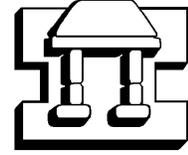




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO



IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Desarrollo folicular postnatal en el ratón de los volcanes

(*Neotomodon a. alstoni*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NAZARETH AVELINO SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR: DRA. JUANA ALBA LUIS DIAZ

TLALNEPANTLA EDO. MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Dedicada

A mi madre Alejandra Mónica Sánchez Martínez, por haberme dado la vida, porque siempre ha estado a mi lado, impulsándome con su ejemplo a seguir siempre adelante, por su confianza y amor, pero sobre todo porque este logro es también tuyo.

Agradecimientos

A mis padres Alejandra y Francisco por estar conmigo a cada paso que doy.

A la Dra. Juana Alba Luis Díaz por sus conocimientos y experiencias compartida, por su infinita paciencia, pero sobre todo por brindarme su confianza y amistad.

A los sinodales, Biol. Mónica Chávez Maldonado, M en C Leticia Verdín Terán, M en C Carmen Álvarez Rodríguez y al Biol. José del Carmen Benítez Flores por sus sugerencias que ayudaron a mejorar la calidad de este trabajo.

Al M. V. Z. Agustín Carmona por su ayuda y colaboración.

A mis hermanos Iván y Etzael con quienes he compartido muchas tristezas y alegrías, por su apoyo y cariño.

A mi tío Miguel y mis tías Javier, Gloria y Raquel por su ejemplo de lucha para seguir siempre adelante y cariño.

A Alejandro Almaguer por su amor, paciencia, confianza, por escucharme y darme un consejo cuando lo he necesitado, por todas las cosas bellas que he compartido contigo, por todo este tiempo juntos y lo que hace falta. Te amo.

A mis primas Abril, Ana Lilia y Areli y mis primos Rodrigo y Cristián, por que con sus juegos, rizas, cariño y confianza, me han impulsado ha seguir adelante

A mi sobrino Etzael Andrés por enseñarme que Javier obstáculo es más fuerte que nuestros deseos de vivir.

A mis amigas Verónica, Zinaeli y Javier y mi amigo José Luis, por su tolerancia, por brindarme su

amistad familiar, por todo lo que hemos aprendido día con día y compartir tantos buenos momentos.

A mis amigos Julio, Isabel, Víctor, Sheyla, Salome, Alelí, Xochitl y Aníbal por su amistad, por todas las parrandas juntos y por aguantar mis verdades Ricardo.

A mis amigos Alejandra, Lorena, Javier y Javier por su paciencia, apoyo y amistad.

Al laboratorio de Biología de la Reproducción de la unidad de Morfofisiología, en especial al maestro Martín y a Alejandra por sus conocimientos transmitidos y a Doña Luz por su amabilidad.

A mis maestros y compañeros que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera que de una u otra forma colaboraron en este trabajo.

.

INDICE

	Paginas
Resumen	6
Introducción	7
Antecedentes	17
Generalidades de la especie	18
Posición taxonómica	20
Objetivo general	14
Material y Métodos	22
Resultados	27
Discusión	39
Conclusiones	44
Referencias	45

RESUMEN

Las hembras de los mamíferos durante el desarrollo fetal del ovario producen por mitosis un gran número de ovogonias, que alrededor del nacimiento dejan de proliferar y entran a la primera división meiótica para detenerse en el diploteno, convirtiéndose en ovocitos. En esta etapa son rodeados por células de la pregranulosa para formar los folículos. Estos folículos permanecen quiescentes hasta que reciben un signo de activación para continuar su desarrollo hacia la ovulación o la atresia. Durante el desarrollo del folículo, el diámetro del ovocito aumenta, se multiplican las células de la granulosa, se forma la cavidad antral y finalmente ocurre la ovulación. Los cambios morfológicos que caracterizan el desarrollo folicular después del nacimiento han sido estudiados en los roedores del laboratorio desde diferentes perspectivas. Sin embargo, poco se conoce sobre este aspecto en especies silvestres, lo cual puede tener gran importancia en su futura preservación. Los animales utilizados en este estudio provinieron de ratones de los volcanes capturados en la Sierra del Volcán Ajusco, se mantuvieron con un fotoperiodo de 12:12 h luz-oscuridad y una temperatura y humedad ambientales de laboratorio. Estos ratones se aparearon y se esperó a que ocurriera el nacimiento de las crías. Se sacrificaron 2 hembras de 0, 7, 15, 17, 28, 30 y 40 días de edad con anestésico gaseoso. Los ovarios se extrajeron, fijaron y procesaron por la técnica de microscopía electrónica. Del día 0 al 7 se observaron ovocitos desnudos y rodeados por células de la granulosa, los cuales estaban agrupados en nidos. En el día 15 se observó que todos los ovocitos están rodeados por células de la granulosa formando folículos tipo 2, 3a, 3b. Del día 17 al 30 se observan folículos medianos y grandes, y una atresia folicular muy elevada que alcanzó un porcentaje del 81%. En el día 40 se observaron folículos preovulatorios y cuerpos lúteos. El desarrollo folicular de éste ratón es similar al del ratón de laboratorio, con la diferencia de que en este es más lenta. Los primeros folículos preovulatorios se observaron a los 40 días, por lo que la madurez sexual debe alcanzarse alrededor de esta edad, sin embargo, por tratarse de una especie con una estructura social muy compleja, la capacidad reproductiva real debe situarse en un intervalo de mayor edad.

INTRODUCCIÓN

El ovario es el órgano que se encarga de la producción de los gametos femeninos, está formado por una corteza y una médula. La superficie de la corteza está revestida por una capa de epitelio cúbico que a medida que se alcanza la madurez adquiere forma aplanada. La capa que se encuentra por debajo del epitelio recibe el nombre de túnica albugínea, esta capa tiene una gran cantidad de sustancia intercelular, sus fibras y células están dispuestas paralelamente a la superficie. El estroma de la corteza del ovario está constituida principalmente por células fusiformes y sustancia intercelular (Fawcett, 1999).

La médula del ovario se caracteriza por la presencia de un gran número de fibras elásticas, algunas células musculares lisas y por estar muy vascularizada.

Los ovocitos que son las células reproductoras femeninas se encuentran en la corteza de este órgano (Fawcett, 1999).

El folículo es una estructura reproductora que en las primeras etapas del desarrollo está constituido por el ovocito y las células precursoras de la granulosa que lo rodean. El ovocito se origina a partir de las células germinales primordiales que llegan al ovario durante el desarrollo embrionario, en el ratón las células germinales se observan por primera vez en el epiblasto posterior y a los 8 días postfertilización en las paredes del saco vitelino, de ahí migran por intestino posterior y mesenterio dorsal hasta llegar a las crestas genitales (entre los 11-12 días postfertilización), colonizando a la gónada indiferenciada, y por divisiones mitóticas producen un gran número de ovogonias (Hirshfield,1991).

Cuando el ovario se está diferenciando las células germinales son rodeadas por las células somáticas que se originan de la fragmentación de los cordones sexuales secundarios para formar el folículo. Los otros componentes somáticos; teca, células endoteliales y el tejido conectivo de soporte se originan del mesénquima de la gónada (Hirshfield, 1991).

En la mayoría de los mamíferos, alrededor del nacimiento, las ovogonias dejan de proliferar mitóticamente y se convierten en ovocitos, excepto en los lémures, en los cuales es demostrable la actividad mitótica de las células germinales en la etapa adulta (Gerard y Herlant, 1953). Estas células inician la primera división meiótica y se quedan detenidas en el estado de diploteno (Hirshfield, 1991). En esta etapa los ovocitos empiezan a ser rodeados por una capa de células escamosas de la pregranulosa para formar los folículos primordiales. Estos folículos permanecen quiescentes hasta que reciben un signo de activación. Cuando los animales maduran sexualmente un grupo de folículos primordiales es activado para continuar el desarrollo hacia la ovulación o más probablemente hacia la atresia. En el desarrollo de folículo primordial a primario las células escamosas de la pregranulosa se transforman en un epitelio cúbico, que a través de divisiones mitóticas forman una capa multilaminar para formar el folículo secundario. El folículo secundario es rodeado por las células de la teca que se diferencia a partir del estroma del ovario. Con la aparición de la cavidad antral el folículo secundario se transforma en terciario, este folículo continúa su desarrollo hasta que el ovocito es liberado (Greenwald y Terranova, 1988).

Durante el desarrollo folicular se forma el antro y por fuera de la membrana basal, la teca interna y externa, también se forma una red capilar y la zona pelúcida que rodea al ovocito (Hirshfield, 1991).

Cuando el folículo entra a su fase final de crecimiento aparecen entre las células de la granulosa varios espacios llenos de fluido que finalmente se unen y forma una sola cavidad, el antro, cuyo tamaño aumenta conforme el folículo se aproxima a la ovulación. Esta cavidad está llena de un fluido procedente de la filtración de los vasos capilares de la teca. La composición del fluido antral varía de acuerdo a las concentraciones del plasma sanguíneo; en el cerdo se señala que contiene glucosa, lípidos, amino ácidos, proteínas y mucopolisacáridos, semejantes a chondroitina y heparan sulfato (Greenwald y Terranova 1988).

La membrana basal es una estructura de tejido conectivo que rodea aún a los folículos primordiales más pequeños. El tamaño de esta membrana aumenta conforme el folículo se desarrolla, aunque los mecanismos a través de los cuales se expande no se conocen. Estudios de inmunofluorescencia indican que entre los componentes de la membrana basal se encuentran el colágeno tipo IV, lamininas y fibronectina. Estos componentes parecen ser sintetizados por las células de la granulosa (Hirshfield, 1991).

La teca interna y externa aparecen cuando el folículo inicia su crecimiento; en el ratón se observa que las membranas tecales se empiezan a formar en los folículos con 2 o 3 capas de células de la granulosa, mientras que en el hámster las células de la teca se observan por primera vez cuando el folículo está rodeado de 7 a 8 capas de células. En la rata la formación de la teca ocurre en etapas muy tempranas del desarrollo folicular, cuando el folículo está rodeado por una o 2

capas de células de la granulosa. La teca interna está constituida por células grandes fusiformes o poliédricas, con núcleos ovoides o elípticos con finas gotitas de lípidos en su citoplasma que están incluidas en una red de fibras reticulares que se continúa con las de la teca externa y del resto del estroma ovárico. Aunque son células del estroma modificadas y superficialmente se parecen a fibroblastos, las células de la teca interna en micrografías electrónicas tienen rasgos citológicos semejantes a los de las células de otras glándulas endocrinas secretoras de esteroides. Son las principales responsables de elaborar los precursores esteroides de las hormonas sexuales femeninas (Ross *et al*, 1992).

