

131

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA MADURACIÓN DE LOS
FOLÍCULOS EN EL OVARIO DE LA GALLINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER DEL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:
ROSA MARÍA EUNICE MÁRQUEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARGARITA VIRGINIA GONZÁLEZ DEL PLIEGO OLIVARES



FACULTAD DE CIENCIAS

UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Estudio Morfológico de la Maduración de los Folículos en el Ovario de la Gallina.

realizado por Rosa María Eunice Márquez García

con número de cuenta 6207626 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biólogo

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Margarita V. González del Pliego Olivares

Propietario Dr. Enrique Pedernera Astegiano

Propietario Dra. Patricia Rivas Manzano

Suplente Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Suplente Biol. Rosa Martha Ortega Lojero

Margarita V. González del Pliego Olivares
Enrique Pedernera Astegiano
Patricia Rivas Manzano
Maricela Villagrán Santa Cruz
Rosa Martha Ortega Lojero

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Patricia Ramos Morales



DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, mi "Alma Mater", a la cual por razones personales aprendí a amar y respetar desde niña. A ella agradezco la oportunidad que me brindó al acogerme en su seno.

A todos mis profesores y a todo aquello o aquellos que contribuyeron en mi formación profesional.

Al DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA de la Facultad de Medicina de la U. N. A. M., en el cual se realizó esta tesis. Especialmente a la DRA. MA. ELENA CASTILLO ROMERO, por su apoyo y palabras de aliento.

A mi DIRECTORA DE TESIS, DRA. MARGARITA V. GONZÁLEZ DEL PLIEGO OLIVARES, por su orientación y sus enseñanzas en la técnica de microscopía electrónica, así como por el apoyo que me dio para la realización de este trabajo y la revisión exhaustiva que hizo de él a través su desarrollo.

Agradezco a los MIEMBROS DEL JURADO:
DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO
DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO
DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
BIOL. ROSA MARTHA ORTEGA LOJERO

Por la atención que tuvieron para hacer la revisión de este trabajo, contribuyendo con sus consejos y atinadas sugerencias al mejoramiento del mismo.

Particularmente al DR. ENRIQUE PEDERNERA, por la asesoría que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS.

A mi DIOS, gracias por haberme permitido entender a través del conocimiento la belleza de las ciencias naturales, por lo cual amo a la vida en todo su contexto.

A la memoria de mi PADRE, del cual recibí la mejor herencia que se puede dar a un ser humano, su ejemplo de humildad y honradez, entre otros muchos.

A la memoria de mi MADRE, quien siempre veló por mi bienestar y de la cual recibí siempre apoyo incondicional. Gracias por darme el ser.

A mis HIJOS ALBERTO y ENRIQUE, porque su concepción fue lo más maravilloso que me pudo ocurrir, gracias por haberme dado momentos tan hermosos en esta vida.

A la "GRAN PEQUEÑA", mi nieta. El saber que existes me da nueva fuerza en esta etapa de mi vida, te amo aún antes de conocerte y espero tu arribo con gran ansiedad.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. RESÚMEN | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. ANTECEDENTES | 4 |
| 2. ESTRUCTURA DEL OVARIO DE LA GALLINA | 7 |
| Gónada Indiferenciada | 7 |
| Ovario Izquierdo Inmaduro | 8 |
| Ovario Izquierdo Maduro | 11 |
| 3. APARATO REPRODUCTOR FEMENINO DE LA GALLINA ADULTA | 17 |
| 4. MADURACIÓN FOLICULAR EN LA GALLINA | 19 |
| 5. ESTRUCTURA DEL FOLÍCULO MADURO | 20 |
| Folículo Preovulatorio | 20 |
| Folículo Postovulatorio | 25 |
| Folículo Atrésico | 26 |
| 6. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS EN LAS AVES | 28 |
| Hipófisis | 28 |
| Hormonas Gonadales | 31 |
| Biosíntesis de Hormonas Esteroides | 32 |
| Esteroidogénesis | 37 |
| Poblaciones Celulares Esteroidogénicas en Pollitas Inmaduras | 43 |

| | |
|--|----|
| Fotoperiodos | 44 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 46 |
| IV. HIPÓTESIS | 48 |
| V. OBJETIVO | 49 |
| VI. MATERIAL Y MÉTODO | 50 |
| VII. REACTIVOS Y COLORANTES | 54 |
| VIII. RESULTADOS | 55 |
| Estructura Folicular | 56 |
| Clasificación y Descripción de los Folículos Inmaduros | 58 |
| Folículos < 1 mm | 58 |
| Folículos de 1 a 2 mm | 59 |
| Folículos de 3 a 4 mm | 60 |
| Folículos de 5 a 6 mm | 61 |
| Folículos de 7 a 8 mm | 62 |
| Análisis Morfométrico de las Subpoblaciones Celulares Esteroidogénicas de los Folículos Inmaduros | 64 |
| IX. DISCUSIÓN | 66 |
| X. CONCLUSIONES | 73 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA | 74 |

I. RESUMEN

En el ovario de la gallina adulta se identifican dos tipos de folículos (latín: folliculus-saco pequeño), los inmaduros de crecimiento lento de la línea blanca y los preovulatorios de crecimiento rápido de la línea amarilla. En los folículos inmaduros, están incluidos desde los corticales menores (<) a 1 mm de diámetro, hasta los de 8 mm, en los cuales se distinguieron tres poblaciones de células esteroideogénicas: células de la capa granulosa, células intersticiales ubicadas en la teca interna y células poco diferenciadas, aromatasas positivas, localizadas en la teca externa. Se sabe que la secreción hormonal se modifica a lo largo de la foliculogénesis, al principio la granulosa de los folículos pequeños inmaduros es esteroideogénicamente inactiva, iniciándose la actividad hormonal a partir de los folículos de 1 a 2 mm, donde se aprecia un incremento de progesterona que se mantiene hasta la ovulación. Por el contrario, la producción de andrógenos en la teca interna, así como la síntesis del 17β -estradiol de la teca externa, disminuyen en los folículos de mayor tamaño. A pesar que se tiene información sobre las poblaciones celulares que constituyen a los folículos inmaduros, existen muchas interrogantes sobre cuál es su origen y cómo se modifican a través de la maduración.

El interés de este trabajo fue determinar los cambios morfológicos y morfométricos de las subpoblaciones celulares que conforman los folículos inmaduros del ovario de la gallina White Leghorn adulta en franca postura, para lo cual se obtuvieron los folículos inmaduros de < 1 a 8 mm de diámetro, en los que se realizó el estudio con microscopía de luz y electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos demostraron que en los folículos < 1 mm, la capa granulosa está formada por un epitelio cúbico delimitado por una lámina basal, el cual se modificó a pseudoestratificado en los folículos de mayor tamaño. Entre las células granulosas y los ovocitos se observaron numerosas especializaciones de membrana llamadas transomas o "lining bodies", los que se incrementaron de manera más evidente en la región apical de la capa granulosa conforme aumenta el diámetro folicular. A partir de los folículos de 2 mm, se constituye la zona tecal. En la teca interna se apreció la formación de vasos sanguíneos y lacunares, apareciendo terminaciones y fibras nerviosas, así como cordones epiteliales de células poco diferenciadas delimitados por una lámina basal. En los folículos de 3 a 4 mm, los

cordones celulares comenzaron una transformación gradual hasta adquirir características de células esteroideogénicas. La lámina basal alrededor de estos cordones celulares se empezó a desintegrar en los folículos más desarrollados (5 a 8 mm). La teca externa en los folículos de mayor tamaño (8 a 10 mm) se formó a partir de nuevas generaciones de células poco diferenciadas localizadas entre el tejido conectivo fibroso, las cuales forman cordones de células poco diferenciadas que van empujando hacia el exterior a las células esteroideogénicas típicas, por lo que estas últimas quedan ubicadas por fuera del cuerpo folicular, ubicándose en el estroma ovárico.

Los datos morfológicos pusieron en evidencia que los folículos pequeños inmaduros no están aún completamente formados y sufren una serie de cambios importantes a través del proceso de foliculogénesis. Se demostró una diferencia significativa entre los grupos de 3 a 4 mm con respecto a los de 7 a 8 mm, observándose en la capa granulosa una disminución de su grosor conforme va aumentando el tamaño folicular. Las células poco diferenciadas mostraron una tendencia a incrementarse a través de la maduración folicular, lo cual puede deberse al aumento del diámetro folicular que se lleva a cabo en el desarrollo del mismo. La estructura folicular definitiva se establece a partir de los folículos de 2 a 3 mm de diámetro, observándose que en los de 7 a 8 mm no se presentan cambios importantes, aunque estos entran a la jerarquía folicular, etapa en la que se inicia un crecimiento rápido y se llevan a cabo una serie de eventos que culminan con su transformación a folículos preovulatorios. Puede considerarse a dicho grupo folicular como la transición entre los folículos pequeños inmaduros y los folículos preovulatorios, sin embargo algunos autores ya los clasifican como folículos pequeños amarillos, denominados en inglés *small yellow follicles* (SYF), que son los folículos más pequeños de la línea preovulatoria.

II. INTRODUCCIÓN

En la formación de la gónada femenina de las aves, hay mecanismos morfogenéticos que van determinando la integración de las células germinales primordiales con células somáticas, para constituir los folículos primordiales, participando también hormonas esteroideas y numerosos factores de crecimiento, iniciándose en dichos folículos la foliculogénesis.

Se sabe que existen dos gónadas y oviductos simétricamente bilaterales que se desarrollan en los primeros estadios embrionarios, sin embargo en las aves generalmente el ovario y el oviducto izquierdos están más desarrollados que los derechos, siendo funcionales en la vida adulta solamente los que están situados en el lado izquierdo, quedando como rudimentos los derechos. Las células primordiales germinales aparecen por vez primera hacia el final del día 3° de incubación, las cuales se dirigen hacia la gónada inmadura en formación para que se lleve a cabo la integración de la estructura de la gónada madura (Merchant-Larios, 1978; Scheib, 1970; Stahl, 1973).

La diferenciación morfológica del ovario se inicia alrededor del 3° día y medio del desarrollo, etapa en la que se empiezan a estructurar la corteza y la médula. El epitelio celómico o germinativo delimita la superficie del ovario y rodea a las células germinales. La corteza está separada de la médula por una fina y delgada capa de tejido conectivo denominada túnica albugínea, en la médula subcortical se localizan cordones de células epiteliales, en los cuales los elementos mesenquimatosos dan lugar a células con función endocrina, constituyendo islotes de células esteroideogénicas intersticiales y cordones de células poco diferenciadas con función esteroideogénica (Narbaitz et al., 1968). Entre ambos tipos celulares se llevan a cabo procesos angiogénicos, donde se forman tanto vasos sanguíneos, como vasos lacunares, estos últimos con una aparente actividad linfática (Callebaut et al., 1988), así mismo se ha observado en el ovario de la gallina, la interacción de fibras y terminaciones nerviosas, tanto hacia las células esteroideogénicas como a la vascularización (Avila et al., 1991; Müller-Marschhausen et al., 1988).

Resulta interesante conocer y definir los cambios morfológicos que ocurren durante la maduración folicular, debido a lo cual, el estudio realizado en este trabajo se llevó a cabo en folículos ováricos de gallinas adultas de la raza White Leghorn en etapa de postura.

1. ANTECEDENTES.

En la diferenciación gonadal de las aves, el sexo del embrión está determinado por la fórmula cromosómica, siendo la hembra heterogamética (ZW) y el macho homogamético (ZZ) (Teng y Teng, 1979). Aunque no se ha identificado en las aves la existencia de un verdadero homólogo de la región determinante del sexo de el cromosoma Y (SRY) de los mamíferos, si se ha confirmado la expresión de genes que participan en la regulación del desarrollo gonadal, entre los que se encuentra el cSOX9 (c=chicken), el cual es autosómico y comparte cierta homología estructural y funcional con el SYR, lo que hace pensar que el control genético del desarrollo gonadal está conservado a través de las distintas clases de vertebrados (Clinton, 1998). El ácido ribonucleico mensajero (mARN) para el factor antimülleriano producido por las células de Sertoli del testículo, se expresa antes de la diferenciación sexual en ambos sexos, aún antes de que se exprese el gen cSOX9, habiéndose encontrado que este patrón de expresión es una característica de la diferenciación gonadal (Kent et al., 1996).

En el desarrollo embrionario de las hembras, se forman dos gónadas y oviductos simétricamente bilaterales en estadios tempranos, sin embargo en las aves en general, incluyendo a las domésticas, el ovario y oviducto derechos degeneran y persisten únicamente rudimentos de estos al nacimiento del polluelo, estableciéndose así una asimetría gonadal en las primeras etapas del desarrollo, siendo funcionales solamente el ovario y oviducto izquierdos en la vida adulta (Nakabayashi et al., 1998, Sisson et al., 1986) En algunas especies de aves silvestres se desarrollan ambas gónadas, pero no suelen ser del todo funcionales, en estos casos sólo un oviducto es fisiológicamente apto para la reproducción (Sturkie, 1986).

Si bien no ha sido posible identificar en las aves, el plasma germinal en la etapa de segmentación del huevo, como es el caso de los anfibios anuros como la rana, en los que este se puede rastrear en las células próximas al polo vegetal, si se pueden identificar los precursores de los gametos entre las células endodérmicas del saco vitelino o yema, representados por las células germinales primordiales, a pesar de que estas células generalmente se relacionan con el endodermo, se ha propuesto que no necesariamente se originan de su capa germinal, habiéndose sugerido que en las aves, antes de ingresar a la

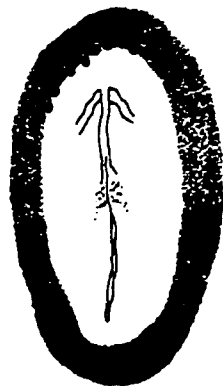
capa germinal endodérmica, las células germinales se originan en la capa germinal ectodérmica conocida como epiblasto (Eyal-Giladi et al., 1981; Gilbert, 2000).

Investigaciones recientes en el desarrollo gonadal temprano de mamíferos, también han puesto de manifiesto que se observa una zona en la porción anterior del área pelúcida sobre el hipoblasto, que corresponde a la "línea o creciente germinal" en la cual se forman los precursores de las células germinales primordiales, siendo reconocibles precozmente en el epiblasto, desde donde pasan a través de la estria primitiva hasta el hipoblasto, para formar el mesodermo y posteriormente se localizan entre las células endodérmicas de la pared posterior del saco vitelino, como un pequeño cúmulo de células del mesodermo extraembrionario, cerca de la base de la alantoides (Carlson, 2000; Gilbert, 2000)

No se ha llegado a dilucidar el porqué las células primordiales germinales se originan tan lejos de las gónadas, pero si se ha determinado como se desplazan para colonizar a dichos órganos, en los embriones de las aves, casi en el momento en que se establece la circulación sanguínea mas temprana del saco vitelino, las células germinales primordiales se abren paso a través de los vasos sanguíneos, hasta alcanzar la gónada indiferenciada (Eyal-Giladi et al., 1981). En etapas tempranas, las células germinales se distribuyen al azar por todo el cuerpo, a lo largo de su trayecto migratorio, pero en periodos tardios la mayor parte de ellas se han ubicado en la gónada indiferenciada (Fig. 1).

La diferenciación gonadal en los embriones de pollo no está determinada estrictamente por el sexo genético, ya que en etapas tempranas de su desarrollo puede estar influida por la acción de hormonas sexuales. El papel que desempeñan las hormonas esteroides en el desarrollo gonadal de las aves es de suma importancia, la expresión del mRNA del receptor de estrógenos ha sido confirmada en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en ambos sexos, antes y durante la diferenciación morfológica de las gónadas, detectándose en la hembra desde el 3.5 día de incubación (Merchant-Larios, 1978; Smith et al., 1997).

Los embriones de pollo tanto machos como hembras, pueden presentar severas alteraciones ontogénicas en respuesta a la administración de hormonas exógenas, antes de la diferenciación morfológica de las gónadas. Si se dosifica 17β -estradiol en etapas tempranas a embriones genéticamente machos, los cambios pueden ser irreversibles, pero si ya se ha lleva a cabo la diferenciación sexual, se provoca una feminización temporal (Nakabayashi,



A



B

Fig. 1 Migración de las células germinales primordiales en el embrión de ave. A. Acumulación pasiva de células primordiales germinales en la creciete germinal anterior a las 23 h de desarrollo. B. Migración de las células germinales a través del torrente sanguíneo y su ingreso temprano a los primordios gonadales a las 48 h. (Nieuwkoop y Sutasurya, 1979).

et al., 1998; Woods et al., 1978). Por otro lado, en embriones de pollo de hembras genéticas, la administración del 17β -estradiol induce a la formación de un testículo atrófico derecho y una gónada izquierda que puede ser un ovario normal o un "ovotestis" (gónada con tejido ovárico y testicular), o bien, dos testículos atróficos. Así también, si se manipula administrando un inhibidor de P450aromatasa (P450arom), enzima necesaria para convertir los andrógenos a 17β -estradiol, se induce al desarrollo permanente de machos fenotípicos así como a la formación de testículos en las hembras (Elbrecht et al., 1992; Guichard et al., 1979; Levin et al., 1995; Nakabayashi, et al., 1998; Scheib, 1983).

En las hembras genéticas el inicio de la expresión de la P450arom se ha rastreado del 5° al 6° día de incubación, asociándose a una diferenciación sexual temprana por el incremento de la síntesis de estrógenos, los cuales actúan como promotores de una proliferación celular de la gónada femenina izquierda. Por el contrario, en la gónada de los machos genéticos hay una marcada expresión de P450c17, con una mínima expresión de P450arom, produciéndose principalmente andrógenos como promotores del desarrollo de los testículos (Kumiko et al., 1996; Nakabayashi, et al., 1998; Smith et al., 1997).

2. ESTRUCTURA DEL OVARIO DE LA GALLINA.

Gónada Indiferenciada.

El desarrollo de la gónada indiferenciada en las aves, se lleva a cabo entre las somitas 20 y 27, surge como un engrosamiento en la cara ventromedial del "blastema mesonéfrico", estructura que deriva del mesodermo intermedio, la cual se ve como un abultamiento sobresaliente al que se conoce como "cresta genital o gonadal". Histológicamente la gónada temprana, alrededor de las 5 h posfecundación, está constituida por un núcleo mesenquimatoso (blastema mesonéfrico) que formará la médula, rodeado por un mesotelio de epitelio celómico o germinal, llamado así porque durante un tiempo se pensó que producía las células germinales. El componente mesonéfrico está aislado por vasos sanguíneos, distinguiéndose en este una porción renal mesonéfrica y otra porción que esta implicada en el desarrollo gonadal (Merchant-Larios, 1978; Sthal et al., 1973).

En los primeros estadios, hacia el final del 3º día, las células germinales migran del saco vitelino hacia las gónadas en formación. Al principio las gónadas izquierda y derecha contienen un número similar de células primordiales germinales y hacia el 4º día, las células germinales primordiales han alcanzado casi en su totalidad al epitelio gonadal, el cual está provisto de una lámina basal bien definida, la que frecuentemente está incompleta y atravesada por células somáticas y primordiales, en esta etapa un gran número de células germinales se transfieren de la gónada derecha a la izquierda, siendo más abundantes en la izquierda ya que esta se diferenciará como una gónada madura, en cambio la derecha terminará por degenerar (Sisson et al., 1986).

En la gónada indiferenciada durante el 5º día de incubación se aprecia una red de cordones mesodérmicos que unen dicha gónada al mesonefros, posteriormente entre el 6º y 7º días el epitelio germinal da origen a los cordones sexuales primarios cubiertos por un epitelio superficial, los cuales degeneran en la gónada derecha de la hembra, sin embargo en la izquierda forman la médula ovárica y también contribuyen a la formación de las células intersticiales medulares que tendrán una función endocrina. Posteriormente el epitelio germinal prolifera en su zona periférica dando origen a la corteza ovárica, la cual queda separada de la médula por una capa de tejido conectivo que es la túnica albugínea primaria.

Del 8° al 11° días, el epitelio cortical prolifera y da lugar a una serie de cordones sexuales secundarios, a partir de los que se forma la corteza ovárica fértil, en la que se encuentran ovogonias, así como elementos mesenquimatosos de los cordones, que dan lugar a las células intersticiales corticales que se entremezclan con las células intersticiales medulares que han migrado dentro de la corteza. Alrededor del 14° día los cordones sexuales secundarios se separan del epitelio germinal por una segunda capa de tejido conectivo denominada túnica albugínea definitiva. (Merchant-Larios, 1978; Narbaitz, 1968; Scheib, 1983; Sisson et al., 1986).

Una vez formada la estructura morfológica del ovario, también queda establecida la diferenciación sexual asimétrica en la generalidad de las aves. La gónada derecha no presenta crecimiento ni vascularización, por lo que a partir del 10° día de incubación empieza a involucionar, habiendo una franca regresión del ovario y oviducto derechos hacia el 15° día de su desarrollo, por lo que sus tejidos degeneran y no son funcionales, quedando sólo como un vestigio (Avila et al. 1991; Merchant-Larios, 1978; Sthal et al., 1973; Sturkie, 1986).

Ovario Izquierdo Inmaduro.

En las aves, el ovario izquierdo de la hembra desde etapas tempranas del desarrollo es de mayor tamaño respecto al derecho, esta desigualdad se percibe aun antes de concluir la etapa de diferenciación del desarrollo embrionario. Solo la gónada izquierda tendrá la capacidad para adquirir la madurez, su tamaño se incrementa lentamente desde la eclosión hasta la madurez sexual que se alcanza alrededor de los cuatro meses (Gilbert, 1979).

El ovario izquierdo ocupa la parte dorsal de la región media del celoma, encontrándose en contacto con la región craneal del riñón izquierdo, así como con la región craneal del riñón derecho. Del mismo modo, se encuentra relacionado cranealmente con el extremo caudal del pulmón izquierdo y ventralmente está cubierto por el saco aéreo abdominal izquierdo. La base del ovario está unida al celoma por un pliegue de peritoneo llamado mesovario, el cual permite que el ovario quede suspendido en el celoma y está formado por tejido conectivo, músculo liso, vasos sanguíneos y nervios, estas estructuras también constituyen al hilio ovárico o pedículo ovárico (Gilbert, 1969).

Se estima que el ovario inmaduro mide entre 1 y 1.5 cm de longitud por 1 cm de ancho, con una profundidad de 3 a 4 mm, en este período todos los folículos son microscópicos, apreciándose hasta después del cuarto mes uno o más folículos de 1 mm de diámetro. El crecimiento principal del ovario se lleva a cabo entre los 150 y 180 días, durante esta etapa muchos ovocitos completan su total crecimiento y el ovario aumenta su volumen, llegando a pesar de 50 a 60 gr (Gilbert, 1971a).

Iniciado el desarrollo del ovario izquierdo, después del 3° día y medio de incubación y aun antes de que se presente la eclosión, las células germinales primordiales ya han alcanzado el epitelio gonadal y la zona genital es aislada por vasos sanguíneos y células mesenquimatosas del área mesonéfrica, distinguiéndose también a partir de este momento una médula, rodeada por la corteza, excepto en el hilio, sitio en el cual la médula está en contacto con la pared dorsal del cuerpo (Merchant-Larios, 1978; Scheib, 1970).

Las ovogonias se localizan en la corteza y la superficie mas externa de esta, se encuentra recubierta por un epitelio cúbico alto que se conoce como epitelio superficial, el cual persiste durante la madurez, por detrás de este epitelio se encuentra una caspa de tejido conectivo denso denominado túnica albuginea. La médula está integrada por tejido conectivo con nervios y músculo liso, así como abundantes vasos sanguíneos, por lo que la médula es la zona más vascularizada del ovario (Hodges, 1974; Sturkie, 1967).

En las gónadas indiferenciadas de las aves, hacia el 4° día de incubación, del epitelio celómico surgen cordones epiteliales denominados cordones medulares primarios, los cuales están cubiertos por epitelio superficial que prolifera por mitosis, incorporándose también a este epitelio células mesenquimatosas adyacentes, generándose así en la gónada izquierda cordones secundarios que darán origen a la corteza ovárica fértil (Merchant-Larios, 1978). Por el contrario, en el ovario derecho cuyo epitelio superficial inicialmente es similar al de la gónada izquierda en los primeros estadios, sus células epiteliales cúbicas se transforman en planas, empezando a involucionar, comenzándose a marcar así la diferencia morfológica asimétrica característica de las aves, siendo más evidente esta degeneración alrededor del 15° día de incubación, apreciándose en la eclosión dicha gónada como un vestigio rudimentario (Merchant-Larios, 1978; Scheib, 1983).

La diferenciación morfológica de las gónadas izquierda y derecha en las aves se acentúa

después del 7° día de incubación (Avila et al., 1987). En el ovario izquierdo se puede observar, que los cordones medulares se encuentran delimitados por una lámina basal, del mismo modo, se ha demostrado que hacia el 8° día del desarrollo embrionario, dichos cordones epiteliales ya presentan una actividad esteroidogénica (Narbaitz, 1968), así como que entre ellos se puede reconocer la presencia de un sistema de conductos denominados lacunares, alrededor de los cuales se encuentra una fina lámina basal que los envuelve (Callebaut, 1988). Las estructuras epiteliales se distribuyen de manera irregular en la médula ovárica, localizándose en la región medular cercana a la corteza conocida como zona subcortical, cordones pequeños de células esteroidogénicas, así como canales lacunares reducidos, en cambio en la médula profunda, se encuentran cordones de células esteroidogénicas de mayor tamaño que corresponden a las células intersticiales del ovario, las cuales contienen organelos típicos de células de secreción estrogénica (Avila et al., 1987; Woods et al., 1978).

De esta forma, la gónada izquierda es capaz de producir secreción estrogénica tempranamente, lo cual es determinante para la desarrollo gonadal. Cabe hacer notar que en estas etapas, la diferenciación se considera dependiente de los estrógenos (Avila et al., 1991), siendo la función hormonal de las aves autónoma, ya que a partir del 14° día de incubación, apenas se inicia la diferenciación morfológica en la hipófisis, por lo que a partir de este momento se comienzan a diferenciar las células gonadotrópicas-adenohipofisarias que regularán en un futuro esta función, estableciéndose paulatinamente el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, marcándose así el inicio del control esteroidogénico por parte de la hipófisis (Gilbert, 1971b).

