



29142

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ESTUDIO DE LA FOLICULOGENESIS EN EL  
OVARIO DE LA GALLINA”.**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

**B I O L O G O**

Presenta:

**Ma. del Carmen Méndez Herrera**

MEXICO, D. F.

1989.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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

### INTRODUCCION

Origen de las células germinales

Proliferación Ovogonial

Ovogénesis

Foliculogénesis

Vitelogénesis

esteroidogénesis

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### MATERIAL Y METODO

Clasificación y conteo de los folículos

### RESULTADOS

### DISCUSION

### CONCLUSIONES

### BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION.

En la gallina doméstica se encuentra modificado el aparato reproductor, de tal manera que sólo la parte izquierda es funcional.

Durante el desarrollo embrionario el ovario derecho se atrofia a partir del noveno día y para el tiempo de la eclosión es rudimentario y sigue involucionando hasta quedar como vestigio; aunque hay reportes de casos excepcionales donde llega a ser funcional en el adulto (Gilbert, 1971).

El ovario normal se ubica a la izquierda, dentro de la cavidad abdominal, se une a la pared del cuerpo por el mesovario que junto con tejido conectivo, músculo liso y vasos sanguíneos forman el tallo ovárico. El ovario presenta dos zonas, la médula y la corteza, en el pollo joven se observan separadas pero en la madurez se pierde la distinción. Está cubierto por el epitelio germinal que consta de una sola capa de células cuboideas, de núcleo redondo y vesiculoso, bajo de este se encuentra la corteza formada por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, fibroblastos, células intersticiales e indiferenciadas. En la corteza del ovario sobresalen los folículos, considerados como unidades independientes, los cuales consisten de un ovocito rodeado por células foliculares y una membrana basal, su formación es gradual e involucra la organización y diferenciación de varios tejidos como la médula, también conocida como zona vascularizada contiene vasos sanguíneos, linfáticos y sinusoides, está provista además de paquetes nerviosos, algunos de los cuales se asocian a vasos sanguíneos y músculo liso y otros pueden llegar a inervar la corteza (Hodges, 1974).

## ORIGEN DE LAS CÉLULAS GERMINALES.

Como en otros vertebrados superiores, el sistema genital de aves, se inicia en el individuo con la aparición de las células germinales primordiales (c.g.p.) que surgen en etapas tempranas del desarrollo embrionario. En el pollo se reconocen elementos que corresponden a las c.g.p. antes de la gastrulación, estas células son identificadas en las áreas extraembrionarias del blastodermo y se llevan al embrión por vía sanguínea. El mayor número de células germinales se observa entre 50-55 hrs. de incubación en el embrión del pollo. En el ratón se identifican c.g.p. en la línea primitiva, la alantoides, la parte posterior del intestino, el mesenterio y finalmente en la cresta genital entre los 8-13 días de vida fetal (Byskov 1986).

Aunque no se sabe exactamente el tiempo ni la capa blastodérmica de la cual surgen, se han propuesto diferentes teorías para explicar su origen. La idea más aceptada es que surgen precozmente, aún antes de que se diferencien las capas embrionarias. Los mecanismos involucrados en la migración de las c.g.p. desde su origen hasta colonizar la gónada en desarrollo son poco claros. En mamíferos las c.g.p. tienen movimientos amiboideos, se sugiere además que algunos tejidos donde están embebidas las ayuden en su traslado; otra posibilidad es que sigan caminos predeterminados guiadas aparentemente por sustancias quimiotácticas producidas por la gónada en desarrollo (Byskov, 1984).

En aves el traslado de las c.g.p. se lleva a cabo por vía sanguínea como ya se había mencionado, precedido y seguido por movimientos ameboides activos y de mecanismos quimiotácticos. Las c.g.p. durante su migración y después de alcanzar la gónada se dividen por mitosis, incrementando su número rápidamente (Byskov, 1986).

#### PROLIFERACION OVOGONIAL.

Una vez establecidas las ovogonias en el ovario, se inicia el período activo de divisiones mitóticas, aunque no hay sincronización de éstas a lo largo del ovario, se observa que por regiones grupos de ovogonias se dividen simultáneamente. La duración de este período varía según las especies, pero generalmente se completa en la etapa fetal. En mamíferos, el patrón de proliferación ovogonial va del interior al exterior de la corteza del ovario, podría ser que el micrambiente juegue un papel importante en esta etapa. Los factores que controlan las mitosis de las ovogonias no han sido aclarados, una posibilidad sería que intervinieran las hormonas gonadotrópicas; pero experimentalmente no ha sido demostrado. En el ovario izquierdo del embrión de pollo se pueden distinguir grupos de ovogonias desde el día nueve de incubación, observándose el pico máximo de multiplicación el día diecisiete de desarrollo embrionario. En total la población de ovogonias se incrementa cerca de 25 veces entre el día nueve y diecisiete (Hughes 1963). Así como en mamíferos, las mitosis ovogoniales en las aves se suceden por regiones.

Otro fenómeno que ocurre en ovogonias y ovocitos es la atresia; en el primer día posteclosión han degenerado el 50% de las células germinales en el pollo (Hughes 1963). Las ovogonias degeneran en mitosis o en interfase; los cambios morfológicos que presentan las ovogonias atrésicas en interfase son: núcleo picnótico, membrana nuclear plegada, citoplasma eosinófilo y para etapas más avanzadas el citoplasma está francamente vacuolizado (Gondos 1978).

Las ovogonias que degeneran en profase mitótica presentan condensación del material cromosómico; en metafase los cromosomas se ven delgados pero en etapas avanzadas de degeneración se los encuentra formando densas capas. Después de que se ha iniciado la meiosis, aumenta la proporción de células degenerativas, aunque en etapa premeiótica degeneran muchas ovogonias en interfase (Gondos, 1978).

En mamíferos se han estudiado las diferentes etapas de atresia de la células germinales; en el ovario humano se presentan tres etapas, una afecta ovogonias en mitosis, otra ovocitos en paquiteno y la última ovocitos en diploteno. Se ha sugerido que puentes intercélulares están involucrados en los fenómenos atrésicos ya que se han encontrado en células adyacentes en etapas tempranas de degeneración (Gondos, 1978), pero los mecanismos que determinan la atresia aún no han sido esclarecidos.

#### OVOGENESIS

Cuando la célula germinal entra en meiosis se conoce como ovocito, y el proceso es conocido como ovogénesis; empieza en etapa

embrionaria o inmediatamente después del nacimiento.

En mamíferos los primeros ovocitos aparecen en la parte central de la corteza y luego hacia el exterior. Los factores que inician la maduración son desconocidos pero se supone la existencia de un inductor de meiosis de acción regional, y podría ser que la médula interactúe con la corteza para iniciar la meiosis (Byskov, 1984).