Los folículos pequeños carecen de un aporte directo de sangre, sin embargo los folículos de tamaño medio (80µm-100µm) dependen de 1 o 2 arteriolas cuyas terminaciones se anastomosan para formar una red capilar por fuera de la membrana basal, esta red capilar se hace más extensa conforme el folículo crece. La zona pelúcida es una membrana acelular que rodea al ovocito, está constituida por tres glucoproteínas; ZP1, ZP2, ZP3, a esta última se une el espermatozoide durante la fecundación. La zona pelúcida empieza a formarse poco después que el folículo inicia su crecimiento, sus componentes se depositan entre el ovocito y las células de la granulosa, en este espacio penetran microvellosidades de forma irregular que proceden del citoplasma del ovocito y de las células de la granulosa vecinas. En este espacio se acumula también un material amorfo (las glucoproteínas de la zona) que envuelve a las microvellosidades y que se condensa poco a poco para formar la zona pelúcida (Greenwald y Terranova, 1988).

En los mamíferos no todos los folículos que inician el desarrollo alcanzan la madurez y ovulan, debido a que la mayoría se convierten en atrésicos, por ejemplo, el número de folículos atrésicos en el ratón se estima en un 77%, es decir, número de folículos que llegan a la etapa preovulatoria son menos del 25% (Hirshfield, 1991). Aunque comúnmente se cree que la atresia puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular, lo cual es verdadero, un análisis cuidadoso de los patrones de desarrollo folicular y atresia, ha revelado que la atresia no prevalece en todas las etapas del desarrollo folicular. Hirshfield analizó los patrones de crecimiento folicular y atresia, de acuerdo al número de generaciones de células de la granulosa, encontrando que la primera generación de células de la granulosa se forma más lentamente que las generaciones de células de las etapas finales del desarrollo folicular. Además, encontró que durante las primeras 7 generaciones de células de la granulosa la atresia es menor comparada con la que se observa en la 8ª y 9ª generación. Esto sugiere que el desarrollo folicular hasta determinadas etapas puede ocurrir en presencia de concentraciones basales de hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) y factores del crecimiento. Sin embargo, cuando los folículos alcanzan la 8ª y 9ª generación de células de la granulosa llegan a un periodo crítico en el que la estimulación hormonal y de los factores de crecimiento son necesarios para continuar su desarrollo hasta la ovulación. En la rata la mayor cantidad de atresia ocurre en los folículos con pocas generaciones de células de la granulosa y no al final del desarrollo folicular.

En algunas especies el desarrollo folicular puede seguir en ausencia de pituitaria, sugiriendo que las etapas foliculares anteriores a las etapas de reclutamiento son reguladas por factores internos del ovario, antes que por la interacción entre el

hipotálamo y la hipófisis. Sin embargo, los folículos que no tienen la capacidad de desarrollarse hasta la última generación de células de la granulosa, a menos que sean expuestos a señales específicas, se pueden convertir en atrésicos. En las ratas el periodo en el cual hay más atresia es, en el de la formación del antro. Mientras que en otras especies como el humano el periodo de mayor porcentaje de atresia ocurre después de esta etapa (Hirshfield, 1991).

Todos los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que ocurren en el ovario durante el crecimiento folicular son controlados por la producción de factores intraováricos y endocrinos. Estos factores actúan a través de mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos. Entre los factores intraováricos que regulan el crecimiento folicular están el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I), esteroides, miembros del factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) y la familia de receptores Wnt/Frizzled. Entre los factores endocrinos que regulan el desarrollo están las gonadotropinas hipofisarias la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Richards *et al*, 2002).

El desarrollo inicial del folículo tiene lugar sin que haya una influencia importante de las hormonas, pero a medida que se aproxima la pubertad, el desarrollo del folículo, a partir del estado preantral requiere de la estimulación hormonal para madurar y finalmente ovular. Las células de la teca de un folículo preantral poseen receptores para la LH, que al ser estimuladas por esta hormona empiezan a sintetizar testosterona, la cual pasa a través de la membrana basal hacia las células de la granulosa. La influencia de la FSH induce a las células de la granulosa a sintetizar el sistema de enzimas aromatasas que convierte a la testosterona en estrógenos, principalmente 17 β -estradiol. El estradiol (E₂)

estimula la formación de receptores de LH en las células de la granulosa, a través de este mecanismo las células foliculares pueden responder al gran pico de LH que precede inmediatamente a la ovulación y la LH (Carlson, 2000).

Recientes modelos de ratones mutantes han servido para identificar nuevos componentes de la IGF-1, FSH y estradiol, estos hallazgos han permitido inferir las vías de señalización a través de las cuales los factores intraováricos y endocrinos pueden interactuar en la regulación del desarrollo folicular. La relación funcional entre la FSH e IGF-1 es apoyada por las investigaciones que muestran que el receptor IGF- (igf.-1r) y FSH se colocan en células de la granulosa de folículos pequeños en crecimiento y preovulatorios. En un ratón mutante en el que no se expresa el receptor para FSH o la subunidad FSH β , el crecimiento folicular después de la etapa preantral es dañado. Este trastorno está asociado con la alteración de genes específicos que intervienen en el desarrollo folicular después de la etapa preantral. En el ratón nulo para IGF-1 (Igf-1) se observan diferentes retrasos en el crecimiento, incluyendo el crecimiento folicular. En contraste en el ratón en el que no se produce la hormona del crecimiento (GH), exhibe una reducción en la velocidad de crecimiento y tiene bajos niveles de IGF-1, pero la función del ovario es normal, probablemente a consecuencia de la producción de GH es independiente de IGF-1 por células de la granulosa. Finalmente IGF-1 mejora la acción de FSH en células de la granulosa por mecanismos que no son enteramente claros pero que involucran estas dos vías de señalización (Richards *et al*,2002).

Un modelo actual de la acción de IGF-1 indica que la fosforilación de Forkhead (factores de transcripción) por cinasas limita la localización nuclear de estos

factores. Esto impide el disparo de la transcripción específica de los genes Forkhead, así como Fasligan (FasL), un inductor de la apoptosis, de p27KIP que es un inhibidor de la progresión del ciclo celular y del factor semejante a la insulina que liga a la proteína 1 (IGFBP-1), un posible inhibidor de IGF-1. Recientemente se ha mostrado que miembros de la familia Forkhead como: FKHR, KKHRLJ y AFX son expresados en el ovario de roedores (rata y ratón), en células específicas, de manera que determinan etapas de crecimiento folicular y luteinización. La expresión de FKHR RNAm está restringido a células de la granulosa de folículos en crecimiento y no ha sido detectado en células luteínicas. En contraste FKHLI y AFX están altamente expresadas en cuerpo lúteo. En suma la expresión de FKHR es regulada por E₂, IGF-1 y gonadotropinas. Así la expresión del RNAm de FKHR, proteínas y la fosforilación no están estrictamente asociadas con folículos que sufren apoptosis o que parecen estar destinados a la atresia. Los niveles altos de FKHR en células de la granulosa sugieren un papel clave de este factor en la promoción del crecimiento folicular (Richards, 2002).

El E₂ y IGF-1 integran un sistema de regulación autócrino en las células de la granulosa que promueven la supervivencia y proliferación celular. En contraste el E₂ y niveles basales de FSH y niveles ovulatorios de LH ocasionan un decremento notorio en la expresión de FKHR, que en los folículos preovulatorios es irreversible, cuando se avanza hacia la luteinización. Sin embargo, es posible que FKHR, FKHL1 y AFX tengan funciones que sean dependientes del tipo de células, de la etapa de diferenciación o proteínas específicas asociadas. Las gonadotropinas, así como IGF-1 participan en la fosforilación de las proteínas de Forkhead, controlando así su actividad funcional (Richards *et al*, 2002).

ANTECEDENTES

La biología reproductiva de los roedores de laboratorio como la rata, ratón y hámster ha sido estudiada detalladamente, tal es el caso del ratón del laboratorio, en el que Pederson y Peters (1968) estudiaron el desarrollo folicular, proponiendo una clasificación de los folículos basada en el diámetro del ovocito y el número de células y capas de la granulosa. Peters (1969) hizo un estudio del desarrollo del ovario en el ratón de laboratorio desde el nacimiento hasta la madurez, en el cual describe los cambios morfológicos que ocurren en el ovario durante este periodo. Hage y Welschen (1978) observaron el crecimiento folicular en ovario de ratas inmaduras y el desarrollo de los folículos a diferentes edades. En México existe una gran diversidad de especies endémicas de roedores, de las cuales se desconoce su biología reproductiva, aspecto que puede ser fundamental para entender el por qué de una distribución limitada a una sola región del planeta, y en la posible preservación de la especie, una de ellas es el ratón de los volcanes que habita en el Eje Neovolcánico Transversal. En este contexto el estudio del desarrollo folicular en el ratón de los volcanes tiene como finalidad contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de esta especie.

El ratón de los volcanes forma parte de la fauna endémica de México, su hábitat está restringido al Eje Neovolcánico Transversal también llamado Cordillera o Sierra Volcánica Transversal. Esta región se localiza entre los 18 y 22 ° de latitud norte, abarcando los Estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Estado de México, D. F., Morelos, Tlaxcala, Puebla y Veracruz. Este

roedor se distribuye en un rango altitudinal de los 2400 a los 3500 m s n m
(Villa,1953).

GENERALIDADES DE LA ESPECIE

Su hábitat esta constituido por bosque mixto de pino-encino en las partes bajas y abeto en las partes altas, encontrándose en la línea de nieve perpetua bosque formado principalmente por pino, asociadas a este tipo de vegetación se encuentran varias gramíneas de los géneros *Stipa*, *Muhlenbergia* y *Festuca*, llamadas comúnmente zacatón que constituye uno de los factores más importantes de su hábitat (Villa, 1953).

El ratón de los volcanes es un roedor que mide entre 149 a 240 mm de longitud, el largo de la cola es aproximadamente la mitad de la longitud corporal, presenta pelaje abundante, cuya coloración varía según la zona del cuerpo; en el dorso es de color gris oscuro, el abdominal es blanquecino y el pectoral de color castaño, sus ojos son grandes y negros (Martín y Álvarez, 1982).

Este roedor se reproduce todo el año, tanto en cautiverio como en condiciones naturales, alcanzando su mayor actividad reproductiva en primavera-verano (Chavez, 1988). Este pico en la actividad reproductiva sugiere patrones de reproducción predecibles, de tal forma que cuando las condiciones son favorables exhiben un patrón poliéstrico continuó (Sánchez *et al*, 1989).

POSICIÓN TAXONOMICA

Merriam en 1898 describe por primera vez el género *Neotomodon* con tres especies: *Neotomodon alstoni*, *Neotomodon perotensis* y *Neotomodon Orizabae* .

El ejemplar tipo del género fue colectado en Nahuatzen, Michoacán a una altitud de 2592 ms.n.m., este espécimen se encuentra en National Museum, Biological Survey Collection en Estado Unidos de Norteamérica (Merriam, 1898). Miller y Rhen (1903) corroboran la existencia de las especies descritas por Merriam y colocan al género *Neotomodon* en la Subfamilia Neotominae de la Familia Muridae. Sin embargo, Goldman (1910) incluye a este género en la subfamilia Cricetinae, junto con *Peromyscus* y otros géneros semejantes. Posteriormente Davis y Follansbee (1946) basándose en un estudio de la morfología somática y craneal considerando que el género *Neotomodon* sólo incluía una especie con dos subespecies o razas geográficas; *Neotomodon alstoni alstoni* y *Neotomodon alstoni perotensis*. Además, al comparar las características taxonómicas del género *Neotomodon* con las *Peromyscus* y *Neotoma*, establecieron una relación filogenética entre *Neotomodon alstoni* y *Peromyscus melanotis*.