Existe gran controversia acerca de la formación de los componentes esteroidogénicos y no se ha determinado con exactitud el origen de las poblaciones celulares que llevan a cabo esta función, siendo una de las propuestas a este respecto, que las poblaciones esteroidogénicas surgen a partir de las células indiferenciadas del estroma ovárico (Sthal et al., 1973).

Con la aparición de la actividad sexual, la distinción entre corteza y médula se pierde virtualmente, no obstante, es posible reconocer zonas irregulares que contienen numerosos folículos inmaduros y maduros, en el tejido parenquimatoso (corteza) una vez que inicia la foliculogénesis, identificándose entre el 9° y 15° días de incubación en la corteza un gran

número de ovogonias que proliferan por mitosis rápidamente, aumentando en forma exponencial hacia el 9° día, encontrándose estas en un número de alrededor de 28 000, las cuales se organizan en estructuras particulares llamadas "nidos de ovogonias", debido a que cada ovogonia se rodea paulatinamente por células foliculares formando los folículos primordiales a partir de los cuales se formarán los diferentes tipos foliculares (Hughes, 1963). Las mitosis en las ovogonias son asincrónicas, lo cual permite una proliferación en diferentes zonas de la corteza a un mismo tiempo, dando por resultado la duplicación del número de ovogonias hacia el 17° día, incrementándose aproximadamente a 680 000, empezando a decrecer posteriormente hacia el 20° día, llegando hasta unas 480 000 al terminar la ovogénesis (Hughes, 1963; Sturkie, 1986). La atresia de las células germinales ha sido demostrada a partir del 9° día y va en aumento hacia el 20° día, conforme se van presentando las diferentes etapas de la gametogénesis.

Por otro lado, la ovogénesis inicia alrededor del 13° día de incubación, concluyendo la profase I hacia el 20° día de incubación, se han podido identificar diferentes estadios del desarrollo de los ovocitos, así tenemos que entre el 13° y 14° días de incubación, se han observado los ovocitos primarios en estado preleptoténico temprano, la fase leptotena se ha identificado hacia el 16° día, la cigotena y paquitena alrededor del 17° día de incubación y entre el 19° y 20° días, se observa a los ovocitos en estado de diploteno, caracterizado por ser una etapa larga así como por presentar cromosomas plumosos (Callebaut, 1968a, Hughes, 1963; Wylie, 1972).

Al terminar la formación de la yema, los huevos de las aves están listos para ser ovulados, llevándose a cabo la ruptura del estigma que rodea a los folículos, lo cual coincide casi exactamente al terminar la primera división meiótica, ya que la segunda división no se llevará a cabo, a menos de que los huevos sean fecundados, en una forma similar como sucede en los mamíferos, siendo esta etapa en la cual se presenta la postura en las aves, entre el 4° y 5° días de eclosión (Callebaut, 1968a; Hughes, 1963).

Ovario Izquierdo Maduro.

La gallina adulta alcanza su etapa de madurez reproductiva alrededor de la 20ª semana de edad, llegando a presentar un aumento en el peso ovárico de 0.4 a 2.0 g, presentándose un

rápido incremento en peso maduro entre 40 y 60 g, lo cual se debe al desarrollo que se está llevando a cabo en él. El ovario es muy variable en cuanto a forma y consistencia, en fase de reposo el ovario adulto tiene una forma oval aplanada y mide unos 3 cm de longitud, en cambio cuando está activo mide 5 cm o más. Simultáneamente crecen de cuatro a seis folículos hasta alcanzar un diámetro de 35 a 40 mm aproximadamente, los cuales posteriormente serán ovulados (Romanoff et al., 1949; Sisson et al., 1986).

Antes de la madurez sexual el ovario de la gallina consta de una masa de cientos de miles de pequeños folículos sin embargo, solamente unos cuantos llegan la madurez, entrando a la etapa de ovulación. El número de ovocitos que se pueden distinguir a simple vista es de alrededor de 2 500, considerándose a los folículos corticales como los más numerosos del total de ellos (Nitta et al., 1991a).

Los ovocitos pequeños tienen un color blanco grisáceo, son muy abundantes y visibles con microscopio, pueden alcanzar un número mínimo de alrededor de 12 000, aunque se ha llegado a estimar que éste número puede ser aún mayor. Del total de ovogonias, solamente unas cuantas logran completar su desarrollo, concluyendo con la eclosión (Sisson et al., 1986; Sturkie, 1967).

Cada ovocito primario está contenido dentro de un folículo, quedando en conjunto adheridos por tallos a la masa principal del ovario, la cual en las gallinas adultas contiene generalmente folículos preovulatorios en número de cuatro a seis, los que miden de 10 a 35 mm de diámetro, estos son conocidos como folículos grandes de color amarillo por su gran contenido de vitelo y constituyen una parte importante de la masa ovárica, clasificándose de acuerdo a su tamaño y secuencia ovulatoria. También se encuentran abundantes folículos < 1 mm de diámetro, los cuales se encuentran embebidos en el estroma ovárico, por lo que son denominados corticales (Sturkie, 1986).

En el ciclo de vida de la gallina, se distinguen diferentes etapas de su desarrollo, las cuales se presentan paulatinamente conforme se va dando la maduración, estos estadios inician con la eclosión y culminan en la etapa adulta con la madurez sexual.

En el siguiente cuadro se resumen las etapas que se pueden identificar durante el citado desarrollo de la gallina doméstica, desde su nacimiento, hasta llegar a la adultez en la que se adquiere la madurez (North, 1986).

ETAPAS**EDAD EN SEMANAS**

| | | | |
|------------------------|----|---|---------------|
| Pollas Jóvenes | 0 | - | 5 |
| Pollas Adultas | 5 | - | 21 |
| MADUREZ SEXUAL: | | | |
| Pollas Ponedoras | 21 | - | 23 |
| Pollas Reproductoras | 23 | - | 24 (hasta 60) |

En el ovario de la gallina se distinguen diferentes tipos de folículos (Fig. 3), los cuales se clasifican de la siguiente manera:

a) Folículos preovulatorios, que miden de 10 a 35 mm de diámetro, los cuales contienen vitelo amarillo y son denominados de acuerdo a su tamaño en orden decreciente desde F1 hasta F5. El folículo preovulatorio F1 es el de mayor tamaño y es el más próximo a ovular, los folículos que le siguen en orden decreciente de tamaño, continúan su desarrollo y van madurando, en este mismo orden son ovulados desde el F1, F2, F3, F4 hasta el F5, siendo su tamaño de 35, 30, 25, 20 y 15 mm de diámetro respectivamente, el folículo F5 es el de tamaño más pequeño. Una vez llevada a cabo la ovulación, la pared folicular remanente persiste, formando el folículo postovulatorio (Bellairs, 1965; Kikuchi et al., 1992, Sturkie, 1986).

b) Folículos amarillos pequeños que miden de 6 a 10 mm de diámetro.

c) Folículos blancos grandes cuyo tamaño va de 3 a 5 mm de diámetro, presentando un vitelo de color blanco-amarillo.

d) Folículos blancos pequeños que miden de 1 a 3 mm de diámetro y folículos pequeños corticales (inmaduros) < 1 mm de diámetro (Nitta et al., 1993).

Los folículos que entran a la jerarquía de los preovulatorios son reclutados de una vasta población de folículos inmaduros de la línea blanca, estos folículos corticales maduran pasando a través de los estadios descritos anteriormente, de tal forma que ellos pueden entrar a la jerarquía folicular hasta ser ovulados, o bien, pueden degenerar transformándose en folículos atrésicos.

El ovario maduro consta de una corteza externa también llamada zona parenquimatosa, en la que se encuentran folículos en diversos grados de maduración, incluyendo folículos atrésicos y postovulatorios en estado de regresión, así como de una médula interna provista de nervios y una vascularización rica en vasos sanguíneos y linfáticos, los cuales inervan e irrigan a las estructuras corticales (Hodges, 1974; Sisson et al., 1986).

En el ovario funcional de las aves hacia el 8° día de desarrollo, se ha demostrado la presencia de cordones epiteliales medulares delimitados por una lámina basal, los cuales ya presentan una actividad esteroideogénica (Narbaitz et al., 1968), del mismo modo, se ha detectado la biosíntesis de estrógenos en la médula ovárica (Woods et al., 1978).

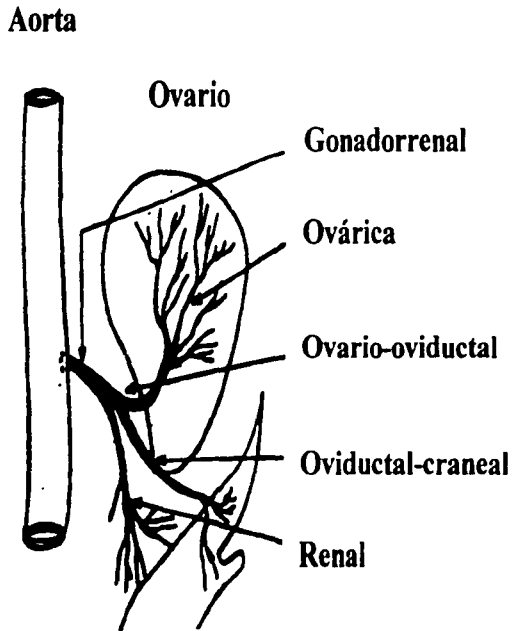
Irrigación Sanguínea. El ovario recibe su aportación sanguínea de la arteria ovárica que usualmente se origina de la arteria gonadorrenal (renolumbar) izquierda, la que puede ramificarse directamente de la aorta dorsal. La arteria ovárica se divide usualmente en 2 a 4 ramas separadas que se dirigen al pedículo folicular, ramificándose finalmente para irrigar todo el ovario (Fig.2). Unas cuantas arterias rodean al ovocito después de ramificarse y pasan a través de la teca, transformándose en arteriolas y dando lugar a una red capilar periférica de la membrana basal (Hodges, 1974; Sturkie, 1986).

Las venas que drenan la sangre al ovario se unen a través de dos venas principales, la ovárica craneal que se une a la vena suprarrenal izquierda, la cual entronca con la vena cava, y la vena ovárica caudal que desemboca directamente en la parte ventral de la vena cava, cerca de las venas ilíacas externas (Fig. 2). El sistema venoso del folículo es más prominente que el arterial, está formado por tres capas (Fig. 4): una red capilar interna localizada entre el límite de la lámina basal de la granulosa y la teca interna, una media constituida por un sistema de pequeñas venas y vasos sinusoides localizados en la teca externa, el cual se extiende vascularizando el estigma y otra periférica formada por grandes vasos sanguíneos que rodea circularmente al folículo, proyectándose desde la teca externa hasta el estroma ovárico (Hodges, 1974; Philips, 1987; Sisson et al., 1986).

Inervación. La anatomía del sistema nervioso en las aves presenta una alta complejidad, el oviducto tiene tanto una inervación simpática como parasimpática.

La inervación simpática (Freedman et al., 1963b) proviene fundamentalmente de dos sitios: 1) El plexo prevertebral que se encuentra formado por una red extensa de ganglios y nervios

a) ARTERIAS



b) VENAS

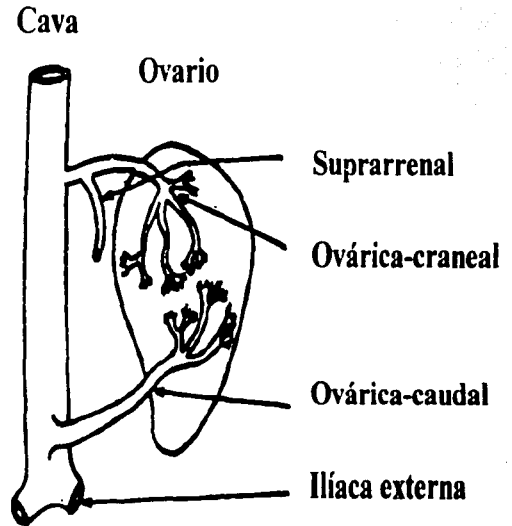


Fig. 2 Diagrama que muestra la irrigación del ovario izquierdo maduro. a) Aporte sanguíneo arterial que recibe el ovario. b) Venas que drenan la sangre del ovario. (Basado en datos de Hodges, 1965).

simpáticos relacionados ventralmente con la aorta, motivo por el cual la región del oviducto inervada por esta red es llamada plexo aórtico. Los nervios simpáticos surgen de este plexo y acompañan a la arteria isquiática (sacra) hasta su origen en la arteria media del oviducto. La mayor parte del nervio simpático que inerva el oviducto, proviene del plexo situado en el borde lateral del uréter izquierdo de la arteria media del oviducto, llamado plexo hipogástrico, cuyas ramas inervan a través de la arteria media, en el extremo craneal del oviducto al infundíbulo y mágnun, así como al istmo y útero en la región caudal (Hodges, 1974). 2) La cadena ganglionar del tronco simpático izquierdo, caudal a la arteria iliaca externa, también contribuye en forma importante a la función simpática (Freedman et al., 1963b).

La inervación parasimpática está constituida por el plexo pélvico izquierdo, que deriva de los nervios espinales 30 a 33, cada uno de estos inerva el uréter izquierdo y forma el nervio pudendo (pélvico), el cual continúa a lo largo del mismo uréter izquierdo hasta el primer segmento de la vagina, en donde se origina la arteria del mismo nombre. A lo largo del nervio pudendo, en la hembra hay ganglios cloacales izquierdos llamados ganglios uterovaginales, de los cuales el mayor y más caudal, asienta entre la unión del útero y la vagina, los nervios que se ramifican en él acompañan tanto a los vasos sanguíneos de ambos lados de la vagina, como a los del esfínter uterovaginal y a los de la porción distal del útero. El plexo correspondiente del lado derecho participa en la formación del nervio intestinal y no proporciona ninguna rama al tracto reproductor (Freedman et al., 1963b).

La inervación terminal del útero, en su unión con la vagina tiene una cantidad abundante de tejido nervioso, en relación con el istmo y el resto de la vagina. Se distinguen dos redes nerviosas complejas: la más externa consta de grandes nervios y está situada por detrás de la serosa, y la red más profunda se encuentra conectada a la red anterior, está formada por fibras simples asociadas con células musculares. También hay células ganglionares relativamente numerosas (Gilbert et al., 1963).

La inervación de la médula ovárica, está representada por pequeños haces de nervios, asociados a vasos sanguíneos y músculo liso, por el contrario, en la zona parenquimatosa o corteza del ovario, hay una red extensa de fibras nerviosas que están relacionadas principalmente con los folículos, las cuales también se encuentran asociadas a vasos

sanguíneos y músculo liso (Gilbert, 1969).

Los pedículos de los folículos son inervados por abundantes fibras nerviosas pequeñas, las que se asocian a vasos sanguíneos, músculo liso y células luteas, también se observan células nerviosas (Gilbert, 1965). La inervación de la pared folicular, se observa en los folículos en las diferentes etapas del desarrollo, tanto en los folículos pequeños como en los maduros, ésta es similar a la del pedículo, la generalidad de las fibras nerviosas se asocian a vasos sanguíneos y músculo liso, localizándose algunas de estas en la capa granulosa, se encuentran pocas células nerviosas y unas cuantas terminaciones nerviosas (Gilbert, 1965).

Del mismo modo, se ha descrito la presencia de delicados nervios en la teca interna, así como la inervación en la teca externa, de las células intersticiales o luteas, denominadas también "glándulas tecales", habiéndose demostrado la llegada de terminaciones nerviosas a ellas. En su mayoría las fibras son amielínicas, aunque algunas pueden estar mielinizadas (Dahl, 1970).

3. APARATO REPRODUCTOR DE LA GALLINA ADULTA.

La gallina adulta en etapa de franca postura, presenta un aparato reproductor en el que se distinguen el ovario y el oviducto izquierdos funcionales.

El ovario izquierdo se encuentra localizado en el extremo cefálico del riñón, unido a la pared del cuerpo a través del ligamento mesovárico mediante tejido conectivo fibroso, músculo liso, vasos sanguíneos y nervios (Hodges, 1974). A pesar de que el ovario derecho degenera, permanece en el adulto como un rudimento, estando su tamaño disminuido considerablemente (Gilbert, 1979; Sturkie, 1986).

El oviducto izquierdo ocupa completamente el cuadrante dorsal izquierdo del celoma y solamente una pequeña porción del ventral derecho, mide alrededor de 65 cm y se divide anatómicamente en 5 regiones (Fig. 3): el infundíbulo que tiene una longitud total de 4 a 10 cm, está formado por una estructura denominada embudo por su forma, la cual tiene un borde fimbriado que facilita la penetración de los ovocitos a través su orificio u ostium, en este sitio los ovocitos secundarios llevan a cabo la segunda división meiótica, en el caso de ser fecundados y permanecen aquí aproximadamente 18 min; en seguida se encuentra el cuello del infundíbulo que tiene pliegues en forma de espiral y conduce a los ovocitos a la siguiente región oviductal (Sisson et al., 1986). A continuación se encuentra el magnum que es el componente más ancho del oviducto, así como el de mayor longitud, midiendo de 20 a 48 cm, su naturaleza es glandular y en él se forma la mayor parte de la albúmina de huevo, este proceso tiene una duración de alrededor de 2.45 h. El istmo es corto, en su interior se secretan las membranas interna y externa de la cáscara, el huevo permanece aquí aproximadamente 1.14 h (Sisson et al., 1986; Sturkie, 1986).

La siguiente región del oviducto es el útero, el que es denominado también como glándula cascarógena, mide de 10 a 12 cm de largo en la gallina ponedora, sus paredes son gruesas y musculosas, el tiempo que permanece el huevo en el útero es aproximadamente 20 h, en este lapso es formado el cascarón y se adicionan agua y sales minerales a la albúmina. El pigmento de la cáscara se forma en el útero durante las últimas 5 h previas a la postura, es una porfirina de color pardo que se sintetiza a partir de ácido δ -amino levulínico (Sturkie, 1986). La vagina mide unos 12 cm, conecta al útero con la cloaca y está implicada en la expulsión del huevo, el tiempo que tardará el huevo en recorrer este trayecto es de unas

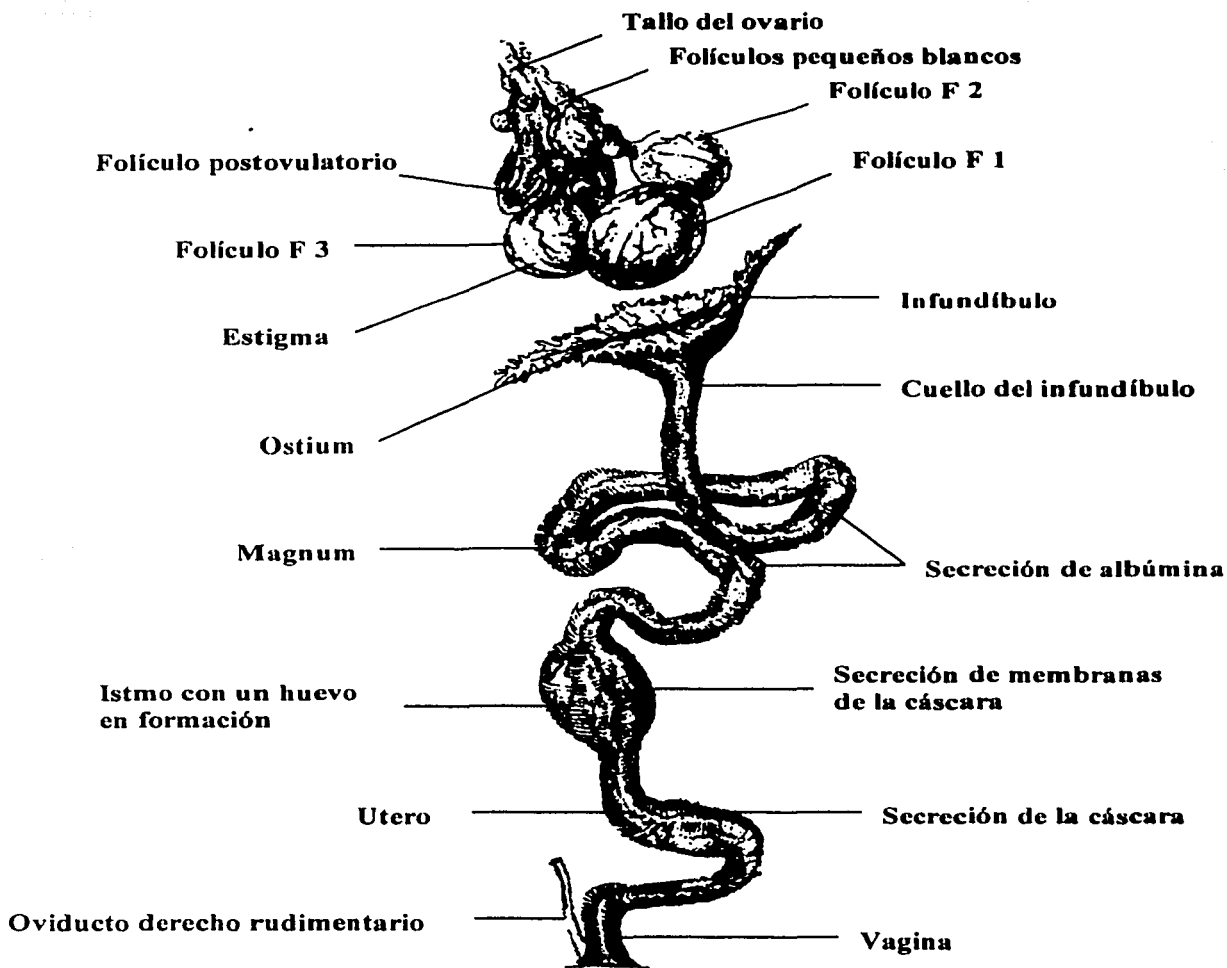


Fig. 3 Aparato genital de la gallina adulta, mostrando el oviducto izquierdo con sus regiones anatómicas. (Modificado de Romanoff et al., 1949).

24 h. Después de la postura el oviducto se reduce considerablemente en longitud, midiendo alrededor de unos 15 cm (Sturkie, 1986).

La vagina es un tubo estrecho, largo y sigmoide que se abre en la cloaca. El límite entre el útero y la vagina está marcado por un vigoroso esfínter, el cual tiene un componente muscular circular particularmente poderoso y es varias veces más grueso que cualquiera otro de los músculos que constituyen al oviducto. En la región del esfínter vaginal hay unos pliegues especialmente modificados con superficies rugosas que presentan glándulas vaginales, siendo este el principal sitio de almacenamiento de los espermatozoides, las glándulas citadas parecen contribuir a la formación de la capa de la cutícula de la cáscara del huevo. El huevo pasa a través de la vagina en unos cuantos segundos (Sisson et al., 1986; Sturkie, 1986).

4. MADURACIÓN FOLICULAR EN LA GALLINA.

En las aves las células germinales primarias se distinguen por ser de mayor tamaño, en relación a las células somáticas, así como por tener un núcleo prominente con dos grandes masas de cromatina, estas células germinales llegan a la cresta urogenital aproximadamente el día 3.5 de incubación, iniciándose la diferenciación gonadal (Hughes, 1963).

Las ovogonias llevan a cabo la primera división meiótica entre el 13° y 14° días de incubación, finalizando hacia el 20° día. Al inicio de la meiosis éstas reciben el nombre de ovocitos primarios localizándose en la zona cortical del ovario, donde se encuentran formando nidos de células germinales. Cuando el ovocito primario ha llegado a la etapa de diploteno de la primera profase meiótica, es rodeado por células foliculares planas y circundado por una membrana basal formando una unidad independiente de su medio ambiente, iniciándose así el proceso conocido como foliculogénesis (Hughes, 1963; Wylie, 1972)).

La foliculogénesis en las pollitas se completa después de la eclosión, al nacimiento el ovario se encuentra constituido por los ovocitos primarios que serán rodeados durante el 4° y 5° días postnatales por las células prefoliculares que se originan del epitelio celómico, así como por el mesénquima de la cresta urogenital (Tokarz, 1978).

Durante la ovogénesis en las aves, las ovogonias pasan por tres etapas: a) proliferación caracterizada por presentar una numerosa cantidad de ovogonias debido a la abundancia de divisiones mitóticas, b) crecimiento que consiste en un aumento de tamaño, el cual se da principalmente por la vitelogénesis, en la que se lleva a cabo la formación y acumulación de la yema y c) maduración del ovocito que comprende dos divisiones meióticas, la primera origina un ovocito secundario y el primer cuerpo polar llevándose a cabo dos horas antes de la ovulación y la segunda se realiza en el oviducto, probablemente por la penetración del espermatozoide como sucede en el caso de los mamíferos (Bradley, 1960; Carlson, 2000).

5. ESTRUCTURA DEL FOLÍCULO MADURO.

FOLICULO PREEVULATORIO.

Los folículos preevulatorios en las aves que se clasifican del F5 al F1, presentan características similares entre ellos. La pared del folículo maduro está constituida por seis capas (Fig. 4), de afuera hacia adentro son: epitelio superficial, túnica superficial, teca externa, teca interna, membrana basal, estrato granuloso y la capa intermedia que comprende el citoplasma del ovocito, la zona radiada y la membrana perivitelina que se encuentra en relación directa con el ovocito (Phillips, 1987; Van Nassauw et al., 1994).

Epitelio Superficial.- Es un componente formado por fibras que recubren la superficie folicular. A pesar de que se ha presentado una controversia, no dilucidada aún, acerca de si el epitelio superficial cubre siempre al folículo hasta el momento de la ovulación, Gilbert (1971a) describió que la totalidad del ovario, incluyendo los folículos maduros y postovulatorios, están cubiertos por este epitelio.

Túnica Superficial.- El estroma ovárico aporta la totalidad del folículo, excepto el estigma. Esta capa superficial se encuentra integrada por una red de tejido conectivo relativamente pobre si se compara con las tecas, la cual rodea al folículo y al tallo, en ella también se localiza el sistema lacunar que se comunica a la cavidad peritoneal (Van Nassauw et al., 1994). Los folículos preevulatorios se caracterizan por tener una capa superficial sumamente vascularizada, excepto en el estigma, observándose como una banda avascular localizada en la pared del folículo, situada en oposición al pedículo (Hodges, 1974).