En cultivo de órgano de hamster y en cultivo ovárico y testicular de ratón y hamster se observó que el factor disparador de la meiosis podría estar en la rete ovarii, se demuestra la existencia de una sustancia P.A.S. positiva al momento de iniciar la meiosis, que sólo actúa en distancias menores de 2 mm. En otros estudios se han visto interconexiones entre el cordón cortical y la rete ovarii durante el desarrollo. Byskov da una hipótesis más, propone al tejido mesonéfrico como iniciador de la meiosis, porque cerca de éste aparecen los primeros ovocitos y folículos; se apoya en experimentos hechos con células germinales de ovario fetal indiferenciado de ratón, las que sólo alcanzan la meiosis si se transplantan con tejido mesonéfrico o con células germinales que ya han entrado en meiosis; estos resultados no se obtienen en ratones de 13-17 días ni con conejos de 15 días de edad (Byskov 1984). Sin embargo, se necesitan más evidencias sobre esto y en la actualidad, se desconoce si la meiosis se inicia por contacto de células somáticas con células germinales, por sustancias humorales, por previa programación genética o si todos los factores son importantes.

En aves la ovogénesis comienza durante el desarrollo embrionario y concluye para la eclosión. Su inicio está relacionado con los periodos de incubación necesarios para las diferentes especies;

la meiosis se inicia antes si el período de incubación es más corto. Al igual que en mamíferos, la aparición de los ovocitos es en la parte central de la corteza. En el embrión de pollo la ovogénesis se inicia entre los 13-14 días de incubación y la máxima conversión de ovogonias a ovocitos ocurre alrededor del día 17 de desarrollo embrionario, estando terminada para el día 20 cuando el pollo eclosiona, (Gondos, 1978).

Experimentos hechos por Erickson (1974) sugieren que la diferenciación de las células germinales en aves está controlada por las células somáticas. Este investigador trabajando con piezas de corteza aislada de pollo de 6 días de incubación observó que las germinales se desarrollaban normalmente hasta cigoteno, al igual que en las piezas de gónada completa, proponiendo que el control de la diferenciación de las células germinales del embrión de pollo radica en la corteza del ovario y que después del 6o. día de incubación la misma no depende de estrógenos medulares ni de las hormonas pituitarias. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con reserva ya que el medio de cultivo contenía 10% de suero bovino fetal y de esta manera se suplementa al tejido con hormonas.

#### FOLICULOGÉNESIS

Cuando el ovocito ha llegado a diploteno, es rodeado por células de la granulosa y encerrado con una lámina basal haciéndolo independiente del medio ambiente circundante, a este proceso se le llama foliculogénesis. Sobre el origen de las células de la granulosa se han propuesto diferentes teorías, algunos autores

proponen que derivan del mesonefros porque las primeras presuntas células granulosa son morfológicamente muy parecidas a las células mesonéfricas. En estudios hechos "in vitro" con ovario fetal de ratón se encontró que no hay formación de folículos si se quita el tejido mesonéfrico antes que sus células hayan invadido el ovario (Byskov, 1984).

Sin embargo, es más aceptado que el epitelio superficial contribuye a la formación de los folículos. Su importancia en este proceso depende de la especie; en humano, perro, gato, mono y conejo tiene gran actividad proliferativa durante la foliculogénesis.

En el feto humano de 12-20 semanas de gestación, el epitelio superficial tiene importante actividad celular y continúa proveyendo células de la granulosa hasta el octavo mes de vida, pero sigue en actividad si quedaron ovocitos desnudos después del nacimiento o cerca de él (Gondos, 1978).

En el perro los folículos se forman dentro o cerca de cordones formados por el epitelio superficial que han penetrado a el ovario; se propone que estas células llegan a diferenciarse en células de la granulosa (Byskov, 1984). También se han observado ovocitos y folículos degenerativos en la superficie de los cordones y tubos, podría ser que el epitelio superficial interviniera además en la remoción de estructuras degenerativas. La contribución del epitelio superficial a la foliculogénesis es después de que esta ya se ha iniciado y no es esencial para que se dispare, (Byskov, 1984).

Los primeros folículos aparecen en el interior de la corteza, progresando hacia la zona externa y hasta que todos los ovocitos se encuentren formando parte de folículos. No se sabe las causas que provocan la foliulogénesis, se ha visto que en fetos humanos anencéfalos y en fetos de mono hipofisectomizados el crecimiento foliular está retrasado, al llegar a término sólo tiene la tercera parte del número total de ovocitos y la mitad degenera. La reducción en el número de folículos se puede asociar a la ausencia de células germinales ya que para la formación de folículos es indispensable que haya ovocitos (Peters, 1978). Sin embargo, no se descartan otros mecanismos y la explicación puede ser más compleja.

#### VITELÓGENESIS

El proceso que sigue a la foliulogénesis es la acumulación de vitelo en el ovocito, (vitelogénesis) el cual está regulado por 17 beta estradiol. En el vitelo de las aves, anfibios, reptiles, peces e insectos encontramos dos grupos principales de proteínas que son de fácil purificación y caracterización, las fosvitinas y las lipovitelinias. Las fosvitinas tienen alto contenido de serina, la mayoría de sus aminoácidos residuales están fosforilados, tiene relativamente alto contenido de azúcar y una sola metionina. Ambos grupos derivan de un precursor común llamado vitelogenina que se sintetiza en el hígado de todos los animales ponedores de huevo. Se transporta por vía sanguínea hasta el ovario donde se rompe para formar las proteínas del vitelo. Se sabe que en los insectos la vitelogénesis está controlada por la

hormona juvenil y en vertebrados por las hormonas estrogénicas. El estímulo inicial lo da el medio ambiente y puede ser temperatura o duración del período de luz/oscuridad. Luego se transmite vía neuroendocrina hipotálamo - hipófisis - ovario, produciéndose 17 $\beta$ -estradiol. Poco antes de la vitelogenénesis los niveles de estrógeno circulante se incrementan rápidamente, (Tata y col., 1979).