En estudios citogenéticos (Uribe *et al*, 1971; Uribe, 1977) realizados con el ratón de los volcanes mostraron que el género *Neotomodon* y *Peromyscus* están emparentados filogenéticamente. Yates *et al* (1979) señalaron que *Neotomodon* es congénérico de *Peromyscus* considerando a la especie de este género como polítipica, Williams y Ramírez-Pulido (1985) con base en un estudio morfométrico de este roedor, concuerda con lo anterior, pero señalan que la especie es monotípica (*Peromyscus alstoni*). En este estudio se conservó el nombre original del género debido a que el cambio taxonómico sugerido por Williams y Ramírez-

Pulido (1985), no ha sido reconocido por las autoridades taxonómicas correspondientes.

OBJETIVO GENERAL

- Observar y describir histológicamente el desarrollo folicular de la hembra del ratón de los volcanes (*Neotomodon a. alstoni*) desde el nacimiento hasta la madurez sexual.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el desarrollo folicular postnatal de la hembra del ratón de los volcanes con el de otros roedores como *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*.
- Establecer si la proliferación mitótica de las células germinales de esta especie está restringida a etapas fetales.
- Establecer a qué edad alcanza la madurez sexual la hembra de esta especie.

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se utilizaron 24 ratones (12 hembras y 12 machos) de los volcanes, que fueron capturados en la Sierra del Volcán Ajusco, en una región comprendida entre los km 44 y 60 de la carretera federal a Cuernavaca.

Para las capturas se utilizaron trampas “Sherman” plegables, las cuales se colocaron entre las 16:00 y 18:00 horas y se recogieron al siguiente día entre las 8:00 y 10:00 horas, se utilizó como cebo hojuelas de avena. Los animales capturados se llevaron al laboratorio para ser ectodesparasitados y se pusieron en cuarentena para después hacer el apareamiento. En el laboratorio los ratones se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo 12:12 h luz-oscuridad, temperatura y humedad ambientales del laboratorio. Se les proporciono como alimento “Labdiet” para roedores y agua corriente *ad libitum*, alternando semillas de girasol y zanahorias dos veces por semana.

A los 25 días siguientes al apareamiento, se revisaron las jaulas de nidación diariamente para determinar y registrar cada una de las fechas de nacimiento de las crías. Dos hembras del ratón de los volcanes fueron sacrificadas a la edad de 0, 7, 15, 17, 28, 30, y 40 días con un exceso de anestésico gaseoso (éter). Se abrió la cavidad peritoneal para extraer los ovarios. Los cuales se fijaron en Karnovsky modificado sin calcio durante 24 h a 4 °C, después se lavaron con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1M (pH 7.2). Posteriormente el tejido fue postfijado en una solución de tetraóxido de osmio al 1% y amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.2) durante 2 h, en seguida de la postfijación el tejido se lavo nuevamente con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio. Los ovarios fueron deshidratados pasándolos por soluciones de alcohol en

concentraciones ascendentes (60% al 100%) durante 10 minutos en cada una y finalmente se pusieron en óxido de propileno (10 minutos). La preinclusión de las muestras se realizó colocando el tejido primero en una solución de Epon 812 y óxido de propileno (1-1) durante 1h a 60°C y enseguida en Epon 812 y óxido de propileno (3-1) durante 24 h a temperatura ambiente. La inclusión se realizó en resina Epon 812 pura a 60°C por 48 h. Se realizaron cortes semifinos de 2-3 μm los cuales fueron teñidos con azul de toluidina.

La clasificación de los ovocitos y folículos se hizo en base al tamaño del ovocito (midiendo el diámetro más largo en un corte transversal) y el tamaño del folículo que está definido por el número de células de la granulosa y el número de capas en que estas células están organizadas, propuesta por Pedersen y Peters (1968), sin embargo se realizaron algunas modificaciones a partir del folículo tipo 3b (Fig.1´).

Los ovocitos fueron divididos en:

- a) Ovocitos pequeños con un diámetro menor de 20 μm .
- b) Ovocitos en crecimiento, la célula está en crecimiento pero su diámetro final se encuentra entre los 20 -70 μm .
- c) Ovocitos grandes que tienen un diámetro mayor a 70 μm .

Los folículos están divididos en:

- a) Folículos pequeños

Tipo 1: El ovocito es pequeño y no tiene células que lo rodeen.

Tipo 2: El ovocito es pequeño y están rodeados por pocas células en su superficie.

Tipo 3a: El ovocito es pequeño o en crecimiento y son rodeados por menos de 20 células de la granulosa.

b) Folículos medianos y grandes

Tipo 3b: Ovocito en crecimiento rodeados de 20-60 células de la granulosa distribuidas en 2 y 3 capas.

Tipo 4: Ovocito en crecimiento rodeados por 2 o 3 capas de células de la granulosa (60-100 células).

Tipo 5a: Esta es una etapa transitoria entre los folículos medianos y grandes . Los ovocitos están creciendo y tienen 3 o 4 capas de células de la granulosa (100 a 200 células en un corte transversal).

Tipo 5b: El ovocito es grande y esta rodeado por varias capas de células de la granulosa (200 a 400 células). No tiene fluido

Tipo 6: El ovocito es grande rodeado por muchas capas de células de la granulosa (de 400 a 600 células) y con algunas áreas dispersas que contiene fluido.

Tipo 7: El folículo tiene más de 600 células de la granulosa con una simple cavidad que contiene liquido. El *cumulus oophorus* aun no se ha formado.

Tipo 8: Es un folículo con cavidad antral y el *cumulus oophorus* ya esta bien formado. Es un folículo preovulatorio.

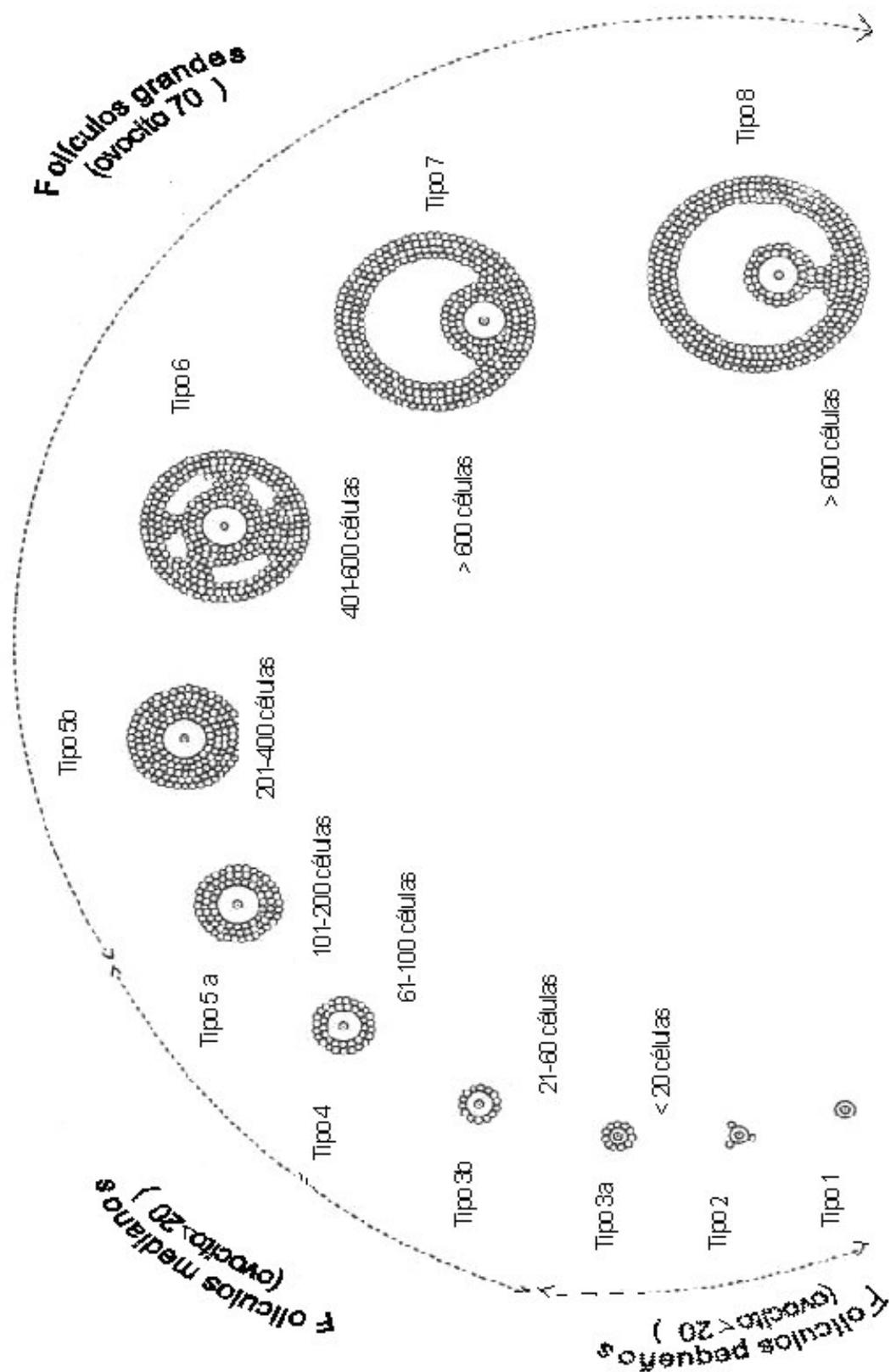


Fig.1'. Clasificación de los ovocitos y folículos.

Para establecer el tiempo en el que este roedor alcanza la madurez sexual se tomó como criterio la observación de los primeros folículos preovulatorios y del cuerpo lúteo.

La atresia folicular fue evaluada de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos: La presencia de núcleos picnóticos en células de la granulosa, extensiones de las células de la granulosa, fragmentación de las células de la granulosa, restos celulares en el antro, pérdida de la arquitectura de la zona pelúcida y del ovocito, todo esto se cuantificó en un corte transversal (Hsueh *et al*, 1994, Grenwald, 1988).

RESULTADOS

El ovario de cero días (2-6 h después del nacimiento) es un órgano sólido lleno de células germinales y con muy poco tejido intersticial. El epitelio que lo cubre es cúbico simple, la túnica albugínea esta en formación, el estroma y la corteza aun no están definidas; las células germinales se encuentran organizadas en nidos delimitados por tejido conjuntivo (Fig.1). Las células germinales están unidas a través de puentes citoplasmáticos formando sincicios, el diámetro de estas células fue de 8 a 15 μm (tabla 2), el núcleo es esférico y ocupa casi todo el volumen de la célula (Fig. 2). En esta etapa hay ovogonias en división mitótica y se pueden identificar por el aspecto de su núcleo y porque con frecuencia se pueden encontrar en pares. En el núcleo de estas células se observan grumos gruesos de cromatina que corresponden a cromosomas. En algunas de estas células la envoltura nuclear se mantiene íntegra. Las etapas que se identificaron con más frecuencia son profase, anafases y telofase temprana. Además, se observó citocinesis en algunas de estas células (Fig. 3). Alrededor del 56% de estas células están desnudas, mientras que el 44% empiezan a ser rodeadas por células de la pregranulosa (tabla 1). Las células de la pregranulosa que no están asociadas a células germinales son de forma ovoide y tienden a agruparse en un número de tres a cinco.

