167
2ej-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ESTUDIO CITOLÓGICO DE LAS CÉLULAS GERMINALES DEL OVARIO DE POLLO RECIÉN NACIDO TRATADO CON LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE.

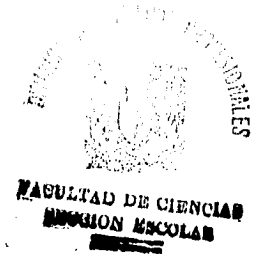
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

TORRES VÁZQUEZ LUZ MARÍA



MEXICO.D.F. SEPTIEMBRE DE 1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

VNIVERSIDAD NACIONAL
AVPNOMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
ESTUDIO CITOLOGICO DE LAS CELULAS GERMINALES DEL OVARIO DE POLLO RECIEN NACIDO TRATADO CON LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE.

realizado por LUZ MARIA TORRES VAZQUEZ

con número de cuenta 7537817-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA..

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dra. MARIA GENOVEVA GONZALEZ MORAN
Director de Tesis
Propietario

M. en C. SAUL CANO COLIN
Propietario

Dra. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES
Propietario

M. en C. SILVIA DEVARS RAMOS
Suplente

M. en C. MARIA TERESA BENITEZ RODRIGUEZ
Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, U.NA.M., BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MA.GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN.

A MIS PADRES OFELIA Y CANDELARIO:

Les agradezco por su comprensión y apoyo incondicional para salir adelante y les dedico esta tesis que es uno de mis mayores anhelos.

A MIS HERMANOS

David, Rosa, Guille, Bety, Alicia y Martín por su cariño.

A MI ESPOSO MARIO ESPINA GÓMEZ:

Por su gran confianza y comprensión, reflejo del amor que siempre me ha demostrado. Tan significativo para mi en todo momento que ha sido la base y el aliciente para salir adelante para lograr este propósito y sobre todo por llenar mi vida de ilusiones.

CON CARIÑO

A mi hijo Hugo O. por el motivo de superación.

AGRADEZCO A:

La Dra. Genoveva González Moran por darme la oportunidad de realizar esta tesis en el laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, por su paciencia, por el esfuerzo y tiempo que dedico a la asesoría de este trabajo, por su apoyo moral que me ha brindado en todo momento, sobre todo por su amistad y los gratos momentos compartidos.

AL HONORABLE JURADO:

- *Dra. Ma. Genoveva González Moran*
- *M. en C. Saúl Cano Colín*
- *Dra. Marcela Aguilar Morales*
- *M. en C. Ma. Teresa Benitez Rodríguez*

Por su revisiòn, comentarios, y valiosas opiniones a este trabajo.

- *A mis compañeros del laboratorio de Biología de la Reproducción Animal por su ayuda brindada.*

AL HONORABLE JURADO:

- *Dra. Ma. Genoveva González Moran*
- *M. en C. Saúl Cano Colín*
- *Dra. Marcela Aguilar Morales*
- *M. en C. Ma. Teresa Benitez Rodriguez*

Por su revisiòn, comentarios, y valiosas opiniones a este trabajo.

- *A mis compañeros del laboratorio de Biología de la Reproducción Animal por su ayuda brindada.*

INDICE

		página
Resumen		1
I.-	INTRODUCCION.	
1.1.-	Desarrollo del ovario en aves.	3
1.2.-	Migración de las células germinales primordiales.	9
1.3.-	Morfología de las células germinales primordiales, ovogonias y ovocitos.	13
1.4.-	Ovogénesis.	16
1.5.-	Control Hormonal Eje Hipotálamo-Hipófisis Gonada.	19
II.-	ANTECEDENTES	25
III.-	HIPOTESIS DE TRABAJO	29
IV.-	OBJETIVOS DEL TRABAJO	30
V.-	MATERIALES Y METODOS	31
VI.-	RESULTADOS	35
VII.-	DISCUSION	38
VIII.-	CONCLUSIONES	43
IX.-	APENDICE	44
X.-	BIBLIOGRAFIA CITADA	46

RESUMEN

En aves, la ovogénesis se inicia durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y se completa en el momento del nacimiento. Se propone que las hormonas gonadotrópicas son esenciales para la diferenciación, morfología y función de las gonadas embrionarias.

Los trabajos sobre la ovogénesis en aves son escasos y existe mucha controversia, por lo que nos propusimos estudiar si la hormona Folículo-Estimulante afecta la división ovogonial y/o la profase meiótica en ovocitos.

Para realizar este trabajo se utilizaron embriones de pollo (White-leghorn), los cuales se dividieron en tres grupos:El grupo I se trató con 0.9% NaCl (Control), el grupo II con 1μg de FSH y el grupo III con 40 μg de FSH. Las dosis de hormonas se aplicaron sobre la membrana coriolantoidea en los días 13, 15 y 17 de incubación. A las 24 hrs. después de la eclosión se sacrificaron los pollitos, disecando los ovarios

izquierdos, disociándolos por agitación y digestión enzimática. Se siguió el procedimiento para realizar las preparaciones de Squash. Se contó el número de ovogonias y ovocitos en sus distintas fases de la profase meiótica por Ovario.Los resultados mostraron que los ovarios de los animales tratados con las diferentes dosis de FSH presentaron un mayor porcentaje de ovogonias que de ovocitos, a diferencia de los controles, en los que el mayor porcentaje es de ovocitos.

Concluimos que la FSH propicia un microambiente adecuado para la proliferación ovogonial y el retraso del inicio de la profase meiótica.

I.- INTRODUCCION

1.1. DESARROLLO DEL OVARIO EN AVES.

En la mayoría de las especies aviarias sólo el ovario y el oviducto izquierdo son funcionales. El ovario derecho crece en los primeros estadios del desarrollo y hacia los días 9 a 11 sufre regresión y en el día 15 deja de ser funcional presentando un aspecto rudimentario, mientras que el ovario izquierdo continúa su diferenciación hasta constituir un ovario funcional TENG y TENG, (1977).

Una excepción se presenta en algunas aves de rapiña en las cuales funcionan ambos ovarios con sus correspondientes oviductos COLE Y CUPPS, (1959) Y DE ALBA, (1985).

El desarrollo del ovario se inicia desde el primer día de incubación, ya en las primeras horas se observan las células germinales primordiales (C.G.P.) que se originan en el endodermo y pared vitelina durante el estado de blástula RUIZ, (1988).

Estas se agrupan en el disco germinativo o primordio gónadal que se encuentra localizado en el mesodermo esplácnico dorsal, a ambos lados del mesenterio dorsal, donde aparece el epitelio célomico más denso.A partir de éste las C.G.P. migran hacia la región de las futuras gónadas. Durante el segundo día comienzan a llegar al mesenterio dorsal y crestas germinales, saliendose de los vasos sanguíneos migrando por movimientos ameboides hacia la futura gónada HOUILLON,(1977).Estos movimientos los realizan por la atracción ejercida por sustancias quimiotácticas liberadas por el epitelio peritoneal de la cresta gonadal HOUILLON.(1977) Y CRAWFORD,(1990).En los dias tercero y cuarto de desarrollo embrionario, ya se observa los primordios de las gónadas, las cuales están construidas de un epitelio germinal o corteza que se origina a partir del epitelio celómico y una médula originada del blastema mesonefritico COLE Y CUPPS. (1959) Y TIENHOVEN, (1983) Y COLE Y CUPPS. (1989)

En ambas gónadas la distribución de las C.G.P. es uniforme, posteriormente esta distribución empieza a ser claramente asimétrica, observándose una mayor colonización en la gónada izquierda con respecto a la derecha

Entonces presenta una migración activa de las células germinales desde la gónada derecha a la izquierda. GILBERT, (1969 y 1971), AUSTIN, (1972), JONES, (1978) y CRAWFORD, (1990).

Al séptimo día de incubación se forman los cordones sexuales primarios que dan lugar a la médula y a las células intersticiales medulares. Entre el octavo y onceavo día de desarrollo embrionario el epitelio germinal prolifera y forma la corteza y los cordones sexuales secundarios, posteriormente se forman las ovogonias o espermatogonias.