Como ya se había mencionado, la vitelogenina se sintetiza en el hígado, luego se transporta por la sangre al ovario y al ovocito. El ovario tiene una enzima específica que rompe la vitelogenina en fosvitina y lipovitelina; se sabe que el ovocito no sintetiza las proteínas del vitelo sino que estas derivan exclusivamente de la vitelogenina circulante, el ovocito las incorpora por pinocitosis seguida de absorción de la membrana plásmática. Los estudios realizados para detectar la síntesis de vitelogenina después de la administración de estrógenos se han hecho principalmente en *Xenopus*, en general existe un período refractario que antecede a la respuesta a un estímulo hormonal de su tejido blanco cuando se expone por primera vez a la acción de los estrógenos; hay un período refractario relativamente largo antes que el hígado responda a la estimulación y se conoce como inducción primaria. Las técnicas empleadas para la detección de vitelogenina, así como si son estudios hechos "in vivo" o "in vitro" influyen en la medición de la duración del período refractario, en aves esto es más corto que en *Xenopus* y para ambos casos la producción hormonal es reversible si se retira el estímulo primario. En la inducción secundaria cuando se administra una segunda dosis de estrógenos, el período refractario disminuye o prácticamente desaparece y la

síntesis proteica alcanza rápidamente la tasa máxima de producción. Los trabajos "in vitro" permiten afirmar que en la inducción directa de la vitelogenina, el estrógeno es el único inductor y no se requieren otro tipo de esteroides, insulina u hormonas pituitarias. Este fenómeno es parecido al que se da en la síntesis de ovalbumina inducida por estrógeno en el oviducto de pollo. Haciendo la curva de dosis-respuesta a estradiol "in vitro" y probando la potencia de otros esteroides, se ve que los resultados son compatibles con la existencia de un receptor a estradiol similar al encontrado en el oviducto de pollo y otros tejidos blancos de mamíferos. Al exponer a *Xenopus laevis* crónicamente a estradiol se activan los genes encargados de la vitelogénesis, desaparecen prácticamente la albúmina y otras proteínas plásmaticas y son reemplazadas por vitelogenina. Es importante notar que la síntesis de vitelogenina se da en un tipo celular (hepatocitos), y su rompimiento para dar origen a las proteínas finales del vitelo es en otro sitio muy distante del lugar que se produce (ovocito), (Tata y col. 1979).

#### ESTEROIDOGENESIS

Las dos funciones principales del ovario son proporcionar los óvulos para la fecundación y producir las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestágenos). Los estrógenos se forman por la aromatización de los andrógenos en un proceso complejo con tres hidroxilaciones, cada una de las cuales requiere oxígeno y NADPH. El 17-B-Estradiol es el estrógeno principal de origen ovárico, pero en algunas especies la estrona es más importante.

aunque su origen sea extraovárico. Los estrógenos estimulan el desarrollo de los tejidos que intervienen en la reproducción, mejoran el tamaño y número de células incrementando la velocidad de la síntesis de proteína, RNAR, RNAt, RNAm y DNA. (Harper, 1986).

La morfología del ovario izquierdo de las aves es similar al de mamíferos, pero dado que el modo de reproducción es diferente, es de esperarse modificaciones en la estructura y función de ambas clases.

La gallina produce tres tipos de hormonas sexuales, estrógenos, andrógenos y progestágenos que tienen amplias manifestaciones fisiológicas y anatómicas. Por ejemplo, influyen en los caracteres sexuales que distinguen al macho de la hembra; en el *Gallus domesticus* son: el crecimiento de la cresta, deposición de la grasa, amplitud de los huesos pélvicos y más directamente en la reproducción. Además los estrógenos intervienen sobre el crecimiento del oviducto, la síntesis de proteína dentro del oviducto y el movimiento del huevo. (Gilbert, 1984).

En el pollo la gónada se diferencia alrededor del 6.5 día de desarrollo embrionario (d. e.), se ha demostrado que produce  $17\beta$ -estradiol y estrona a esta edad (Weninger y Zeis, 1971). Por inmunofluorescencia (Woods y Erton, 1978) la detectaron a partir del 3.5 días d.e. en el blastema gonadal de ambos sexos. Más adelante la síntesis de las hormonas sexuales es preferencial según la diferenciación sexual del embrión, en el testículo hay principalmente testosterona y dihidrotestosterona, en ovario izquierdo predomina la estrona y el  $17\beta$ -estradiol, (Woods y

Erton, 1978). Trabajando con pollos recién nacidos, Pedernera y col. (1988), disociaron enzimáticamente el ovario e identificaron varios tipos celulares: ovocitos, células con inclusiones de lípidos y a células sin ellas, en los primeros 20 minutos se disocia totalmente la corteza del ovario y 10 minutos después la medula, de la suspensión celular obtenida se separan 6 fracciones por gradiente de densidad en metrizamida; en la fracción en que se encuentran células esteroideogénicas típicas con reacción positiva a  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa,  $5^{\alpha}$ - $3^{\alpha}$ -isomerasa ( $5^{\alpha}$ - $3^{\alpha}$ -HSD) se secreta testosterona pero no estradiol. En la fracción que contenía predominantemente células indiferenciadas se cuantifica la más alta secreción de estradiol y muy baja secreción de testosterona. En la fracción de la corteza no se detecta secreción importante de hormonas esteroideas. Se sugiere la existencia de dos subpoblaciones celulares en el ovario inmaduro de pollo, las esteroideogénicas típicas encargadas de la secreción de andrógenos y las células poco diferenciadas que secretan estradiol. Gaili y Wasserman (1973) usando progesterona como precursor en gónadas de embrión de pollo entre los 7 y 10 días d. e. encontraron que el principal metabolito de testículo y ovario derecho es la  $20\beta$ -dihidroprogesterona ( $20\beta$ -DHP), además a los 10 días en ovario derecho se secretan  $17\beta$ -estradiol y testosterona.

En ovario izquierdo a los 7 días se detecta  $20\beta$ -DHP y a los 10 días  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, además en testículo se detecta en baja concentración  $20\alpha$ -dihidroprogesterona,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona; en ovario izquierdo se detectan también  $17\beta$ -estradiol y estrona.

Guichard y col. (1977) demostraron la capacidad de las gónadas de embriones de pollo de ambos sexos de 7.5-18.5 d.e. para producir hormonas esteroides si se les proporcionaban los precursores adecuados. La secreción hormonal es preferencial según el sexo del animal. Posteriormente en 1979 estos mismos autores observaron el efecto de  $\Delta^4$ -androstenediona, D.H.A. y pregnenolona en gónadas de 15 a 18 días de d.e. en pollo. La síntesis de estradiol se ve favorecida en gónadas femeninas y por los niveles de  $\Delta^4$ -androstenediona, demostraron que las enzimas encargadas de la esteroidogénesis siguen activas en cultivos de hasta 48 horas. Teng y col. (1982), utilizando embriones de pollo de 15 días encontraron diferencias en la producción hormonal entre ovario izquierdo y ovario derecho y estudiaron el efecto de las gonadotropinas LH y FSH sobre la misma. El ovario derecho crece muy lentamente entre los 8-10 días de d.e., después del día 12 involuciona y para el día 15 es rudimentario; su respuesta a gonadotropinas es más baja, se necesitan cinco veces más cantidades de LH y LH-FSH para producir el mismo efecto que en ovario izquierdo y diez veces más FSH. Ambos ovarios son capaces de producir testosterona y estradiol, además estimulando con LH se obtienen hasta cuatro veces más estradiol y ocho veces más testosterona. Con estos experimentos se demuestra la presencia de receptores hormonales acoplados al sistema adenil-ciclasa y que, el ovario izquierdo es cinco veces más sensible a LH y FSH de mamífero que el ovario derecho, esto podría deberse a diferencias en el número de receptores, aunque no sería el único factor. La producción de andrógenos se incrementa de manera importante con la