Teca Externa.- Es la capa más ancha, ocupa la mayor superficie de la pared folicular, se localiza periféricamente y está rodeada por tejido cortical, colindando con la teca interna (Romanoff et al., 1949). Está constituida por tejido conectivo denso fibroso, así como fibras de colágena organizadas paralelamente en forma concéntrica envolviendo al folículo, siendo estas fibras más gruesas en el sitio de unión entre la teca externa y la teca interna. Entre las fibras se distinguen numerosas hileras de fibroblastos, así como algunas fibras musculares, de las cuales no ha sido bien aclarada su composición, algunos autores las proponen como células mioepiteliales (Hodges, 1974; Nitta, 1991b; Phillips, 1987).

Estudios de microscopía electrónica de la pared de folículos preevulatorios realizados en

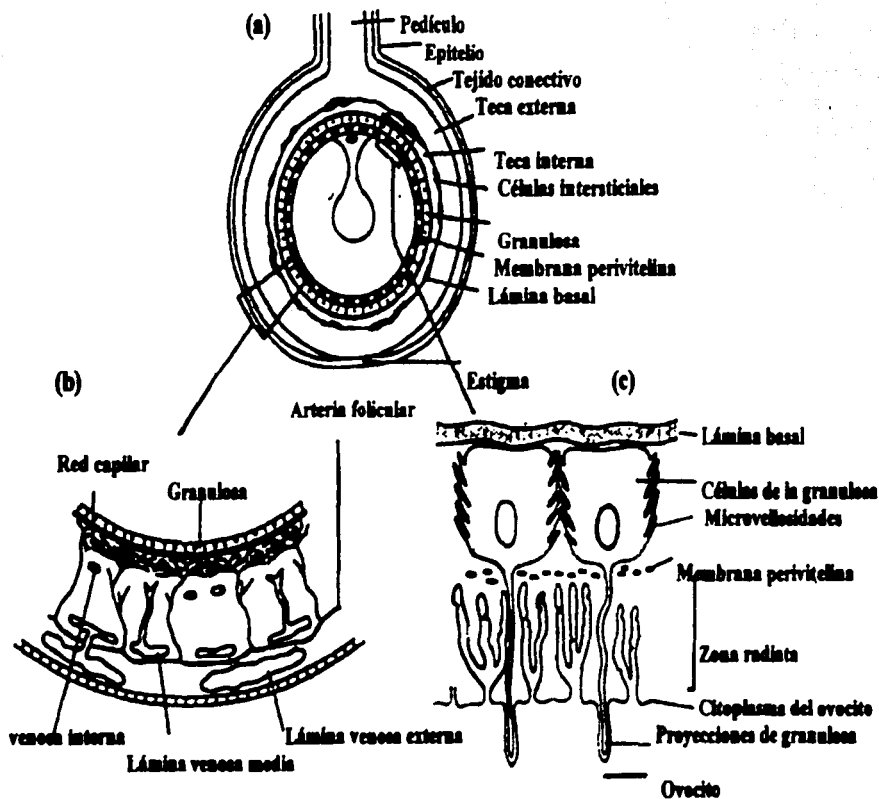


Fig. 4 Esquema de un folículo maduro. a) Estructuras que constituyen un folículo, b) Sistema vascular del folículo, c) Relación entre del estrato granuloso y el ovocito, a través de las especializaciones de membrana de las células granulosa. (Gilbert, 1979).

aves como la codorniz, han permitido demostrar claramente la presencia de fibras de músculo liso en la teca externa (Van Nassauw et al., 1992), las cuales son influidas por un control neurogénico que regula la ruptura del folículo (Dahl, 1970). La contracción de la teca externa durante la ovulación es debida a una disminución en la tensión de la pared folicular, inducida por una proteólisis del estigma en la que se localiza una abundante musculatura lisa. El papel de la teca externa durante la ovulación es mantener una presión intrafolicular constante (Van Nassauw et al., 1994).

En la teca externa, se ha referido la presencia de nidos de células intersticiales denominadas luteas, que corresponden a la llamada "glándula tecal" (Dahl, 1970). Estudios ultraestructurales de ellas, muestran que están formadas por cúmulos de células epiteliales que se localizan a lo largo del diámetro folicular, en los cuales han sido descritos dos tipos de células productoras de esteroides: unas que se localizan hacia el interior de dichos cúmulos celulares, y otras que son células "envolventes" que rodean a las primeras, localizándose en la periferia de la teca (Dahl, 1970; Nita, 1991b).

También han sido descritas en la pared de éstos folículos, estructuras denominadas "black holes", a las cuales se ha considerado como componentes del drenaje venoso, se presentan como interrupciones en las membranas foliculares y llevan una vena radial en forma de embudo, parecen constituir una adaptación del sistema circulatorio al rápido crecimiento folicular, funcionando como válvulas locales para la regulación de la circulación sanguínea a través de la teca externa, éstos se incrementan conforme avanza el desarrollo folicular. A pesar de que estas estructuras se localizan en la teca externa, se aprecian como una depresión a partir de la capa granulosa (Callebaut et al., 1990).

Teca Interna.- Es una lámina compacta de un grosor mucho menor que el de la teca externa, siendo un tercio de ella aproximadamente. Está constituida por células fibroblásticas fusiformes, así como de escasas fibras finas de colágena, en ella se localizan islotes de células esteroideogénicas típicas caracterizadas por contener abundante retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas tubulares y gotas de lípidos, estas células están en contacto directo con capilares y terminaciones nerviosas (Dahl, 1971; Gilbert, 1979).

En la teca interna se pueden distinguir tres regiones: una interna de fibras colágenas, una media en la que predominan los fibroblastos y una externa de células vacuoladas (Wyburn et

al., 1965), siendo esta la principal población de la teca interna, conociéndose como células intersticiales, glandulares o esteroideogénicas debido a que son productoras de esteroides (Nitta et al., 1991b), ellas se caracterizan por contener abundantes inclusiones lipídicas.

El grosor de las tecas, tanto externa como interna, así como su estructura, se van modificando de acuerdo al grado de desarrollo del folículo. No existe diferenciación de la capa tecal en su porción externa e interna en los folículos <1 mm de diámetro, conforme se va incrementando su tamaño, se empiezan a distinguir estas dos capas (Hodges, 1974)

Estrato Granuloso.- Esta membrana denominada también epitelio folicular, se encuentra rodeando al ovocito (Fig. 5). Las células del estrato granuloso aparecen por vez primera en los folículos primordiales, inmediatamente después de la eclosión, generalmente proceden del epitelio germinativo a través de los cordones sexuales primarios.

En un principio los ovocitos primarios están rodeados por una simple capa de células planas que mide de 0.01 a 0.02 mm. La granulosa en los folículos de 2 a 4 mm de diámetro, tiene el grosor de una a dos células (Romanoff et al., 1949; Wyburn et al., 1965), conforme transcurre la diferenciación folicular las células granulosas que son relativamente planas, se incrementan y forman una sola capa de células cúbicas (Guraya, 1968; Bellaris, 1965), constituyendo posteriormente un epitelio pseudoestratificado que mide de 0.4 mm en los folículos menores, a 4.0 mm en los de tamaño intermedio (Bellaris, 1965), este epitelio conserva su estructura histológica en las aves, a diferencia de lo que sucede en los mamíferos, en los cuales se lleva a cabo una estratificación de éste. El núcleo de las células granulosas es grande, esférico y contiene parches de cromatina condensada, y en su citoplasma hay abundantes gránulos lipídicos (Gilbert, 1979; Hodges, 1974).

Al inicio de la vitelogénesis las células de la capa granulosa disminuyen su tamaño y reducen la cantidad de sus organelos, solamente el retículo endoplásmico liso y las mitocondrias de crestas tubulares son abundantes. Parece ser que las células foliculares secretan lípidos, principalmente triglicéridos y fosfolípidos, glucógeno, proteínas y ARN, los cuales migran hasta el citoplasma del ovocito, sirviendo como nutrientes del mismo y colaborando en la formación de los gránulos de vitelo (Gilbert, 1979; Wells et al., 1984).

Las células granulosas llevan en la superficie apical prolongaciones celulares, las que se proyectan hacia el ovocito, permitiendo una comunicación continua entre ellos. La

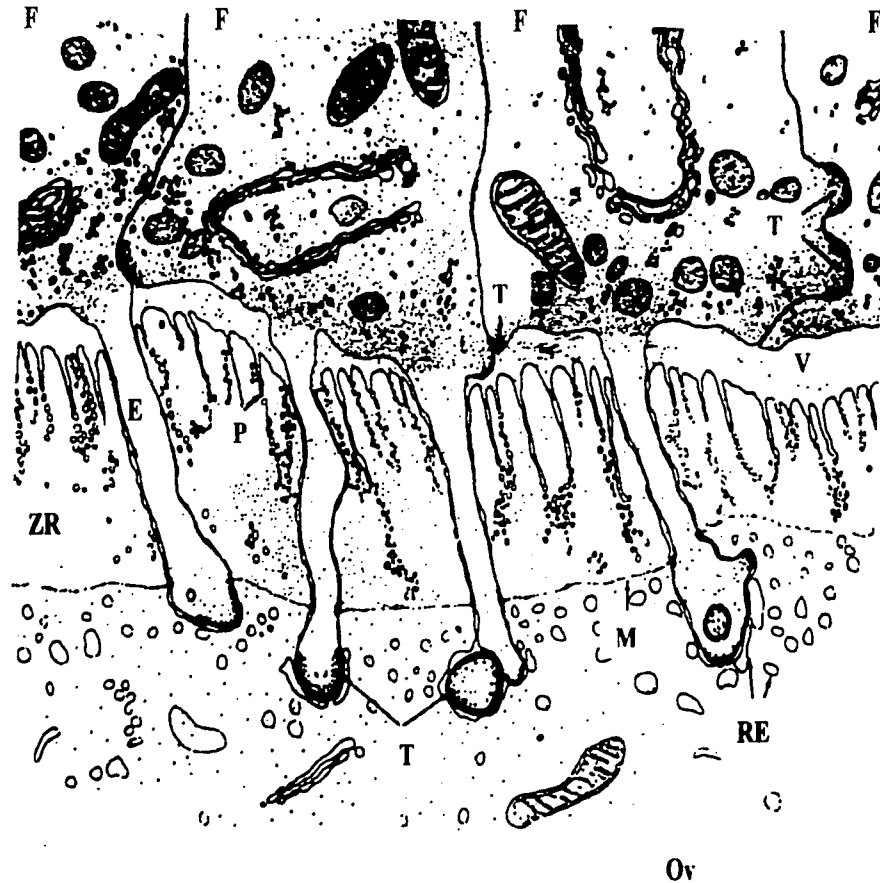


Fig. 5 Esquematzación de la zona radiada (ZR) de un folículo de 3 mm en el que se aprecian extensiones (E) de las células foliculares hacia el ovocito (Ov), las que se relacionan con él a través de los "lining bodies" o transomas (T). Se observan células foliculares (F), la membrana perivitelina (V) y canales pinocíticos (P), hacia el ovocito se encuentran uniones de membrana (M) y retículo endoplásmico (RE). After Press (1964).

membrana vitelina queda ubicada entre las proyecciones de células granulosas y el trayecto que estas siguen hacia el ovocito. Estas estructuras constituyen adaptaciones de superficie de membrana altamente especializadas poco comunes, características de los folículos previtelogénicos de las aves, conocidos como premitocondrias, transosomas o "lining bodies" (Fig. 5). El citoplasma de estas células lleva un alto contenido de organelos, sus mitocondrias son ovoides o alargadas con crestas transversales y llevan numerosas vesículas y vacuolas de diferentes tamaños y contenidos (Hodges, 1974).

Los transosomas o "lining bodies" se originan del epitelio folicular y aumentan en número justo antes del depósito de vitelo. Se ha pensado que corresponden a bolsas de ribosomas que son activos en la elaboración de enzimas involucradas en la organización, modificación y eventual lisis del gránulo de vitelo. También ha sido sugerido que intervienen en la transferencia de material de las células foliculares al ovocito (Gilbert, 1979; Guraya, 1978; Wyburn et al., 1965).

La membrana basal de la capa granulosa está muy bien desarrollada, mide aproximadamente 1 μm de grosor, aunque varía de acuerdo a los estadios de crecimiento folicular, se encuentra limitando a la teca interna y el estrato granuloso, químicamente está compuesta por glucoproteína y fibronectina (Hodges, 1974), así como laminina y colágena $\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$ que forman una red que sirve como estructura para el depósito de otros materiales extracelulares (Karp, 1996).

Membrana Intermedia.- Es la capa más interna de las seis capas foliculares, la cual ha sido muy discutida, debido a que está formada por un número variable de componentes, de los cuales, los primeros en aparecer son la membrana perivitelina y la zona radiada, que se forman en el período de máximo crecimiento del ovocito (Fig. 5). Con las observaciones llevadas a cabo con microscopía electrónica de estas estructuras, parece que se ha aclarado como está constituida la anatomía de los componentes de la membrana intermedia, ya que con la microscopía de luz, ésta era confusa (Gilbert, 1971a; Wyburn et al., 1965).

La clasificación de las membranas del huevo sugerida por Boyd et al. (1952), permitió ordenar la nomenclatura confusa a este respecto. En esta clasificación, una membrana primaria del huevo está formada por el citoplasma del propio ovocito, una membrana secundaria del huevo es producida por las células del folículo del ovario y una membrana

terciaria del huevo es adicionada por el útero o el oviducto. De acuerdo con ésta clasificación, la capa mas interna del folículo maduro está formada por tres componentes principales desde afuera hacia adentro: la membrana perivitelina que es una membrana secundaria del huevo; la zona radiada que es una membrana primaria del huevo, formada por prolongaciones citoplásmicas foliculares; y el citoplasma del ovocito que es también una membrana primaria.

Membrana Perivitelina.- Es una zona estrecha situada entre el ovocito y las células granulosas adyacentes, sirviendo de límite a estas dos estructuras (Fig. 5). La microscopia electrónica ha permitido dilucidar que es una zona de sustancia acelular, formada por la secreción de las células granulosas, por lo tanto es una membrana secundaria del huevo, esta membrana aparece en folículos de 7 mm, midiendo 1 μ m de espesor y en los folículos de 15 mm, su grosor se duplica (Hodges, 1974; Wyburn et al., 1965). La membrana perivitelina se ha considerado homóloga de la zona pelúcida de los mamíferos y también se ha descrito en las aves un espacio perivitelino (Romanoff et al., 1949), mismo que algunos autores consideran que es propiamente la misma membrana perivitelina.

Zona Radiada.- Esta región es estrecha y presenta una estriación radial formada por finas prolongaciones citoplásmicas que relacionan al citoplasma del ovocito con la membrana perivitelina (Fig. 5). El ovocito está limitado externamente por su membrana plasmática y por la membrana perivitelina (Hodges, 1974). La zona radiada se modifica a través del desarrollo folicular, disminuyendo su tamaño conforme se va dando la maduración del folículo. En el folículo de 7 mm mide cerca de 5 μ m de grosor, viéndose como una serie de prolongaciones citoplásmicas digitiformes y en el folículo de 15 mm, estas prolongaciones citoplásmicas se relacionan con las proyecciones de las células granulosas conocidas como "lining bodies", los cuales se abren paso entre las prolongaciones citoplásmicas de la zona radiada, hasta contactarse con el citoplasma del ovocito (Bellaris, 1965; Wyburn et al., 1965).

La función de las proyecciones citoplásmicas de la zona radiada es aumentar la superficie de absorción, colaborando para que se lleve a cabo el paso de sustancias de la membrana perivitelina hacia el citoplasma del ovocito, así como facilitar el transporte de nutrientes hacia el interior del mismo para que se forme la yema. Entre la zona radiada y el citoplasma

del ovocito se observa la presencia de vesículas pinocíticas, que probablemente contribuyen también para el transporte de dichas sustancias (Gilbert, 1971a).

Las prolongaciones citoplásmicas de la zona radiada, son evaginaciones transitorias de la membrana vitelina, cada una de las cuales contiene citoplasma del ovocito, por lo que es clasificada como una membrana primaria del huevo. Por su misma naturaleza, existe una controversia acerca de si puede ser considerada como una verdadera membrana (Hodges, 1974; Phillips, 1987; Sisson et al., 1986).

La zona radiada descrita anteriormente para las aves, no debe confundirse con la corona radiada de los mamíferos, ésta última es una capa formada por células granulosas que se adhiere al ovocito aún después de la ovulación. Aunque se ha descrito una verdadera corona radiada en las aves (Bradley, 1960), no hay otros autores que confirmen su presencia.

Estigma.- Cabe aclarar que no es una capa del folículo maduro. Es una banda meridional blanca que mide unos 2 mm de ancho y se localiza en la superficie de todos los folículos mayores de 4 mm de diámetro. Según las observaciones de Romanoff et al. (1949) y Van Nassauw (1994), la región del estigma está situada adyacente a las células tecales, es compacta y se considera como una zona prácticamente avascular, debido a que se encuentra irrigada solo por unos cuantos vasos (arterias y venas) de pequeño calibre, está formada principalmente por células musculares de tipo liso (Hodges, 1974). Durante la ovulación, se ha observado que el estigma es el sitio en donde se rompe el folículo, permitiendo la liberación del ovocito.

Pedículo o Tallo Folicular.- En el folículo maduro se encuentra constituido por tejido conectivo, músculo liso, células glandulares, vasos sanguíneos y abundante tejido nervioso. El pedículo mantiene unidos a los folículos de diferentes estadios a la masa ovárica, dando el aspecto de un racimo de uvas (Hodges, 1974; Sisson et al., 1986; Sturkie, 1986).

FOLÍCULO POSTOVULATORIO.

Inmediatamente después de la ovulación el folículo se contrae debido a lo cual las paredes foliculares se engruesan, observándose en particular un aumento de las células de la granulosa. El folículo tiene una total regresión en unos cuantos días y es reabsorbido dentro del tejido ovárico. En la gallina en etapa activa de postura, se pueden observar de cuatro a

seis folículos postovulatorios en diferentes estadios (Hodges, 1974 ; Van Nassaw, 1994).

Los folículos postovulatorios presentan cambios histológicos graduales importantes, los cuales se empiezan a hacer evidentes en términos generales después del tercer día de la ovulación, dentro de dichos cambios podemos destacar los siguientes:

Estadio 1) Una vez realizada la ovulación se forma un nuevo folículo postovulatorio, el que se contrae rápidamente como consecuencia de la contracción de la teca, la cual presenta hemorragia de sus capilares. Del mismo modo, las células de la granulosa empiezan a hipertrofiarse y algunas se desprenden.

Estadio 2) Las células hipertróficas de la granulosa dan un aspecto de sincicio multilaminar y la membrana basal se rompe en algunas zonas. La granulosa y la teca interna muestran sus células vacuoladas y la teca externa se empieza a transformar en una capa más fibrosa.

Estadio 3) El folículo se muestra contraído y ocupado por las células granulosas, no distinguiéndose ya el punto de la ruptura folicular. Las células granulosas están vacuoladas, la membrana basal se fragmenta desapareciendo gradualmente y los fibroblastos invaden las células de la granulosa y de la teca interna.

Estadio 4) El tamaño del folículo disminuye considerablemente. La granulosa muestra sus células con núcleos picnóticos, existe un incremento de las vesículas lipídicas, desintegración de organelos celulares y finalmente la desaparición de éstas. Las láminas tecales son indistinguibles y sumamente fibrosas. Los procesos degenerativos continúan y cuando concluye la regresión los restos de los folículos preovulatorios pasan a formar parte del estroma.

Los folículos postovulatorios tienden a involucionar rápidamente, aunque su funcionalidad se mantienen de 3 a 4 días, su mayor actividad se da en las primeras 24 h, siendo identificables hasta los 10 a 15 días. Parece ser que sus funciones están asociadas con la estimulación y control de la actividad del oviducto, transporte del huevo e instinto de nidación (Saidapur, 1982).

FOLÍCULO ATRÉSICO.

Son los folículos que van degenerando a través del proceso de maduración folicular, se encuentran normalmente en ovarios funcionales y se han descrito tres tipos de ellos. El

primer tipo de atresia es la más común y se presenta en folículos que miden aproximadamente 500 μm de diámetro, las células granulosas de los cuales empiezan a proliferar formando numerosas e irregulares capas alrededor del ovocito, al mismo tiempo que este va disminuyendo en su tamaño. Dichas capas celulares terminan por ocupar completamente al folículo, esta masa celular es invadida por células de la teca haciéndose heterogénea y finalmente se hialiniza, formando una cicatriz de tejido conectivo fibroso.

El segundo tipo de atresia es la más frecuente en aves viejas, las capas granulosa y teca proliferan en el interior del folículo haciéndose hipertróficas e hiperplásicas. Las células de la granulosa migran hacia el estroma y junto con el ovocito presentan una degeneración grasa, se hialinizan y el folículo se colapsa.

El tercer tipo se presenta tanto en ovarios jóvenes como viejos, en folículos mayores de 1.5 mm de diámetro se observa que mientras la capa granulosa permanece inactiva, la capa teca muestra una gran vascularización e hipertrofia. Posteriormente la granulosa prolifera e invade en su totalidad al folículo, sufriendo este una degeneración completa y consecuentemente la formación de una gran cicatriz, la que es más evidente que en los dos tipos de atresia anteriormente mencionados (Gilbert et al., 1981; Hodges, 1974).

6. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS- GÓNADA EN LAS AVES.

El florecimiento de la endocrinología reproductiva entre 1920 y 1940, permitió entender la función endocrinológica del proceso reproductivo, ya que las funciones de los componentes del aparato reproductor son coordinadas por la acción de las hormonas sexuales, las cuales llevan a cabo una serie de interacciones complejas para la regulación hormonal de los fenómenos reproductivos. En dichos años, se pudieron detectar las hormonas sexuales y las vías de control entre la glándula hipofisiaria y los órganos de la reproducción durante las diferentes etapas del ciclo sexual, a lo cual se le conoce como eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Young, 1961).

Para que se lleve a cabo el ciclo sexual, se requiere de la integridad anatómica y funcional de los órganos que forman el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, mediados por sus hormonas, lo que constituye la unidad funcional de la reproducción, la cual está integrada por: a) eje neuroendocrino central (sistema nervioso central) formado por el hipotálamo e hipófisis, b) eje endocrino periférico formado por el ovario, las suprarrenales y algunos otros tejidos blanco específicos (en aves los efectos de estrógenos y progesterona sobre el oviducto, depósito de grasa, etc.) (García et al., 1987).

Las glándulas u órganos endocrinos en las aves son: hipófisis o pituitaria, tiroides, paratiroides, adrenales, páncreas, gónadas e intestino. Los cuatro primeros son órganos endocrinos estrictos, mientras que los tres últimos realizan tanto funciones endocrinas como exocrinas.

Hipófisis.

La hipófisis o pituitaria es un órgano endocrino principal, debido a que elabora hormonas que tienen la capacidad de estimular a otras glándulas para que a su vez segreguen hormonas diferentes, tal es el caso del testículo y el ovario que segregan andrógenos y estrógenos respectivamente.

Esta glándula en la gallina está ubicada en la depresión de la silla turca del hueso esfenoides, inmediatamente por detrás del quiasma óptico, en el piso del diencéfalo. El cuerpo de la hipófisis está formado por la adenohipófisis, que es la porción glandular (lóbulo anterior) y la neurohipófisis (lóbulo posterior), no está presente el lóbulo intermedio, como ocurre en

los mamíferos. Tanto la adenohipófisis que deriva de la bolsa de Rathke (evaginación del estomodeo), como la neurohipófisis que deriva del diencefalo (evaginación de la región del infundibulum), son de origen ectodérmico. La adenohipófisis y la neurohipófisis se encuentran separadas por una capa de tejido conectivo (Phillips, 1987; Sisson et al., 1986; Sturkie, 1986).

El hipotálamo tiene estructuras formadas por células neurosecretoras (núcleos supraópticos, paraventriculares e infundibulares), cuyos axones forman haces de fibras (haces supraóptico-hipofisiario, paraventricular-hipofisiario y túbero-hipofisiario). Las secreciones producidas por las citadas células, migran hacia abajo a través de sus axones, hasta llegar a la neurohipófisis directamente, sin embargo, hay evidencias de que los productos neurosecretorios hipotalámicos en las aves, alcanzan la adenohipófisis y la estimulan para liberar hormonas, en una forma similar a los mamíferos (Sturkie, 1986).

Lóbulo Anterior.

El lóbulo anterior de la hipófisis de las aves, como en los mamíferos, produce las hormonas adrenocorticotrófica (ACTH), tirotropina o tirotrófica (TSH), foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH), prolactina (PRL) y la hormona del crecimiento (GH) o somatotropina (HST).

La FSH, LH y prolactina son denominadas genéricamente hormonas gonadotrópicas, las cuales han sido detectadas en la hipófisis de aves (Godden et al., 1975), así como en embriones de pollo, a partir de etapas tempranas del desarrollo (Sturkie, 1986)

El crecimiento y maduración de los folículos ováricos depende directamente de la acción de la FSH sobre los mismos, conforme se va aproximado la hembra a la madurez sexual, los folículos inmaduros empiezan a crecer rápidamente.

La ovulación es inducida por la liberación cíclica de la LH, esta secreción de la pituitaria se lleva a cabo 4 a 6 h antes del momento de la ovulación (Etches et al., 1976a). El primer folículo ovárico liberado de una secuencia de folículos preovulatorios, es más sensible a una cierta concentración de la hormona ovulatoria, con respecto al resto de este grupo de folículos.

En la citología de la adenohipófisis aviar, se han descrito los siguientes tipos de células: cromófobas (no están formadas por gránulos) que son células inactivas o de reserva (dan

origen a las cromófilas) y cromófilas (contienen gránulos de hormona almacenada) que se subdividen en acidófilas que tienen grandes gránulos y basófilas que contienen gránulos pequeños. Las basófilas son responsables de las secreciones tirotrópicas que se caracterizan por regular funciones de órganos endocrinos diferentes a los que producen las secreciones (todas las adenohipofisarias, menos la GH) y las gonadotrópicas (FSH y LH). Las acidófilas son productoras de PRL y de HG (Ganong, 1991; Herlant et. al., 1960).