Las ovogonias empiezan una activa división mitótica que dura hasta el nacimiento, dando origen a los ovocitos primarios. También hay formación de la segunda túnica albuginea, separando el epitelio gonadal o corteza de la médula del ovario. La primera capa o túnica albugínea entra en regresión formándose el ovario inmaduro.

El ovario izquierdo inmaduro es un órgano de color amarillento, oval y aplanado, situado en la cavidad del cuerpo, en posición ventral a la aorta y posterior a la vena cava y en posición craneal al riñón. Está formado por una corteza que contiene a las células germinales (ovogonias y ovocitos) y una médula altamente vascularizada que contiene tejido conectivo, nervioso, músculo liso y células con actividad

esteroidogénica y un sistema de conductos denominados lacunares CALLEBAUT, (1979). separados por una túnica que es una capa de tejido denso. Durante los primeros 5 días después de la eclosión la gónada mantiene su peso pero aumenta su tamaño.

Las células prefoliculares que derivan del epitelio celómico se integran a la corteza rompiendo la linea que existía entre el tejido medular y la corteza y se acercan a los ovocitos que se encuentran en la profase meiótica en estado de diplóteno GILBERT, (1971), BYSKOV, (1979), CRAWFORD, (1990).

El epitelio cúbico pseudoestratificado se forma a partir de que las células prefoliculares se extienden y se superponen unas con otras a lo largo de la periferia del ovocito GREENFIEL, (1966), GILBERT, (1971), CALLEBAUT, (1976) y BALINSKY, (1982). El ovario maduro es sexualmente activo (18-20 semanas) formando folículos de distintos tamaños (F1-F5). La maduración folicular incluye también la maduración de los ovocitos, así como la producción de un gran volumen de yema. Este crecimiento de la yema domina el volumen del citoplasma del ovocito, siendo desplazado por ésta a una región de la esfera total DE ALBA, (1985).

En pollos, entre los días 6 y 14 antes de la ovulación, se

da el crecimiento del ovocito. Dos horas antes de la ovulación ocurre la primera división meiótica y la expulsión del primer cuerpo polar. La segunda división de reducción ocurre en el oviducto.

La ovulación en aves es casi siempre nocturna ya que comienza, en el momento que obscurece mientras que el apareamiento es diurno. En estos organismos hay un proceso de almacenamiento de espermatozoides, los cuales después de la inseminación migran hacia el infundíbulo para penetrar en las glándulas uterovaginales, éstas tienen forma de criptas ocasionadas por invaginación del epitelio en la región limítrofe entre el útero y la vagina.

Los espermatozoides ahí alojados después de la inseminación natural o artificial se liberan, de tal manera que una sola inseminación es capaz de garantizar huevos fértiles después de un mes. Al ocurrir la fertilización la yema que acompaña al blastodisco se convierte en blastodermo. La yema se cubre de albúmina, membranas y cascarón saliendo al exterior del huevo.

Bajo condiciones naturales el desarrollo del embrión se lleva a cabo gracias al calor corporal de la gallina. En condiciones artificiales se

obtiene en incubadoras,controlando la humedad y temperatura que debe ser de 37°C COLE Y CUPPS, (1959) Y DE ALBA, (1985).

1.2 MIGRACION DE LAS CELULAS GERMINALES PRIMORDIALES.

Las células germinales primordiales se originan del endodermo del saco vitelino, cerca de la membrana alantoidea que se encuentra en desarrollo. Observaciones de FUJIMOTO y col. (1976) probaron que las células germinales primordiales migran a partir del endodermo y la capa ectodérmica del borde anterior de la zona pelúcida, en un área en forma de media luna WENTWORTH y col.(1989) (Fig.1.A), a esta región se le llama media luna germinal, la cual se forma al finalizar el primer día (24 hrs.) de incubación.

Durante el primer día y medio (33 hrs.) se efectúa la migración a través de los vasos sanguíneos. Las C.G.P. entran a los vasos por diapedesis (Fig.2A), que es un tipo de migración común en los linfocitos y macrófagos. De esta forma las células se deslizan entre las células endoteliales hacía dentro de los pequeños vasos sanguíneos localizados en el mesodermo esplácnico caudal, inmediato a la arteria onfalomesentérica SCOTT, (1988), siendo transportadas por la sangre a

las gónadas en desarrollo (Fig. 2B).

Algunas se agrupan cerca del epitelio de la cresta genital, mientras que otras se introducen en el epitelio gonadal ROMANOFF, (1960).

AUSTIN Y SHORT, (1972) opinan que en las células de las crestas genitales de la pared dorsal se producen enzimas líticas que atrae a las células germinales primordiales. Otros autores opinan que las células germinales primordiales se adhieren a las células de los capilares gonádicos por medio de una molécula de adhesión celular haciendo que las C.G.P. se adhieren a ellas especificamente.

En las aves, llegan más células germinales primordiales a la gónada izquierda que a la derecha la migración es un proceso activo de locomoción celular.

El número de C.G.P. aumenta por división mitótica, de manera que a las 18 hrs. las células del pollo se incrementan de 28,000 al principio de la migración hasta 680,000 a las 120 hrs. en la gónada indiferenciada. Al encontrarse las C.G.P. en el tejido del mesenterio dorsal adyacente al desarrollo de las gónadas y dentro de ellas comienza la división de las C.G.P. Se localizan también en la cara del mesénquima desplazándose por una rama, alrededor de la notocorda del tubo neural.

Las C.G.P. al estarse dividiendo entran en un período de migración definitiva SWARTZ J.W. and DOMM L.V., (1972).

Cuando la gónada se va a diferenciar en ovario, al final de la migración, las C.G.P. permanecen en la corteza. Pero si éstas pasan a la médula (mesénquima) se desarrolla un testículo. La diferenciación gonadal puede modificarse por factores internos como las hormonas y sustancias inductoras no hormonales y factores genéticos. Las aves con dos cromosomas Z están destinadas a ser machos, y las que sólo presentan un cromosoma ZW lo están a hembras. En estas condiciones, los genes deben actuar sobre los sistemas productores de hormonas que, a su vez, determinan el desarrollo de las gónadas y estructuras secundarias. Si algunas C.G.P. se encuentran en posición equivocada pueden empezar a dividirse o presentar cambios meióticos.

En algunos casos degeneran posteriormente. Este fenómeno se presenta en hembras con tratamiento de hormonas gonadotrópicas las que inducen el crecimiento folicular, AUSTIN, (1972) Y SANDOVAL, (1965).

Las C.G.P. se transforman en ovogonias que son células más grandes y tienen una distribución diferente de organelos citoplasmáticos a las

C.G.P. Durante el periodo de división mitótica las ovogonias se transforman en ovocitos, en el momento que entran en la profase de la primera división meiótica.

El número de células germinales primordiales disminuye con el paso del tiempo, lo que ocurre al presentarse la atresia (degeneración)y ovulación

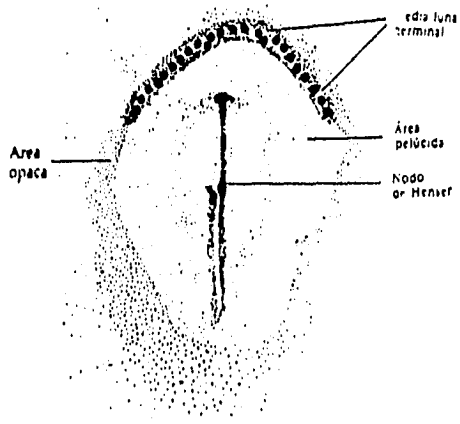


Fig.-1. Esquema que muestra la vista dorsal de un embrión de pollo de un día de desarrollo en estadio de línea primitiva mostrando la región denominada media luna germinal, en la que se encuentran las células germinales. (Tomado de: Scott F.G. - Biología del Desarrollo, p.669, Ed. Omega, Barcelona, 1988).