administración de LH, y los receptores del ovario del embrión de pollo son más sensibles a LH que a FSH.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ovario es un órgano de gran actividad endocrina, su morfología y fisiología varían durante el ciclo reproductivo de la hembra, dentro de los procesos que se llevan a cabo está la foliculogénesis; la población folicular es dinámica, con la edad sufre cambios importantes acordes con la maduración del animal, tanto en el número de folículos como en la morfología de los mismos. No se han reportado trabajos que estudien cuantitativamente la foliculogénesis en el ovario de la gallina doméstica (*Gallus domesticus*) que empieza a los 7 días post eclosión. El interés de este estudio radica en conocer cuantitativamente los cambios que se dan durante el proceso de la foliculogénesis y tiempo en que se realizan los mismos, ya que su conocimiento permitirá estudiar la manera en que influyen las hormonas en la maduración folicular. Las edades estudiadas fueron 15, 22, 29 y 36 días post eclosión.

## MATERIAL Y METODO

Huevos fertiles de la raza Leghorn (Sas-Cock 1961), provenientes de la granja " La Veracruz " de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U. N. A. M. , fueron incubados a 37.8 °C en incubadora con circulación de aire y humedad controlada. El día 13 de incubación se practicó ovoscopia para seleccionar los embriones viables y con desarrollo normal. los huevos se limpiaron con alcohol al 70% y fueron manejados bajo campana de flujo laminar. Se utilizó el método de cámara falsa que se realiza de la siguiente manera:

- 1.- Con aguja de disección se perfora el cascarón a la altura de la cámara de aire.
- 2.- En la parte media lateral del huevo, se corta un pequeño triángulo de 5mm. por lado con siqueta comercial.
- 3.- Se retira el cascarón cortado con ayuda de la aguja de disección.
- 4.- La porción expuesta de la membrana se humedece con agua destilada estéril, para facilitar la separación de la membrana corioalantoidea. La membrana papirácea se desgarró con cuidado.
- 5.- Con un bulbo de latex se succiona en el orificio de la cámara de aire para que descienda la membrana corioalantoidea.
- 6.- Una vez que el embrión descendió, se retira la membrana papirácea con pinzas de punta fina, teniendo cuidado de no romper algún vaso sanguíneo.
- 7.- Ambos orificios son sellados con cinta adhesiva transparente.

Un promedio de 150 embriones por experimento fueron abiertos con esta técnica, la mitad se emplearon como lote experimental y el resto como testigo que son los que se utilizaron en este estudio. Los pollos se sacrificaron por decapitación los días 15, 22, 29 y 36 después de eclosionados, previa anestesia con éter, disecando por la parte media ventral para extraer el ovario izquierdo que inmediatamente se fijó en solución de Allen 815 por una hora y una hora más en solución de Bouin. Después se lavaron los ovarios con cambios repetidos de alcohol al 70 %, se deshidrataron con cambios de alcohol en concentraciones crecientes, 70, 80, 90, y 96 % de 10 minutos c/u y luego 3 cambios de alcohol absoluto, como aclarante 2 cambios de xilol de 10 min. c/u. La preinclusion de las muestras se hizo en mezcla de parafina - paraplast 1:1 fundida a 56° C; finalmente se incluyeron los ovarios en mezcla de parafina-paraplast con la orientación necesaria para hacer corte seriado de la corteza.

Los cortes se practicaron en un microtomo American Optical; para las edades de 15, 22, y 29 días se realizaron cortes de 7 de espesor para 36 días el grosor del corte fué de 10 . El bloque se corta seriado tomando una muestra cada 40 cortes. Después de rehidratar la muestra de la manera convencional se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina.

#### CLASIFICACION Y CORTES DE FOLICULOS

La clasificación se hizo en base al tamaño del ovocito y grado de desarrollo del folículo según la morfología que presentaban. Las características morfológicas como base de la clasificación se

tomaron de la propuesta por Komarek y Prochazkova en 1967, que contempla cuatro estados foliiculares después de la eclosión. Se contaron y clasificaron todos los foliículos que contenían ovocitos con núcleo bien definido en todo el campo focal de cada corte del ovario. El conteo se practicó con doble ciego en microscopio American Optical a 40X de aumento.

Para obtener el número total de foliículos en cada ovario se sumaron los resultados parciales de todas las preparaciones correspondientes a un mismo ovario y luego se multiplicaron por 40 (se contó un corte de cada 40). Además se les aplicó un factor de corrección para evitar que un mismo foliículo fuera contado más de una vez, este factor cambia para cada tipo de foliículo y se calcula de la siguiente manera: La probabilidad P de que un foliículo con núcleo bien definido aparezca en más de un corte muestreado depende del grosor del corte y del diámetro promedio en micras del núcleo del tipo foliicular que corresponda. La fórmula que se aplica es  $Fc = T/D-T$ . Donde T es el grosor del corte y D diámetro promedio del núcleo. El número de foliículos corregido por diámetro se obtiene multiplicando el número de foliículos obtenidos directamente del corte por el factor de corrección correspondiente. Para 15, 22, y 29 días  $T = 7$  micras, para 36 días  $T = 10$  micras. La tabla 3 muestra los factores de corrección que se emplearon para los diferentes tipos foliiculares. Los diámetros de los ovocitos y sus núcleos así como el del foliículo completo se midieron con ocular milimétrico, para foliículos tipo I y II a 100X de aumento, para los tipo III y IV a 40X.

## RESULTADOS

En las preparaciones del ovario se pueden ver los diversos tipos foliculares en todas las edades aunque su proporción varía con la edad. La clasificación de estos se hizo de la siguiente manera:

Folículos tipo I: son ovocitos pequeños rodeados por una escasa capa de células foliculares planas.

Folículos tipo II: se consideran también como ovocitos pequeños, las células foliculares que los rodean forman un epitelio cúbico bien definido.

Folículos tipo III: son ovocitos de tamaño mediano, que ya han iniciado su crecimiento. Presentan epitelio folicular cilíndrico pseudoestratificado.

Folículos tipo IV: Son ovocitos francamente grandes rodeados por una sola capa de células foliculares cúbicas, en el citoplasma de sus ovocitos podemos observar gránulos de vitelo.

Las edades estudiadas en nuestro laboratorio fueron 15, 22, 29 y 36 días y la clasificación se hizo de F I a F IV como se describe previamente.

La tabla 1 muestra el crecimiento folicular por tipos medio como el diámetro promedio en micras a partir del día 22 post eclosión, se observa que hay un aumento en el tamaño del núcleo del ovocito, del ovocito mismo y del folículo que lo rodea con la edad del animal, aún cuando morfológicamente correspondan a un mismo tipo folicular de nuestra clasificación. Por supuesto que también se observa aumento de tamaño entre los diferentes tipos foliculares dentro de una misma edad.