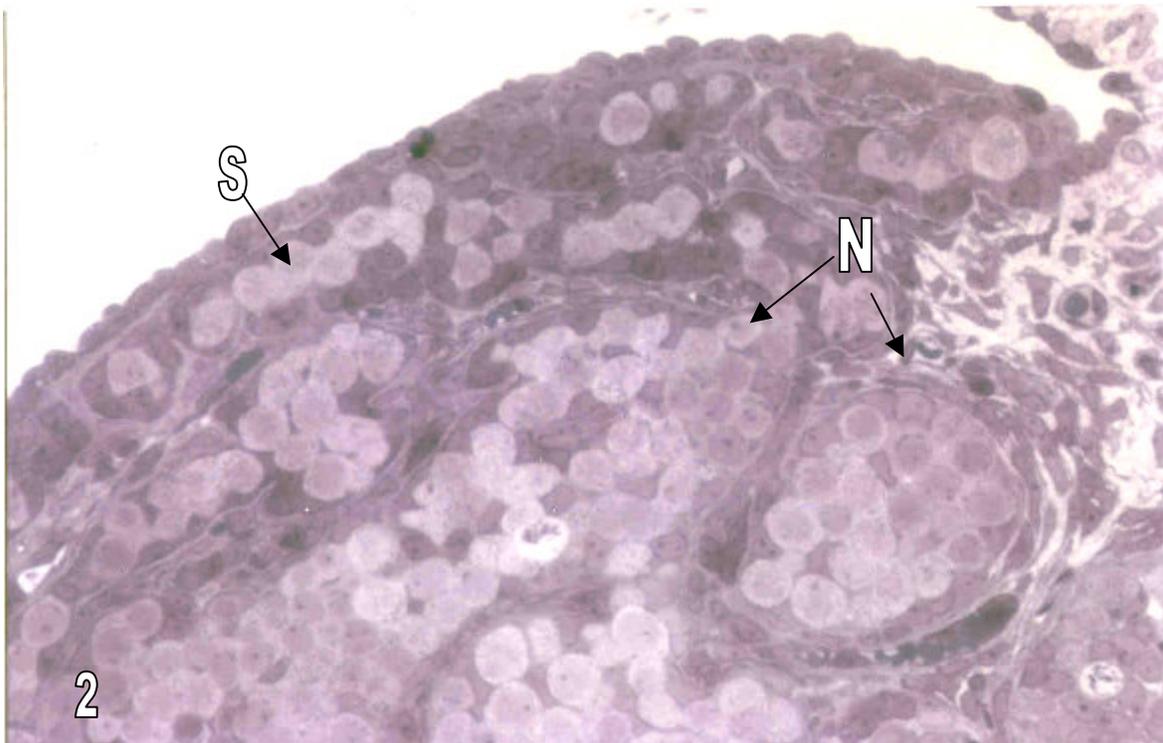
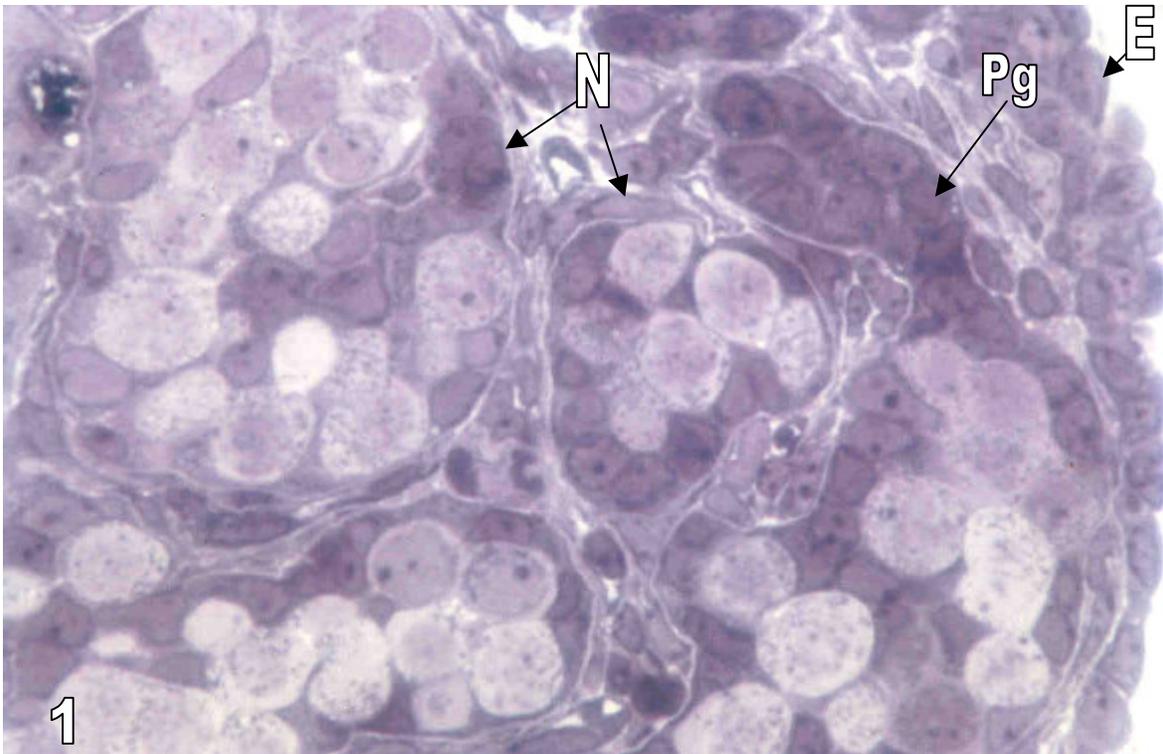


Fig. 1 Corte transversal de ovario de cero días de *Neotomodon a. alstoni* días x 1600, tinción azul de toluidina. N: nido de células germinales; Pg: células de la pregranulosa; E: epitelio
 Fig. 2 Corte transversal de ovario de cero días de *Neotomodon a. alstoni* x 800, tinción azul de toluidina. S: sincicios; N: nidos.

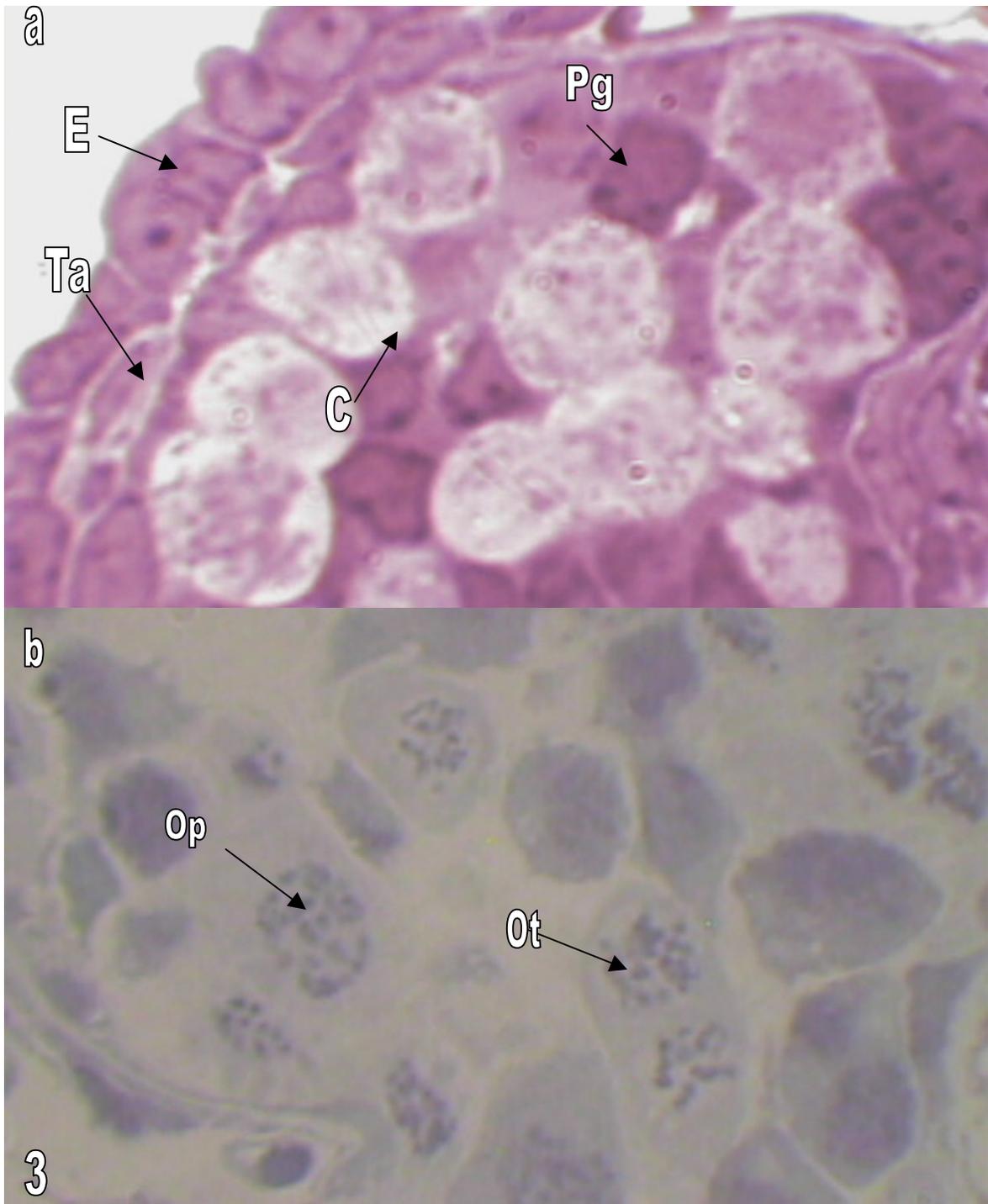


Fig. 3. Corte transversal de ovario de cero días de *Noetomodon a. alstoni* x 1000, tinción azul de toluidina. (a) C: citocineis; Pg: células de la pregranulosa; Ta: túnica albugínea E: epitelio. (b) Op: ovogonia en profase; Ot: ovogonia en telofase.

En el ovario de 7 días aún se observa que las células germinales están organizadas en nidos aunque están menos delimitados (Fig.4). Estas células tienen un diámetro de 11 a 16 μm (Tabla 2). El 65% de los ovocitos están rodeados por células de la granulosa (Tipo1), y aunque ya no se observan figuras mitóticas, en algunas aún se observa tabicaciones citoplasmáticas (Fig.5). En esta etapa del desarrollo de la gónada la médula y la corteza del ovario están bien definidas (Fig. 6). El epitelio que envuelve al ovario se ha estratificado en 2 o 3 capas de células de forma cúbica.