Existe controversia respecto a la edad exacta en la cual aparecen por primera vez los gránulos secretores, sin embargo, está aceptado que es en etapas tempranas del desarrollo (Sturkie, 1986).

Durante los periodos de "cloquez" (incubación o empollamiento) de la gallina se producen las mayores cantidades de prolactina, decreciendo extraordinariamente el número de células basófilas de la pituitaria, siendo reemplazadas por pequeñas células acidófilas o "células de la cloquez" (Yasuda, 1953).

La prolactina es la hormona responsable de la secreción de leche en los mamíferos, en cambio en la gallina se ha visto que ésta ejerce influencia en la incubación de los huevos, hecho que se ha comprobado mediante la inyección de prolactina en aquellas razas que muestran una tendencia natural a empollar. También se sabe que la prolactina tiene una acción antigonal, ya que actúa suprimiendo la liberación de la FSH, la cual es indispensable para la estimulación folicular (Phillips, 1987; Saeki et al., 1955).

Por otro lado, se ha demostrado que la prolactina contenida en la pituitaria, tiende a ser inversamente proporcional a los niveles de FSH y LH, pudiendo ser interrumpido el periodo de incubación de los huevos por administración de estrógenos, sin embargo, se ha encontrado que la progesterona induce el comportamiento de la etapa de incubación, lo que sugiere que éste proceso estimula la secreción de prolactina (Lehrman et al., 1961).

Lóbulo Posterior.

El lóbulo posterior o neurohipófisis se asienta cerca del infundíbulo, no existe un lóbulo intermedio estructural como en los mamíferos, encontrándose ocasionalmente como una estructura rudimentaria, quedando la neurohipófisis separada de la adenohipófisis, por una lámina de tejido conectivo. En la gallina existe una circulación portal de la hipófisis que relaciona a la adenohipófisis con la neurohipófisis, recibiendo estos vasos fibras nerviosas de

el tracto hipotálamo-hipofisiario (Sisson et al., 1986).

El proceso reproductivo de las aves está influido tanto por estímulos del medio ambiente como por factores hormonales neuroendócrinos, ambos regulados por el sistema nervioso central a través de una vía vascular entre hipotálamo e hipófisis, lo que a su vez coordina el ciclo sexual (Young, 1961).

La neurohipófisis aviar contiene las hormonas oxitocina y arginina-vasotocina y *o*/mesotocina, hormonas que han sido asociadas con la contracción uterina en el proceso de la oviposición, de las cuales la oxitocina es sintetizada principalmente por las neuronas del núcleo paraventricular y tiene una potencia extraordinaria sobre la musculatura lisa, contribuyendo en una forma importante para que se lleven a cabo las contracciones del oviducto en las aves domésticas para que el huevo sea expulsado al exterior durante la postura (Phillips, 1987; Sturkie, 1986).

Las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipofisiario de las aves se han puesto en evidencia con numerosos estudios realizados, tales como la demostración de la secreción de hormonas estrogénicas, señalando al 17β -estradiol como uno de los estrógenos más importantes que intervienen en la reproducción de las aves, el cual juega un papel muy importante en la síntesis protéica, en la producción de diferentes tipos de ARN, en la duplicación del ADN, así como también interviene en la inducción del crecimiento del oviducto y la movilización del embrión de las aves dentro del huevo (Gilbert, 1981, 2000).

Del mismo modo, se ha comprobado que la administración de LH tiene un efecto sobre la secreción de estradiol, detectándose desde la etapa embrionaria en el ovario del pollo, entre el 7.5° y 9° días de desarrollo, un incremento en la síntesis de estrógenos, de tal modo que es posible encontrar cambios morfológicos en el ovario desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (Woods et al., 1981).

Hormonas Gonadales.

Las principales hormonas gonadales de las aves son andrógenos, estrógenos y progesterona, cuya naturaleza química es esteroidea. Estas hormonas denominadas sexuales, son secretadas en el ovario de la gallina, llevando a cabo importantes efectos fisiológicos y anatómicos ya que determinan los caracteres sexuales secundarios como son: el tamaño y

forma de la cresta, el color y estructura del plumaje, la emisión de sonidos (voz), temperamento y depósito de la grasa corporal. Del mismo modo, influyen en la conducta sexual e interviene en el metabolismo del calcio tanto en el hueso como en el intestino, regulan la síntesis de lipoproteínas hepáticas y en el oviducto son responsables del incremento de su tamaño, así como de la síntesis de proteínas y el movimiento del huevo a través de este (Gilbert, 1971b; Huang et al., 1979; Nitta et al., 199a; Wells et al., 1984).

Las gonadotropinas juegan un papel muy importante en el patrón de regulación del crecimiento y maduración de los folículos ováricos, estas son transportadas por el torrente sanguíneo desde la adenohipófisis, en donde son secretadas, hasta el ovario sobre el cual actúan.

Las gonadotropinas ejercen su acción mediadas por receptores específicos localizados en la membrana plasmática de los órganos blanco. La señal hormonal se transmite al interior de la célula mediante un mecanismo de ampliación de la señal que requiere de adenosin-monofosfato cíclico (cAMP) como segundo mensajero. La interacción hormona-receptor permite la activación de una enzima de la membrana plasmática denominada adenilato ciclasa que transforma el adenosin-trifostato hasta cAMP, utilizando Mg^{++} como cofactor (Kowalski et al., 1991).

BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES.

La síntesis de esteroides sexuales involucra la participación de las enzimas del complejo conocido como P450, así como otras oxido-reductasas.

Los citocromos P450 representan una superfamilia de hemoproteínas monooxigenasas que juegan un papel muy importante en el metabolismo de una amplia variedad de sustratos endógenos y exógenos, estas hemoproteínas contienen además, otras proteínas que participan en la transferencia de electrones y protones a partir de fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH).

El grado de oxidación del Fe^{++} central del grupo hem de los citocromos P450 le confiere características espectrales, este grupo es el sitio activo de la enzima y se une al sustrato y al oxígeno molecular según su estado de oxidación. El monóxido de carbono compite con el O_2 por el sitio activo de la enzima, inhibiendo de este modo la acción enzimática, ésta

interacción del grupo hem en estado reducido, presenta un pico máximo de absorción de 450 nm, hecho del cual deriva su nombre de complejo P450.

Las reacciones catalizadas por las enzimas de P450 pueden presentar una monooxigenación (hidroxilación), o una serie de monooxigenaciones específicas que dan por resultado la ruptura de enlaces C-C, o la aromatización del anillo A del esteroide. Los citocromos esteroideos están asociados a la membrana mitocondrial interna o a la membrana del retículo endoplásmico liso (Hanukoglu, 1992).

La actividad biosintética de hormonas esteroideas en la capa granulosa aislada de folículos preovulatorios, ha permitido detectar una gran producción de progesterona en los folículos preovulatorios próximos a ovular, la cual es prácticamente inexistente en los folículos inmaduros (Huang, 1979; Nitta et al., 1991b).

Estudios moleculares han puesto en evidencia que el gene para la P450arom, enzima implicada en la síntesis de 17β - estradiol, se expresa en la médula de las gónadas tanto izquierda como derecha de embriones de pollo hembras, pero no en las gónadas de embriones machos, así como el gene receptor de estrógenos, es expresado solamente en el epitelio de la gónada izquierda de ambos sexos, aunque ésta expresión es temporal en los embriones de los machos, restringiéndose a las etapas tempranas de su desarrollo, a diferencia de las hembras en las que además de persistir dicha expresión, en etapas tardías también se expresa el gene receptor de estrógenos en la corteza. La diferencia de la expresión de estos dos genes, permite entender porque se lleva a cabo la diferenciación gonadal en las aves (Nakabayashi et al., 1998; Yoshida et al., 1996).

La administración de 17β -estradiol, en embriones de pollo entre el 5° y 14° días de incubación, inhibe la expresión del gene receptor de estrógenos en la gónada derecha de embriones tanto de machos como de hembras, lo que sugiere que la ausencia de la expresión del gene receptor de estrógenos en la gónada derecha, puede ser considerada como un factor importante en el desarrollo unilateral ovárico de las aves. La expresión diferencial de éstos dos genes, contribuye a explicar el porqué del desarrollo gonadal desigual en las hembras respecto a los machos, así como el proceso de gonadogénesis unilateral en los embriones de pollo de hembras genéticas, en las cuales sólo el ovario izquierdo alcanza su total desarrollo (Nakabayashi, et al., 1998).

Así mismo, la expresión de P450_{17α} hidroxilasa, ha sido detectada por hibridación "in situ" a partir del 5° al 6° día de incubación, tanto en testículos de pollos machos como en el ovario vestigial derecho de la hembra, encontrándose en concentraciones altas en el lapso del 10° día de incubación al 7° día posteclosión. Por el contrario, sólo en el ovario izquierdo de la hembra se han evidenciado niveles altos de P450_{arom}, desde el 6.5° día de incubación, manteniéndose así, incluso hasta el 7° día posteclosión (Yoshida et al., 1996). Esto sugiere que la expresión de la P450_{arom} se relaciona con la diferenciación sexual (Elbrecht, et al., 1992), feminizándose el ovario izquierdo de las hembras genéticas por aumento en la producción de estrógenos (Woods et al., 1978), que juegan el papel de promotores de la proliferación celular en dicha gónada, hasta alcanzar su desarrollo normal, en contraste con la gónada del macho genético que tiene una marcada expresión de P450_{17α}, que induce a la producción de andrógenos promoviendo el desarrollo de los testículos, ya que en estos se lleva a cabo una pobre expresión de P450_{arom} (Yoshida et al., 1996).

Las hormonas esteroideas se sintetizan en órganos de secreción interna, que son las gónadas (ovarios y testículos) y las suprarrenales, éstos vierten sus secreciones al torrente sanguíneo ejerciendo un efecto específico sobre las células del órgano blanco.

Los esteroides son lípidos insaponificables, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, contienen en su molécula un núcleo común a ellos, denominado ciclopentanoperhidrofenantreno, formado por 17 átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis carbonos cada uno, denominados como anillos A, B y C, además de un anillo de 5 carbonos que es el D (Fig. 6). Los carbonos adicionales pueden agregarse en las posiciones 10 y 13, o como una cadena lateral unida al carbono 17, las hormonas esteroideas así como sus precursores y metabolitos difieren en el número y tipo de grupos sustituidos, en el número y ubicación de las dobles ligaduras y en la configuración estereoquímica (Murray et al., 1994).

Colesterol.

Es el principal precursor de la biosíntesis de las hormonas esteroideas, siendo este un intermediario obligado para la formación de ellas. Tiene una estructura química cíclica de 27 átomos de carbono que se forma mediante una serie de reacciones bioquímicas, a partir de un terpeno de cadena lineal de 30 átomos de carbono, el cual da origen al escualeno, que es

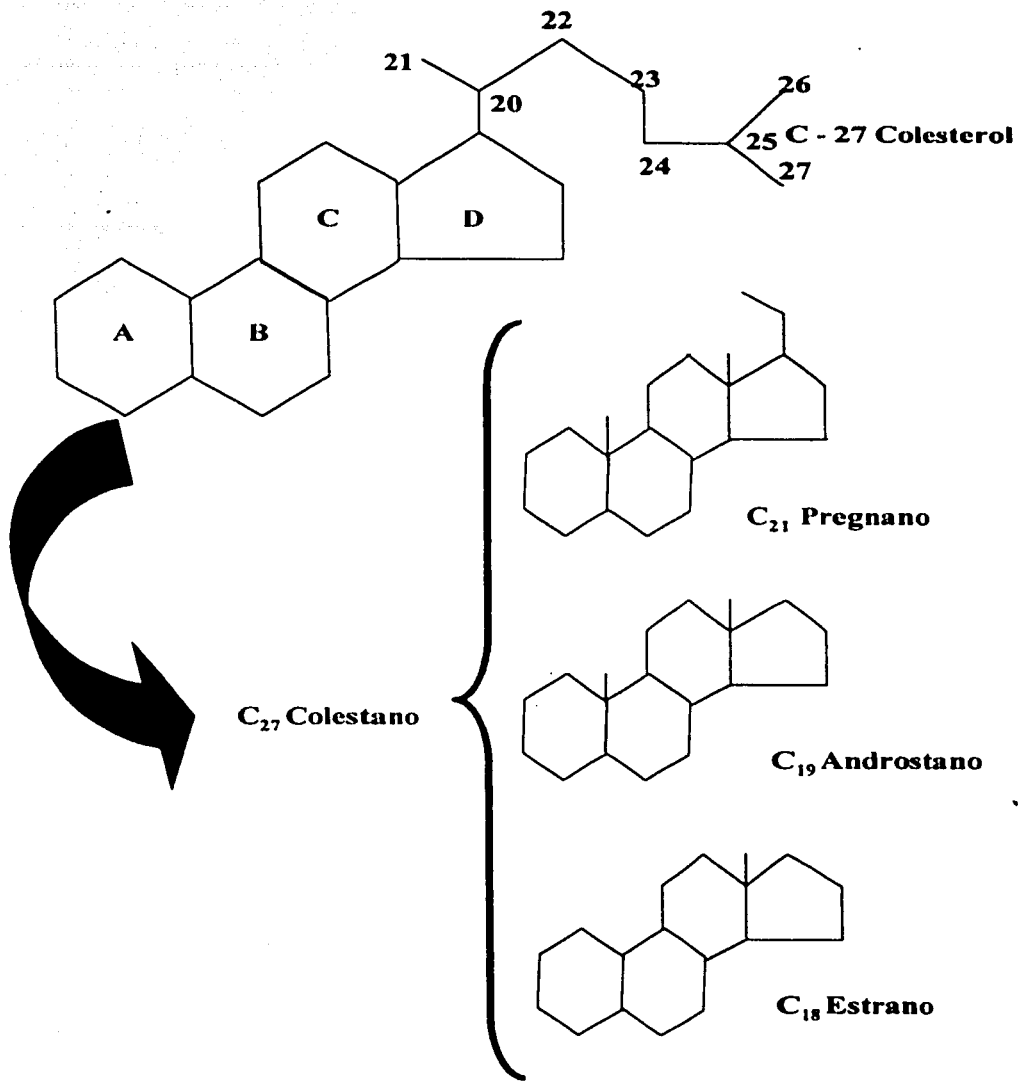


Fig. 6 Nomenclatura de las hormonas esteroides y sus núcleos principales.
 (García et al., 1987).

el precursor del colesterol, a través de la síntesis del lanosterol (Murray et al., 1994).

En la biosíntesis del colesterol se pueden distinguir cinco etapas: 1) La síntesis de mevalonato, a partir de acetil-CoA, 2) Formación de unidades isoprenoides por pérdida de CO₂ del mevalonato, 3) Condensación de seis unidades isoprenoides para formar al escualeno, 4) Ciclización del escualeno para dar origen al lanosterol y 5) El lanosterol forma al colesterol a través de varios pasos, incluyendo la pérdida de tres grupos metilo (Fig 7).

Las células esteroideas obtienen el colesterol de tres fuentes: a) síntesis "de novo" a partir de acetato que proviene de la oxidación de ácidos grasos en el hígado, b) incorporación de lipoproteínas del torrente sanguíneo y c) gotas intracelulares de ésteres del colesterol del citoplasma (Anderson et al., 1978; Murray et al., 1994)

Las hormonas esteroideas derivan de los hidrocarburos básicos que tienen la estructura cíclica del colesterol (Murray et al., 1994), el cual pertenece al grupo colestano (C₂₇) que es la molécula precursora de las hormonas esteroideas, cuya nomenclatura se da en relación a el número de metilos angulares, de acuerdo a lo cual tenemos: el pregnano (C₂₁) característico de las hormonas esteroideas que tienen una actividad progestacional, glucocorticoide o mineralocorticoide; el androstano (C₁₉) que constituye la estructura química de las hormonas esteroideas con actividad andrógena y el estrano (C₁₈) que incluye los esteroides de tipo estrogénico (Fig. 6).

Biosíntesis de Pregnelonona.

Se lleva a cabo en las células esteroideas por intervención de hidroxilasas y liasas que desdoblan y oxidan los ésteres de colesterol en su cadena lateral, la enzima colesterol-hidroxilasa actúa al nivel de la membrana interna de la mitocondria, sitio en el cual el colesterol es convertido a pregnenolona (Kimura, 1981).

Cabe hacer la aclaración de que la conversión del colesterol a pregnenolona es idéntica en suprarrenal, ovario y testículo.

En la síntesis de esta hormona se realizan tres reacciones de hidroxilación por la acción del citocromo P450_{scc} (side chain cleavage), dos de las cuales se llevan a cabo en posición C-20 y C-22, dando la tercera como resultado la ruptura del enlace entre dichos carbonos, eliminándose la cadena terminal de seis carbonos del colesterol y produciéndose como consecuencia pregnenolona y aldehído isocáprico (Fig. 8).

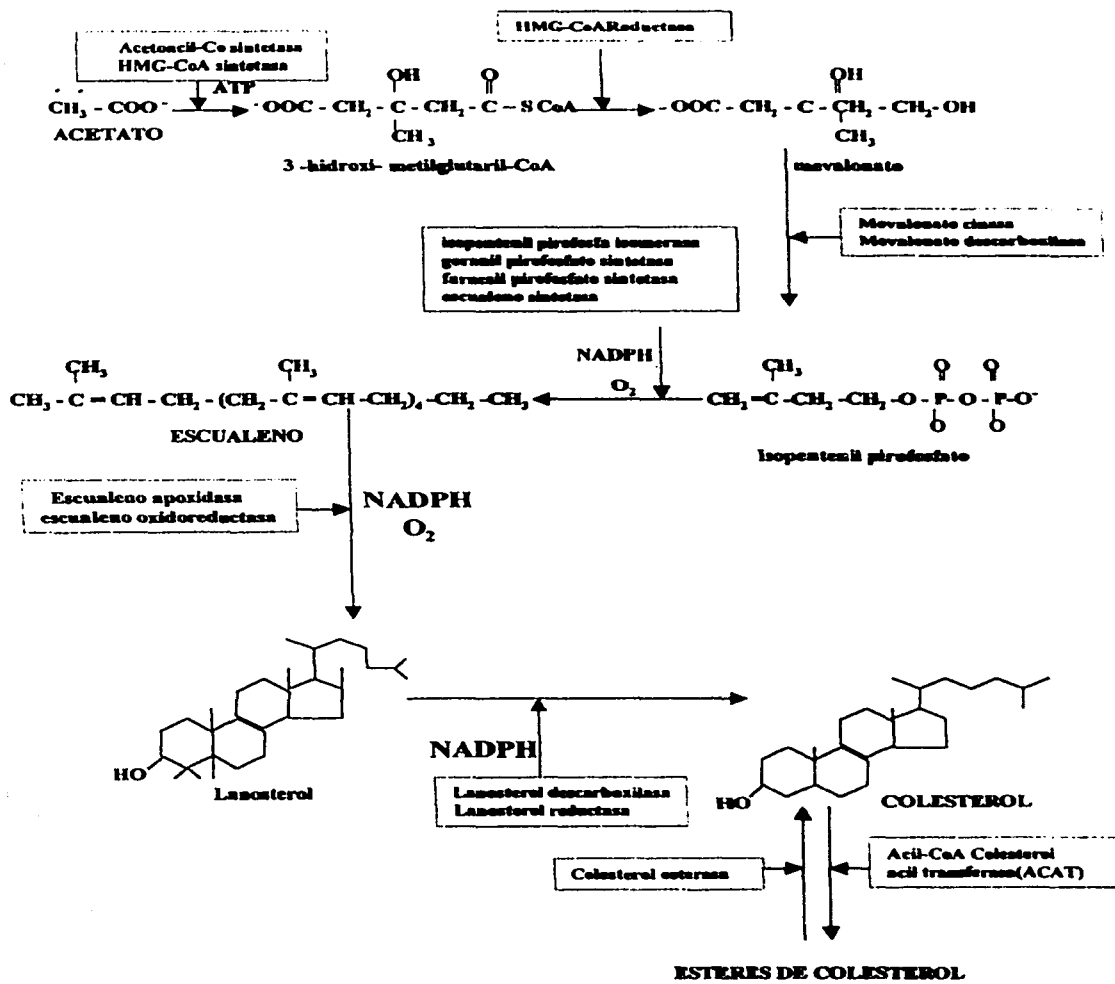


Fig. 7 Biosintesis del colesterol a partir de acetato. (Murray et al., 1994).

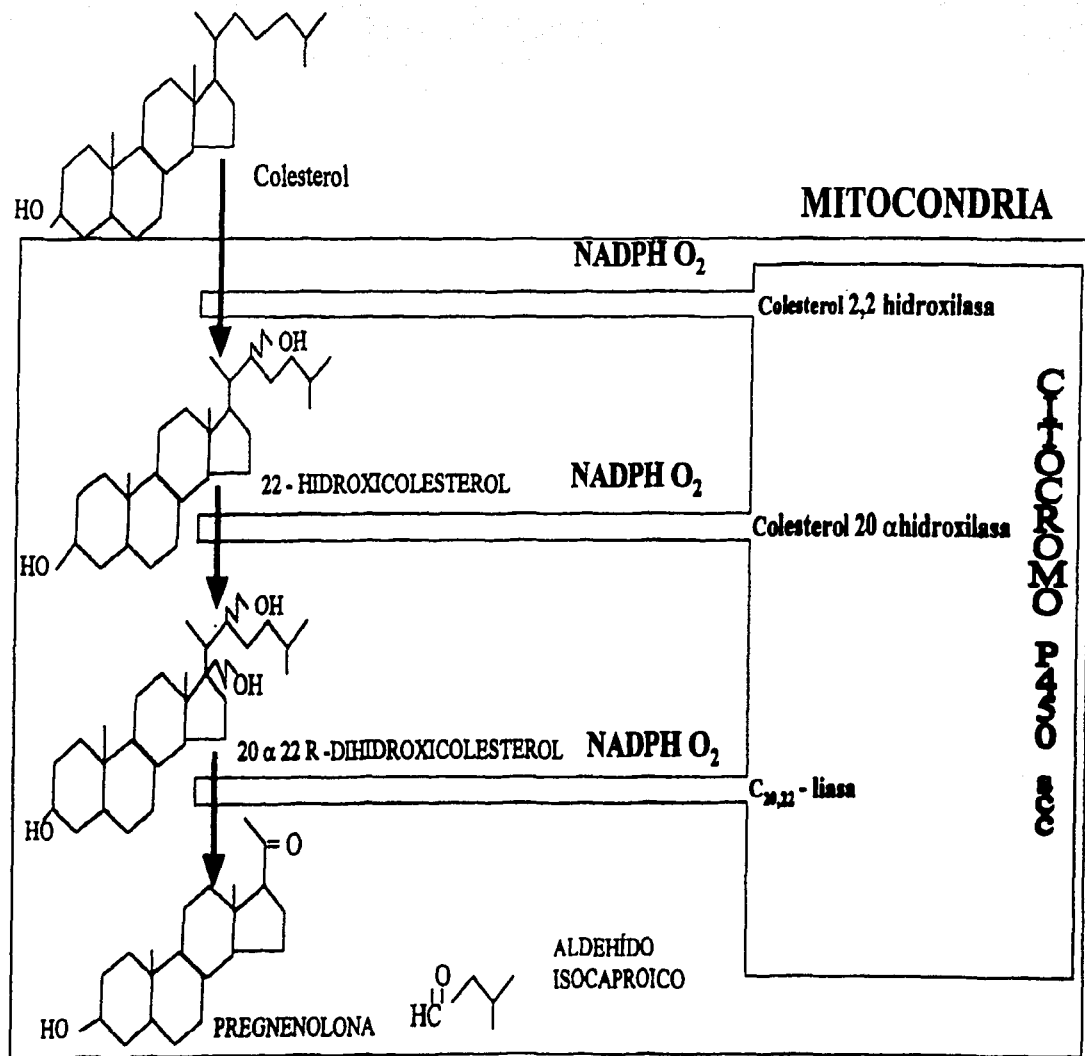


Fig. 8 Vía de síntesis de pregnenolona a partir de colesterol, mostrando la ruptura de la cadena lateral del colesterol en la mitocondria. El sistema enzimático involucra al citocromo P450 scc. (Díaz Zagoya, 1988).

La transformación del colesterol a pregnenolona se conoce como el "paso limitante" en la vía esteroidogénica, ya que es un evento indispensable para la formación de pregnenolona (Murray et al., 1994). La concentración del citocromo P450_{sc} es el principal factor que determina la velocidad de la síntesis de pregnenolona (Tuckey et al., 1989).

Biosíntesis de Progesterona.

La progesterona es sintetizada a partir de pregnenolona mediante un complejo enzimático microsomal 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa (3 β -HSD)/ Δ^{3-4} -isomerasa (Fig. 9). La progesterona es una molécula de suma importancia para la biosíntesis de esteroides, ella juega un doble papel en éste proceso, como producto final o bien, como productor de corticoesteroides, andrógenos y estrógenos (Hall, 1984 ; Lee et al., 1998; Murray et al., 1994).

Se han identificado diferentes tipos de progestinas derivadas tanto de progesterona como de pregnenolona, las que probablemente ejercen un papel regulador en la síntesis de las gonadotropinas hipofisarias (Díaz Zagoya et al., 1988).

Biosíntesis de Andrógenos.

La pregnenolona y la progesterona son los precursores de los andrógenos, este evento se ve influido por el citocromo P450_{C17}, inicia con una hidroxilación en el C-17 de las moléculas citadas, rompiendo las cadenas laterales respectivas, formando 17 α -hidroxipregnenolona que se convertirá a dehidroepiandrosterona por la vía Δ^5 , transformandose hasta androstenediona y finalmente a testosterona. Por otro lado se formará la 17 α -hidroxiprogesteronona, la cual también formará androstenediona por vía Δ^4 , pudiendo ser transformada hasta 17 β -estradiol, o bien, a testosterona (Fig. 9). La ruta tomada para la síntesis de andrógenos es simultánea, depende de la concentración del sustrato así como de la naturaleza del tejido que la lleva a cabo. Las enzimas necesarias para que se lleve a cabo la biosíntesis de andrógenos, se localizan en la fracción microsómica de la gónada (Hanukoglu, 1992; Lee et al., 1998; Murray et al., 1994).

