ukeshima, and R. Kyofuji (1975). **Light and Electron Microscopic Studies of the Origin and Migration of the Primordial Germ Cells in the Chick.**
Acta Anat. Nippon. 50:22-40 (in Japanese with English summary).
- Fujimoto, T., A. Ukeshima, y R. Kyofuji (1976). **The Origin, Migration and Morphology of the Primordial Germ Cells in the Chick Embryo.**
Anat. Rec. 185:139-154.
- Fujimoto, T., T. Ninomiya & A. Ukeshima (1976). **Observations of the Primordial Germ Cells in Blood Sample from the Chick Embryo.**
Dev. Biol. 49:278-282.
- González del Pliego, M. V. (1991). **Estudio Ultraestructural de las Poblaciones Esteroidogénicas Durante el Desarrollo del Ovario de las Aves.**
Tesis de Doc. en Ciencias. Fac. Ciencias U.N.A.M.
- Greenfield, M. L. (1966). **The Oocyte of the Domestic Chicken Shortly After Hatching, Studied by Electron Microscopy.**
J. Embryol. Exp. Morphol. 15:297-316.

- Gondos, B. (1970). Granulosa cell-Germ cell Relationships in the Developing Rabbit Ovary.
J. Embryol. Exp. Morphol. Vol. 23(2).
- Gondos, B. (1978). Oogonia and Oocytes in Mammals.
The Vertebrate Ovary, Chapter III
Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- Guraya, S. S. (1962). The Structure and Function of the So-called Yolk-Nucleus in the Oogenesis of Birds.
Q. J. Microsc. Sci. 103:411-415.
- Guraya, S. S. (1976-b). Correlative Cytological and Histochemical on the Avian Oogenesis.
Mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig. 90:91-156.
- Hardisty, M. W. (1978). Primordial Germ Cells and the Vertebrate Germ Line.
The Vertebrate Ovary, Chapter I.
Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- Houillon, C. (1956). Recherches Expérimentales sur la Dissociation Médullo-Corticale dans la Organogénèse chez le Triton Pleurodeles waltlii.
Bull. Biol. Fr. Belg. 90:359-445.
- Hoyt, D. (1957). A New Model of Avian Embryonic Metabolism.
J. Exp. Zool. supplement 1:127-138.
- Hughes, G. C. (1963). The Population of Germ Cells in the Developing Female Chick.
J. Embryol. Exp. Morphol. 11:513-536.
- Jordanov, J. et al (1978). Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function.
Z.Mikrosk Anat. Forsch 92:449-464.
- Kopp, F. et A. Stahl (1975). Evolution de la Lignée Germinale dans la Médullaire Ovarienne du Foulet.
Société de Biologie de Marseille.
Seance de 24 juin 1975.
- Lance, V. & I. F. Callard (1978). Hormonal Control of Ovarian Steroidogenesis in Nonmammalian Vertebrates.
The Vertebrate Ovary, Chapter X.
Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- McCarrey, J. & U. Abbott (1982). Functional Differentiation of Chick Gonads Following Depletion of Primordial Germ Cells.
J. Embryol. Exp. Morph. Vol.68.