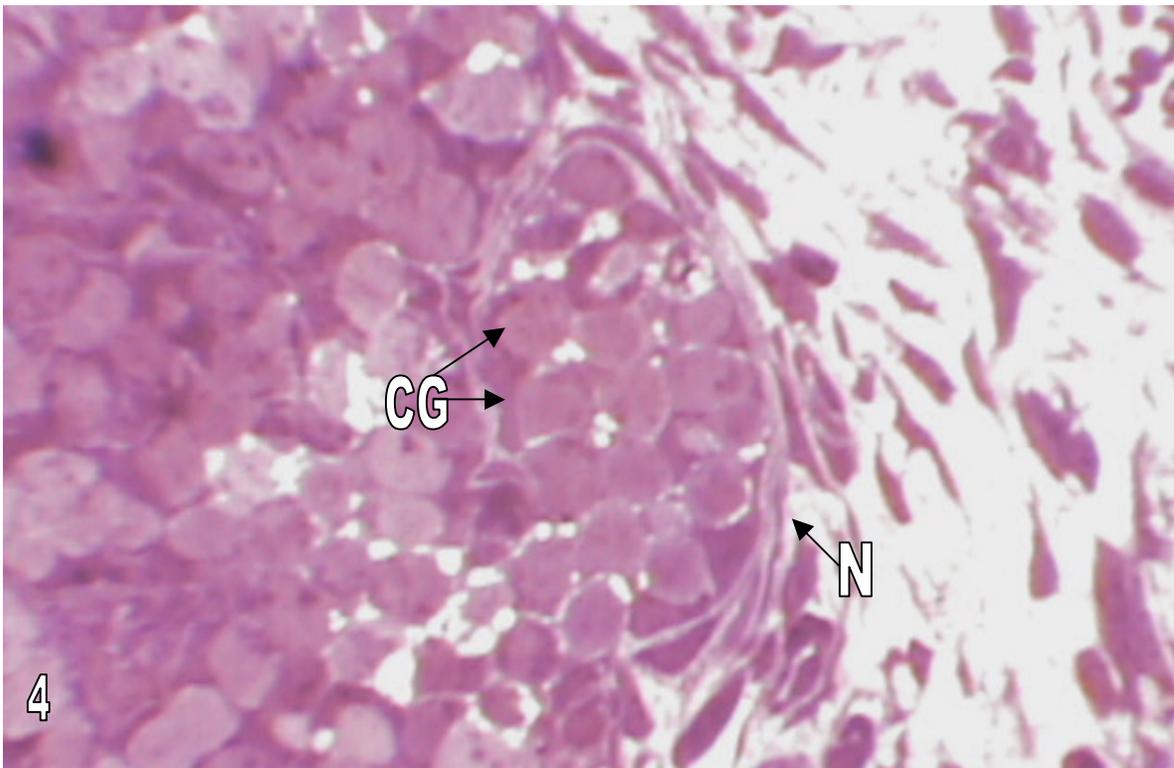


Fig. 4. Corte transversal de ovario de 7 días x 400, de *Neotomodon a. alstoni* tinción azul de toluidina. CG: células germinales; N: nido

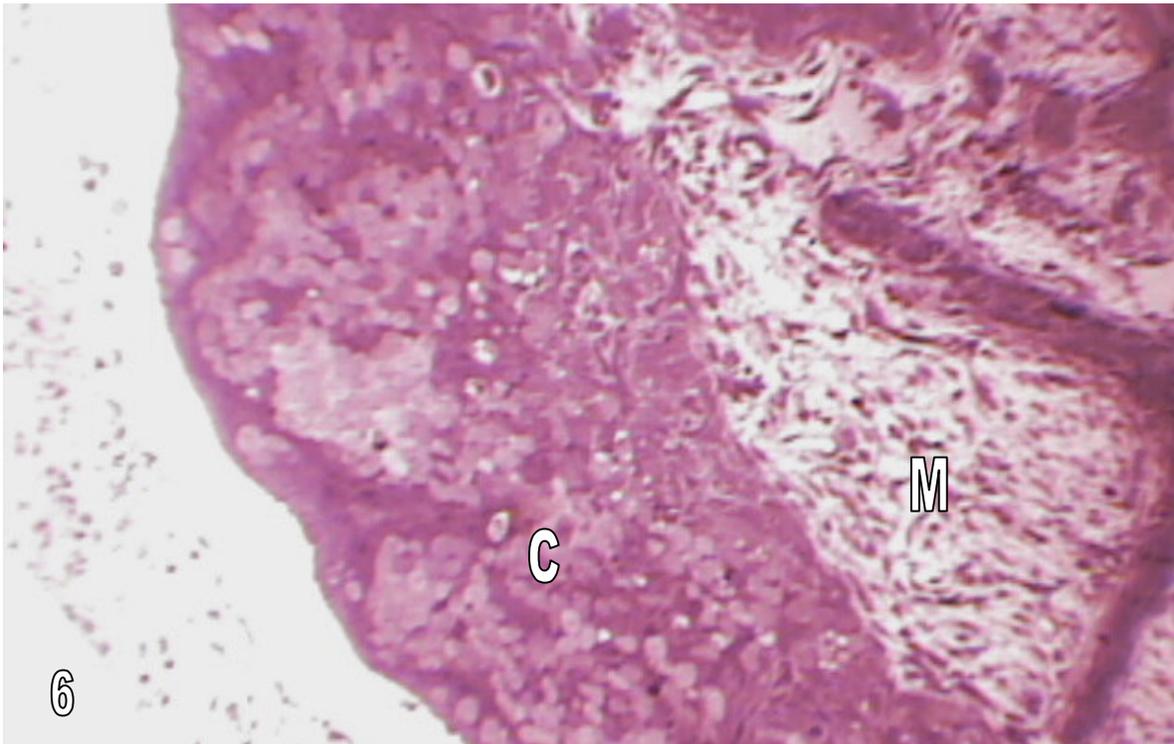


Fig. 5. Corte transversal de ovario de 7 días x 1000, de *Neotomodon a.alstoni*, tinción azul de toluidina. C: tabicaciones citoplasmaticas

Fig. 6. corte transversal de ovario de 7 días x 2500 de *Neotomodon a .alston*, tinción azul de toluidina. C: corteza; M: médula.

En el ovario de 15 días los ovocitos ya no están organizados en nidos, todos están rodeados por células de la granulosa de forma aplanada formando folículos de tipo 2, 3a, y 3b (Tabla 1), el diámetro del ovocito en estos folículos es de 22.5 a 40 μm . El 7.8 % de los folículos está rodeado de dos capas de células foliculares. En este periodo del desarrollo, en los folículos que han iniciado el crecimiento se observa por primera vez la membrana basal y es más evidente en los folículos bilaminares (Fig.7). En los folículos que han alcanzado un diámetro de 40 μm se observa la teca, que está constituida por dos capas de células fusiformes. El 19% de los folículos, en este periodo del desarrollo son atrésicos. El tejido estromático está organizado en bandas paralelas con células fusiformes que rodean a los folículos.

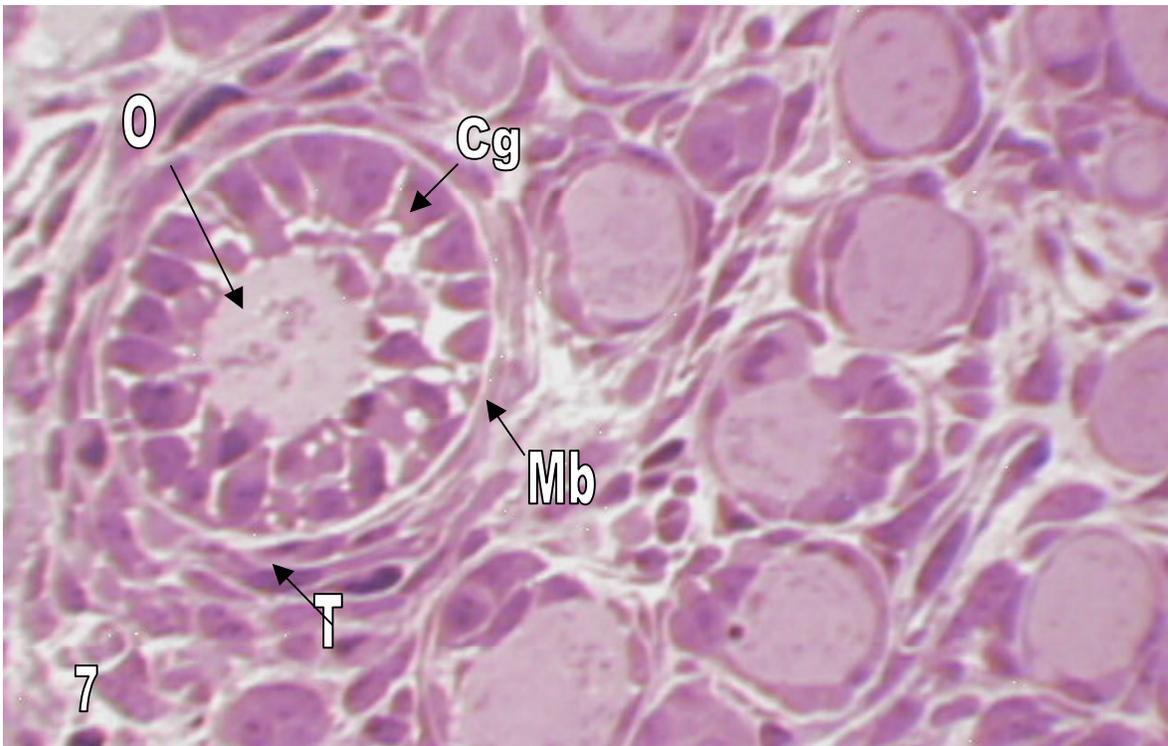


Fig. 7. Corte transversal de ovario de 15 días x 400, *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. Folículo bilaminar: O: ovocito; Cg: células de la granulosa; Mb: membrana basal; T: teca

En el ovario de 17 días se observan folículos en diferentes etapas del desarrollo: pequeños de tipo 2 y 3a; medianos de tipo 3b, 4 y 5a (Tabla 1), en los que el diámetro del ovocito es de 35 a 37.5 (Tabla 2), estos están localizados hacia la medula del ovario. En esta etapa del desarrollo se observa que alrededor del 81 % de los folículos son atrésicos (Fig. 8). En algunos de estos folículos se observa por primera vez la zona pelúcida. La teca presenta 4 capas de células y abundantes fibras (Fig. 9). El tejido estromático conserva la misma organización de la etapa anterior con una irrigación sanguínea abundante.