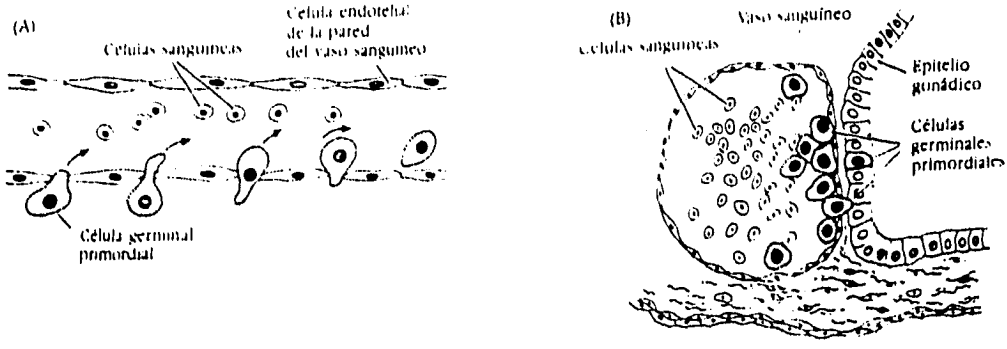


Fig. 2.-Esquema que muestra la diapédesis de las células germinales en los vasos sanguíneos del embrión de pollo. (A) Representación esquemática de la diapédesis, un proceso por el que las C.G.P.s pueden entrar en los vasos sanguíneos vitelinos.
(B) Sección transversal a través de la región gonádica anterior de un embrión de pollo. Varias C.G.P.s del interior del vaso sanguíneo se agrupan cerca del epitelio de la cresta genital. Una C.G.P. está cruzando a través del endotelio del vaso sanguíneo y otra C.G.P.ya está situada en el interior de la gonada primitiva. (Tomado de: Scott F.G. Biología del Desarrollo,p. 669, Ed.Omega, Barcelona, 1988).

1.3 MORFOLOGIA DE LAS CELULAS GERMINALES PRIMORDIALES, OVOGONIAS Y OVOCITOS.

Las C.G.P. presentan un tamaño aproximado de 20µm, contienen un núcleo grande y redondo con un diámetro de 8µm en promedio con nucleolos prominentes FUJIMOTO y col.,(1976).

La cromatina se encuentra arreglada uniformemente y es granular, generalmente tienen poca heterocromatina.

La envoltura nuclear está bien definida, ocasionalmente se pueden observar algunos poros nucleares.

El citoplasma está constituido de un gran número de organelos, incluyendo mitocondrias, pocas elongaciones de retículo endoplasmático rugoso, encontrándose ribosomas libres dando la forma de filas de polisomas y una cantidad considerables de lípidos.

La mitocondrias tienen forma esférica o de bastón. También se ha podido observar la presencia de pseudópodos, en la membrana plasmática los cuales se asocian con los movimientos ameboides. Estos movimientos se observan durante la colonización de las crestas germinales KUWANA y

col., (1987).

El tamaño de las células germinales varia por ejemplo en los humanos, las C.G.P. miden entre 19-20μm de diámetro en promedio; en reptiles tienen un intervalo promedio de 10-18μm, y en embriones de pollo miden entre 14-20μm de diámetro WENTWORTH y col., (1989).

Las células germinales primordiales se identifican por medio de ciertas técnicas histoquímicas como la Azoica y la de PAS, ya que las C.G.P. contienen enzimas específicas y sustancias químicas como la fosfatasa alcalina, glucógeno y estereasas.

Las C.G.P. se multiplican activamente por una serie de divisiones mitóticas y después se transforman en ovogonias.

Las ovogonias presentan un crecimiento celular extraordinario debido al acúmulo de sustancias. Después estas dejan de multiplicarse y entran en fase de premeiosis.

Las ovogonias contienen un núcleo redondo con nucleolos, cromatina granular fina arreglada uniformemente, dándole al núcleo una acuosidad aparente.

Durante la profase mitótica la envoltura nuclear se rompe, sin embargo los fragmentos de las membranas, permanecen para contribuir al

restablecimiento de la envoltura nuclear de las células hijas. El citoplasma esta constituido por mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, y los ribosomas que están uniformemente distribuidos en todo el citoplasma.

El periodo de multiplicación de las ovogónias en las aves termina entre los 4-5 días antes de la eclosión para convertirse en ovocitos.

El ovocito es una célula voluminosa que mide cerca de 40μm de diámetro en promedio. Su crecimiento depende del aumento de los órganelos citoplasmáticos como el núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, centriolos y mitocondrias.

El centrosoma se forma a partir del citoplasma denso que rodea a los centriolos. Los elementos golgianos y las mitocondrias se unen al centrosoma formándose el cuerpo de Balbiani.

El cuerpo de Balbiani desaparece cuando los ovocitos miden 50μm de diámetro, a los cinco días después de la eclosión. Cuando los centriolos se fragmentan en pequeños elementos, el cuerpo de Balbiani hasta entonces observable, desaparece.

1.4 OVOGENESIS

La ovogénesis es el desarrollo y maduración de las células sexuales femeninas, que en aves comienza durante el desarrollo embrionario y se completa durante el momento del nacimiento JONES, (1978)

El desarrollo del ovocito se puede dividir en tres etapas: A) Las C.G.P. se multiplican activamente por divisiones mitóticas. Aquí se les da el nombre de ovogonias, B) Las ovogonias entran a la profase meiótica para formar ovocitos primarios y C) La foliculogénesis que es cuando los ovocitos primarios se rodean de células foliculares, formando el folículo primario. (Fig.3).

Midiendo los niveles de incorporación de timidina tritiada de las C.G.P. se ha demostrado que presentan una tasa alta de división mitótica.

A partir de aquí las células se llamarán ovogonias, las cuales reducen a la mitad su material genético durante la primera división meiótica.

En el día 13 del desarrollo embrionario, las ovogonias se convierten en ovocitos al continuar la profase de la primera división meiótica. Esta etapa se divide en cuatro estadios que comienzan a partir del día 16 de

desarrollo y que son: Leptóteno, Zigóteno, Paquíteno y Diplóteno.

HUGHES, (1963) reporta haber observado en el día 16 de desarrollo ovocitos en estado de leptóteno. En el día 17 de desarrollo embrionario se observan ovocitos en estado de zigóteno en donde los cromosomas se aparean. En el estado de paquíteno, que se presenta en el día 18 del desarrollo embrionario, los cromosomas se observan entrecruzados en determinados sitios formando los llamados quiasmas. El estado de Diplóteno, en pollos tiene una duración larga y se presenta en los días 19 y 20 D'HOLLANDER, (1904), HUGHES, (1963).

El ovocito joven permanece detenido en estado de diplóteno formando después el ovocito primario. El crecimiento del ovocito se efectúa lentamente debido a que se inicia la vitelogénesis. El vitelo es una mezcla de sustancias que se utilizan para la nutrición del embrión. El componente principal del vitelo es la vitelina que es una proteína que se sintetiza en el hígado y se transporta por la sangre hasta el ovario.

DE ALBA, (1985).

Cada folículo primario consta de un ovocito rodeado por una capa única de células aplanadas, denominadas células foliculares o granulosas que se originan del epitelio de la corteza del ovario.

La ovogénesis en el pollo es asincrónica, encontrándose varios estadios de la profase meiótica en la corteza del ovario izquierdo del pollo recién nacido.

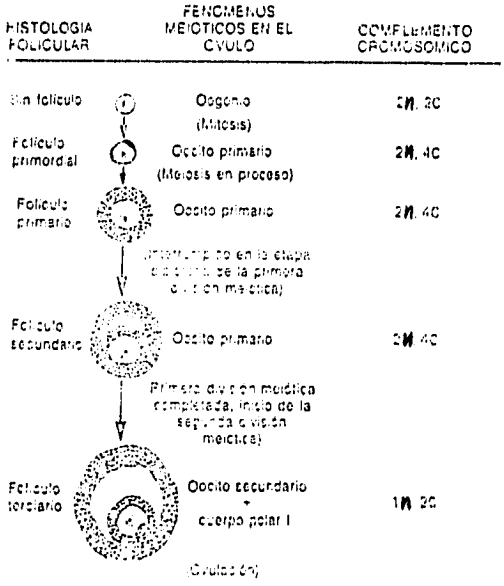


FIG.3.- Resumen de los principales fenómenos durante la ovogénesis (Tomado de : Patten B.M. Embriología Humana, p.85,Ed.MC Graw-Hill Company New York,1968).