Los cifras de la cantidad de cada uno de los tipos foliculares se presentan resumidas en la tabla 2.

Los folículos tipo I son la población más abundantes a los 15 días p.e., aunque se ven en todas las edades estudiadas, su número va decayendo con la edad. Expresado como porcentaje del total se observa que del 52 % que hay a los 15 días p.e. bajan a 23 % a los 22 días p.e. y se mantienen alrededor de esta cifra hasta los 29 días p.e., para que a los 36 días p.e. sólo el 4 % de los folículos sean de tipo I. ( Fig. 1 ). La gráfica 1 muestra los cambios de los folículos tipo I con la edad.

Los folículos tipo II se encuentran desde los 15 días p.e. su valor relativo es del 21 %, aumentan para los 22 días p.e. a 36 % y caen en las edades posteriores. ( Fig. 2 ).

Los folículos tipo III van aumentando progresivamente con la edad, 14 y 23 % a los 15 y 22 días p.e. respectivamente, a los 29 días p.e. son ya el 27 % de la población folicular y se incrementan a 35 % a los 36 días p.e. ( Fig. 3 ).

Los folículos tipo IV, aparecen alrededor del día 22 p.e. siendo su número absoluto de 293 folículos por ovario, en 29 y 36 días hay 262 y 177 respectivamente, valores que representan porcentajes muy bajos sobre el total de los folículos.

Los folículos atrésicos se observan en todas las edades, a los 15 días su número es 3050, para 22 días 2020, 1063 para 29 días y en 36 se observan sólo 320 imágenes atrésicas. ( Tabla 2 ).

La población total de folículos disminuye en números absolutos, va decayendo gradualmente entre 15-29 días. Para la edad de 36 días p.e., baja más rápidamente y tenemos menos de la mitad de folículos totales que se encuentran en 29 días. Analizando el periodo entre 15 y 36 días el número de folículos pasa de 60507 a

22719 es decir que sólo queda el 37% de folículos que tenemos a los 15 días.

Desglosando por tipo, los cambios que sufre la población folicular en el ovario de la gallina en estas edades, encontramos que los folículos tipo I a partir de los 15 días p.e. son los que se pierden de manera más importante entre los 15-22 días p.e. bajan de 35375 a 15899 y entre 29-36 días p.e. de 14018 a 2508.

Los folículos tipo II, aumentan de 15-22 días para luego decaer entre 29-36 días, bajan de 27229 a 13770. Para los folículos tipo III, la tendencia es más bien a aumentar la población, aunque en números absolutos los incrementos son bajos, pasan de 2389 a 3928 entre 15 y 22 días p.e. y luego de 4649 a 6002 de 29 a 36 días p.e..

La figura 4 resume el comportamiento de la población total de folículos así como el de cada tipo folicular por separado entre los 15 y 36 días p.e., la disminución en la población total es gradual pero entre 29 y 36 días decae casi a la mitad, la caída de los folículos tipo I se da mientras se observa un aumento en los folículos tipo II y III.

## DISCUSION

El factor de corrección se emplea como un intento para reducir el error que se introduce en el conteo de los folículos, es un ajuste matemático que como se explicó en su deducción, se basa en la probabilidad que tiene el núcleo del ovocito de aparecer nítidamente en dos cortes. Esto obviamente depende de su diámetro y del espesor del corte y son los parámetros que usualmente se toman en cuenta para este tipo de corrección, (Floderus, 1944), por lo que consideramos que los valores informados en este estudio se ajustan a los valores reales.

En esta etapa de maduración del ovario, se observa el pasaje de folículos primordiales hacia formas más maduras conforme avanza la edad del animal. Los folículos tipo I se reducen notablemente a los 36 días, esta población sigue una función de decaimiento, cambiando rápidamente hacia el siguiente tipo folicular; y en tres semanas se reducen al 3.7% la población inicial. Los folículos de tipo II después de los 22 días tienen un comportamiento parecido al de los de tipo I, ya que el valor máximo lo presentan a los 22 días para luego decaer aunque no tan marcadamente como lo hacen los de tipo I. Los folículos tipo III son aparentemente la población más estable en el ovario por lo menos en esta etapa, van aumentando gradualmente sin hacer caídas drásticas; mientras que la formación de los folículos tipo IV empieza a los 22 días p.e. y se encuentran también en 29 y 36 días pero su número es muy bajo y no podemos tomar en cuenta una tendencia definida en base a estas cifras.

De los resultados obtenidos se desprende que el número de folículos cambia entre los 15 y 36 días posteriores a la eclosión,

los folículos de tipo I son los más abundantes a los 15 días, y disminuyen a los 22 días en casi la misma proporción en que aumentan los de tipo II. A partir de los 29 días los de tipo II aumentan en número, aunque en una proporción menor a la que correspondería por la disminución del número de los folículos de tipo I y II. Este resultado se puede explicar por la atresia folicular que se da en todas las edades pero sobre todo entre 22 y 36 días. Sin embargo, las imágenes de atresia que se observaron en las preparaciones histológicas son muy pocas comparadas con el número de folículos que se pierden. Creemos que esto se explica porque las células atrésicas se eliminan rápidamente y como lo proponen Beaumont y Mandi (1962), esto sería dentro de las primeras 24 horas posteriores a su degeneración. Nosotros pensamos que se pierden por vía peritoneal ya que en el ovario se pueden ver imágenes que sugieren la salida de los folículos atrésicos por esta vía.

Hughes (1963), utilizando la misma técnica de obtención de muestras y una técnica de conteo similar, calculó el número de células germinales que se encuentran en el ovario del embrión de pollo de 15 días hasta el nacimiento en F1 de híbridos de White Leghorn-Rhode Island Red. Las cifras que obtuvo en los animales recién nacidos son de un orden de magnitud mayor comparado con el número total de folículos obtenidos en este estudio, lo que nos hace suponer que el fenómeno de atresia es muy importante entre el nacimiento y los 15 días post eclosión. En base a nuestros hallazgos y los datos de Hughes podemos decir que desde los 17 días de desarrollo embrionario y los 36 días post natales el

número de las células germinales se reduce en un 90% este fenómeno es similar al encontrado en mamíferos (Arai, 1920 ; Beaumont y Mandl 1962). Arai, (1920) encontró en rata albina que existen 35000 ovulos al nacimiento y a los 31 meses de edad solo quedan 2000. Beaumont y Mandl (1962) estudiaron también en la rata los cambios que a partir del 14 día p.c. (post coito) hasta el día 2 post parto (p.p.), observaron que hay gran pérdida de ovocitos desde antes del nacimiento asociada probablemente a las divisiones atróficas que se suceden, luego hay degeneración celular en profase meiótica principalmente en paquíteno. A los 14.5 días p.c. encuentra 12000 c.g., aumentan a 71000 a los 17.5 días p.c. que es el pico máximo de c.g., luego disminuyen hasta 27263 c.g. a los 2 días p.p.