Biosíntesis de Estrógenos.

Los estrógenos son una familia de hormonas que se sintetizan en varios tejidos, el 17 β -estradiol es el estrógeno primario de origen ovárico. En algunas especies en lugar de estradiol, se sintetiza en los tejidos estrona, siendo ésta más abundante.

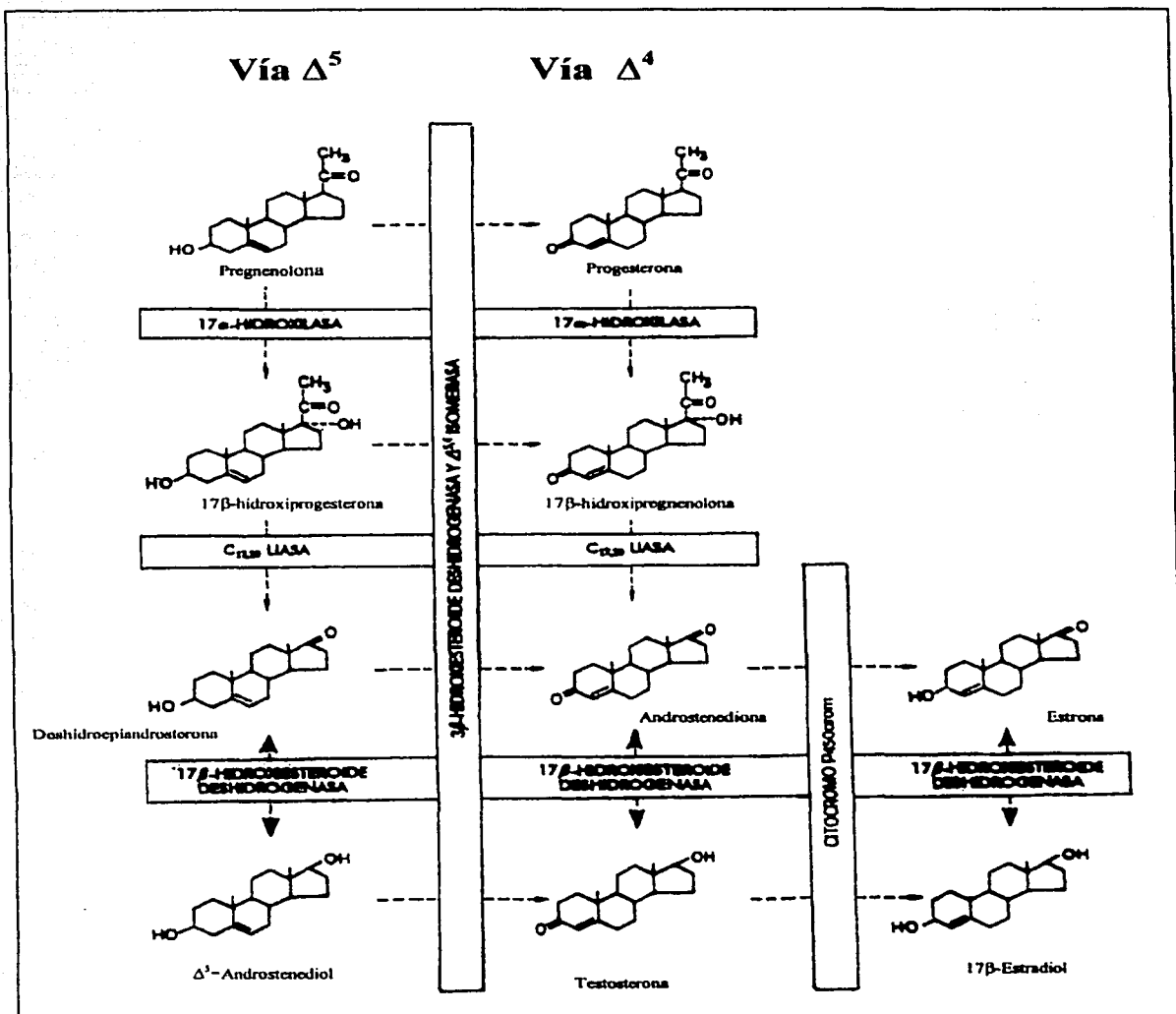


Fig. 9 Vías de biosíntesis de testosterona en los microsomas. La vía Δ^4 se conoce como de la progesterona, en ella se aromatiza la testosterona para formar estrógenos. La vía Δ^5 se llama de la deshidroepiandrosterona, en la cual se lleva a cabo la síntesis de andrógenos. (Murray et al., 1994).

En el proceso de biosíntesis los andrógenos se convierten hasta estrógenos, a través de una serie de reacciones enzimáticas secuenciales conocidas como "aromatización", en la cual el anillo A de los andrógenos se transforma en un anillo aromático cuya estructura es característica de los estrógenos. La androstenediona puede ser aromatizada directamente a estrona o bien, convertirse primero a testosterona y después aromatizarse a 17β - estradiol (Fig 10).

El paso de androstenediona a testosterona, o de estrona a estradiol son reacciones bioquímicas de tipo reversible que permiten regular la cantidad de estrógenos que se producen en el ovario (Díaz Zagoya et al., 1988; Murray et al., 1994).

Se sabe que el mecanismo de aromatización es un proceso complejo en el que intervienen tres hidroxilaciones sucesivas, cada una de las cuales requiere de O_2 y NADPH (Murray et al., 1994). Se piensa que el complejo enzimático de aromatasa incluye una oxidasa P450 de función mixta, si el sustrato para este complejo enzimático es testosterona, se forma estradiol, en tanto que la estrona se debe a la aromatización de la andostenediona (Fig. 10).

Biosíntesis Subcelular de Esteroides.

A nivel celular la síntesis de esteroides se realiza en dos sitios: la membrana interna de la mitocondria y en la fracción microsomal del retículo endoplásmico liso (Gore-Langton, 1988; Hanukoglu, 1992).

En el ovario humano el colesterol es convertido a pregnenolona en la membrana interna de la mitocondria, el cual pasa al citosol con la posibilidad de ser transformado mediante la acción de la 20-hidroxiesteroide deshidrogenasa, hasta pregnandioliol (Brodie, 1983). Tanto la pregnenolona como el pregnandioliol pasan a los microsomas del retículo endoplásmico liso para dar lugar a la formación de progesterona, la cual puede formar a este nivel reticular, tanto 17α -hidroxipregnenolona que podrá convertirse hasta androstenediol (testosterona) y estradiol, como a 17α -hidroxiprogesteroona que puede dar lugar en el mismo retículo a testosterona que por aromatización llegará a estradiol, o bien, esta progesterona puede pasar nuevamente al citosol, transformándose a 20α -hidroxiprogesteroona (Fig. 11).

ESTEROIDOGÉNESIS.

En las aves la participación de las hormonas gonadotrópicas adenohipofisarias FSH y LH,

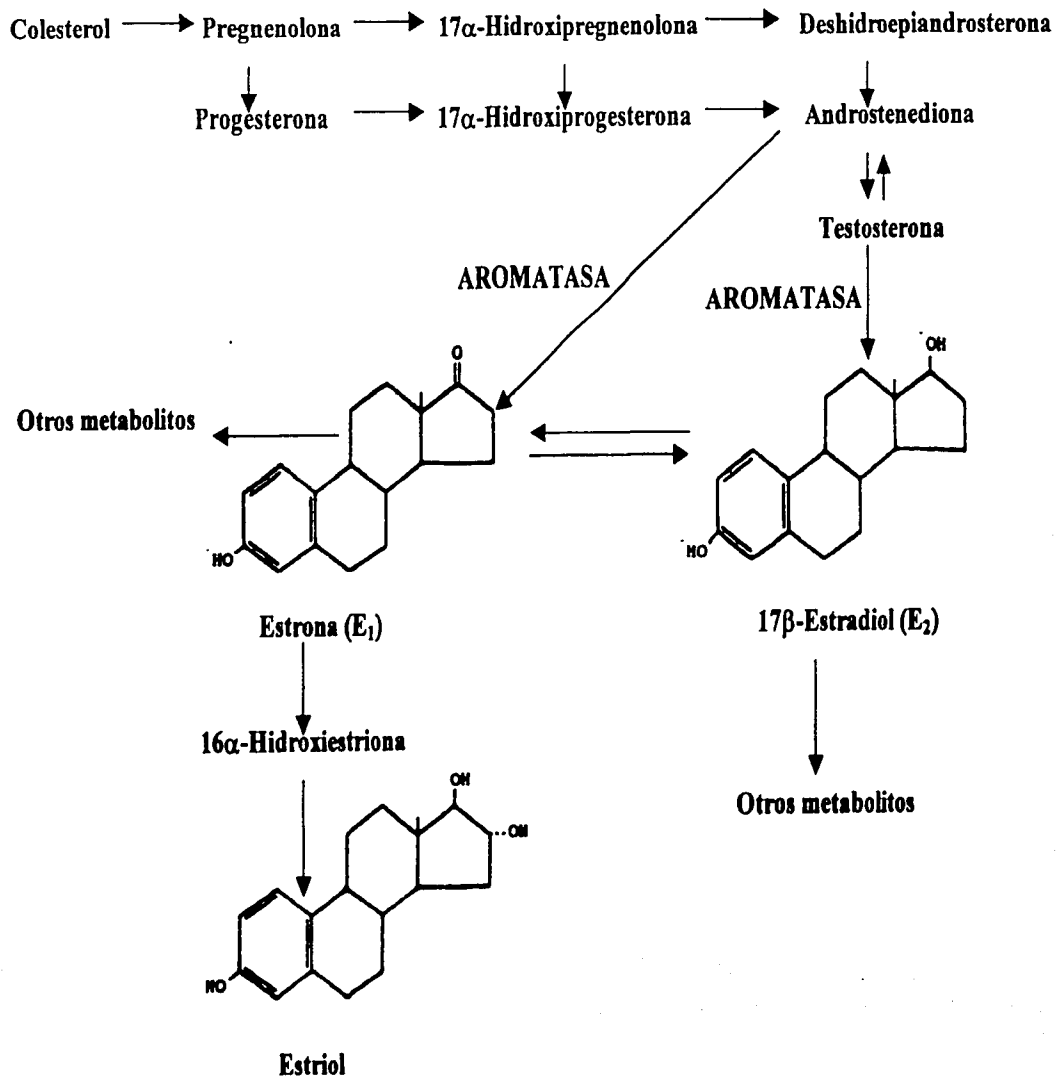


Fig. 10 Biosíntesis de estrógenos por el proceso de aromatización. (Modificación de Ganong, 1991).

tiene una gran importancia para el desarrollo folicular y la secreción endocrina, estas sustancias de naturaleza glucoprotéica se enlazan a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula blanco (Wells, 1984). Su acción es variable dependiendo de la fase de desarrollo en la que se encuentran los folículos, pueden ser folículos corticales embebidos en el estroma, que miden < 1 mm de diámetro, folículos pequeños de la línea blanca de 1 a 7 mm de diámetro, SYF de más de 8 mm de diámetro, o bien folículos preovulatorios (F5 a F1) de 15 a 35 mm de diámetro (Kikuchi et al., 1992).

La producción de las hormonas esteroideas durante la maduración de los folículos está regulada por la hormona LH. Cuando son estimuladas las células de la granulosa de los folículos preovulatorios F1, F2 y F3 con LH, hay un incremento en la liberación de progesterona, habiéndose encontrado al folículo F1 como el principal productor de ésta hormona, contrario a lo que sucede en los folículos menos desarrollados, ya que esta va disminuyendo paulatinamente de F2 hacia F5 (Marrone, 1983 ; Nitta et al., 1993)

El pico de LH se presenta de 6 h a 8 h antes de la ovulación y va acompañado de un aumento en la concentración de la progesterona (Gilbert, 1971b; Huang, 1979)

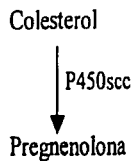
Se ha observado que en los folículos preovulatorios las células de la granulosa son el principal órgano blanco de la LH, mientras que en los postovulatorios no hay respuesta a ésta hormona (Nitta et al., 1993).

Las células tecales en los folículos preovulatorios F3 a F5, convierten la pregnenolona y la progesterona hasta testosterona y 17β -estradiol, interviniendo en este proceso en forma importante el complejo enzimático P450, mientras que en las células de la granulosa de estos mismos folículos, solamente se sintetiza progesterona (Huang et al., 1979; Lee et al., 1990; Nitta et al., 1991b; Wells et al., 1984).

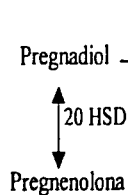
Respecto a la síntesis de 17β -estradiol, se lleva a cabo de manera más importante en los folículos preovulatorios SYF y va decreciendo en los folículos de mayor tamaño (F2 y F1), lo que indica que conforme el folículo va madurando, la actividad de la enzima aromatasa disminuye (Armstrong, 1984; Lee et al., 1998), haciéndose la correlación entre éste hecho y el que las células aromatasa positivas disminuyen de manera importante en el folículo maduro (Hernández et al., 1993; Lee et al., 1994; Nitta et al., 1991b).

En el ovario de las aves, se han encontrado estrógenos en los folículos pequeños < 1 mm,

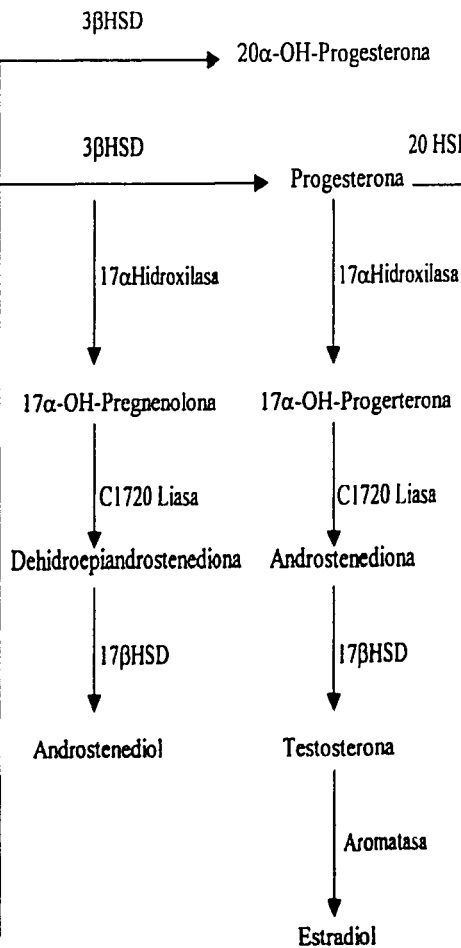
MITOCONDRIAS



CITOSOL



RETICULO ENDOPLASMICO



CITOSOL

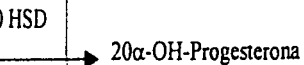


Fig. 11 Biosintesis de esteroides a nivel subcelular. (Brodie, 1983).

encontrándose que estos son necesarios durante los estadios tempranos del desarrollo folicular, puesto que ellos inducen a los receptores de gonadotropinas, permitiendo la respuesta del folículo a la FSH y a la LH (Bahr et al., 1983; Lee et al., 1994; Nitta et al., 1991a). Estos folículos, bajo estimulación de LH no producen progesterona, pero si son una fuente importante de 17β -estradiol y androstenediona (Robinson et al., 1986).

Se ha calculado que el estroma ovárico y los folículos pequeños contienen aproximadamente el 50% de la actividad de aromataasa, el resto de esta actividad está representada por los folículos preovulatorios F5 a F1. Tal vez, los niveles basales de 17β -estradiol en las aves, son mantenidos por los SYF y el estroma ovárico, mientras que las variaciones en el ciclo ovárico se deben a los folículos preovulatorios (Armstrong, 1984; Lee et al., 1998; Nitta et al., 1991b; Robinson et al., 1986).

Respecto a la maduración de los folículos preovulatorios, se ha postulado que la interacción entre las células foliculares en la síntesis de hormonas esteroideas, permite regular el desarrollo del folículo, en concordancia con las poblaciones celulares implicadas. Estos conocimientos se han ido dando a través del tiempo, descifrándose paulatinamente los mecanismos de interacción de las diferentes poblaciones celulares implicadas en la foliculogénesis, aunque no se ha logrado aclarar totalmente este proceso.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, Huang (1979) describió el clásico **"modelo bicelular"** para la esteroidogénesis de los folículos preovulatorios, en el cual propone que en la gallina en postura la biosíntesis de las hormonas esteroideas ováricas, tienen como principal fuente de progesterona a las células de la capa granulosa, así como las células del tejido tecal son el precursor para la síntesis de andrógenos y estrógenos (Lee et al., 1990).

Se ha observado experimentalmente un efecto sinérgico incubando células granulosas junto con células tecales en presencia de LH, lo cual ha permitido corroborar que las células granulosas producen progesterona en respuesta a la LH, así como el que las células tecales requieren de la participación de las granulosas para sintetizar andrógenos y estrógenos (Huang et al., 1979; Marrone et. al., 1983).

Apoyando a la **"teoría bicelular"** propuesta para la maduración de los folículos preovulatorios en las aves, Phillips (1987) refiere que las hormonas esteroideas son sintetizadas por tipos celulares específicos (Fig. 12). El precursor para la síntesis de éstas

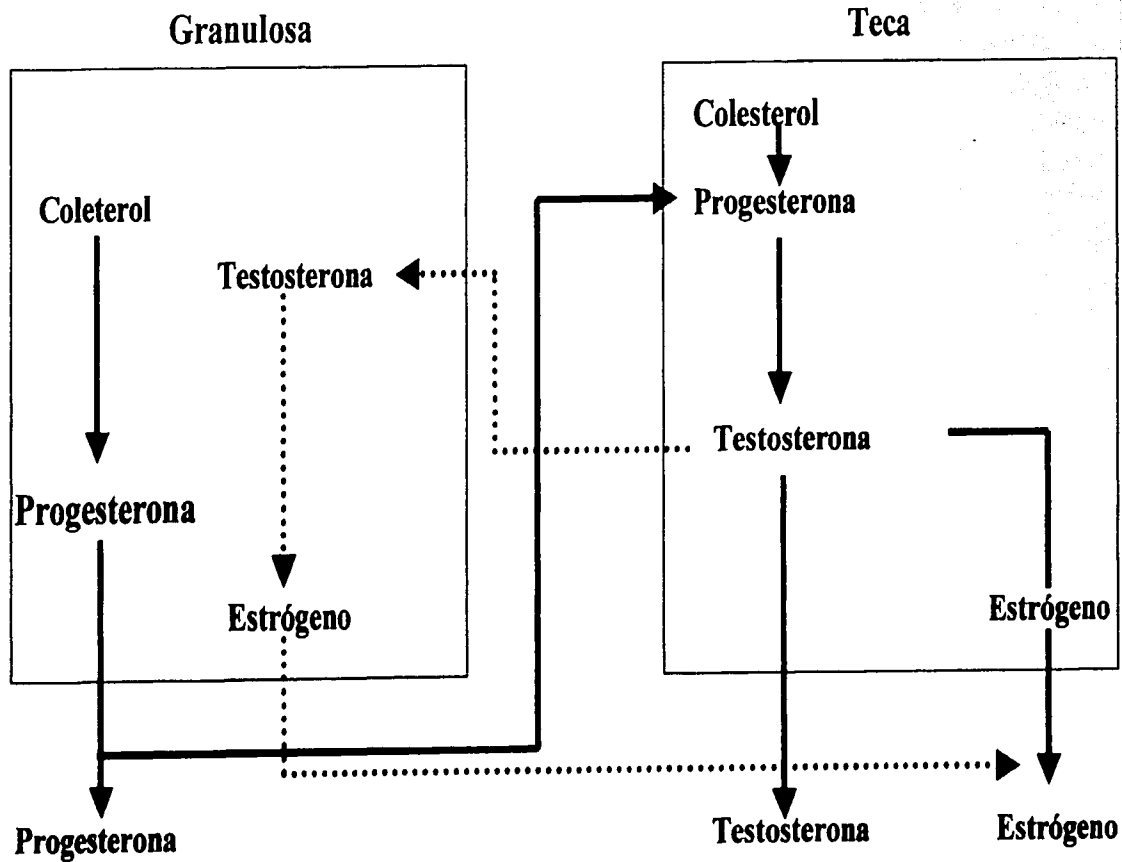


Fig. 12 "Modelo Bicelular" de la síntesis hormonal en las aves. Las líneas continuas indican las rutas principales. (Phillips, 1987).

hormonas es el colesterol, activando la biosíntesis de éstas gracias a hormonas gonadotrópicas, particularmente la LH. Las células de la granulosa sintetizan la mayor parte de la progesterona, aumentando su capacidad esteroideogénica de acuerdo a la madurez folicular y sólo producen una pequeña cantidad de estrógenos. Por otro lado, las células de la capa tecal convierten a la progesterona en estrógenos, así como también a partir de colesterol se puede llevar a cabo la formación "de novo", de una mínima cantidad de progesterona.

La mayoría de los estudios referidos en la literatura respecto a la esteroideogénesis en las aves, han sido realizados en folículos preovulatorios, el primero que estudia la producción de esteroides en los folículos pequeños < 1 mm en ovario de pollitas es Nitta et al. (1991), basando sus observaciones en la inmunolocalización de enzimas esteroideogénicas del citocromo P450. Proponen también un "modelo bicelular" para el desarrollo folicular (Fig.13), exponiendo que en la esteroideogénesis de los folículos pequeños, las células granulosas son inactivas a la producción de esteroides, siendo responsable la capa tecal en etapas tempranas del desarrollo, de la actividad esteroideogénica (Kowalski et al., 1991a; Lee et al., 1994), dependiendo la biosíntesis de esteroides de la cooperación de las dos poblaciones celulares que constituyen a la capa tecal, por un lado las células intersticiales de la teca interna, que producen progesterona y andrógenos a partir de colesterol, así como las células de la teca externa, que se encuentran rodeando a los cordones de células poco diferenciadas, denominadas "envolventes" que son aromatasas positivas, debido a que utilizan a los andrógenos como sustrato para llevar a cabo la biosíntesis de estrógenos. La localización anatómica de las poblaciones celulares esteroideogénicas de la capa tecal, presenta variación en los diferentes estadios de maduración folicular, ya que inicialmente está constituida como capa única y posteriormente se diferencia en teca interna y externa.

Por otro lado, Porter et al.(1989), establece un "modelo tricelular" respecto a la biosíntesis de las hormonas esteroides en los folículos preovulatorios de las aves, proponiendo que las células de la capa granulosa sintetizan principalmente progesterona y al ser estimuladas con LH, ésta aumenta. Las células de la teca interna utilizan dicha progesterona y la biotransforman hasta andrógenos principalmente testosterona, aunque también pueden partir del colesterol para la síntesis de ésta hormona, aumentando la producción de andrógenos

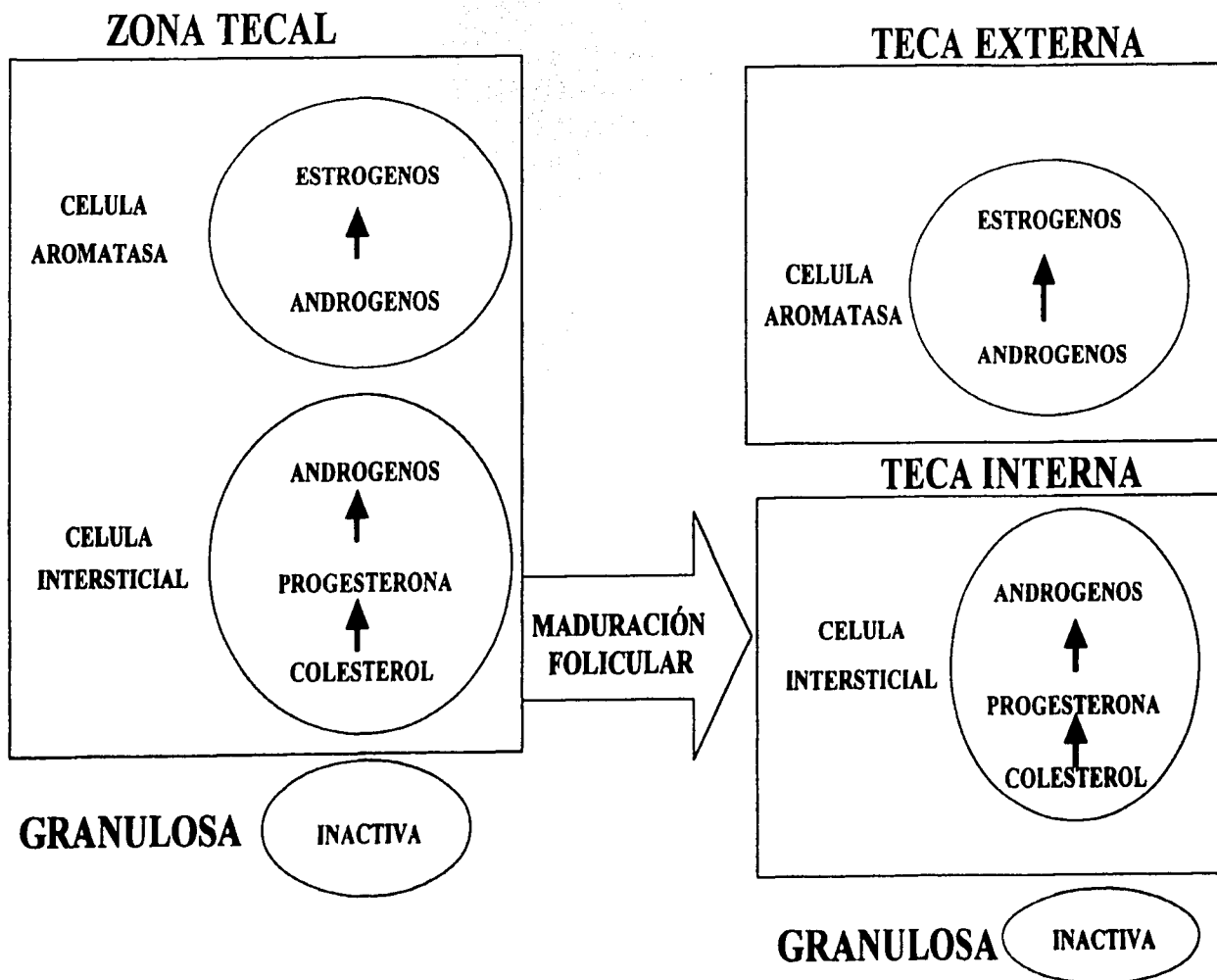


Fig. 13 "Modelo Bicelular" propuesto para la esteroidogénesis de folículos pequeños inmaduros en aves. (Nitta, 1991).

cuando la teca interna es estimulada por la LH. Se concluye que bajo el estímulo de LH, las células de la teca externa producen estrógenos a partir de andrógenos (Fig. 14).