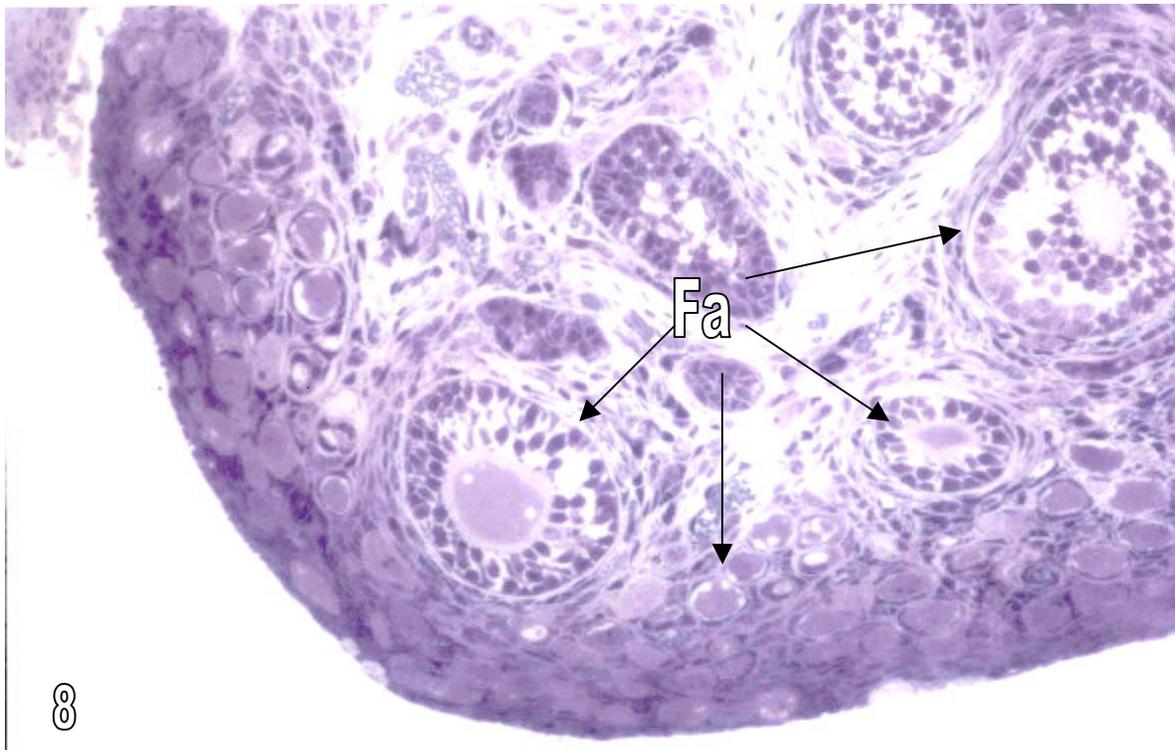


Fig. 8. Corte transversal de ovario de 17 días x 400, de *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. Fa: folículos atrésicos

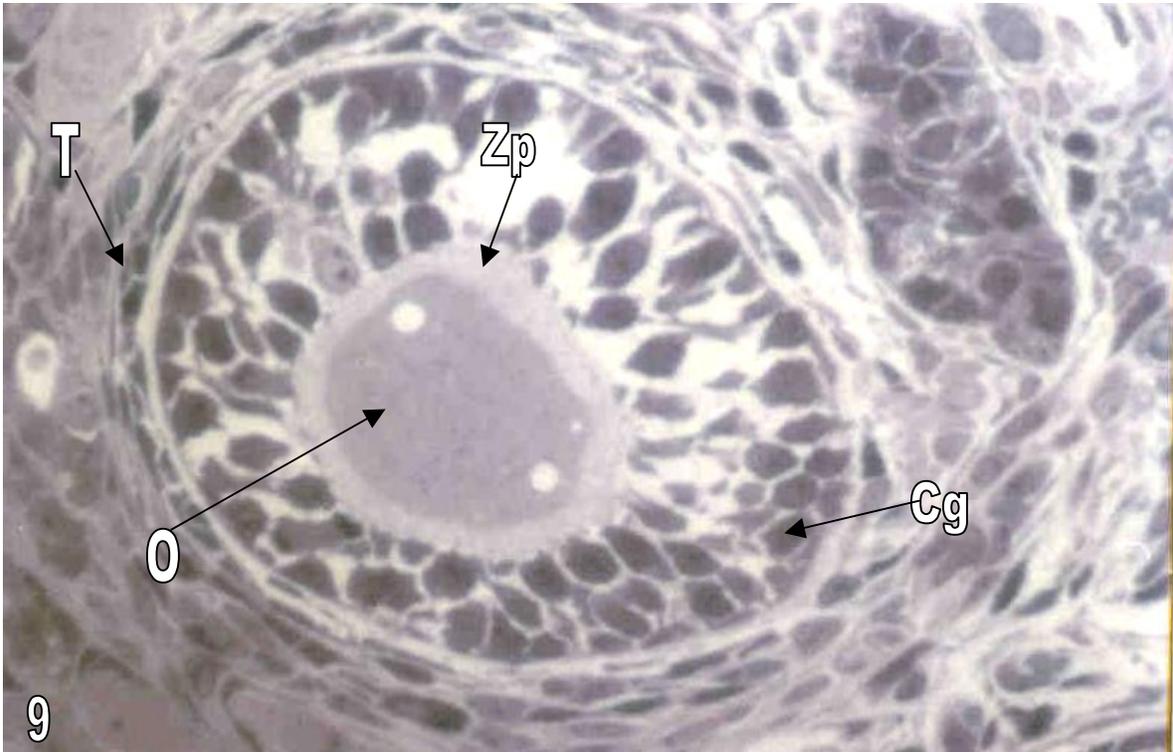


Fig. 9. Corte transversal de ovario de 17 días x 800 de *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. Folículo atrésico: O: ovocito; Zp: zona pelucida; Cg: células de la granulosa; T: teca

En el ovario de 28 y 30 días se observan folículos en diversas etapas del desarrollo, que están rodeados de 2 a 14 capas de células de la granulosa, los más desarrollados presentan un antro pequeño. Estos folículos son de tipo 3a, 3b, 4 y 5a, y se localizan principalmente en la parte interna de la corteza. El diámetro del ovocito en esta etapa del desarrollo fue de 67.5 a 75 μm (Tabla 2). A partir de los 30 días se observa bien definida la teca interna y externa, en la interna se distinguen células fusiformes organizada en dos y tres capas y en la externa abundantes fibras con un número variable de capas de fibras (Fig.10). En el día 28 alrededor del 50 % de los folículos en desarrollo son atrésicos (Fig. 11) mientras que a los 30 días el porcentaje de atresia ha disminuido a un 19.11%.

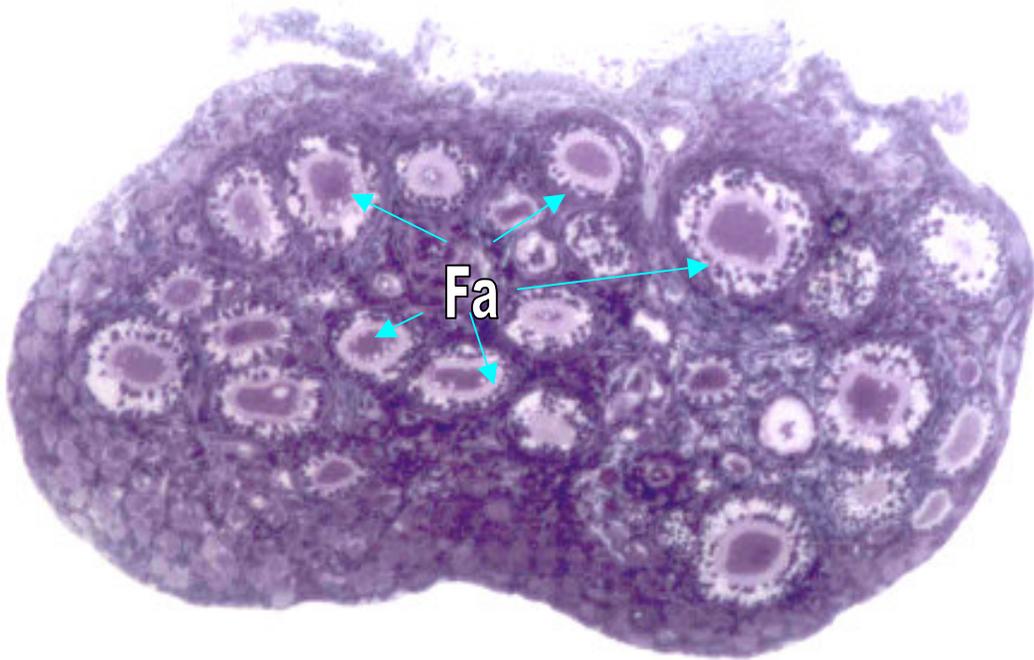
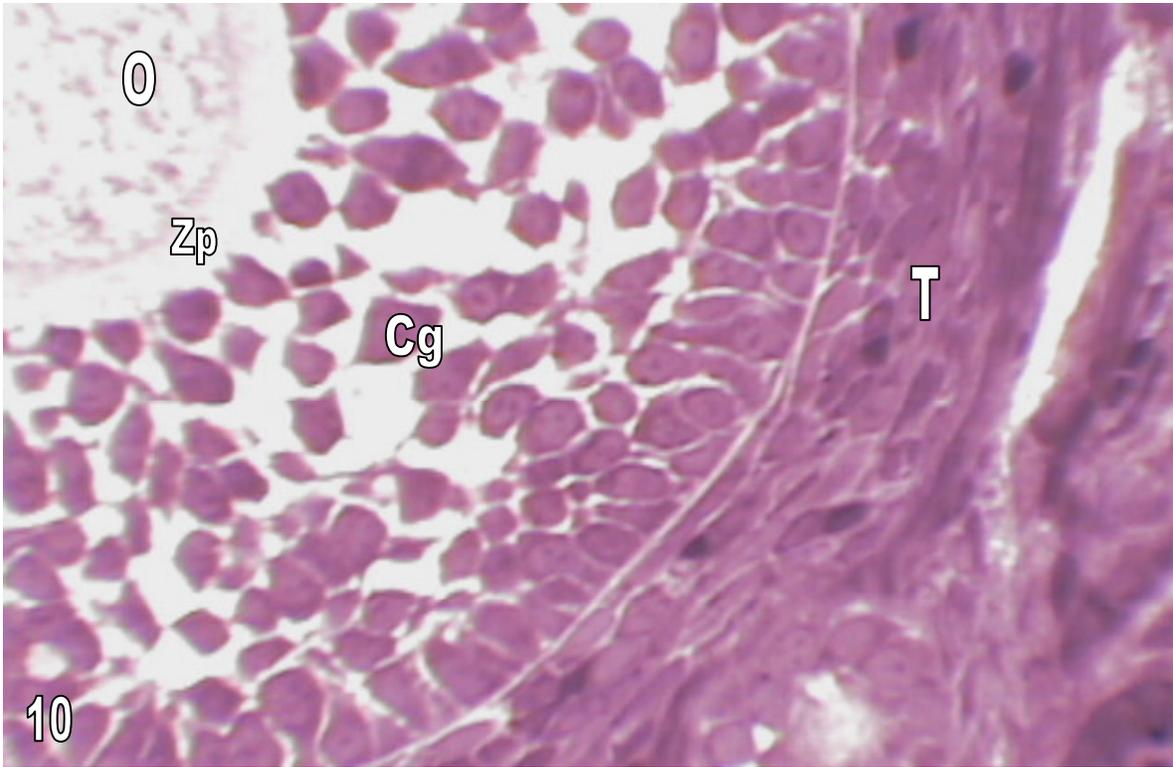


Fig. 10. Corte transversal de ovario de 30 días x 500, de *Neoptodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. O:ovocito; Zp: zona pelúcida; células de la granulosa; T: teca

Fig. 11. Corte transversal de ovario de 28 días x 160 de *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. Fa: folículos atrésicos

En el ovario de 40 días en los folículos más desarrollados el ovocito tiene un diámetro de 75 a 77.5 μm , estos están rodeados por 13 o más capas de células de la granulosa (Tabla 2), presentan un antro grande, el ovocito está unido al cumulus oophorus, y en algunos éste se ha desprendido del cumulus con su corona radiada, indicando que la ovulación está próxima (Fig. 12 y 13). Estos folículos presentan una teca muy desarrollada constituida de 5 a 6 capas en la que se observan células poliédricas y fusiformes, así como fibras. En esta etapa del desarrollo del ovario, se observan por primera vez cuerpos lúteos de reciente formación, en los que la antigua cavidad antral está siendo invadida por tejido conectivo (Fig. 14). En estos cuerpos lúteos las células que los constituyen aún no adquieren la forma esférica, característica de las células luteínicas.