1.5 CONTROL HORMONAL: EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA.

Se sabe que el Hipotálamo, se localiza en la base del diencéfalo, detrás del quiasma optico, por encima de la glándula hipófisis.

El hipotálamo es una región especifica del encéfalo y une física y funcionalmente al sistema endócrino y con el sistema nervioso. Por lo tanto, el hipotálamo es el principal regulador del sistema neuroendócrino denominado Eje Hipotálamo - Hipófisis - Gonada.

El hipotálamo se une a la hipófisis por vías vasculares y nerviosas, controlando las funciones de la hipófisis anterior (adenohipófisis). Produciendo, neurohormonas o factores de liberación que inducen la síntesis y secreción de las hormonas de la adenohipófisis, y en particular de las gonadotropinas.

Las células neurosecretoras hipotalámicas son estimuladas por otras células nerviosas de las regiones superiores del encéfalo y en respuesta a esa señal liberan mensajeros químicos denominados factores liberadores.

Estos a su vez llegan a la hipófisis, vía sistema porta hipotálamo - hipofisiario donde regulan la síntesis y liberación de las hormonas gonadotrópicas cuyo blanco son las gónadas su función es la de estimular la producción de esteroides sexuales en las células esteroidogénicas de la gónada.

La hipófisis es una glándula que es el centro del sistema endocrino, y se mantiene unido por un tallo muy delgado al piso del cerebro, es una glándula impar situada en el hueco del hueso esfenoides llamada silla turca. Está formada por dos partes, la adenohipófisis (lóbulo anterior) y la neurohipófisis (lóbulo posterior)

El lóbulo anterior estimula las actividades funcionales de otras glándulas endocrinas; llamadas trópicas y éstas a su vez activan órganos blanco como las glándulas tiroides, la corteza suprarrenal, el testículo y el ovario.

La hipófisis en aves está formada de un lóbulo caudal y lóbulo cefálico, el lóbulo anterior o adenohipófisis es muy pequeño, pesa 7 a 10 µg, los pollos adultos carecen de lóbulo intermedio SCANES, (1986).

La adenohipófisis secreta tres hormonas gonadotrópicas: la hormona folículo estimulante (FSH); la hormona luteinizante (LH); y la hormona luteotrópica (LTH).

La hormona Folículo estimulante (FSH) es necesaria para el desarrollo de los folículos ováricos. Esta hormona es una glicoproteína hidrosoluble y su peso molecular oscila entre los 30,000 y 67,000 Daltons. Según reportes está constituida por dos cadenas polipeptídicas, una alpha de 93 residuos de aminoácidos y otra beta de 118 residuos de aminoácidos.

La FSH se considera como primer mensajero que llega a los receptores de superficie de las células blanco. Esta acción genera un segundo mensajero intracelular que es el AMPc, el cual dentro de la célula va a desencadenar diversos efectos biológicos. FRAPS Y DURI en 1943 observaron que la inyección de LH indujo la ovulación prematuramente. Posteriormente, OPEL Y NALBANDOV en 1961 descubrieron que la LH provocó la ovulación en gallinas hipofisectomizadas. Además COLE Y CUPPS, (1977) en mamíferos indujeron la ovulación a ratas inmaduras hipofisectomizadas administrándoles FSH Y LH.

BAHR Y JOHNSON, (1963) Y NALBANDOV, (1976) concluyeron que ambas hormonas en forma independiente son capaces de inducir la ovulación.

En condiciones fisiológicas la ovulación se produce con mayor facilidad cuando ambas hormonas están presentes y esto sugiere que la

elevación preovulatoria de LH y FSH formen un complejo hormonal inductor de la ovulación.

La LH mantiene a las células Luteicas y favorece la secreción de progesterona en varías especies. La inyección de LH ovina a folículos vesiculares de conejo aumenta la secreción de progesterona en un 1000% después de 5 minutos de aplicada. Mediante estudios autorradiográficos se han obtenido datos que se han demostrado que la membrana plasmática de las células luteicas y las células de la teca contienen receptores de unión específicos para la LH. En el ovario de las aves no se forma cuerpo lúteo, aunque se conoce la capacidad esteroidogénica del folículo postovulatorio se desconoce su importancia NALBANDOV, (1969).

Las hormonas gonadotrópicas son sintetizadas por la hipófisis aún antes de que se establezca la comunicación vascular con el hipotálamo. En el día 7 - 8 del desarrollo embrionario se encuentra el factor liberador de LH en el plexus capilar primario, en la parte media anterior de la hipófisis. En el día 10.5 se encuentra tempranamente el factor de hormona circulante (WOODS, 1984 y 1987). En el día 13 del desarrollo se forma el sistema de la vena porta que comunica al hipotálamo con la hipófisis. La adenohipofisectomía provoca una disminución en la esteroidogénesis

y al realizarse transplantes de adenohipófisis se observó que se restablecía la síntesis de hormonas esteroides. WOODS Y WEEKS, (1969).

La adenohipofisectomía total causa serios daños como interrupción en la ovogénesis, así como también la degeneración de espermatogonias y células de Sertoli localizadas en el epitelio germinal.En diversos estudios en mamíferos se encontró que la hormona FSH provoca un aumento de diversas enzimas implicadas en la biosíntesis de esteroides en el ovario del ratón.

Diversos estudios sugieren que los efectos de la FSH están mediados por las células de la granulosa.

ZELEZNIK en 1941 sugirió que la FSH puede provocar la maduración de las células de la granulosa, con objeto de que los folículos puedan responder a la LH endógena que se segrega durante el ciclo estral.

Se observa cambios estructurales, en los ovarios de ratón privados de FSH como la disminución y forma irregular de la zona pelúcida que separa la célula granulosa del óvulo.

Al inyectarse intrafolicularmente dosis pequeñas de FSH ovina se

luteinizan los folículos de Graaf de conejo. A los 5 minutos de la administración de FSH la producción ovárica de estradiol aumenta aproximadamente el 30% y la de progesterona un 1000%.

II.- ANTECEDENTES

El conocimiento que se tiene hasta hoy de cómo las hormonas son mediadoras de la proliferación ovogonial, y de la regulación de la profase meiótica en aves es muy escaso; debido a que estos eventos se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario.

Para evaluar el efecto de las hormonas gonadotrópicas se usan los métodos de Hipofisectomía, y la administración de hormonas durante el desarrollo embrionario.

Los primeros trabajos fueron realizados por FUGO, (1940) y VOGEL, (1957) quiénes demostraron que la hipofisectomía no afectó la diferenciación y desarrollo de las células germinales.

En mamíferos se han realizado varios trabajos en cultivo de gonadas. STEINBERGER y col., (1964) y STEINBERGER y STRINBERGER, (1966) cultivaron fragmentos de testículo de rata recién nacidas y observaron que las células germinales de estos explantes se dividían mitóticamente y entraban a la profase meiótica. Cuando cultivaron las

células aisladas no se dividieron mitóticamente, ni entraron a la profase. Esto sugiere que su diferenciación depende de la influencia de las células somáticas de los órganos reproductores.

Posteriormente, ERICKSON en 1974 realizó cultivos similares a los anteriores, pero en gónadas de embriones de pollo de 4 - 12 días de incubación. En estos estudios se demostró que el desarrollo en corteza era normal observándose ovogonias en división mitótica y ovocitos en diferentes etapas de profase meiótica. El autor concluyó que la diferenciación de las células germinales estaba regulada por las células somáticas de la corteza y su expresión después de los 6 días de incubación no dependía de la hipófisis o de los estrógenos medulares.

Más tarde, JORDANOV en 1979 al realizar cultivos en serie de fragmentos de ovario de 3 - 4 días a la edad de 12 - 13 días "in ovo", demostró que existía una buena proliferación de ovogonias en la parte cortical, ya que están frecuentemente entrando en mitosis. En un cultivo más avanzado de un ovario de 17 - 18 días, el número de ovogonias era mayor en la parte cortical y se convertían en ovocitos, entrando asincrónicamente en las diferentes fases de la meiosis. JORDANOV también propuso que los factores que controlan la profase meiótica están dentro del ovario.