Estudios realizados en codorniz han demostrado que la capa tecal de los folículos pequeños tiene receptores a FSH, con mayor afinidad respecto a los folículos grandes, ya que estos receptores disminuyen a medida que se va dando maduración folicular (Kikuchi et al., 1992). En los folículos preovulatorios de la gallina, los receptores a FSH de las células granulosas disminuyen conforme se da la maduración folicular, mientras que la afinidad a la LH va en aumento.

Nitta (1991b) ha propuesto otro **“modelo multicelular”** para entender la producción de hormonas esteroideas en los folículos preovulatorios del ovario de la gallina, llevando a cabo la localización inmunocitoquímica de los complejos enzimáticos P450 involucrados en la esteroidogénesis, lo cual ha permitido conocer que existe una interacción entre las poblaciones celulares de la granulosa, teca interna y teca externa. En esta propuesta, se da un mayor énfasis a la inmunorreactividad de las capas tecales, aunque en forma similar a las teorías propuestas anteriormente se concluye que las células de la capa granulosa son el principal sitio de producción de progesterona en este tipo folicular, teniendo como precursor al colesterol. En este modelo, las células intersticiales de la teca interna sintetizan progesterona y andrógenos a partir de colesterol y las células de la teca externa transforman los andrógenos, a través del proceso de aromatización en estrógenos, presentándose en esta capa una modalidad funcional, puesto que se pone de manifiesto que los fibroblastos muestran inmunorreactividad a P450_{C17}, lo cual indica que tienen la posibilidad de convertir la progesterona en andrógenos, los cuales a su vez pueden transformarse por aromatización a estrógenos. Esta capacidad esteroidogénica decrece conforme se lleva a cabo la maduración folicular (Fig. 15).

En otro de los modelos propuesto a cerca de la interacción de los diferentes linajes celulares que participan en la esteroidogénesis, se ha descrito que la actividad de la enzima 3 β -HSD (3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa) puede ser modulada por cambios en la concentración de andrógenos o estrógenos (Lee et al., 1990), regulando de esta manera la síntesis de la progesterona a partir de pregnenolona, que es su precursor. Por otro lado, se ha descrito que la pregnenolona puede seguir hacia la vía alterna de síntesis de testosterona, la cual tiene

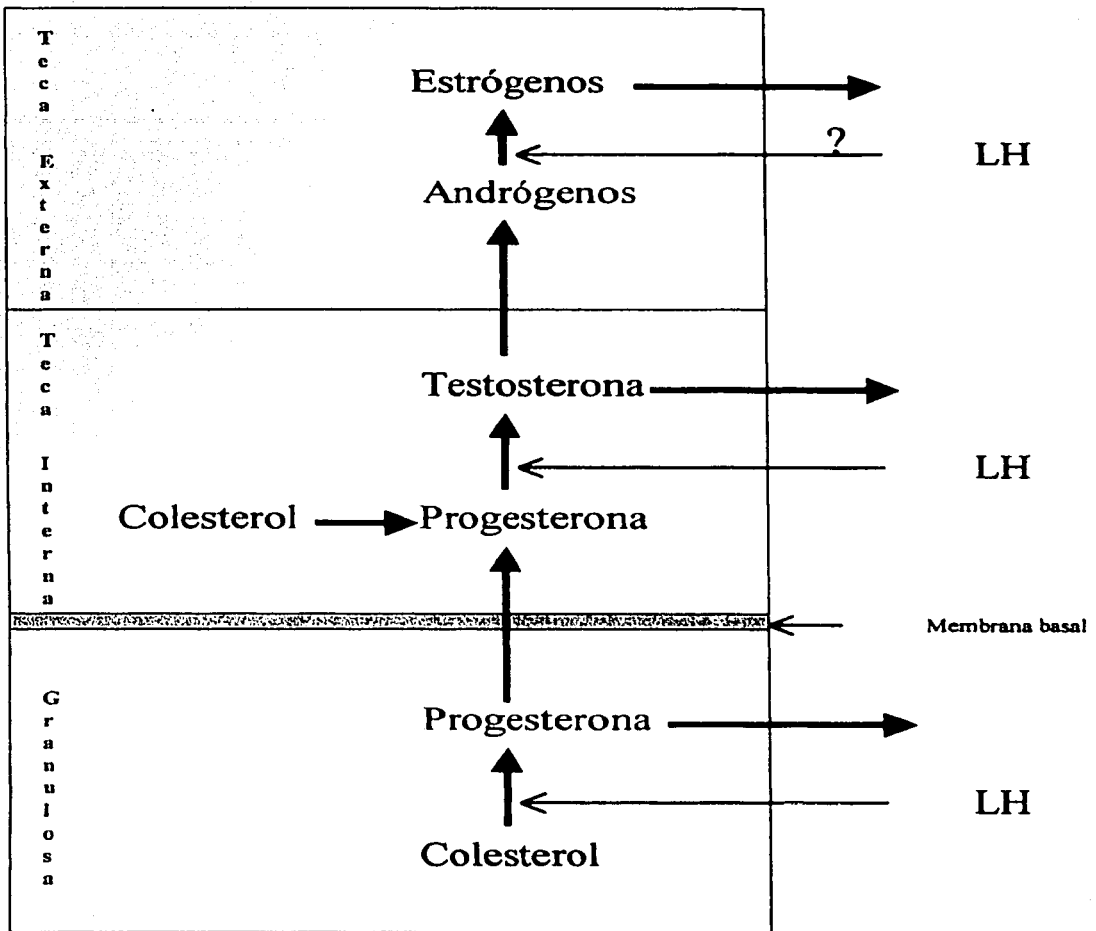


Fig. 14 “Modelo Tricelular” que muestra la esteroidogénesis de folículos preovulatorios en las aves. (Porter, 1989).

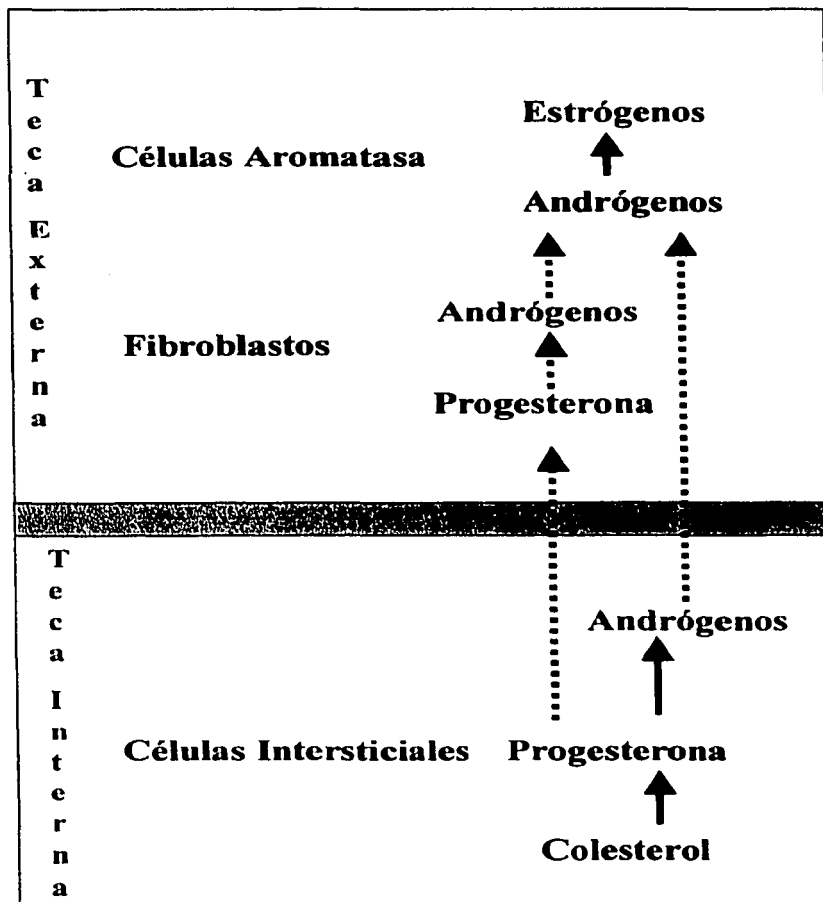


Fig. 15 “Teoría Multicelular” de la esteroidogénesis en folículos preovulatorios del pollo. (Nitta, 1991).

la propiedad de regular su propia producción, disminuyendo la síntesis "de novo" de las enzimas del complejo P450_{C17} (Hales et al., 1987).

También se ha demostrado que la teca externa presenta inactividad del complejo P450_{C17} en los folículos preovulatorios, en cualquiera de sus etapas de desarrollo, así como la disminución de la actividad de 3 β -HSD a medida que el folículo madura, planteándose la posibilidad de que los andrógenos sintetizados en la teca interna y los estrógenos producidos por la teca externa, sean capaces de regular su propia producción (Rodríguez et al., 1996). La disminución de esta actividad durante la maduración folicular, podría explicar la pérdida del efecto inhibitorio que los andrógenos y estrógenos ejercen sobre la producción de progesterona folicular, por lo cual se puede considerar que las enzimas 3 β -HSD y el citocromo P450_{C17} desempeñan un papel importante de regulación de la esteroidogénesis del componente tecal (Johnson et al., 1987; Lee et al., 1990).

Otra aportación de importancia respecto a la actividad metabólica de la teca interna, es el hecho de que al estudiar sus células, presentaron actividad con las enzimas P450_{C17} y 5 β -reductasa (Gómez et al., 1993), pero no con la aromatasas. Este hallazgo, aunado a que en la teca externa no se encuentra actividad tanto de P450_{C17}, como de 5 β -reductasa, indica que existen marcadas diferencias entre las capacidades esteroidogénicas de la teca interna y externa. La teca externa funciona como un compartimento esteroidogénico independiente, capaz de interactuar con las células de la teca interna y de la granulosa en la regulación de la esteroidogénesis folicular. A este respecto, Rodríguez (1995) propone un modelo para explicar dicha interacción en folículos preovulatorios (Fig. 16).

La esteroidogénesis en las aves va a depender de mecanismos reguladores de la concentración en sangre de las hormonas gonadotrópicas, tales como: 1) la cantidad de enzima determinada por transcripción, estabilidad del mRNA y la traducción, 2) la actividad enzimática que depende de las modificaciones postraduccionales de la enzima, condiciones intracelulares y presencia de cofactores, 3) disponibilidad de sustrato, determinado principalmente por la movilización de colesterol y su transporte al complejo P450 mitocondrial y 4) crecimiento de tejido que depende de proliferación celular (Hanukoglu, 1992).

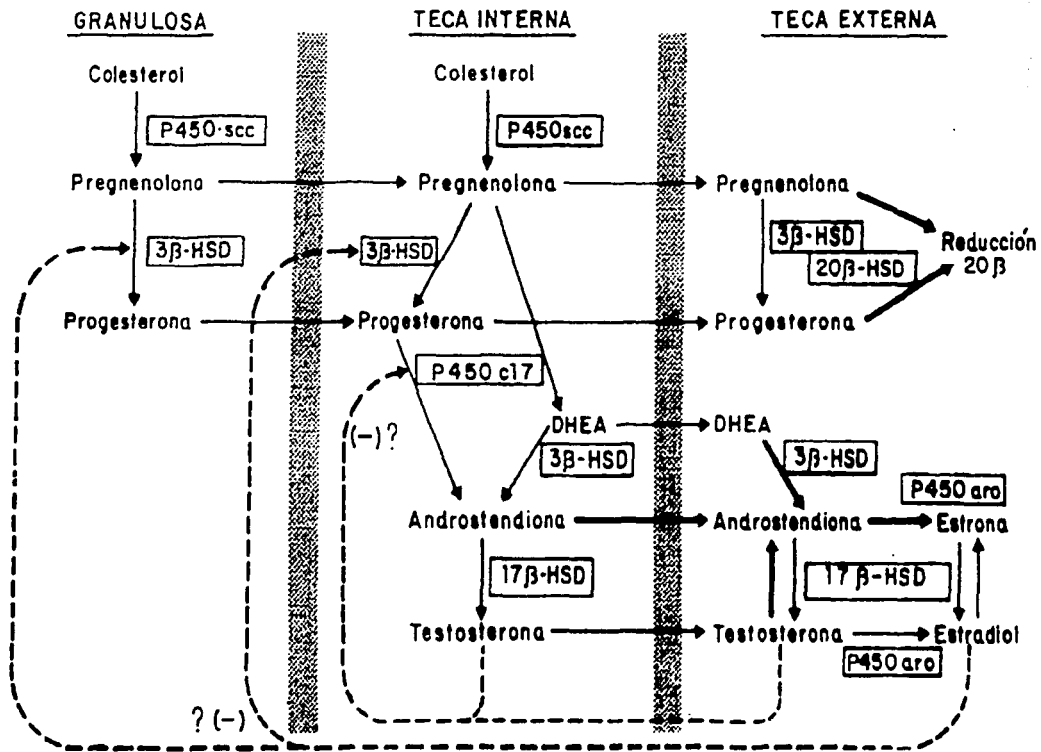


Fig. 16 Modelo propuesto para explicar la interacción entre las células de la granulosa, teca interna y teca externa para la síntesis de esteroides ováricos. Las flechas gruesas indican las rutas metabólicas de la teca externa y las líneas punteadas muestran la probable participación de la teca externa en la regulación de la esteroidogénesis durante la maduración folicular. (Rodríguez, 1995).

Poblaciones Celulares Esteroidogénicas en Pollitas Inmaduras.

La médula del ovario de pollitas recién nacidas presenta cordones o cúmulos de células epiteliales que contienen escaso citoplasma, las cuales están delimitadas por una membrana basal.

En la ultraestructura de los cordones de células epiteliales podemos distinguir: a) células esteroidogénicas que pueden estar aisladas o formando grupos, las que presentan una morfología típica de células secretoras de hormonas esteroides, en ocasiones en éstos cordones la lámina basal está ausente o solamente hay restos de ella, cada cúmulo celular lleva en su interior una terminal nerviosa; b) cordones de células poco diferenciadas que invariablemente están rodeados por una lámina basal y c) canales lacunares delimitados por una membrana basal envolvente, cuyas células tienen una morfología similar a las células poco diferenciadas (Callebeaut, 1988; González del Pliego et al., 1988).

En la médula ovárica se observan cordones epiteliales distribuidos en forma desigual, en la región yuxtacortical se localizan pequeños islotes de células esteroidogénicas denominadas poco diferenciadas, en contraste con la médula profunda en la que se encuentran cordones de mayor tamaño de células intersticiales esteroidogénicas típicas, así como canales lacunares más desarrollados.

Estudios bioquímicos realizados en la gallina, han permitido identificar dos subpoblaciones diferentes: una de células esteroidogénicas que se localiza en la teca interna, cuyas células se caracterizan por contener en su citoplasma inclusiones lipídicas, así como por sintetizar andrógenos y no muestran actividad de aromataasa, en la teca externa se encuentra la otra población, constituida por células poco diferenciadas que secreta estrógenos, a diferencia de la población anterior, esta muestra una notable actividad del sistema de aromatización (Pedernera et al., 1988).

Se ha podido evidenciar el proceso de cooperación celular de la capa granulosa, teca interna y teca externa para la producción de andrógenos y estrógenos en el folículo ovárico maduro. Tal vez este proceso se presenta en el ovario inmaduro prefolicular, con la participación de las dos poblaciones celulares anteriormente descritas, constituyéndose dichas subpoblaciones celulares en los precursores del folículo maduro (Pedernera, 1993; Velásquez et al., 1991). En cuanto a la actividad esteroidogénica, se ha observado que esta disminuye en las células

tecales y se incrementa en las de la capa granulosa cuando el folículo se aproxima a la maduración, presentándose un cambio en la sensibilidad y respuesta de los tipos de células a la estimulación gonadotrópica en los folículos de diferentes tamaños (Huang, 1979; Nitta et al., 1993; Porter, 1991).

FOTOPERIODOS.

Oviposición.

El ciclo de ovulación-oviposición se puede definir como el lapso en el cual el óvulo es transformado hasta huevo y es expulsado.

Es bien conocido que la luz estimula la hipófisis para que esta libere gonadotropinas, así como el hecho de que existe algún factor dentro de la sustancia neurosecretora que alcanza la eminencia media y la adenohipófisis a través de vía sanguínea porta. Se ha demostrado experimentalmente que seccionando el tallo hipofisiario, para la conexión hipofisiaria, la gallina sufre una alteración en la liberación de gonadotropinas, presentando por tanto una anomalía total en su función reproductora (Ma et al., 1963).

En las aves el mecanismo neurosecretor hipofisiario juega un papel muy importante en el control y regulación de la postura del huevo (Fig. 17). En el lóbulo posterior aviar se secretan hormonas que están relacionadas con la contracción del oviducto de la gallina, como son la oxitocina y arginina-vasotocina y/o mesotocina, viéndose que en la función contráctil, no participan las dos, actúa una u otra. Se ha comprobado que estas hormonas están asociadas al estado reproductor de las gallinas adultas en etapa de postura, así mismo otras hormonas secretadas por la hipófisis posterior se han relacionado con los mecanismos de oviposición. La oxitocina es el principal factor para que se lleven a cabo las contracciones musculares uterinas, que permitirán la salida del huevo próximo a ovular, participando también las prostaglandinas E_1 , E_2 , y $F_{2\alpha}$, cuya concentración aumenta en el momento de la oviposición, colaborando así con el estímulo de la dilatación y contracción uterovaginal para dicha expulsión (Phillips, 1987; Sturkie, 1986).

Durante mucho tiempo se pensó que la luz estimulaba directamente la producción de los huevos, debido a su incremento en número durante las horas de luz diurna, sin embargo se ha demostrado que la principal función de ella, consiste en su efecto estimulante sobre la

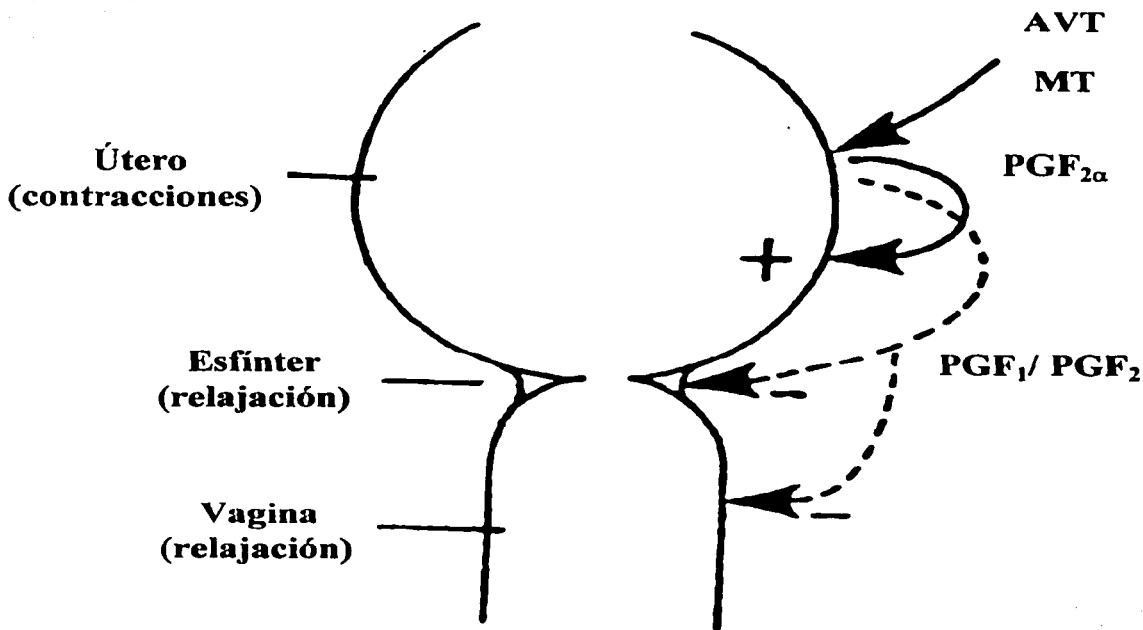


Fig. 17 Control de la ovoposición a través de hormonas de la neurohipófisis (lóbulo posterior): arginina vasotocina (AVT) y/o mesotocina (MT), así como prostaglandinas (PGE₁, y PGE_{2α}). (Phillips, 1987).

hipófisis lo cual trae como consecuencia la liberación de gonadotropinas, que a su vez estimulan al ovario para dicha función (Quiesenberry, 1963).

En la gallina doméstica la etapa de postura inicia al alcanzar la madurez sexual, aproximadamente entre la 20ª y 22ª semanas, siendo la postura inicialmente irregular, presentándose interrupciones en esta ya que aun no es secuencial, habiendo pausas de dos o más días, siendo la postura de un huevo por día. Durante las dos primeras semanas los huevos tienen una alta incidencia de anomalías como puede ser, el cascarón blando o una doble yema. Entre la 6ª y 10ª semanas, la postura del huevo se ha normalizado, presentándose durante esta etapa la mayor producción del huevo, que representa un 80 a 90% del total, decreciendo gradualmente esta actividad hacia la 40ª y 50ª semanas, declinando la postura de forma rápida cuando se presenta la muda de las plumas (50ª semana aproximadamente). En un periodo de postura normal se producen aproximadamente 280 huevos (Sturkie, 1986).

El ciclo de ovulación-oviposición en la gallina doméstica presenta una secuencia larga y una corta duración. Cuando se empieza a establecer este ciclo la secuencia no es constante, el intervalo entre la oviposición y la siguiente ovulación dura entre 15 y 75 min, posteriormente el intervalo entre oviposiciones sucesivas en la mayoría de las gallinas es de 24 h. Aunque en las gallinas la oviposición se puede presentar durante cualquier hora de luz diurna, generalmente ellas ponen por la mañana y tienden a poner más cuando los días son más largos. Las aves que ponen tres o cuatro huevos, lo hacen antes del medio día, la mayoría de las veces ponen entre las 8 y 9.30 h de la mañana, las aves que ponen dos huevos lo hacen entre las 9 y 10.30 h de la mañana y las que ponen un huevo, ovipocitan generalmente entre las 11 h de la mañana y la 1.30 h de la tarde.

Las diferencias que se presentan en la oviposición en las diferentes especies de aves, sugieren que pueden existir diferencias en la liberación de las hormonas hipofisarias que intervienen en el crecimiento y maduración de los folículos, así como en la ovulación y la incubación de los huevos. Se considera que los periodos óptimos de luz-oscuridad para la ovulación, van entre las 12 a 14 h de iluminación continua (Sturkie, 1967).

Tomando en consideración los antecedentes citados, se puede establecer el planteamiento de éste trabajo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que existen en la literatura estudios morfológicos que ponen de manifiesto como están estructurados los folículos maduros del ovario de la gallina, no se ha llegado a esclarecer aún, cómo se lleva a cabo la integración de los diferentes linajes celulares que participan en el proceso de la maduración del folículo, para conformar las capas foliculares a través la foliculogénesis.

Se sabe que los folículos del ovario de la gallina se clasifican de acuerdo a su tamaño y sus características tanto morfológicas como esteroidogénicas, en dos tipos: a) pequeños blancos inmaduros que incluyen a los corticales < 1 mm de diámetro, que están embebidos en el estroma ovárico y constituyen la fuente folicular del ovario, iniciándose a partir de ellos la maduración folicular, así como a los pequeños inmaduros que miden de 1 a 6 mm de diámetro, que son aquellos que entrarán a la jerarquía folicular de los preovulatorios (Sturkie, 1986; Nitta et al., 1991a); b) preovulatorios con vitelo amarillo, que agrupan a los folículos del F5 al F1 (15 a 35 mm), los cuales a través de la foliculogénesis, tendrán una capacidad ovulatoria (Nitta et al., 1993).

En los citados grupos foliculares se han llevado a cabo numerosas investigaciones, que ponen en evidencia una influencia hormonal de las gonadotropinas adenohipofisarias sobre las poblaciones foliculares esteroidogénicas, lo cual podría permitir hacer una correlación a cerca de la transformación que estas poblaciones sufren a través de su maduración. No obstante, el conocimiento referente al establecimiento de un patrón morfológico folicular, mediante la organización de las poblaciones celulares, para la integración del folículo maduro a través de los diferentes estadios, no se ha podido explicado satisfactoriamente.

De acuerdo a la revisión bibliográfica hecha para la realización de este trabajo, sabemos que existen muchas incógnitas respecto a cómo se estructura la pared folicular con sus diferentes componentes celulares, por lo cual resulta interesante plantearnos el tratar de identificar a través del desarrollo, cómo se van integrando los componentes de la pared folicular, en los folículos pequeños de la línea blanca, ya que ellos son el propósito de este estudio, tratando de dilucidar como se dan los cambios estructurales que se presentan

paulatinamente, con la finalidad de establecer la morfología folicular, con la participación de los diferentes componentes, a través del proceso de foliculogénesis. Así mismo, se puede hacer la correlación entre la estructura folicular en los diferentes estadios y la producción de hormonas esteroides por células esteroideogénicas.

En los folículos preovulatorios de la gallina adulta, debido a la influencia que ejercen las hormonas gonadotrópicas sobre las poblaciones celulares, la capa granulosa secreta fundamentalmente progesterona y la capa tecal en cambio, tiene la capacidad de producir andrógenos y estrógenos, sin embargo, esta producción hormonal no se establece así al inicio del desarrollo folicular, ya que en los folículos blancos pequeños inmaduros la secreción hormonal es diferente y va cambiando conforme se va estructurando el patrón morfológico de la pared folicular a través del proceso de foliculogénesis.