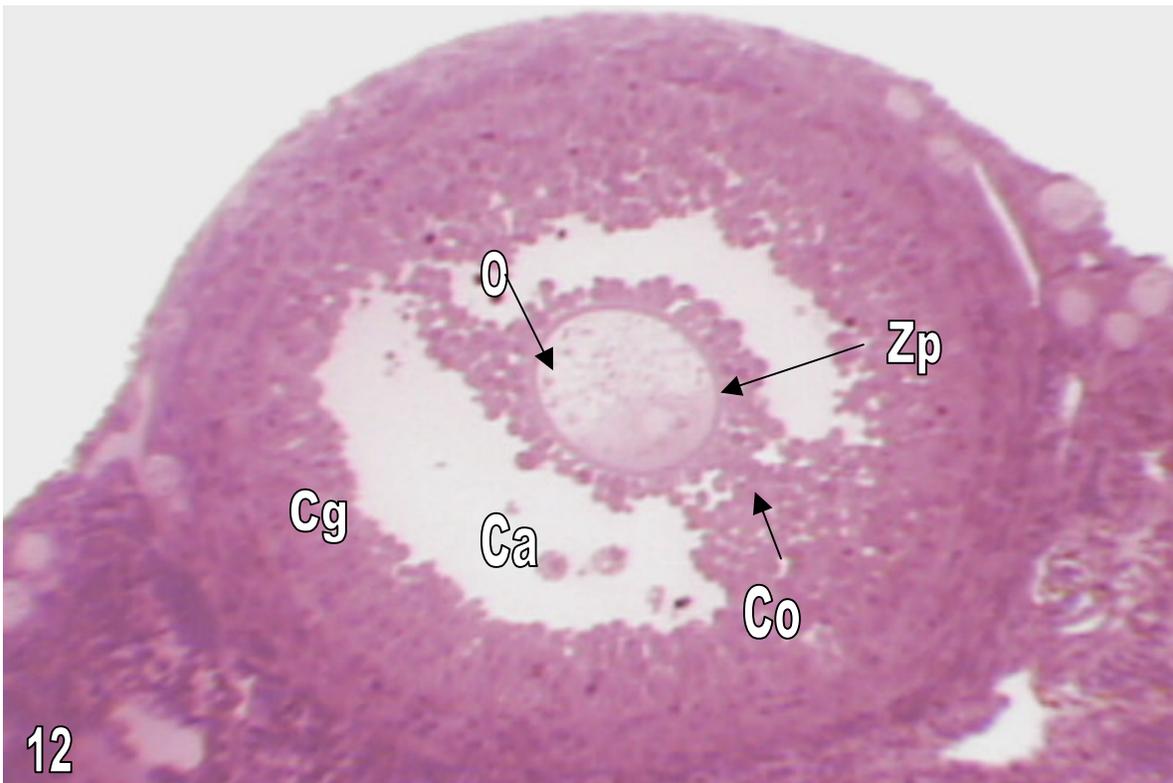


Fig. 12. Corte transversal de ovario de 40 días x 125, de *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. O: ovocito; Zp: zona pelucida; Co: cumulus ooforo; Cg: células de la granulosa; Ca: cavidad antral

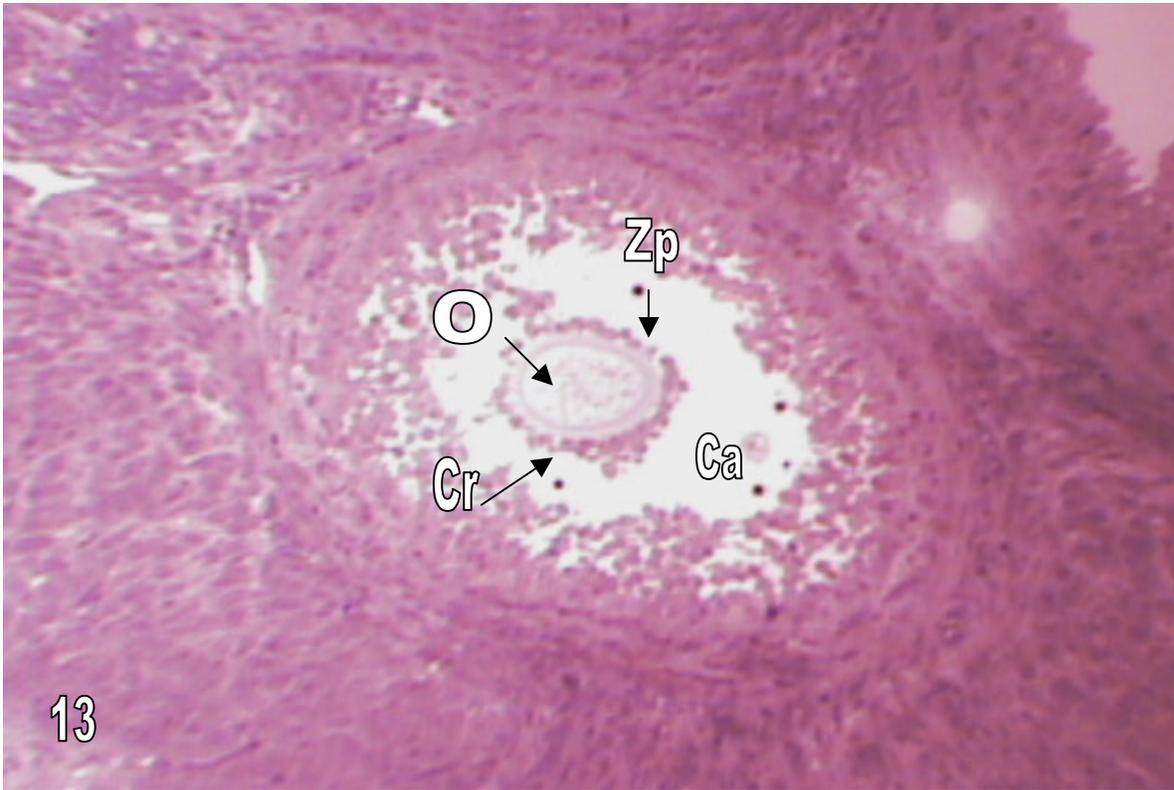


Fig. 13. Corte transversal de ovario de 40 días x 125, de *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. O: ovocito; Zp zona pelúcida; Cr: corona radiada

Fig. 14 Corte transversal de ovario de 40 días x 125. de *Neotomodon a. alstoni*, tinción azul de toluidina. Cuerpo lúteo: Tc: Tejido conectivo: Cl: células luteínicas.

Tabla 1. Número de ovocitos (sanos y atrésicos) en un corte transversal de ovario a diferentes edades.

Edad (días)	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3 ^a	Tipo 3b	Tipo 4	Tipo 5 ^a	Tipo 5b	Tipo 6	Tipo 7	Tipo 8
0	28	329								
7	187									
15		107	82	16						
17		51	58	4	1	1				
28		11	90	12	5	2				
30		127	92	8	11	8				
33			86		1	3	1			
40			23	3	2	2		1		

Tabla 2. Descripción de los folículos más desarrollados y porcentaje de folículos atrésicos en todas las edades en un corte transversal.

Edad del ovario (días)	0	7	15	17	28	30	40
Diámetro del ovocito μm	8-15	11-16	22.5-40	37.5-50	70-75	67.5-72.5	75-77.5
Núm. de células de la granulosa	0-4	2-4	20-50	70-104	63-93	198-276	117-500
Capas de células de la granulosa	0-1	0-1	1-3	4-5	3-4	3-8	4-14
% de folículos atrésicos	—	—	19.02	81.1	50.0	19.11	14.0

DISCUSIÓN

El ovario del ratón de los volcanes al nacimiento es un órgano sólido lleno de células germinales en estrecho contacto, con poco estroma. En otros roedores, como el ratón de laboratorio, la organización histológica del ovario es muy similar a la observada en esta especie (Peters, 1969; Weakley, 1966).

En el ovario del ratón de los volcanes en el día cero algunas ovogonias se encuentran en mitosis, y probablemente estas divisiones continúen durante los primeros días del postparto, debido a que en el ovario de 7 días, se observan células germinales en citocinesis. Sin embargo, esto puede ser corroborado aumentando el número de muestras en este periodo del desarrollo y con edades intermedias o a través de estudios de marcaje con timidina tritiada. En la mayoría de las especies de mamíferos la proliferación mitótica de las células germinales está restringida a etapas fetales (Hirshfield, 1991; Greenwald, 1988). Sin embargo, en algunas especies de prosimios primates, hurones, los visones, conejos y el hámsteres dorado, se señala que la proliferación mitótica de las células germinales puede prolongarse a etapas postnatales tempranas (Peters, 1975). En el ratón de laboratorio, se señala que en el día del nacimiento las células germinales se encuentran en etapas transitorias de la profase (paquiteno y diploteno temprano).

A los 7 días en el ovario del ratón de los volcanes se observaron todavía algunos ovocitos desnudos, lo cual difiere de lo reportado para *Mus musculus*, en el que a la edad de 7 días todos los ovocitos están asociados a células foliculares e inclusive algunos son bilaminares (Peters, 1969). A partir de esta edad, aunque el patrón de desarrollo folicular del ratón de los volcanes es semejante en cuanto a

los cambios morfológicos observados, no hay coincidencia en el tiempo. Debido a que en esta especie el desarrollo folicular es más lento.

Los resultados señalan que en este ratón la formación del folículo primordial abarca desde etapas prenatales hasta periodos postnatales, más de una semana de vida, debido a que a los 7 días aún se observan ovocitos que no están asociados a células somáticas. En otros mamíferos, como el ratón de laboratorio, la formación del folículo primordial abarca periodos semejantes a la de este roedor (Peter, 1969). Mientras que en mamíferos como la oveja la formación del folículo primordial ocurre en etapas fetales (Heywood *et al*, 2002).

En etapas tempranas del desarrollo ovárico en el ratón de los volcanes, se observó que los ovocitos están unidos por puentes citoplasmáticos formando sincicios. Peters (1978) señala que en los primeros estados del desarrollo folicular del ratón de laboratorio, que los ovocitos están organizados en sincicios, y que los ovocitos dentro de un mismo sincicio se encuentran en el mismo estado de transición de la meiosis, leptoteno, zigoteno o paquiteno.