Las imágenes histológicas en las diferentes edades corresponden a las descritas por Komárek (1970), y los diámetros folículos están dentro del mismo rango de los que reportan para las edades de 22 y 29 días post-eclosion.

En nuestras mediciones, se observa que existe un marcado crecimiento en los folículos si consideramos el volumen de los mismos. Comparando los distintos tipos folículos de una misma edad, vemos que se produce un crecimiento del ovocito; por ejemplo, si comparamos un ovario de 30 días, el folículo tipo III tiene un ovocito 6.8 veces mayor que el ovocito del folículo tipo II, y el folículo tipo IV tiene un ovocito que es 145 veces más grande que el del folículo tipo II. Esto nos lleva a concluir que el crecimiento del folículo este dado principalmente por el aumento del volumen del ovocito, es decir que hay una marcada

acumulación de vitelo en estos tipos de folículos y que es más importante a partir de los 22 días p.v.

Por otra parte, aun dentro de un mismo tipo de folículos hay un crecimiento conforme avanza la edad del animal, por ejemplo el folículo de tipo III en el ovario de 36 días es veces mayor que el mismo tipo de folículo a los 15 días. Ambos fenómenos se pueden explicar por una acumulación de vitelo en el citoplasma del ovocito, esto nos sugiere que hay actividad vitelogénica a nivel hepático durante el crecimiento de estas aves. La vitelogénesis requiere de la presencia de niveles adecuados de estrógenos circulantes, esto coincide con la descripción de una actividad esteroidogénica importante en el ovario de las aves en la etapa inmediata a la eclosión. (González del Pliego y col. 1988, Palumbo, Y. 1986).

Todos estos datos nos llevan a comprender que el ovario de las pollitas durante el primer mes de vida post-eclosión no se encuentra en estado de quiescencia, sino en una fase de activo crecimiento y formación de folículos. Este conocimiento es importante porque las patologías intercurrentes ya sean infecciones o deficiencias nutricionales, pueden ocasionar una lesión y dejar secuelas en el animal adulto.

## CONCLUSIONES

En el ovario de la gallina se observa una diferenciación de folículos durante los 36 días siguientes a la eclosión. Los folículos tipo I, son abundantes en las primeras edades, mientras que los folículos de tipo II y III son las poblaciones más importantes entre los 22 y 36 días p.e. La formación de tipos foliculares más maduros a partir de los folículos de tipo I demuestra que la foliculogénesis es muy activa en esta etapa del desarrollo del ovario.

Por medio de la atresia se elimina más de la mitad de la población folicular entre los 15-36 días p.e., en el ovario de las pollitas la eliminación de las células atrésicas es muy rápida y la dinámica del proceso es parecida a la que se observa en los mamíferos.

En la etapa inmediata a la eclosión vitelogénesis, porque el crecimiento observado en el volumen del ovocito se debe a la acumulación de vitelo, ésta es más notable después de los 22 días p.e.

TABLE I

DIAMETROS EN MICRAS DEL FOLICULO, DEL OVOCITO Y SU NUCLEO EN FOLICULOS OVARIOS  
 CLASIFICADOS POR TIPO EN LAS DIFERENTES EDADES DE LAS AVES ESTUDIADAS

EDAD \ TIPO	II			III			IV		
	FOLICULO	OVOCITO	NUCLEO	FOLICULO	OVOCITO	NUCLEO	FOLICULO	OVOCITO	NUCLEO
22	41.92 ± 3.67	27.95 ± 2.99	14.92 ± .72	79.83 ± 1.36	55.57 ± 1.31	24.45 ± 1.41	---	---	---
29	45.02 ± 3.94	31.19 ± 3.48	16.89 ± .83	82.66 ± 4.10	62.14 ± 3.55	27.55 ± 1.44	174.2 ± 20.89	150.63 ± 21.58	53.76 ± 7.81
36	51.58 ± 1.24	37.57 ± 1.79	21.14 ± 1.0	91.81 ± .16	69.33 ± .92	32.29 ± 1.42	221.86 ± 21.25	195.66 ± 30.80	71.5 ± 7.9

NUMERO DE FOLICULOS CLASIFICADOS POR TIPO EN LAS DIFERENTES EDADES

E D A D		T	I	P	O	D	E	F	O	I	C	U	L	O	
D I A S		I	II	III	IV	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	T O T A L							
15		35375	19810	2389		3050									60502
	±	18527	± 7345	± 753		± 1556				±					± 26350
22		15899	35508	3928	293	1543	487								55458
	±	10695	± 9286	± 1339	± 199	± 740	± 548			±				±	26970
29		14018	27229	4949	381	858	205								47341
	±	10381	± 11814	± 1942	± 262	± 601	± 108			±				±	21375
36		2508	13770	6002	177	130	190								22719
	±	2214	± 8651	± 2106	± 147	± 161	± 154			±				±	15547

TABLA III

FACTOR DE CORRECCION EMPLEADO EN LOS DIFERENTES TIPOS FOLICULARES

E D A D	T I P O F O L I C U L A R		
	II	III	IV
22	0.84	0.44	0.17
29	0.71	0.34	0.16
36	0.62	0.25	0.11

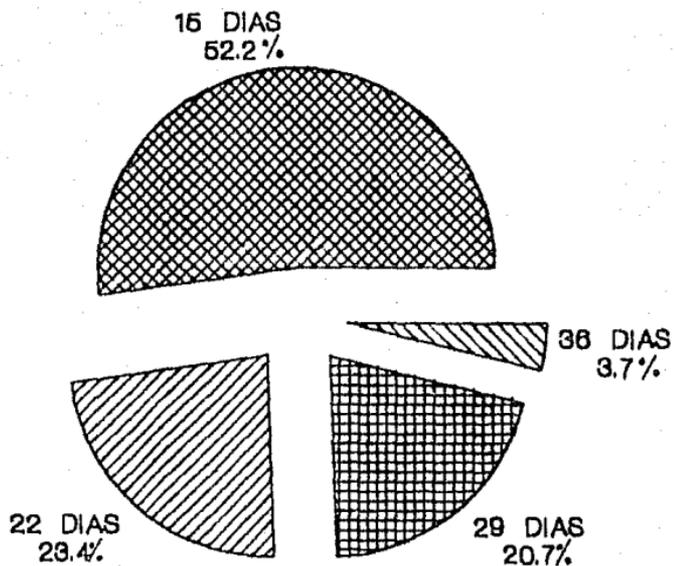


Fig. 1. Muestra el porcentaje de folículos tipo I con respecto a la población total que se encuentran en las diferentes edades estudiadas. Este tipo folicular va disminuyendo con la edad.