IV. HIPÓTESIS

Si dentro de la organización de los folículos pequeños inmaduros de la línea blanca que no han entrado aún a la jerarquía folicular, participan además del epitelio folicular, las poblaciones de células esteroideogénicas, así como la subpoblación de las células poco diferenciadas, vasos sanguíneos y lacunares, fibras nerviosas y tejido conectivo, se pensaría que tales poblaciones celulares se organizan para formar tanto la capa granulosa como la zona tecal, a medida que se va dando el proceso de folículoogénesis.

Por lo tanto, es de esperarse que la capa granulosa se forme a partir de un epitelio folicular pseudoestratificado y las tecas tanto interna como externa, se integren con la participación de ambos tipos de linajes celulares de naturaleza esteroideogénica, así como por vasos sanguíneos y lacunares, terminaciones nerviosas y tejido conectivo.

V. OBJETIVO

No obstante que existe información sobre la estructura histológica de los folículos en la gallina adulta, no ha sido totalmente aclarado cuáles son las poblaciones celulares esteroideogénicas que participan en la formación de la capa granulosa y tecal de los folículos inmaduros.

Tomando en consideración los antecedentes conocidos, el objetivo del presente estudio fue observar los cambios morfológicos estructurales de las poblaciones celulares que conforman al folículo inmaduro. Tratando de entender como éstas se organizan formando las capas granulosa y tecal que constituyen a dichos folículos a través de la foliculogénesis, procurando identificar los cambios sobresalientes que ocurren durante este proceso, así como analizar morfológicamente de acuerdo al tamaño folicular, los cambios respecto al grosor de las capas celulares durante la fase lenta del desarrollo, observando cómo evolucionan las poblaciones celulares, para originar a los folículos que inician esta secuencia para entrar a la jerarquía folicular.

El estudio realizado, aunado a la literatura actual, permitirá conocer un poco más acerca de la correlación que existe entre la organización morfológica folicular y la actividad hormonal de los folículos ováricos maduros que entran a la etapa de crecimiento rápido y finalmente a la ovulación.

MATERIAL Y MÉTODO

OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización de este trabajo se obtuvieron folículos en diferentes estadios de maduración, de ovarios izquierdos de gallinas adultas en etapa de franca postura de la raza White Leghorn, de 5 meses de edad y un peso aproximado de 1 800 gr. Los especímenes fueron obtenidos de la granja avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U. N. A. M., los cuales tenían una postura regular controlada bajo fotoperíodos de luz/oscuridad de 14 h a 10 h, teniendo previamente la referencia de que bajo estas condiciones, los períodos de luz ejercen un efecto estimulante tanto sobre la ovulación como en la puesta del huevo.

Las gallinas fueron sacrificadas por dislocación cervical, en un lapso de 6 h a 8 h posteriores a la ovulación, estandarizando el horario de la obtención de las muestras para que todas se encontraran en condiciones similares. De inmediato fueron eviscerados los ejemplares y se disecó cuidadosamente el ovario funcional (izquierdo) de éstos, seguido de lo cual se procedió a hacer la identificación de los folículos pequeños inmaduros de la línea blanca para clasificarlos de acuerdo a su tamaño, midiéndolos con el auxilio de un vernier para hacerlo con mayor exactitud.

Puesto que el interés del presente estudio fueron los folículos pequeños inmaduros de la línea blanca, se seleccionó a los que medían desde 8 mm de diámetro, hasta los de 1 mm, así mismo se incluyó a los folículos corticales que midieron < 1 mm de diámetro que se encontraban embebidos en el estroma ovárico.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL.

Una vez identificados y disecados los citados folículos pequeños inmaduros de la línea blanca, íntegros fueron introducidos de inmediato para su fijación en glutaraldehído 2.5 % durante 10 min, con el objeto de que el fijador empezara a actuar rápidamente. Se les abrió al nivel del estigma y se inyectaron con el mismo fijador, con la finalidad de que este actuara también internamente.

A continuación se cortaron varios bloques de aproximadamente 1 mm de espesor, de cada

uno de los diferentes tipos de folículos obtenidos (<1 mm a 8 mm), los cuales se mantuvieron en dicha solución para ser fijados por el método de inmersión, permaneciendo en el glutaraldehído al 2.5 % en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.15M a un pH 7.4, durante un espacio de 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se procedió a lavar los bloques con la solución amortiguadora de cacodilato, haciendo tres cambios de 15 min cada uno.

En seguida se hizo la postfijación con tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M a un pH 7.4, por un lapso de 2 h a 3 h, después de la cual se llevó a cabo la deshidratación, utilizando una serie de alcoholes graduales de etanol en orden creciente, iniciando con alcohol de 60° hasta llegar al alcohol de 90°, haciendo los cambios entre ellos cada 20 min. Por último se hicieron tres cambios de alcohol absoluto, de 20 min cada uno y finalmente se concluyó la deshidratación con dos cambios de oxipropileno.

A continuación se llevó a cabo la preinclusión, utilizando una mezcla de oxipropileno y resina epóxica Poly/Bed (Polycience Inc., Warrington, PA) 812 (Merck) en proporción 1:1 durante 12 h a 24 h, posteriormente las muestras fueron trasladadas a otra mezcla de mayor concentración de resina, a una concentración 3:1 por un espacio de 12 h.

Por último se incluyeron las muestras en resina pura, incrementándose gradualmente la temperatura cada 12 h, para que se llevara a cabo la polimerización de la resina, se inició con una temperatura de 35 °C las primeras 12 h, aumentándose a 45 °C las siguientes 12 h y finalmente, a 60 °C las últimas 12 h, para alcanzar la polimerización completa.

TÉCNICA PARA MICROSCOPIA DE LUZ.

Para realizar esta técnica se utilizó un ultramicrotomo (Ultracut Rietcher) que emplea cuchillas de vidrio, con las que se obtuvieron cortes semifinos de 1 μ m de espesor, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina.

La observación de los cortes semifinos se llevó a cabo con microscopio fotónico, seleccionando de esta manera las áreas de interés para nuestro estudio. Estas zonas nos fueron de utilidad tanto para tomar placas fotográficas con un fotomicroscopio Polyvar, como para hacer más tarde el análisis morfométrico de las mismas, así como para hacer la localización de las regiones que se observaron con microscopía electrónica.

TÉCNICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Basándonos en las observaciones de microscopía de luz, se eligieron las áreas para hacer los cortes finos, utilizando para ello el Ultracut Rietcher con una cuchilla de diamante, estos cortes tuvieron un rango de espesor entre 60 y 150 nm y se identificaron a través del estereomicroscopio que está integrado al ultramicrotomo, por sus coloraciones grises y doradas características.

Los cortes finos fueron trabajados con la técnica tradicional de microscopía electrónica, hecha a base de acetato de uranilo en solución acuosa o alcohólica con metanol y citrato de plomo.

En el fondo de una caja de Petri se puso una base sólida de parafina, en la cual se vertieron unas cuantas gotas de acetato de uranilo, guardando una distancia conveniente entre gota y gota. En cada una de las gotas se colocó una rejilla fina de cobre, sobre cada una de las cuales se acomodaron varios cortes finos con sus caras opacas orientadas hacia abajo, para que entraran en contacto con el acetato de uranilo y su caras brillantes dirigidas hacia arriba, dejando actuar esta solución por un lapso de 20 min. Transcurrido este tiempo se lavaron con una solución de agua-metanol 1:1 los cortes situados sobre las rejillas, cuidadosamente para que no se fueran a desprender.

Por otro lado, se preparó una caja de Petri en la forma descrita anteriormente, pero utilizando citrato de plomo, sobre el cual fueron colocaron las rejillas preparadas con los cortes, previamente lavadas para hacer el contraste metálico, dejándolas en este reactivo por un espacio de 10 min. A continuación se lavaron con agua ultrapura y se dejaron secar al aire.

Una vez preparados los cortes para microscopía electrónica, fueron observados en el microscopio de transmisión Karl Zeiss EM-10, obteniéndose las placas fotográficas para su estudio.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

El estudio morfométrico se llevó a cabo en los cortes semifinos empleando microscopía de luz con una cámara lúcida integrada, captando las imágenes observadas en una computadora mediante un digitalizador, utilizando el programa de análisis para imagen llamado "Image Pro Plus", Media Cybernetics, Maryland, USA.

En los folículos corticales < 1 mm de diámetro, no se hicieron mediciones puesto que en ellos todavía no se han integrado las diferentes capas foliculares, procediéndose a hacer la descripción microscópica de la morfología de ellos.

Las estructuras foliculares que se midieron en los demás grupos foliculares estudiados fueron: la capa granulosa, teca interna, teca externa y los cordones de células poco diferenciadas. Se midió el espesor de cada una de estas, delimitando una área determinada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores obtenidos son el promedio de la \pm DS del total de mediciones de la muestra. Las diferencias fueron probadas mediante el análisis de varianza (F) entre las estructuras foliculares medidas y se aplicó la prueba de Student-Newman-Kleus para el estudio de contrastes múltiples de promedios significativamente diferentes. El grado de significancia se reportó como $p < 0.05$.

REACTIVOS Y COLORANTES

- Glutaraldehído al 2%. SIGMA Chemical Company. St. Louis, MD. USA
- Cacodilato de Na 0.15M a pH 7.4. SIGMA Chemical Company. St. Louis, MD. USA
- Tetraóxido de osmio al 1%. Electron Microscopy Sciences. Washington, PA. USA
- Serie de alcoholes graduales de 60° a 90°. MERCK Darmstadt. Germany
- Alcohol absoluto. MERCK Darmstadt. Germany
- Oxipropileno. MERCK Darmstadt. Germany
- Acetato de uranilo al 1% a pH 5. MERCK Darmstadt. Germany
- Citrato de plomo. Electron Microscopy Sciences. Washington, PA. USA
- Azul de Toluidina. SIGMA Chemical Company. St. Louis, MD. USA
- Resina epóxica Poly/Bed 812. Polysciences, INC. Warrington, PA. USA

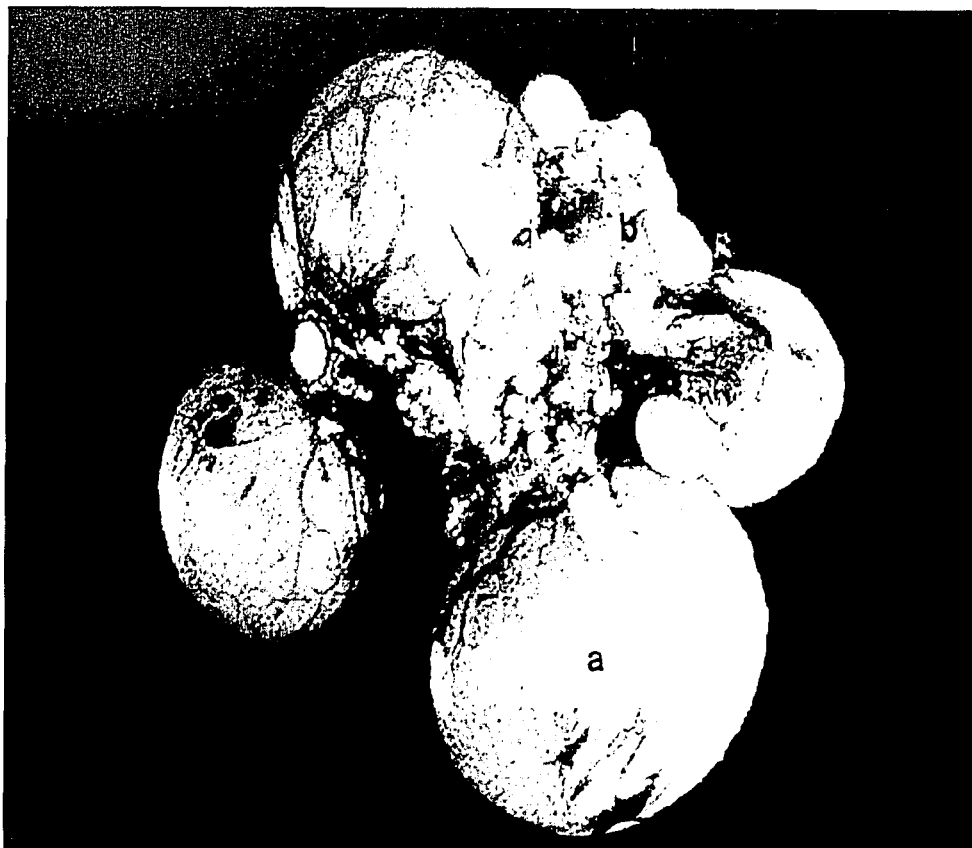
VIII. RESULTADOS

En este trabajo se estudiaron los folículos inmaduros de la línea blanca, desde los corticales < 1 mm que se encontraron inmersos en el estroma ovárico, hasta los de 1 a 8 mm de diámetro. En los primeros se observó una estructura más simple, ya que en ellos se empieza a llevar a cabo la estructuración folicular, a diferencia de los de mayor tamaño que se encontraron constituidos por la capa granulosa y la zona tecal, capas que en los folículos de menor tamaño aún no estaban conformadas. En los folículos más desarrollados la zona tecal se observó completamente integrada, incluso ya se ha transformado en una capa externa y otra interna.

Macrocópicamente en la masa ovárica se encontraron numerosos folículos en diferentes estadios, unidos a ella por medio de tallos o pedículos, semejando racimos de uvas (Fig. 1). Los folículos preovulatorios pertenecientes a la "jerarquía folicular", considerados como de la línea amarilla, se identificaron en un número de 5 a 6 y tenían un diámetro entre 10 y 35 mm, siendo el próximo a ovular el de mayor tamaño. También se observaron numerosos folículos pequeños inmaduros de la línea blanca, así como folículos corticales embebidos en el estroma ovárico que midieron < 1 mm de diámetro y algunos folículos postovulatorios (Fig. 1).

Siguiendo la secuencia del desarrollo folicular, se observaron los folículos de la línea amarilla en la cual se encontraron desde los SYF que midieron de 7 a 10 mm de diámetro, hasta los de mayor tamaño que son los preovulatorios, que han entrado a la jerarquía folicular y se denominan de acuerdo a su tamaño en orden decreciente: F1 que es el de mayor diámetro (35 mm), próximo a ovular, pasando por el F2 (30 mm), F3 (25 mm), F4 (20 mm) y F5 (15mm) (Fig. 2).

En la corteza del ovario se identificaron los folículos pequeños que se clasificaron de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encontraban en: a) folículos grandes inmaduros que midieron de 6 a 5 mm, b) folículos blancos inmaduros medianos de 4 a 3 mm de diámetro, c) folículos blancos pequeños de 2 a 1 mm y d) folículos corticales que son los más pequeños, siendo su tamaño < 1 mm de diámetro, estos últimos se hallaron embebidos en la superficie del estroma ovárico (Fig. 3).



Fig, 1 Ovario de la gallina adulta en el período de puesta, en el cual se puede identificar la masa ovárica con: a) Folículos preovulatorios de la “jerarquía folicular”, b) Numerosos folículos pequeños inmaduros que semejan racimos de uvas y ↓) Folículo postovulatorio.

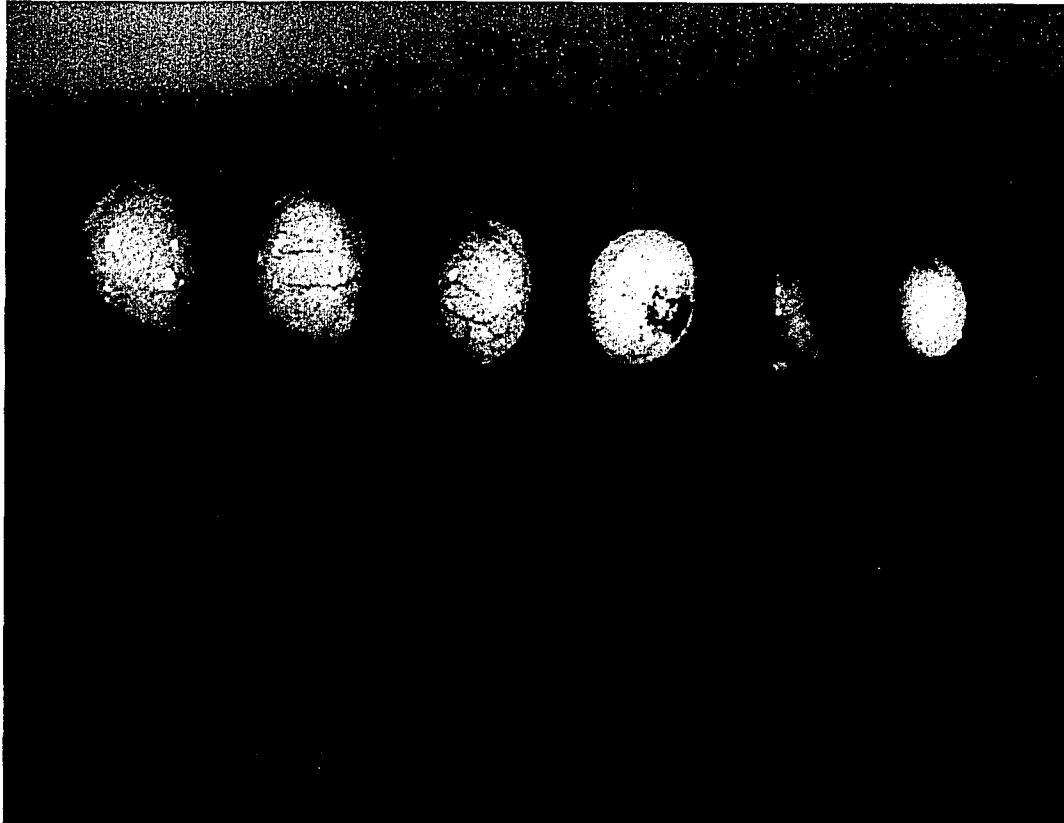


Fig. 2 Folículos de la línea amarilla. Los folículos preovulatorios que han entrado a la “jerarquía folicular”, están en orden decreciente de tamaño, desde el F1 que es el más grande próximo a ovular, hasta el F5 que es de menor tamaño. También se observa un SYF.

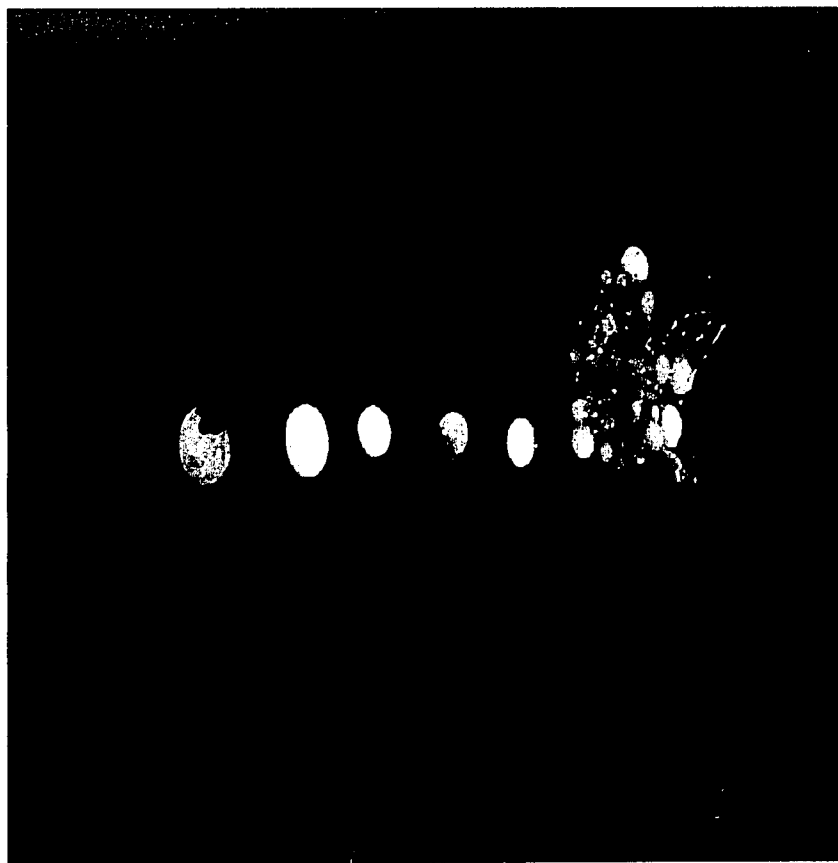


Fig. 3 Folículos pequeños inmaduros en diferentes estadios: a) Grandes blancos (5-6 mm), b) Medianos blancos (3-4 mm), c) Pequeños (1-2 mm) y d) Corticales (<1 mm).

Al diseccionar los especímenes estudiados, se disecó el tracto reproductor, encontrándose constituido por las regiones anatómicas típicas de una gallina en etapa de postura, que ha alcanzado la madurez sexual, en él se identificaron las siguientes partes: a) oviducto, integrado por el infundíbulo, magnum e istmo, b) útero en el cual frecuentemente se encontró un huevo en etapa de calcificación y c) vagina (Fig. 4).

ESTRUCTURA FOLICULAR.

Los folículos estudiados presentaron una estructura histológica general, la cual se halló constituida por las siguientes partes:

Estroma Ovárico.- Se encontró constituido por tejido conectivo en el cual se observaron numerosos vasos sanguíneos, fibras nerviosas, algunas células mioepiteliales y cordones de células esteroideogénicas típicas que constituyen la denominada "glándula intersticial", así como una red de tejido conectivo situada en el epitelio de la superficie del ovario.

Epitelio Superficial.- Se observó formando la superficie de la corteza, rodeando completamente al ovario y delimitando a cada folículo en toda su superficie, incluyendo al tallo folicular, esta capa se halló constituida por un epitelio alto, cuboide o plano, dependiendo del estadio de desarrollo. En cada folículo, esta capa se encontraba ricamente vascularizada por la capa venosa externa, excepto en la región del estigma, el cual estaba formado principalmente por músculo liso y pequeños vasos sanguíneos ubicados en el extremo opuesto al tallo o pedículo folicular.

Zona Teca.- Al iniciar el desarrollo folicular, esta zona aún no se había formado en los folículos corticales < 1 mm de diámetro. Por fuera de la capa granulosa de estos, se observaron fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos lacunares, así como cordones de células poco diferenciadas y células esteroideogénicas típicas en la zona más externa. Todos estos componentes se organizaron para constituir la futura teca, de tal modo que a partir de los folículos de 1 mm la capa teca se diferencia en dos zonas: teca interna y externa.

Teca Externa.- Es la capa folicular más periférica y de mayor grosor, se encontró constituida por tejido conectivo denso fibroso en el que se localizaron abundantes fibroblastos, fibras de colágena y miocitos, entre ellos se identificaron cordones de células

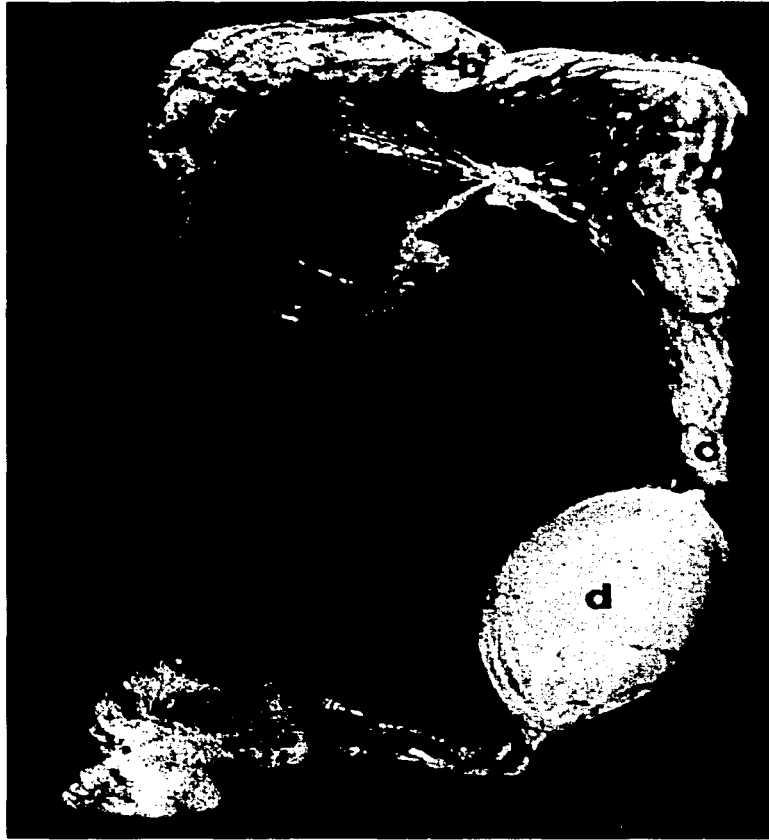


Fig. 4 Aparato reproductor de la gallina adulta en etapa de postura, mostrando sus regiones anatómicas: a) Infundíbulo, b) Mágnum c) Istmo, d) Útero con un huevo en su interior y e) Vagina.

intersticiales que formaban la "glándula tecal".

Tanto el grosor de la teca externa como el de la teca interna, se fueron modificando de acuerdo al grado de desarrollo folicular, haciéndose evidentes estos cambios en los folículos de 1 a 2 mm de diámetro, ya que a partir de estos tipos foliculares se pueden distinguir conformadas las dos capas tecaes.

Teca Interna.- Es una lámina compacta de menor grosor que la teca externa, la cual estaba formada por células fibroblásticas y fibras de colágena, así como por islotes de células esteroidogénicas caracterizadas por contener en su citoplasma retículo endoplásmico liso (REL), retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de Golgi, mitocondrias con crestas tubulares y gotas de lípidos. También se observaron en esta capa terminaciones nerviosas y una irrigación provenientes de la capa venosa media.

Capa Granulosa (Estrato o epitelio Folicular).- Se encontró rodeando al ovocito, al principio se observó como una capa de células foliculares planas, las cuales se fueron transformando a través del desarrollo folicular, primero en células de tipo cúbico alto y finalmente constituyeron un epitelio pseudoestratificado.

En la superficie apical de las células granulosas, se encontraron abundantes prolongaciones celulares que se insinuaban hacia el interior de la membrana del ovocito, en ellas se localizaron especializaciones de membrana características de los folículos de las aves, conocidos como premitocondrias, transosomas o "lining bodies".

Lámina Basal.- Se identificó como el límite entre la teca interna y las células de la capa granulosa, midiendo aproximadamente 1 μm de grosor, es una estructura de naturaleza anhistia que se identificó en los folículos pequeños < 1 mm de diámetro, ya que a partir de los folículos de 1 mm se observó una membrana basal.