En el desarrollo folicular del ratón de los volcanes la membrana basal se observa por primera vez a los 15 días postparto, lo cual difiere de lo observado en *Mus musculus*, en el que la membrana basal se observa a partir del día 7 (Peters, 1969).

En el ovario del ratón de los volcanes a los 15 días de edad se observó por primera vez la membrana tecal en los folículos con tres capas de células de la granulosa. En el ratón de laboratorio esta membrana aparece en una etapa muy similar, a los 14 días, en los folículos de 2 a 3 capas (Peters, 1969). Mientras que

en la rata esta membrana es evidente en los folículos de una o 2 capas de células de la granulosa (Hirshfield, 1991).

En el ovario del ratón de los volcanes, a los 30 días se observaron los primeros folículos con pequeñas cavidades antrales, mientras que en el ratón de laboratorio en esta etapa del desarrollo ovárico se pueden observar folículos preovulatorios y cuerpos lúteos (Peters, 1969). En el ratón de los volcanes estas etapas del desarrollo se observaron a los 40 días de edad.

Con base en estas observaciones este ratón alcanza la madurez sexual alrededor de los 40 días, en otro estudio basado también en desarrollo del ovario, se señala que la madurez sexual se alcanza a la edad de 49 días, tomando como criterio el desarrollo de los primeros folículos preovulatorios (Ortiz *et al*, 1987). El ratón de laboratorio alcanza la madurez a los 30 días y la rata de laboratorio a los 17 días en una etapa más temprana (Hage *et al*, 1978).

Aunque la madurez sexual, tomando en cuenta el desarrollo de los primeros folículos preovulatorios, en el ratón de los volcanes se alcanza entre los 40 y 50 días, la capacidad para copular, según Olivera (1984, 1986), se alcanza a una edad mayor; de los 65 a los 85 días el 8%, mientras que el 50 % copula a los 219 días. En el laboratorio la primera camada se obtuvo a la edad de 130 días. El intervalo entre el tiempo que alcanza la madurez sexual tomando como criterio el desarrollo de los primeros folículos preovulatorios y la verdadera capacidad para procrear, probablemente se deba a la estructura social de este ratón; esta especie es monógama, el macho proporciona cuidados a sus crías y conforma unidades familiares en la que los hijos mayores también participan en el cuidado de las crías (Luis *et al*, 2000). En las especies con estructura social compleja la edad en la que

se alcanza la madurez sexual, tomando como criterio la madurez gonadal está separada por un periodo considerable de tiempo de la capacidad conductual para copular y reproducirse.

El diámetro del ovocito se incrementó de 8 a 77 μm y las células de la granulosa de cero a 500, desde el día cero hasta los 40 días, este aumento en el diámetro del ovocito fue muy similar al señalado para *Mus musculus* durante el desarrollo folicular postnatal (Peters, 1969).

De acuerdo con Peters (1969) el desarrollo folicular involucra un incremento en el diámetro del ovocito, el crecimiento y proliferación de las células de la granulosa y el desarrollo de la cavidad antral.

En el ratón de los volcanes la atresia folicular fue muy alta durante los primeros 30 días postparto, siendo muy elevada alrededor del día 17. Esto es similar a lo señalado para el ratón de laboratorio, en el que la degeneración de los folículos es común durante los primeros 30 días postparto y es poco frecuente en los animales que han alcanzado la madurez sexual (Edwards, 1977). Esta atresia folicular masiva durante los primeros 28 días de la vida es la causa de la disminución en el número de células germinales.

Los mecanismos exactos a través de los cuales los folículos degeneran se desconocen. Sin embargo, se conoce que la degeneración folicular o atresia es un proceso apoptótico controlado hormonalmente, por el cual los folículos degeneran y son eliminados en forma coordinada. En todas las especies examinadas, la atresia es correlacionada con una disminución en la síntesis de estrógenos aunado con un incremento en la producción de progesterona. Las bases del cambio de la relación de estrógenos a progesterona es específica y es atribuido, a

un decremento en la actividad de la liasa C_{17,20} que a su vez ocasiona una disminución del substrato para la aromatización en células de la granulosa y pérdida de la actividad de la aromatasasa (Kaipia *et al*, 1997; Aaron *et al*, 1994) .

Durante lo primeros 30 días postnatales del desarrollo del ovario los folículos en crecimiento en el ratón de los volcanes se localizaron en la parte interna del ovario, mientras que los folículos pequeños que no están en crecimiento se encuentran en la corteza. Este patrón de distribución no sólo se encuentra en el ratón de laboratorio (Peters,1969) sino también en el ovario de mamíferos jóvenes (Mossman y Duke 1973 citado en Peters, 1975).

CONCLUSIONES

Al nacimiento en el ovario de *Neotomodon a. alstoni* existe proliferación mitótica de las células germinales.

En esta especie la asociación de las células germinales con las células somáticas (formación de folículo primordial) ocurre desde etapas prenatales hasta poco después del nacimiento.

En el ratón de los volcanes la atresia folicular es más marcada entre los 17 y 28 días del desarrollo postnatal.

En el ratón de los volcanes alcanza la madurez sexual aproximadamente a los 40 días de edad.

Finalmente, el desarrollo folicular postnatal del ratón de los volcanes es similar al del ratón y la rata de laboratorio, con la diferencia de que en este ratón el crecimiento folicular es más lento.

REFERENCIAS

Aaron J.W. Hsueh, A.J. Billig, H., Tsafiriri, A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinology Reviews*. 15(6):707-724.

Davis, W.B. y Follansbee. 1946. The mexican volcano mouse *Neotomodon*. *Journal of Mammology*. 26(4):401-411

Carlson, M.B. 2000. Embriología humana y biología del desarrollo. 2a edición . Harcourt. Pp 2-13.

Edwards, G.R., Flower, R. E., Gore-Langton, R. E., Gosden, R.G., Jones, E. C., Readhead, C., Steptoe, P.C. 1977. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and ovaies human. *Journal Reproduction and Fertility*. 51:237-263.

Fawcet, W. D. 1999. Tratado de Histología. Décima primera edición. Interamericana, Mc Graw-Hill. México, Pp. 1026

Greenwald, S. G. y Terranova, P.F. 1988. Follicular Selection and its Control, en *The physiology of Reproduction* (Knobil E.; J Nell; L. Ewing; G. Grenwald; C. Market y D. Pfaff eds.) Raven Press, New York, p.387-432.

Gerard, P., y Herlant. M. 1953. Sur la persistance de phenomenes d'oogenese chez les lemuriens adultes. *Archives Biologies*. 64: 97-111.

Goldman, E. A.. 1910. Revision of the wood rats of genus *Neotoma*, U S. Dept. Agric. Bur. Biol. Surv., N. Amer. Fauna. 31: 1-124.

Hage, J.C., Groen-Klevant, C:A., Welschen, R. 1978. Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta endocrinologica*. 88:375-382.

Heywood, R. S., Smith. P., Heath A. D., Juengel, L. J., Wakefield, J. S., McNatty, P. K. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproducction*. 66:2234-2250.

Hirshfield, A. N. y Midgley A. R. 1978. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*. 19:597-605.

Hirshfield, A. N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review Cytology*, 124:43-101.

Hirshfield, A. N. 1994. Relationship between the supply of primordial follicles and the on set of follicular growth in rats. *Biology of Reproduction*, 50: 421-428.

Hsueh, A. J., Billig, H., Tsafari, A. 1994. Ovarian follicles in the mammalian ovary. *Endocrinology Review*. 15:707-724.

Kaipa, A., Aaron J.W., Hsueh, A. J. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review Physiology*. 59: 349-63

Linter-Moore, S. y More, G. P. 1979. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*. 20:773-778.

Luis, A. J., Carmona, A., Delgado, J., Cervantes, A. F., Cardenas, R. 2000 Parental behavior of the volcano mouse, (*Neotomodon Alstoni*). *Journal of mammology*. 81 (2): 600-605.

Martín, F. E. y Álvarez, S. T. 1982. Crecimiento y desarrollo en el laboratorio de *Neotomodon a. alstoni* (Rodentia Cricetidae). *Anuario Escuela Nacional de ciencias Biológicas*. México. 26:55-84.

Merriam, C. H. 1898. A new genus (*Neotomodon*) and three new species of murine rodents from the mountains of southern México. *Proc. Biol. Soc.* 12:127-129.

Miller y Rhen 1903. Systematic results of the study of north American land mammals to the close of the year 1900. *Proc. Boston. Society Natural History*. 30(1):1-352.

Olivera, L. J. 1984. Reproducción de *Netomodon a. alstoni* (Rodentia: Cricidae) en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. UNAM. Iztapalapa, México.

Olivera, L. J., Ramírez-Pulido, J., Williams, S. L. 1986. Reproducción de *Peromyscus (Neotomodon) Alstoni* (Mammalia: Muridae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana*. 16: 1-27.

Ortiz, R., Aguilar, C., Granados, H. 1987. Histología de la madurez gonadal en la hembra del ratón de los volcanes (*N.A.alstoni*) XVIII. Histología de la madurez testicular XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qr., Resumen C17.

Peters, H. 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica*, 62:98-116.

Peters, H. Biskov, G. A. Himelstein-Braw, R. Faber, M. 1975. Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. *Journal Reproduction and fertility*. 45: 559-566.

Peters, H. 1978. Folliculogenesis in mammals. In *The vertebrate ovary*. (Jones R.E.). The Finsen Institute, Copenhagen. Pp. 121-143.

Pederson, T. y Peters, H. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal Reproduction and Fertility*, 17: 555-557.

Richards, S. J., Russell, L.D., Ochsner, S., Hsien. M., Doyle. H. K., Falender, A. E., Lo, K. Y. y Sharma, C. S. 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent progress in hormone research*. 57: 195-220.

Ross, H.M., Reith, J: E. Romrell, J. L. 1992. Histología; Texto y atlas color. Segunda edición, Panamericana. Pp:623-634.

Sánchez, H. C., Rojas, A., Chávez, C. 1989. Fluctuación poblacional de *Neotomodon alstoni alstoni* (rodentia Cricetidae). En la Sierra del Ajusco, México, *in: Ecología urbana*. Museo nacional de Historia Natural, México. P. 105-112.

Uribe, A.M., Laguarda F:A., Romero, J. J., Paulette, J., De Paulette, S. 1974 Cytogenetic analysis of *Neotomodon alstoni alstoni* . *Cytologia*.39: 437-442.

Uribe, A. M. 1977. Estudios citogenéticos en algunas especies de roedores lagomorfos de México. Tesis Doctoral . Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Villa, R.B.1953. Mamíferos silvestres del Valle de México. Anales del Instituto de Biología, UNAM, 23: 269-492.

Williams, S. I. y Ramírez-Pulido. 1995. Morphometric variation in the volcano mouse, *Peromyscus (Neotomodon) alstoni* (Mammalian: Cricetidae). *Ann. Carnegie Museum Natural History*, 53: 163-183.

Yates, L.T., Baker, R.L., Barnett. 1979. Phylogenetic analysis of karyological variation in three genera of Peromyscine rodents. *Systematic Zoological*. 28: 40-48.