- Merchant-Larios, H. (1975). Rat Gonadal and Ovarian Organogenesis With and Without Germ Cells: An Ultrastructural Study. *Dev. Biol.* 44:1-21.
- Merchant-Larios, H. (1976). The Role of Germ Cells in the Morphogenesis and Cytodifferentiation of the Rat Ovary. *Progress in Differentiation Research*, pp.453-462. Muller-Berat Ed., Amsterdam.
- Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian Differentiation. *The Vertebrate Ovary*, Chapter II. Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- Merchant-Larios, H. (1984). Germ and Somatic Cell Interactions During Gonadal Morphogenesis. *Ultrastructure of Reproduction*. Maritims Nijhoff Publishers.
- O'Connor, R. J. (1939). Experiments on the Development of the Amphibian Mesonephros. *J. Anat.* 74:34-44.
- O'Malley, B. W. & W. T. Schrader (1976). The Receptors of Steroid Hormones. *Sci. Am.* 234(2):32-43.
- Peters, H. G. (1978). Folliculogenesis in Mammals. *The Vertebrate Ovary*, Chapter IV. Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- Sardul, S. G. (1978). Maturation of the Follicular Wall of Nonmammalian Vertebrates. *The Vertebrate Ovary*, Chapter VIII. Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- Schieb, D. (1970). Sur la Présence de Cellules "Interstitielles Primaires" dans les Cordons du Testicule de L'Embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sci. Ser. D Sci. Nat.* 270:123-125.
- Schwartz, W. J. & L. V. Lonn (1972). A Study on Division of Primordial Germ Cells in the Early Chick Embryo. *Am. J. Anat.* 135, pp. 51-70.
- Simon, D. (1964). La Lignée Germinale des Oiseaux et les Migrations des Gonocytes Primaires. *L'Origine de la Lignée Germinale* (séminaire dirigé par E. Wolff), pp. 235-262. Hermann, Paris.
- Singh, R. P. and D. E. Meyer (1967). Primordial Germ Cells in Blood Smears from Chick Embryo. *Science* 156:1503-1504.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Sotelo, L.F. (1985). Estudio del Oviducto de Pollo Recién Nacido, Tratados Prenatalmente con Estradiol y Testosterona.
Tesis de Lic. en Biol. Fac. Ciencias, U.N.A.M.
- Spiegelman, M. and D. Bennett (1973). A Light Microscopic and Electron Microscopic Study of Primordial Germ Cells in the Early Mouse Embryo.
J. Embryol. Exp. Morphol. 30:97-118.
- Stahl, A. et N. Carlon. (1973). Morphogenèse des Cordons Sexuels et Signification de la Zone Médullaire de la Gonade chez L'embryon de Poulet.
Acta Anat. Vol. 65.
- Swift, C. H. (1915). Origin of the Definitive Sex-Cells in the Female Chick and their Relation to the Primordial Germ-Cells.
Amer. J. Anat. 13:441-470.
- Teng, C. T. (1982). Differential Response of Growing and Regressing Chicken Ovaries to Gonadotropic Hormones.
Gen. Comp. Endocrinol. 48:325-332.
- Tokarz, R. R. (1978). Oogonial Proliferation, Oogenesis and Folliculogenesis in Nonmammalian Vertebrates. The Vertebrate Ovary. Chapter III.
Richard E. Jones Ed., Plenum Press, New York.
- Upadhyay, S., J. M. Luciano y L. Zamboni (1981). The Role of Mesonephros in the Development of the Mouse Testis and its Excurrent Pathways.
Development and Function of Reproductive Organs. V workshop, Copenhagen, July 6-9.
Eyskov, Peters Ed. Amsterdam. Excerpta Medica 1981.
- Waddington, C. H. (1938). The Morphogenetic Function of a Vestigial Organ in the Chick.
J. Exp. Biol. 15:371-376.
- Wartenberg, H. (1981). The Influence of the Mesonephric Blastema on Gonadal Development and Sexual Differentiation.
Development and Function of Reproductive Organs. Copenhagen, July 6-9.
Eyskov, Peters Ed. Amsterdam. Excerpta Medica 1981.
- Weniger, J. E. et A. Zeis (1971). Biosynthèse D'Oestrogènes par les Ebauches Gonadiques de Poulet.
Gen. Comp. Endocrinol. 16:391-397.

- Witschi, E. (1931). Studies on Sex Differentiation and Sex Determination in Amphibians. V. Range of the Cortex-Medulla Antagonism in Parabiogenic Twins of Ranidae and Hylidae.
J. Exp. Zool. 56:113-145.
- Woods, E. J. Maturation of the Hypothalamo-Adenohypophyseal-Gonadal (HAG) Axes in the Chick Embryo.
J. Exp. Zool. Supplement 1. 1987.
- Woods, E. J. and L. H. Erton (1978). The Synthesis of Estrogens in the Gonads of the Chick Embryo.
Gen. Comp. Endocrinol. 36:360-370.
- Wylie, C. C. (1972). Nuclear Morphology and Nucleolar DNA Synthesis During Meiotic Prophase in Oocytes of the Chick Gallus domesticus.
Cell. Differ. 1:325-334.
- Zamboni, L. et al (1979). The role of the mesonephros in the development of the sheep fetal ovary.
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 19:1153-1178.