Estudios realizados por SKALKO y col.(1972) en cortes de tejido ovárico de pollos recién nacidos, encontraron puentes intracelulares entre los ovocitos. Estos puentes se originan al estar incompleta la citocinesis, en la actividad mitótica ovogonial, éstos pueden ser los responsables de la división mitótica de las ovogonias y la sincronización de los eventos meióticos de los ovocitos. Recientes investigaciones han sugerido que los puentes intecelulares pueden servir para restringir el número de células germinales maduras. Faltan realizar varios experimentos para demostrar la función precisa de los puentes intercelulares.

La adición "in vitro" de hormonas gonadotrópicas combinadas (FSH pura, LH y prolactina) a ovarios de cordero y de hamster no modifica el desarrollo de las ovogonias. Sin embargo, en el Loris adulto al tratarse con estrógenos varia el número total y la proporción de ovogonias, comparados con ovocitos, aumentando el número total de células germinales COLE y CUPPS, (1977).

BYSKOV en 1974 demostró que el factor medular (sistema rete ovari) influye en la corteza para iniciar la diferenciación de las células

germinales y células de la granulosa. En 1975 BYSKOV señaló la importancia del rete ovari para iniciar la meiosis y formación de folículos en gónadas de ratón, gato. hurón y visón.

Estudios posteriores de BYSKOV, (1978) confirmaron que la presencia del sistema rete era necesario para el comienzo de la meiosis e influye también en la síntesis de esteroides gonadales. En 1993 BYSKOV propuso que algunas substancias inducen la iniciación de la meiosis. JONES E. (1978) menciona que las gonadotropinas y quizás los esteroides gonadales incrementan la división y el número de ovogonias en algunos peces adultos, anfibios y reptiles.

CSABA y col. en 1980 realizaron experimentos con embriones de pollo de 15 días de desarrollo embrionario, administrándoles LH + FSH. Encontraron un mayor número de ovocitos tanto en división mitótica como en profase meiótica en los animales tratados en comparación con los controles. Mencionan que los receptores a LH aumentaron por la influencia de FSH.

III.- HIPOTESIS DE TRABAJO.

Varios trabajos han demostrado que las gonadotropinas incrementan el número de ovogonias en algunos peces adultos, anfibios y reptiles, pero no ha sido demostrado en larvas de lamprea y en embriones de aves, Suponemos que es posible que las gonadotropinas regulen la proliferación ovogonial y la ovogenesis en aves.

IV.- OBJETIVOS DEL TRABAJO

I. Determinar si la Hormona Folículo Estimulante afecta la división ovogonial y/o la profase meiótica en ovocitos de pollo.

II.- Observar los cambios a nivel poblacional y estructural de las células germinales (ovogonias y ovocitos) en el ovario del pollo recién nacido tratado con la Hormona Folículo Estimulante (FSH), en etapa embrionaria.

III.- Cuantificar el porcentaje de células de las distintas subpoblaciones de células germinales (ovogonias y ovocitos) en sus distintas fases de la profase meiótica de ovarios de pollos recién nacidos tratados prenatalmente con FSH.

V.- MATERIALES Y METODOS

Se incubaron huevos fértiles de la raza White leghorn, los cuales se pusieron en una incubadora a 37 grados centigrados y con humedad constante. A los 12 días de incubación se realizó la ovoscopía. A cada embrión se le realizó una pequeña abertura en el cascaron con una segueta, a nivel de la parte proximal de la cámara de aire procurando no romper la membrana corioalantoidea. Se colocó suero fisiológico sobre la membrana externa (NaCl 0.9 %) para separar la membrana externa y la corioalantoidea. Con unas pinzas de punta roma se eliminó la membrana externa de la abertura, sellándose con cinta adhesiva transparente ambos orificios.

Se procedió a dividir en tres grupos a los embriones Grupo I control, Grupo II (1µg de FSH) y Grupo III (40 µg de FSH). Se añadieron 3 dosis, a los 13, 15 y 17 días de incubación sobre la membrana corioalantoidea. A los embriones control se les suministró solución de Dulbeco.

A las 24 hrs. después de la eclosión se sacrificaron los pollitos por decapitación, se disecaron los ovarios izquierdos colocándolos en una solución libre de calcio y de magnesio, posteriormente se colocó cada ovario en un matraz con solución de tripsina al 0.25%. Se procedió a colocar el tejido en un baño a 37 grados centígrados con agitación por 30 min. Enseguida se terminaron de disgregar los fragmentos de tejido con una pipeta Pasteur siliconizada. Se les agregó inhibidor de tripsina (0.5%). Se procedió a filtrar la suspensión a través de una gasa. Se centrifugaron las muestras a 1200 rpm. durante 5 min., eliminándose el sobrenadante, al botón celular se le agregó citrato de sodio al 1% (2.5ml) (sol. hipotónica), y se agitó. Se colocaron en un baño a 37 °.C con agitación durante 40 min. Por segunda vez se centrifugaron a 1200 rpm. durante 5 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y al botón se le añadió 5 ml de fijador (metanol - ácido acético 3:1), se resuspendió y se dejó reposar una hora en frío.

Posteriormente se centrifugó dos veces a 1200 rpm. por 5 min. cada una se decantó el sobrenadante y se agregaron de 15 - 20 gotas de fijador, resuspendiendo el material con una pipeta Pasteur siliconizada. Para la evaluación de las fases meióticas se prepararon las laminillas por la

técnica de goteo, dejandose secar la muestra sobre los portaobjetos. Posteriormente las preparaciones se tiñeron con Giemsa. Realizándose por observación a microscopía de luz el conteo tanto de ovogonias como de ovocitos en las diferentes fases de la profase meiótica en las distintas laminillas (fig.4).

Se realizó un análisis de varianza considerando un nivel de significancia del 5% y un intervalo de confianza del 95% con comparaciones múltiples de Kruskal - Wallis.

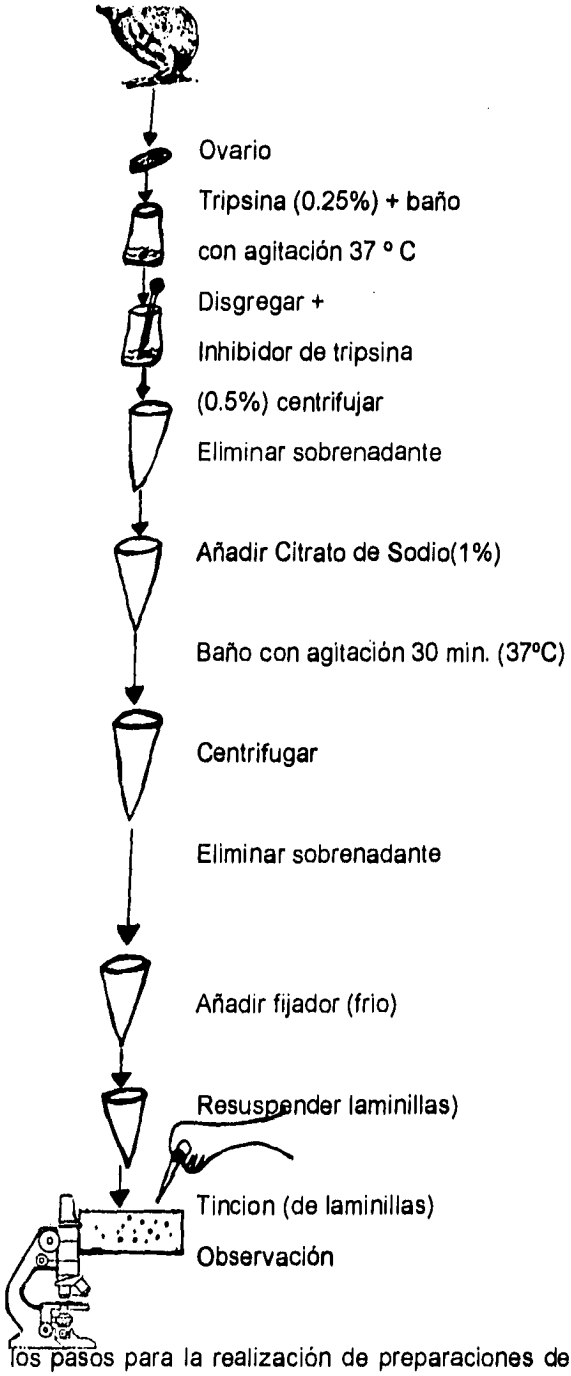


Fig.4 Descripción de los pasos para la realización de preparaciones de las células germinales en Squash

VI.- RESULTADOS

Al observar las preparaciones de Squash de la células germinales del ovario izquierdo de pollos recién nacidos controles y tratados con la hormona folículo estimulante (FSH), encontramos tanto ovogonias, como ovocitos en las distintas fases de la profase de la primera división meiótica, distinguiéndolas entre si por sus características morfológicas.