TIPO II

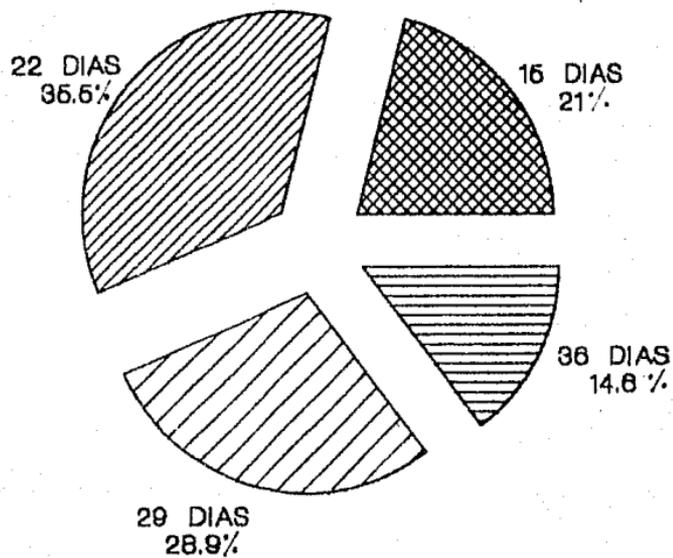


Fig. 9. Los 90 feridos Tipo II se encuentran en todas las edades; aumentan entre 16-22 días p.e., luego disminuyen después del día 29 p.e.

Fig. 3

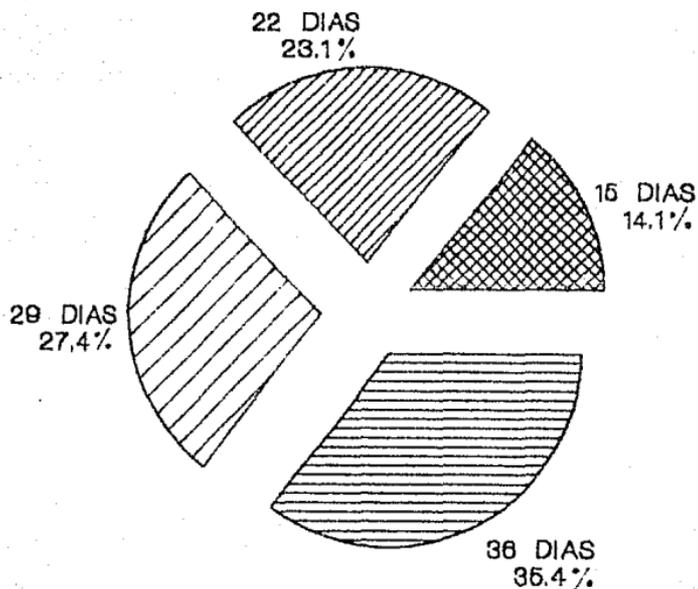


Fig. 3. La población de folículos tipo III aumenta con la edad y es la más importante a los 36 días p.e.

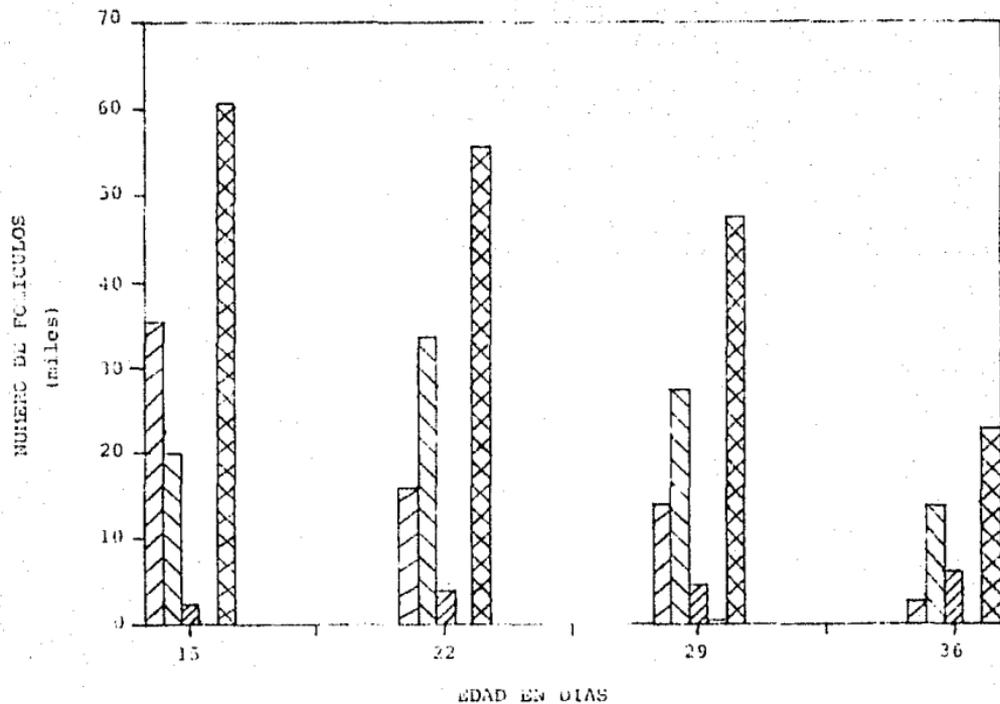


Gráfico No. 4. Muestra el comportamiento de la población folicular y separada por tipos de folículos. Hay decaimiento de la población total y de los folículos de tipo I, los tipos II y III permanecen con poco cambio.

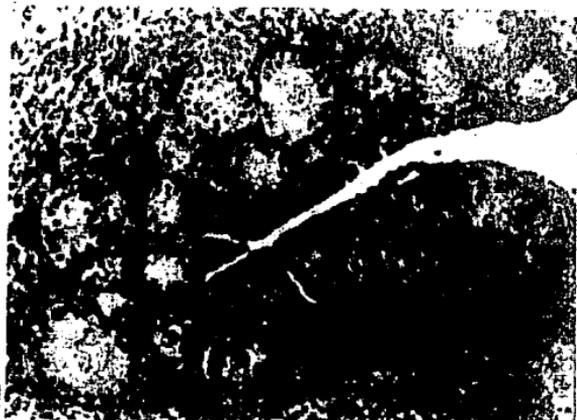
Tipo I  Tipo II  Tipo III  Totales 



Ovario de Polla de 15 días p.e. con folículos de tipo I y II



Folículos tipo II y III en ovario de pollo 22 días p.e.



Folículos de tipo II y III en ovario de pollo de 29 días.

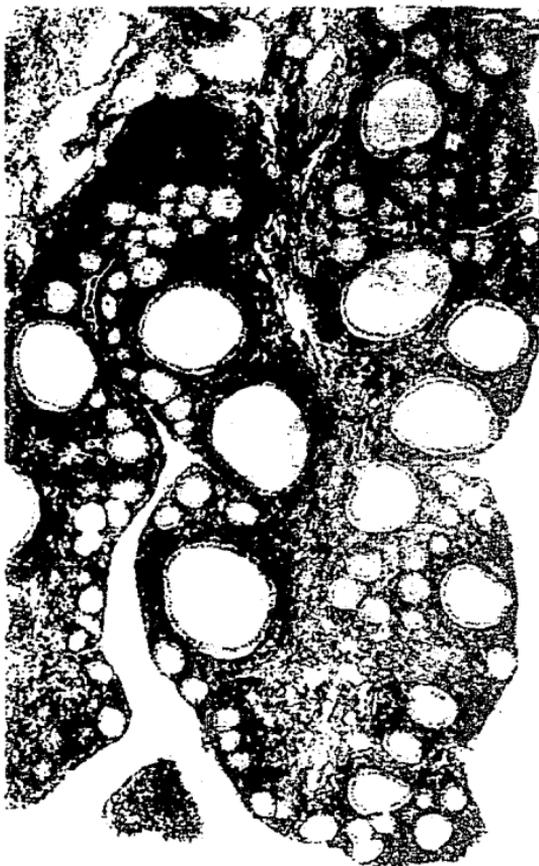


Folículo de tipo IV en ovario de pollas de 36 días p.e.

Foliculos tipo I, II y III en ovario de polilla de 22 días p.u.



Ovario de molilla de 36 dias p.c. com folículos de tipo IV



## BIBLIOGRAFIA

- 1 Arai, H., On the postnatal development of the ovary (albino rat) with special reference to the number of ova., *Am. J. Anat.*, 27 (1920) pp. 405-462.
- 2 Beaumont, H. and Mandl, A.M., A quantitative and cytological study of oogenesis and oocytes in the foetal and neonatal rat., *Proc. R. Soc. London Ser. B* 155 (1962) pp. 557-579.
- 3 Brodie, A.M.H., The Ovary. In G.B. Serra (ed.), *Comprehensive Endocrinology*, Raven Press, New York, 1983, pp. 1-17.
- 4 Byskov, A.G., Differentiation of mammalian embryonic gonad, *Physiological Reviews*, 66-1 (1986) pp. 71-117.
- 5 Erickson, G.F., The control of the differentiation of female embryonic germ cells in the bird. *Development Biology*, 36 (1974) pp. 113-129.
- 6 Floderus, S., Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse., *Acta Patol. Microbiol. Scand.*, 53 (1944) pp. 1-276.
- 7 Galli, F.E. and Wassermann, G.F., Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick

- embryos., *Gen.Comp.Endocrinol.*, 21 (1973) pp. 77-83.
- 8 Gilbert, A.B., The Ovary. In (ed.), *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, Academic Press, New York, 1971, pp. 1163-1208.
- 9 Gondos, B., Oogonia and Oocytes in Mammals. In R.E. Jones (ed.), *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*, Plenum Press, New York, 1978, pp. 83-120.
- 10 Gonzalez del Pliego, M., Gonzalez Moran, G. and Pedernera, E., Ultraestructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin., *Cell Tissue Res*, 253 (1988) pp. 665-670.
- 11 Gonzalez Moran, G., Gonzalez del Pliego, M. and Pedernera, E., Morphological Changes in the Ovary of newly Hatched Chickens Treated with Chorionic Gonadotropin during Embryonic Development., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 59 (1985) pp. 162-167.
- 12 Granner, D.K., Accion de las Hormonas. In (ed.), *Bioquimica de Harper, El Manual Moderno.*, Mexico, D. F., 1986, pp. 513-523.
- 13 Griffin, H.D., Perry, S.M. and Gilbert, A.B., Yolk Formation. In B.M. Freeman (ed.), *Physiology and*

Biochemistry of the Domestic Fowl., Academic Press,  
New York, 1984, pp. 346-373.

- 14 Guichard, A., Cedard, L. and Haffen, K., Aspect  
comparatif de la synthese de steroides sexuel par  
les gonades embryonnaires de Poulet a differents  
stades du developpement (etude en culture  
organotypique a partir de precursors radioactifs),  
Gen. Comp. Endocrinol., 20 (1973) pp. 16-28.
- 15 Guenard, A., Cedard, L., Mignot, T.N.-M., Scheib,  
D. and Haffen, K., Radioimmunoassay of Steroids  
Produced by Chick Embryo Gonads Cultured in the  
Presence of Some Exogenous Steroid Precursors, Gen.  
Comp. Endocrinol., 39 (1979) pp. 9-19.
- 16 Guichard, A., Scheib, D., Haffen, K. and Cedard, L.,  
Radioimmunoassay of steroid hormones produced by  
embryonic chick gonads during organ culture, J.  
Steroid. Biochem., 8 (1977) pp. 599-602.
- 17 Hodges, R.D., The Reproductive System. In (ed.),  
The Histology of the Fowl, Academic Press, New York,  
1974, pp. 300-417.
- 18 Huang, E.S. and Nalbandov, A.V., Synthesis of sex  
Steroids by Cellular Components of chicken Follicles,  
Biol.Reprod., 20 (1979) pp. 442-453.

ESTA TESIS NO DEBE  
SER

- 19 Hughes, G.C., The Population of Germ Cells in the Developing Female Chick., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 11 - 3 (1963) pp. 513-536.
- 20 Komarek, V. and Prochaskova, E., Growth and differentiation of the ovarian follicles in the postnatal development of the chicken, *Acta Vet. Brno.*, 39 (1970) pp. 11-16.
- 21 Peters, H., Folliculogenesis in Mammals. In R.E. Jones (ed.), *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*, Plenum Press, New York, 1978, pp. 121-144.
- 22 Reyss-Brion, M., Guichard, A., Mignot, T.H. and Scheib, D., Capacites Hormonales Precoces et Differentiation des Gonades de Caille, *Archiv. Anat. micr. Morphol. exper.*, 74 (1985) pp. 91-95.
- 23 Tanabe, Y., Saito, N. and Nakamura, T., Ontogenetic Steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*)., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63 (1986) pp. 456-463.
- 24 Tata, J.R. and Smith, D.F., Vitellogenesis: A Verstile Model for Hormonal Regulation of Gene Expression, *Recent Progress in Hormone Research.*, 35 (1979) pp. 47-95.

- 25 Teng, C.T., Differential Response of Growing and Regressing Chicken Ovaries to Gonadotropic Hormones, Gen.Comp., Endocrinol., 48 (1982) pp. 325-332.
- 26 Wells, J.W. and Gilbert, A.B., Steroid Hormone Production by the Ovary. In B.M. Freeman (ed.), Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Academic Press, New York and London, 1984, pp. 323-342.
- 27 Woods, E.J. and Erton, L.H., The Sintesis of Estrogens in the Gonads of the Chick Embryo., Gen. Comp. Endocrinol., 36 (1978) pp. 360-370.