Las ovogonias en interfase contienen gran cantidad de cromatina en grumos dispersos dentro del núcleo siendo estas células de gran tamaño. (fig. 6 A).

En las ovogonias en metafase se aprecian claramente los cromosomas observando estas células un poco más grandes en comparación con las de Interfase. (Fig.6 B).

Los ovocitos en fase de Preleptóteno de la primera división meiótica son células más pequeñas en comparación con las ovogonias. La masa central de la cromatina se dispersa en todo el núcleo, observándose grumos más grandes que los de las ovogonias en interfase. También

encontramos el principio de la formación de hilos de cromosomas. (Fig.6 C).

Ovocitos en fase de Leptóteno.- Los filamentos de cromatina se ven como una verdadera maraña. Los núcleos son de mayor tamaño en comparación con los ovocitos en Preleptoteno. (Fig. 6 D).

Ovocitos en Zigóteno.- Se observa cromosomas en hilos tanto largos como cortos enrollados entre si. (Fig.6 A).

Ovocitos en fase de Paquiteno.- Se caracteriza por presentar los cromosomas más condensados y gruesos. (Fig. 6 E).

Ovocitos en fase de Diplóteno.- Presentan cromosomas menos gruesos que los de la fase de paquiteno, en los cuales se observan los quiasmas. (Fig. 6 F).

Al realizar el conteo de las células germinales del ovario izquierdo de pollos recién nacidos observamos que el ovario de los animales control presentan un mayor porcentaje de ovocitos (72%), y un menor porcentaje de ovogonias (28%).

Esta relación se invierte en los ovarios de los animales tratados con FSH que presentan de un 94 - 96% de ovogonias con un mínimo porcentaje de ovocitos (3.8 - 5.3 %). (Tabla I). (Gráfica A). El análisis estadístico aplicado muestra que si hay diferencia significativa entre controles y

tratados, pero entre los grupos tratados existe una menor diferencia, aunque también es significativa. (Tabla I).

En la gráfica B., se muestran las variaciones en el porcentaje de ovocitos de cada fase de la profase meiótica. Observamos que el mayor porcentaje de ovocitos se encuentran en preleptoteno y van disminuyendo según avanzan las fases de la profase meiótica, tanto en controles y tratados, aunque en los controles se acumulan más células en diplóteno que en los tratados (Gráfica B).

F.6

Fig.- 6 Microfotografías de las preparaciones de Squash de las células germinales del ovario izquierdo- de pollos recién nacidos: Observamos:

A - Ovogonias en Interfase (O), ovocitos en la fase de- Zigóteno (Z) de la profase de la primera división - meiótica.

B - Ovogonia en Metafase de la Mitosis.

C - Ovocito en la fase de Preleptóteno de la profase de la primera división meiótica.

D - Ovocito en la fase de Leptóteno de la profase de la primera división meiótica.

E - Ovocitos en la fase de Paquíteno (P) de la profase- de la primera división meiótica.

F - Ovocito en la fase de Diplóteno de la profase de la primera división meiótica.

TABLA I

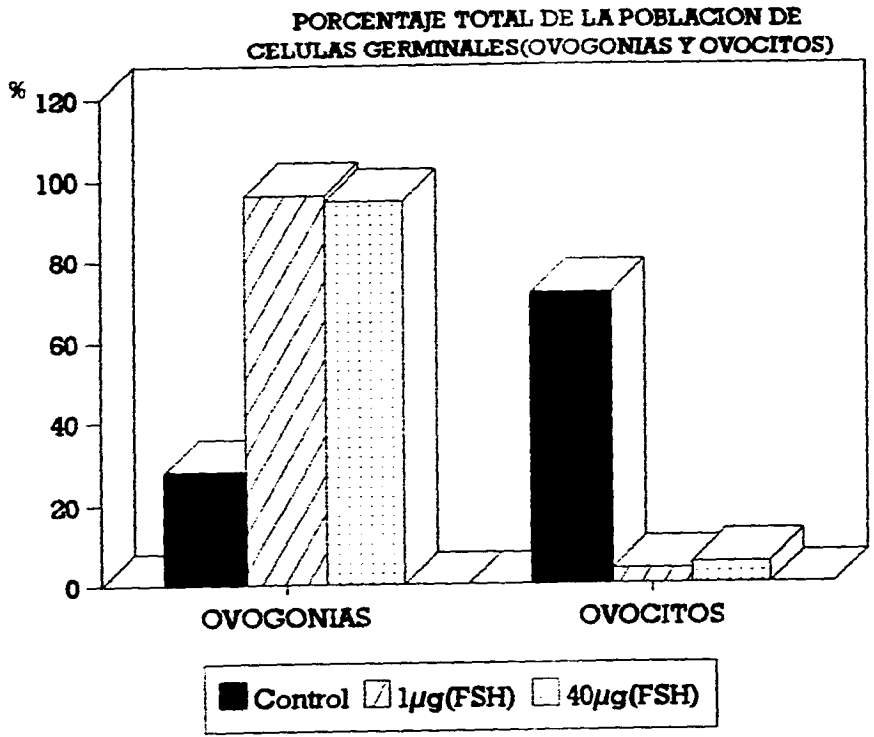
TRATAMIENTO	OVOGONIAS	OVOCITOS	OVOGONIAS		O V O C I T O S				
			INTERFASE	METAFASE	PRELEPTOTENO	LEPTOTENO	ZIGOTENO	PAQUITENO	DIPLOTENO
CONTROL (GRUPO I) n=6	28±0.93	72±0.57	26.7±0.65	1.3±0.11	52.1±1.38	9.6±0.35	1.7±0.16	1.9±0.16	6.7±0.16
1µg (FSH) (GRUPO II) n=6	96.1±0.17	3.8±0.3	96.06±0.17	0.02±0.0016	2.7±0.11	0.63±0.16	0.24±0.02	0.12±0.008	0.07±0.0028
40µg (FSH) (GRUPO III) n=6	94.7±0.45	5.3±0.11	94.7±0.17	0.03±0.0015	2.9±0.11	1.4±0.11	0.7±0.44	0.1±0.012	0.2±0.22

VALORES EXPRESADOS COMO LA MEDIA± ERROR ESTÁNDAR.

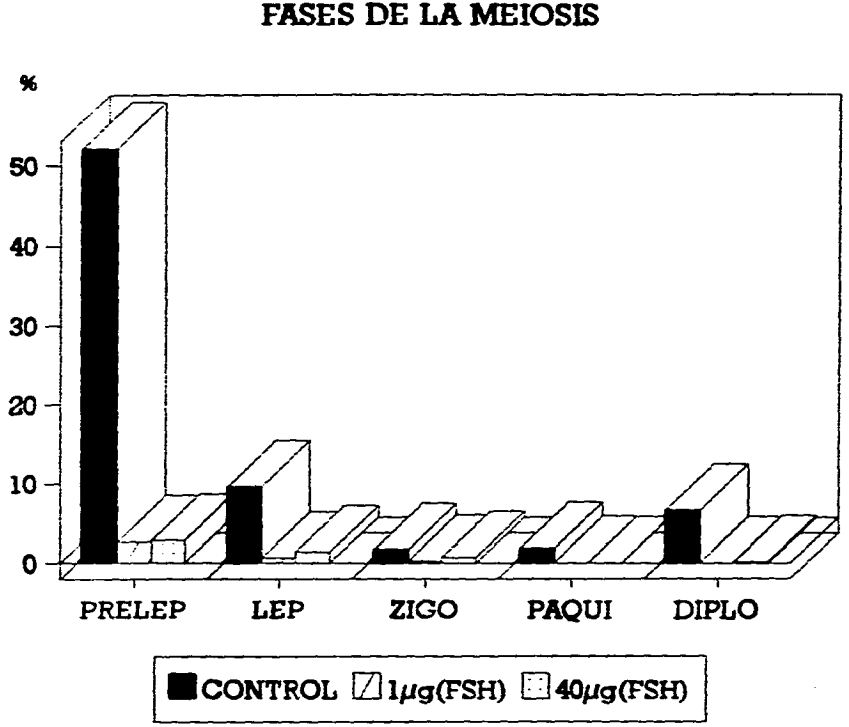
GRUPOS	OVOGONIAS	OVOCITOS	INTERFASE	METAFASE	PRELEPTÓTENO	LEPTÓTENO	ZIGÓTENO	PAQUÍTENO	DIPLÓTENO
I-II	**	**	**	**	**	**	**	**	**
I-III	**	**	**	**	**	**	**	**	**
II-III	**	**	N.S.	N.S.	N.S.	**	N.S.	N.S.	**

SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA AL NIVEL 5%
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA= **
N.S.= NO SIGNIFICATIVA

TABLA I.- VARIACIONES EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS GERMINALES EN EL OVARIO DE POLLOS RECIÉN NACIDOS TRATADOS CON FSH EN ETAPA EMBRIONARIA



Gráfica. A.- Porcentaje del total de la población de células germinales (ovogonias y ovocitos) del ovario de pollo recién nacidos, tratados en etapa embrionaria con FSH.



Gráfica.- B

Variaciones en el porcentaje de cada fase de la profase meiótica de ovocitos de ovarios de po - llos recién nacidos, tratados en etapa embriona ria con FSH.

VII,. DISCUSION

Debido a los escasos trabajos que existe sobre el efecto de las hormonas o factores que controlan la ovogénesis en los embriones de pollo en el presente trabajo se utilizaron ovarios de pollos en etapa embrionaria, tratados con la hormona folículo estimulante (FSH).

La FSH se administró los días 13, 15 y 17 del desarrollo embrionario, ya que en el día 13 se forma el eje HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA y en el día 15 los receptores gonadales son sensibles a las gonadotropinas CSABA Y DOBOSY, (1980) y WOODS, (1987).

Nuestros datos no coinciden con los reportados por HUGHES en 1963; quien establece que el ovario de pollo recién nacido presenta un 100% de ovocitos en sus distintas fases de la profase meótica y un cero porciento de ovogonias. En nuestros resultados encontramos un 28% de ovogonias. Esta diferencia puede deberse a que fueron distintas las técnicas para el conteo de las células germinales. Ya que HUGHES

realizó cortes de tejido mientras que nosotros utilizamos la técnica de disgregación celular. Otro factor puede ser que utilizó embriones (F1 generación White Leghorn x Rhode Islan Rojo) y nosotros utilizamos embriones de la raza (White-leghorn).

Diferimos en lo reportado por CSABA Y DOBOSY en 1980, ya que sus resultados muestran un aumento de un factor 1.8 de ovocitos en los animales tratados con la combinación de LH + FSH (50% + 50%) en comparación a los nuestros en que obtuvimos una disminución de ovocitos en un factor de 18 con el tratamiento con FSH.

Este desacuerdo puede deberse a que utilizamos sólo una hormona gonadotrópica, la folículo estimulante (FSH) y en diferente etapa del desarrollo.

Hay evidencias de que las gonadotropinas y los esteroides gonadales incrementan la división y el número de ovogonias en algunos peces adultos, anfibios y reptiles JONES, (1978).

BYSKOV, 1974, 1975, 1978, y 1993 propone que el inicio de la meiosis en mamíferos es dependiente del rete ovarii. Ha observado que si el rete esta presente dentro como fuera del ovario la mayor parte de las células germinales entran en profase meiótica.

Hay evidencias que indican que la entrada a la meiosis se puede deber a la acción de sustancias difundibles que inducen la meiosis (MIS), las cuales son secretadas por células que derivan de los mesonefros. La razón por la cual la meiosis no se inicia en las células germinales rodeadas en cordones hasta la pubertad es explicada por la acción de sustancias que preveen la meiosis (MPS) presentes dentro de los cordones. La teoría es que el MIS y MPS se opone uno con otro y que el avance de la meiosis es dependiente de las concentraciones de las dos sustancias.

Se ha demostrado que el MIS y MPS son sintetizados por testículos de diferentes mamíferos.

La época en que se realiza la meiosis en las hembras es dependiente de las especies. En ovarios de muchas especies la meiosis se inicia inmediatamente después de la diferenciación sexual, se le ha dado el termino de "meiosis inmediata".

En otras especies el inicio de la meiosis es independiente de la diferenciación sexual y se llama "meiosis retardada" BYSKOV, (1993).

Especies con meiosis inmediata, como el ratón y el humano tienen ovarios compactos con sus células germinales uniformemente distribuidas en todo el órgano o en la corteza.

En especies con "meiosis retardada" como la vaca y el conejo las células germinales están encerradas en cordones bien definidos y sintetizan considerables cantidades de estradiol antes de iniciar la meiosis, mientras que en la "meiosis inmediata" se detecta poco o nada de estradiol antes de iniciar la meiosis. En todas las especies el inicio de la meiosis está también correlacionada con niveles bajos de estradiol dentro del ovario BYSKOV, (1993)

En diferentes especies se ha demostrado que los ovarios y su sistema mesonéfrico secreta MIS al mismo tiempo que cuando se inicia la meiosis AUSTIN y SHORT, (1982).

TENG y colaboradores demostraron que las gonadas en embrión de pollo en condiciones de cultivo de órganos con LH Y FSH incrementan la producción de estradiol y testosterona TENG Y TENG, (1977), TENG y col., (1982).

Con base a los datos anteriores podemos suponer que estamos incrementando los niveles de estradiol y testosterona en los animales tratados con FSH.

Posiblemente los niveles altos de estradiol actúen como un factor mitógenico en las ovogonias y detengan el inicio de la meiosis. Para corroborar ésto será necesario, en futuras investigaciones, medir

los niveles de estrógenos y de otros reguladores no esteroidales en los animales tratados con FSH.

VIII.- CONCLUSIONES

Concluimos que la Hormona Folículo Estimulante propicia un microambiente adecuado para la proliferación ovogonial y retraso del inicio de la profase meiótica. Por lo que el incremento poblacional observado de las células germinales se debe principalmente al aumento en las ovogonias.

IX.- APENDICE

(Soluciones utilizadas)

SOLUCION LIBRE DE Ca^{++} y Mg^{++}

8.0 grs. de NaCl.

0.2 grs. de KH_2PO_4.

0.2 grs. de KCl.

1.15 grs. de Na_2HPO_4.

0.02 grs. de EDTA.

2 gotas de rojo fenol (se ajusto el pH a 7.2-7.4).

(todos los reactivos se aforaron a 1000ml. con agua destilada)

SOLUCION HIPOTONICA

1 gr. de citrato de sodio

aforar a 1000 ml. con agua destilada

COLORANTE DE GIEMSA

1 gr. de Giemsa

66 ml. de glicerina

66 ml. de metanol

(A la glicerina se le agregó la giemsa y ésta se agita en caliente a 60 grados centígrados durante media hora, dejar enfriar y agregar el metanol, agitar durante dos horas en frío y filtrar).

FIJADOR

60 ml. de Alcohol etílico absoluto.

20 ml. de Acido acético glacial.

(Al Alcohol se le agrega el ácido acético).

X.- BIBLIOGRAFIA

Austin, C.R. y Short,R. V. 1972. Células Germinales y Fertilización. Ed.Omega Barcelona vol. I Cap.I p.p.1-26

Austin, C.R. y Short, R.V. 1982. Reproduction in mammals. Book 1.- Germ cells and fertilization. Second Edition. Ed. Cambridge University Press New York. p.p.1-16.

Balinsky, B. J. 1982 . Introducción a la Embriología Ed. Barcelona Omega 5ª edición p.727.

Bahr, J.M. Johnson P.A. 1963.Reproduction in poultry. En Reproduction in domestic animal 4ª Edition CUPPS P.. Ed.Academic Press Sn Diego Calif. 765-789.

Brambell, F.W.R. (1926). Oogenesis of the fowl (gallus bankiva).Phil. Trans. R. Soc.B. 214:113-151.

Byskov,A.G.(1974). Does the rete ovarii ac.as a trigger for the onset of meiosis. Nature. 252:396-197.

Byskov,A.G.1975. The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat , mink and ferret . J.
Reprod. Fert. 45:201-209.

Byskov, A.G.1978. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. Biol.Reprod. Fert. 19:720-735.

Byskov, A.G.1979. Regulation of meiosis in mammals. Ann. Biol. Anim. Biochin. Biophys. 19:1251-1261.

Byskov, A. G.1993. Forskolin and the meiosis inducing subtance synergistically initiate meiosis in fetal male germ. cells. Mol. Rep. Dev. 34:47-52.

Callebaut M.; (1967). Premeiosis and Premeiotic DNA Synthesis in the left ovary of the female chick embryo.J. Embryol. Exp. Morph. 18:299-304.

Callebaut M.1976. Origen of ovarian follicle cells in birds. Experientia 32:1337-1339.

Callebaut M.;(1979). The avian ovary is in open organ Anat. Embryol. 158:103-119.

Cole, H.H. y Cupps P.T. 1959. Reproduction in domestic animal II. Academic Press New York. 344-390.

Cole, H.H. y Cupps P.T. 1977 Reproducción de los animales domésticos. Ed. Acriba España p.p. 146-159.

Cole, H.H. y Cupps P.T. 1989. Reproduction In Domestic Animals 3ª Edition Academic Press New York. 17,190.

Crawford, R.D.; 1990.Reproductive biology in relation to breeding and genetics, Ed. Elsevier Canada. 3:61-90.

Csaba G.,Shahin Ma. y Dobosy; 1980. The overlapping effect of gonadotropins and TSH on embryonic chicken Gonads. Arch. Anat. Hist. Embry. Norm. et Exp. vol 63 p.p. 31-38.

De Alba, J.; 1985. Reproducción Animal. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México, D.F. p.p. 501-522.

D'Hollander, F.1904. Recherches sur 1'oogenesis et sur la structure et el signification du no yau vitelli de Balbiani chez les oiseaux. Arch. Ant. Microsc.7:117-180.

Erickson, G.t. 1974. The control of differentiation of female embryonic germ cell in the bird. Dev. Biol. 36:113-129.

Fugo, N.W.1940. Effects of hypophysectomy in the chick embryo. J. Exp. Zool. 85:271.

Fujimoto, T., Ukeshima, and Kiyofuji, R. 1976. The origin migration and morphology of the primordial germ cells in the chick. Embryol. Anat. Rec.185:139-154.

Fraps, R.H. y Dury, A. 1943. Ocurrence of premature ovulation In the domestic fowl following and administration of progesterona. Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. 52:346-349.

Gilbert, A.B. 1969. Innervation of the ovary of domestic hen.Q.J. Exp. Physiol. 54:404.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gilbert, A.B.1971. The Ovary. In: Physiology and Biochemistry of the domestic fowl vol 3.Bell-Freeman Ed. Academic Press London 1163-1202.

Guraya, S.S. (1957). Histochemical studies of lipids in oocytes I.Lipids in the oogenesis of Columbia livia Q.J.
Microsc. Sci .98:407-423.

Greenfield, M.L.1966. The oocyte domestic chicken shortly after hatching studied by electron microscopy.J. Embriol. Exp. Morph. 153:297-316.

Hughes. C. G.1963. The population of germ cells in the developing female chick. J. Embriol. Exp. Morph. 11 (3):513-536.

Houillon, C; 1977. Embriología. Ed. Omega Barcelona p.p. 26-63.

Jordanov, J.P. 1979. Some relationships among germ, satellite and interstitial cells during chick gonad differentiation.A tissue culture study. Ann. Biol. Anim.
Bioch. Biophys. 19, 4B:1279-1288.

Jones, S.E. 1978. The Vertebrate Ovary Ed. Plenum Press, New York. 18-170.

Konopacka, B. (1933). Estudie Microchimique du comportment de la graisse dans le processes de formation du vitellus et dans le développement de l'embrryon de poule. Archs Biol., Paris, 44:251-305.

Kuwana, Miyayama, Yuji y Fujimoto 1987.Behavior of chick primordial germ cells moving toward gonadal primordium in vitro:scanning electron microscopic study.Anat.Record vol. 219: 164-170.

Loyez, M.C. (1906). Recherches sur le développement ovarien des ceufs ménoblastique. Archs. Anat. Microsc. 8:69-97.

Nalbandov, A.V. 1959. Neuroendocrine mechanisms Bird ovulation in comparative. Endocrimology (A. Grobman, ed), p.p.161-173. Wiley, New York.

Nalbandov, A.V. 1969. Fisiología de la Reproducción Edit. Acriba, Zaragoza España p.p. 98,145-157, 177-182.

Nalbandov, A.V. 1976. Physiology of mammals and Bird.Ed. Freeman and Company p.p. 15:144-146.

Opel, H. y Nalbandov, A.V. 1961. Onset of follicular atresia following hypophysectomy of the laying hen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107:233-235.

Patten, B.M. 1968. Embrilogía Humana. 3ª Ed.MC Graw-Hill Company New York p.85.

Ruiz, D. 1988. Fundamentos de Embriología. 1ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. P.P. 1-54.

Romanoff, A.L. 1960. The avian embryo. Ed. Macmillan, New York. p.p. 816-855.

Sandoval, J.J. 1965. Anatomía de las Aves. Ed. Acriba Zaragoza (España) p.p. 94-97.

Scott F. Gilbert. 1988. Biología Del Desarrollo Ed.Omega Barcelona, p.p. 668-685.

Steinberger, E., Steinberger, A. and Perloff, W.H. 1964. Initiation of spermatogenesis in vitro. Endocrinology 74:788-792.

Steinberger, A., and Steinberger E. (1966). In vitro culture of rata testicular cells. Exp. Cell. Res. 44:443-452.

Scanes, C.G. 1986. Pituitary gland En Avian Physiology. P.D. Sturkie. Ed. Springer - Verlag New York Tokio p.p.383-462.

Stoeckenius, W. 1959. An electron microscope study of myelien figures. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5:491-500.

Swartz, J.W. y Domm,L.V. (1972). A Study on Division of primordial germ cells in the early chick embryo. Amer.J. J. Anat.13:51-70.

Skalko, R.G., Kerrigan,J.M., Ruby J.R. y Dyer R.F. 1972. Bridges between oocytes in the chicken ovary.
Z. Zellforsch 128:31-41.

Teng, C.T. y Teng, C.S. 1977. Studies on sex-organ development hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3'-5'cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. Biochem J. 162 (1):123-134.

Teng, C.T.,Teng C.S., Bousfield, G.R., Liu. W.K. y Wara, D.N. 1982. Differential response of growing andy regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 48:325-332.

Tienhoven, A. 1983. Reproductive physiology of Vertebrates. 2ª ed.Cornell University Press.p.p.38-41,46 y 51.

Varma, D.N. 1954. Cytoplasmic inclusions in the oogenesis of some Indian birds- I. The role of mitochondria. Zool.7:111-121.

Vogel, N.W. 1957. Free tissue cholesterol and growth in chick embryos hypophysectomized by decapitation. Anat. Rec. 127:382-393.

Woods, J.E. y Weeks, R.L. 1969. Ontogenesis of the pituitary gonadal axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 13:242-249.

Woods, J.E. y Thommes, R.V.1984. Ontogeny of Hipothalamo Adenohypophyseal-Gonadal interrelation ships in the Chick embryo. J. Exp. Zool. 232:235-241.

Woods, J.E. 1987. Maturation of the hypothalamo adenohypophyseal gonadal (HAG) axes in chick. embryo. J. Esp. Zool. Supl. 1:265-271.

Wentworth, B.C.H., Hallett J.H., Gonzales, D.S. y Rajcic, G.1989. Poultry Sci. 68:999-1010.

Zeleznik, A.J., Midgley, A.R. y Reichert, L.F. 1974. Granulosa cell maturation in the rat: Increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle stimulating hormona un vivo. Endocrinology 95:818-824.