Membrana Perivitelina (Vitelina).- Esta membrana se encontró delimitando al vitelo, su estructura se origina a partir del ovocito y se apreció asociada a la membrana plasmática, presentando una apariencia granular y fibrilar.

Zona Radiada.- Se observó como un punto de contacto entre el ovocito y el folículo. Incluidas entre esta zona se encontraron prolongaciones finas de las células granulosas dirigidas hacia el ovocito, las cuales se sabe que aumentan la superficie de absorción, dicha zona se encontró delimitada externamente por la membrana plasmática del ovocito y por la

membrana perivitelina. La zona radiada se modificó a través del desarrollo y crecimiento del ovocito.

Ovocitos.- Se localizaron en la parte interna del folículo y en su citoplasma se observó la presencia de gránulos de vitelo constituidos principalmente por fosfolípidos y triglicéridos.

CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS FOLÍCULOS INMADUROS.

Los folículos de la gallina fueron observados con microscopía de luz y con microscopía electrónica de transmisión y se agruparon de acuerdo a su tamaño y a la similitud encontrada entre ellos, en su organización histológica, en la siguiente forma: 1) Folículos < 1 mm de diámetro, 2) Folículos de 1 a 2 mm, 3) Folículos de 3 a 4 mm, 4) Folículos de 5 a 6 mm y 5) Folículos de 7 a 8 mm de diámetro (Fig. 3).

FOLÍCULOS < 1 mm.

Los folículos < 1 mm de diámetro se encontraron embebidos en el estroma ovárico y algunos se localizaron adheridos a la masa ovárica por medio de tallos, éstos empiezan a ser proyectados hacia el epitelio superficial de la corteza conforme van madurando (Fig. 5).

En el estroma ovárico que rodeaba a estos folículos, a partir del cual se empezaba a integrar la zona tecal, se distinguieron vasos sanguíneos rodeados por un endotelio, en cuyo interior se localizaron eritrocitos, así como vasos lacunares que son característicos de las aves Fig. 5, 6). Se observaron algunas terminaciones nerviosas asociadas a estos vasos sanguíneos y lacunares, algunas fibras nerviosas también llegaban a establecer un estrecho contacto con los cordones de células intersticiales típicas, que se localizaban entre el mismo tejido estromal (Fig. 6, 7, 8 y 9).

Los folículos < 1 mm incluidos dentro del estroma ovárico se encontraron delimitados por una capa delgada de epitelio superficial, seguida de la cual se observó rodeando al ovocito una capa de epitelio cúbico granuloso. En el citoplasma del ovocito se localizaron cromosomas dispersos, desprovistos de una membrana nuclear que los limitara, así como

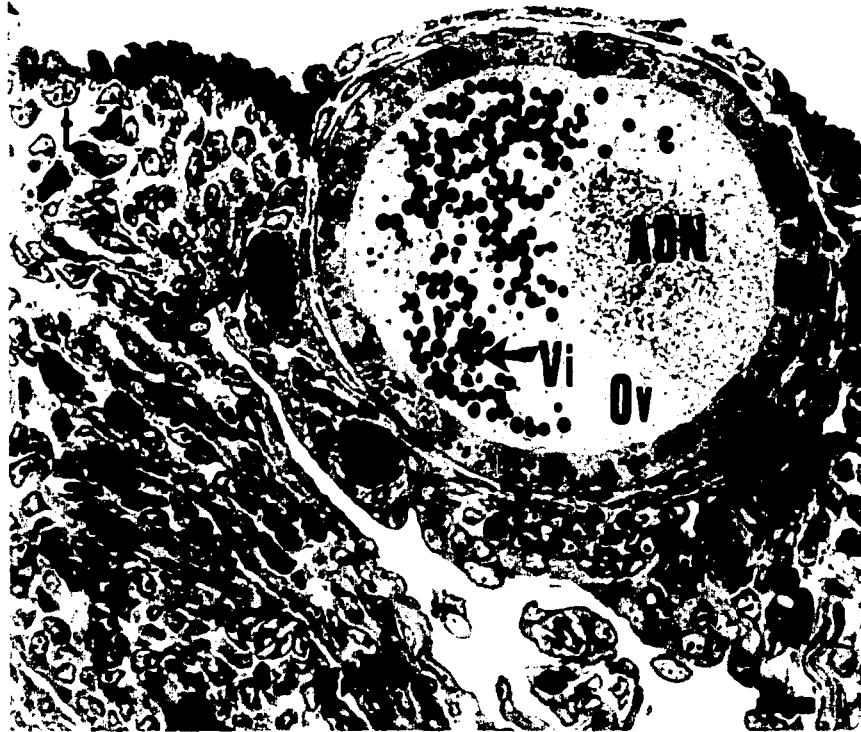


Fig. 5 Panorámica de un corte semifino de un folículo < 1 mm. Se observa el folículo embebido en el estroma ovárico (Es), en el cual se distinguen el tallo (t), los vasos sanguíneos (V), cordones lacunares (L) y células esteroideogénicas (CE). La capa granulosa (G) constituida por epitelio cúbico monoestratificado se encuentra rodeando al ovocito (Ov), dentro del que se distinguen gránulos de vitelo (Vi) y el ADN disperso. Bar= 14µm

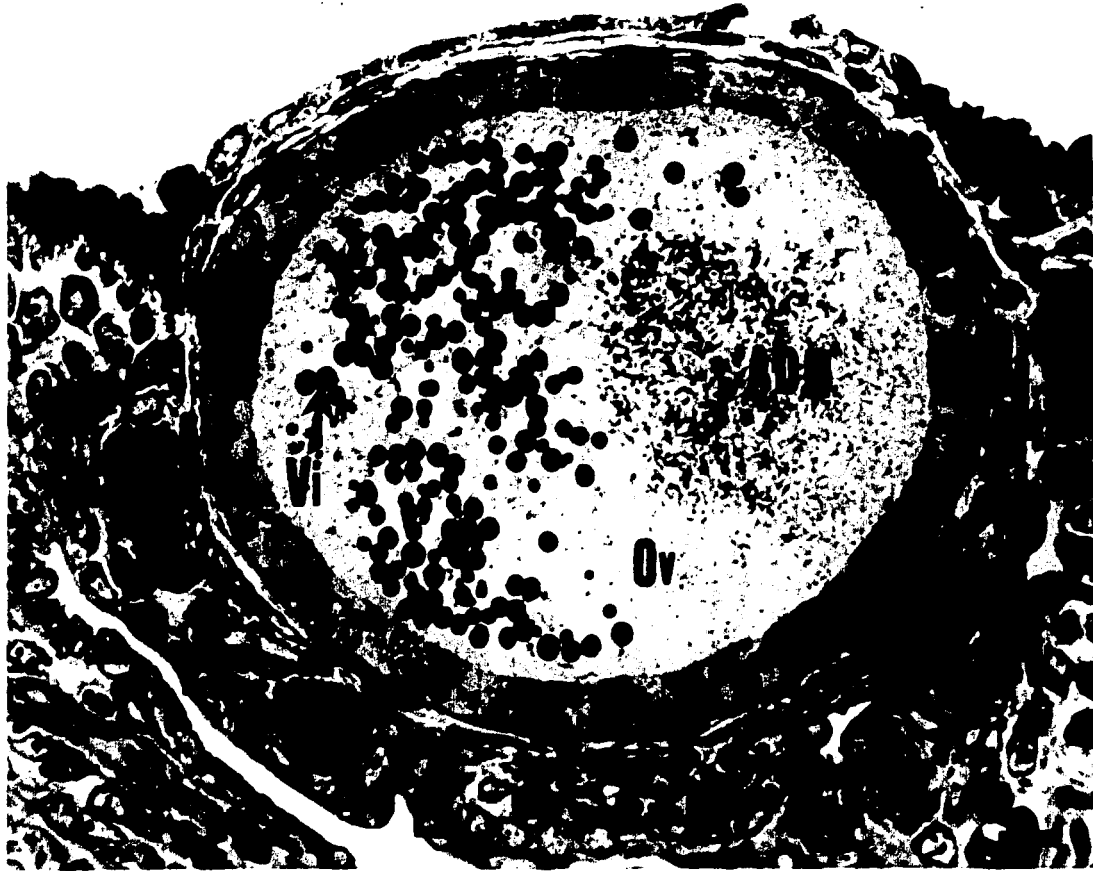


Fig. 6 Detalle de un folículo cortical. Se observa el ovocito (Ov), cuyo citoplasma contiene vitelo (Vi) y ADN disperso, alrededor del cual se encuentra la capa granulosa (G), seguida por la lámina basal (Lb). Rodeando al folículo está la teca (T) en formación, en la que distinguen fibroblastos (F), cordones de células poco diferenciadas (CP) y células esteroidogénicas (CE) intersticiales. Bar=2.5 μ m

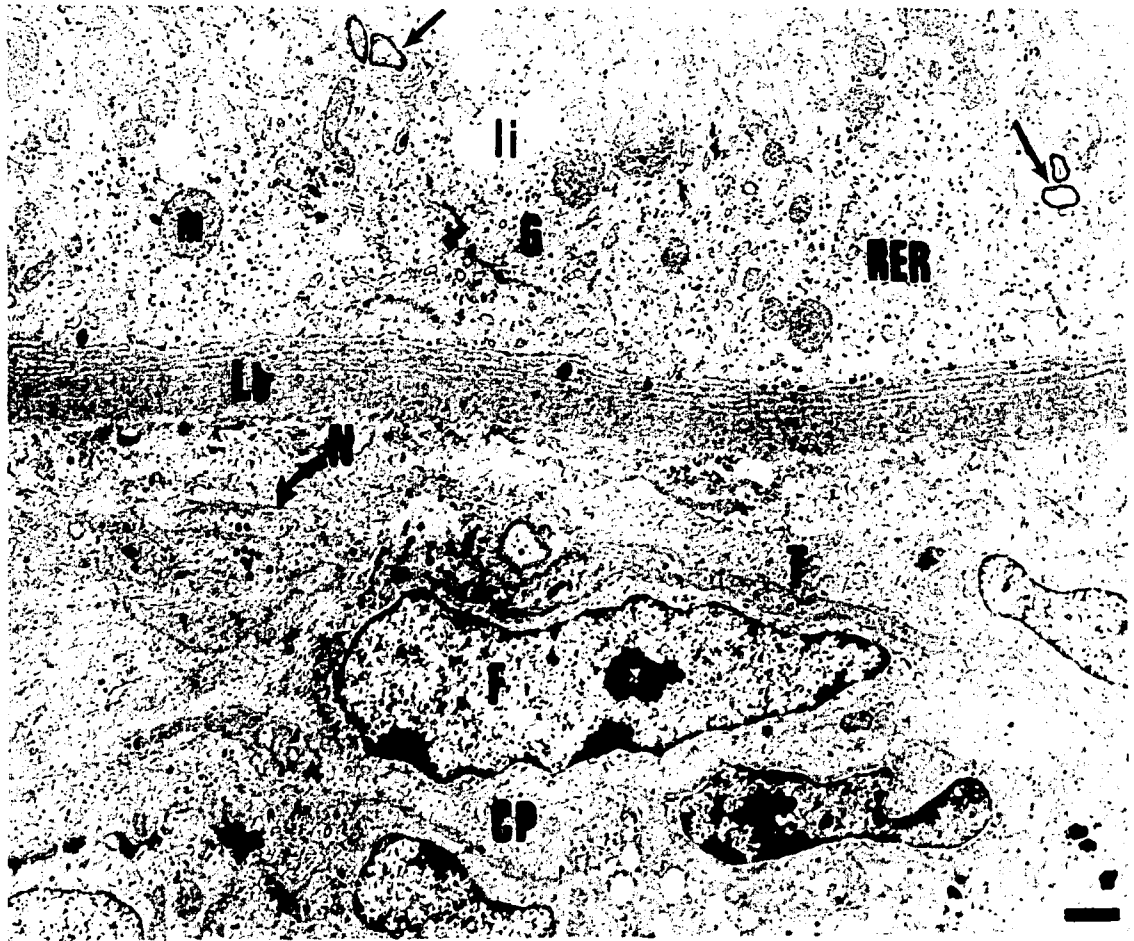


Fig 7 Electromicrografía de un folículo cortical inmaduro. En las células granulosas (G) se distinguen las especializaciones de membrana o "lining bodies" (↓), abundantes lípidos (li), RER y mitocondrias (m), alrededor de esta capa celular se observa una lámina basal (LB). En la teca (T) en formación se ve una fina capa de fibroblastos (F), así como un cordón de células poco diferenciadas (CP) y una fibra nerviosa (N). Bar=2.5 μ m

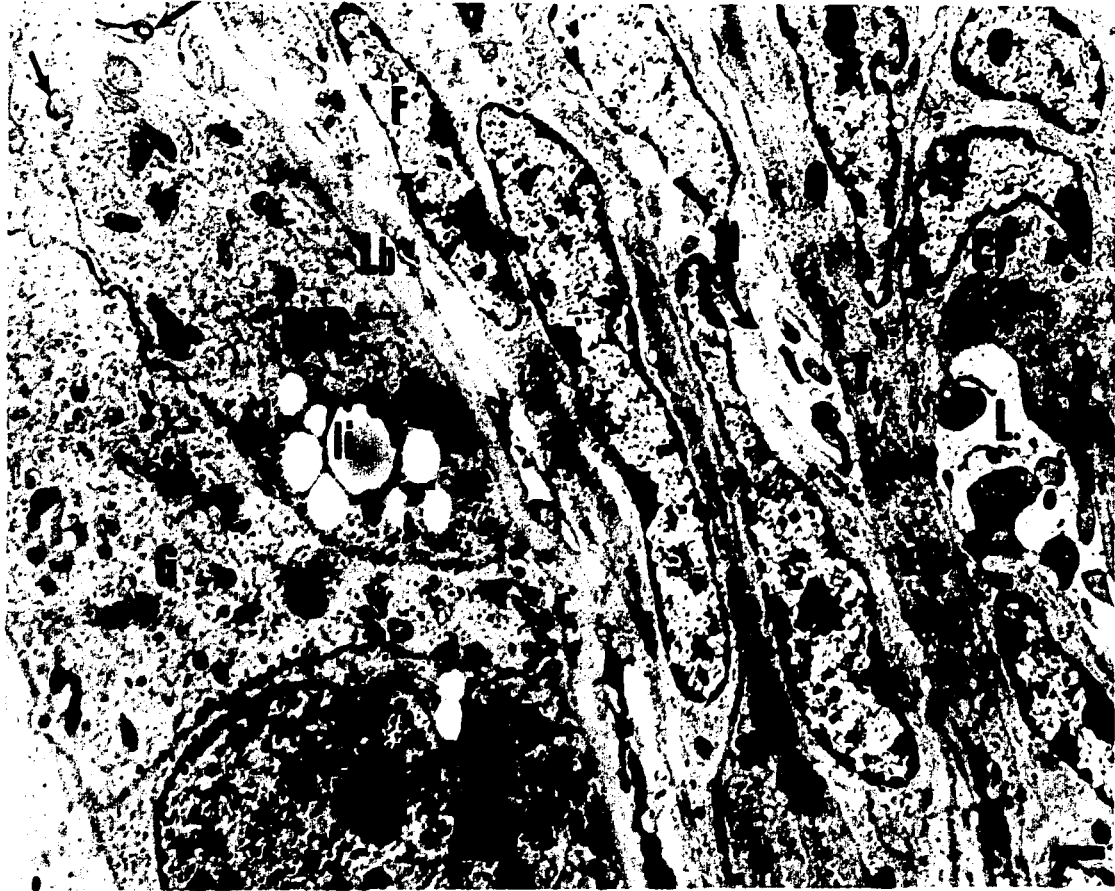


Fig. 8 Microscopía electrónica de un folículo < 1 mm. En el citoplasma de las células de la capa granulosa (G) se observan mitocondrias (m), RER, inclusiones lipídicas (li), así como transosomas (↓) localizados entre estas células. Delimitando a la capa granulosa se distingue la lámina basal (Lb). En la teca en formación se encuentran fibroblastos (F), células poco diferenciadas (CP) y terminaciones nerviosas (N). Bar=2.5 μm

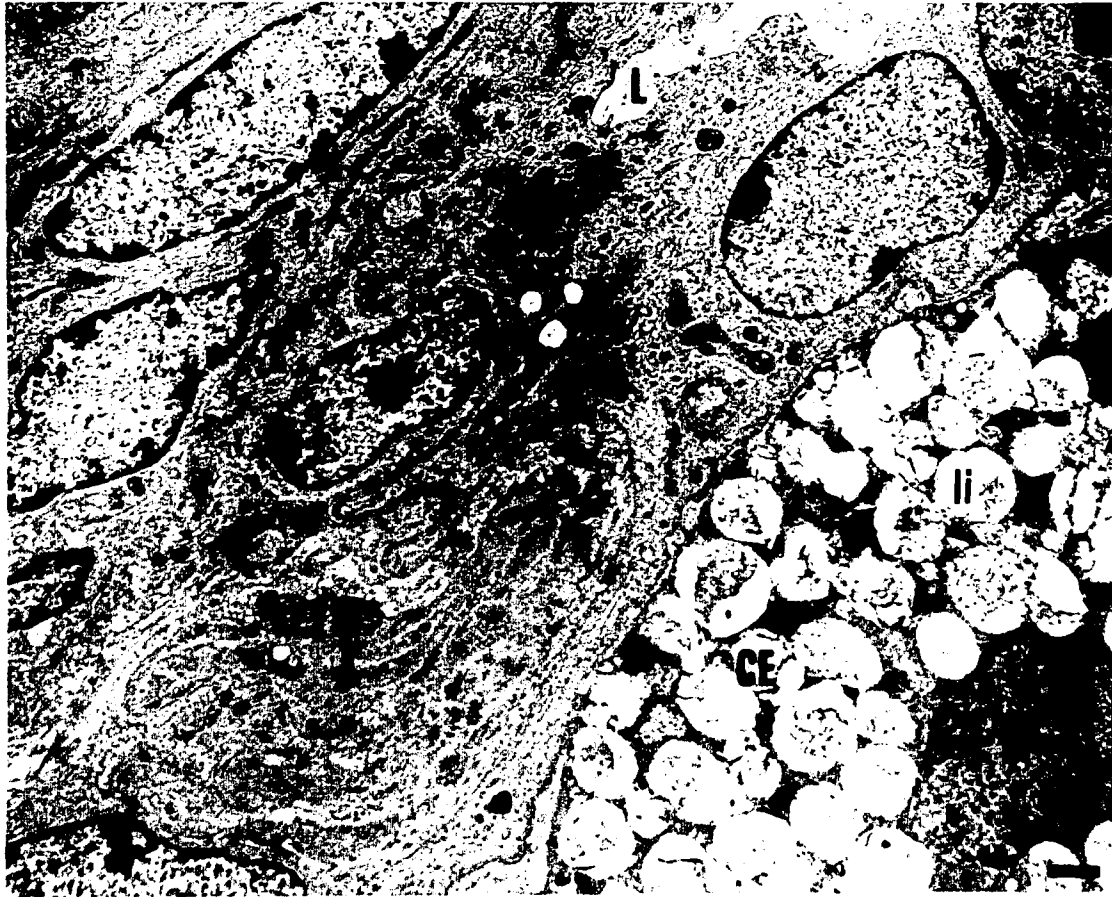


Fig. 9 Ultraestructura de un folículo inmaduro < 1 mm. Se observa la teca (T) en formación en la que se distingue una célula esteroidogénica (CE) intersticial con abundantes lípidos (li), la cual está en contacto con una terminación nerviosa (N) y con un vaso lacunar (L). Bar=2.5 μ m

algunos gránulos de vitelo en formación (Fig.5 y 6).

Se distinguió una lámina basal alrededor de la capa granulosa y por fuera de ella se localizó una fina capa de fibroblastos junto con fibras colágenas y reticulares en el sitio en el que se formará la futura zona tecal. Aunque la teca no se ha formado aún, en la región contigua se distinguieron algunos vasos sanguíneos, vasos lacunares y cordones de células poco diferenciadas rodeados por una lámina basal, localizándose hacia la parte más externa cordones de células esteroideogénicas típicas o intersticiales y en el interior de cada uno de estos cordones esteroideogénicos, se encontraron terminaciones nerviosas (Fig. 6, 7, 8 y 9). Por lo que se refiere a la ultraestructura de los folículos corticales, se apreciaron con detalle las especializaciones de membrana llamadas "lining bodies" entre las células epiteliales. En el citoplasma se distinguieron mitocondrias de diferentes tamaños, algunas con crestas transversales y otras con crestas de tipo lamelar. También se observaron inclusiones lipídicas, así como polirribosomas y abundante RER (Fig. 7 y 8).

En la región que se está constituyendo la futura teca, se distinguió la llegada de algunas terminaciones nerviosas con vesículas de centro denso, algunas de las cuales establecieron contacto con vasos lacunares y células intersticiales esteroideogénicas (Fig. 7, 8 y 9).

FOLÍCULOS DE 1 A 2 mm.

En los cortes semifinos de este tipo folicular, se observaron en el interior del ovocito numerosos gránulos de vitelo blanco. Las células de la capa granulosa se transformaron de un epitelio cúbico alto a un epitelio pseudoestratificado (Fig.10). Con TEM se pudieron distinguir en el citoplasma de las células granulosas, inclusiones lipídicas y mitocondrias pequeñas y grandes, con crestas transversales y lamelares. También se encontró abundante RER y polirribosomas, así como escaso REL. En la región apical del epitelio granuloso se distinguieron numerosas proyecciones celulares hacia el ovocito, con sus característicos transomas o "lining bodies". Este epitelio estaba rodeado por una membrana basal bien conformada, asociados al epitelio se localizaron fibroblastos y fibras de colágena, en esta capa en formación se observó la llegada de abundantes fibras axonales y terminaciones nerviosas, así como cordones de células esteroideogénicas típicas con numerosas inclusiones lipídicas que van siendo empujadas hacia el estroma ovárico (Fig. 11).

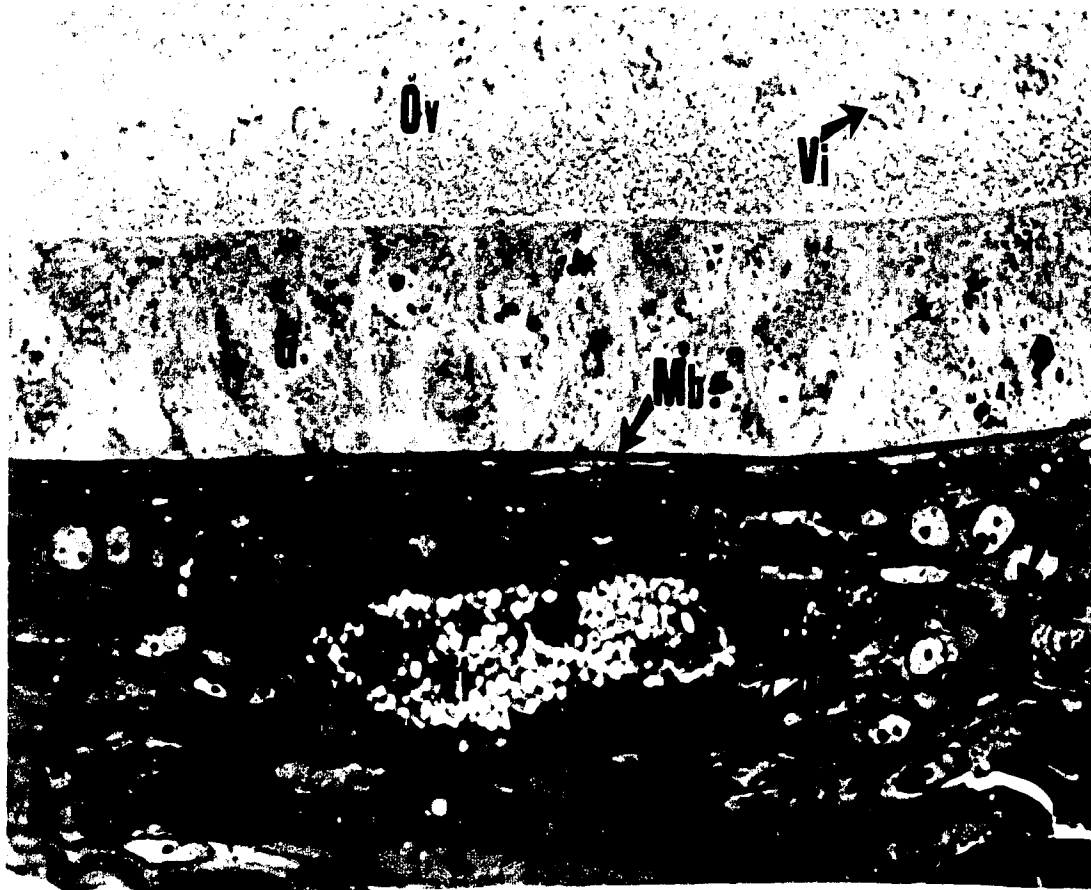


Fig. 10 Corte semifino de un folículo de 2 mm. Se observan gránulos de vitelo (Vi) en el interior del ovocito (Ov), alrededor del cual se encuentra la capa granulosa (G) delimitada por una membrana basal (Mb). La teca interna (TI) presenta una capa fina de fibroblastos (F), cordones de células esteroidogénicas (CE), vasos sanguíneos (V) y células esteroidogénicas típicas (Ti) con inclusiones lipídicas (li). En la teca externa (TE) se distinguen islotes de células poco diferenciadas (CP) y algunos vasos (V) periféricos. Bar=20 μ m



Fig. 11 Micrografía electrónica de un folículo de 2 mm. Se muestran células de la granulosa (G) con inclusiones lipídicas (li), mitocondrias (m), abundante RER, polirribosomas (pr) y "lining bodies" (↓), ésta zona se encuentra delimitada por una membrana basal (Mb). En la teca interna (TI) se observan algunas terminaciones nerviosas (N) v fibras axonales (Ax). Bar=2.5 μ m

La teca interna de los folículos de 2mm, se caracterizó por la presencia de un mayor número de fibroblastos, de tal modo que se hizo más fibrosa, entre dichos fibroblastos se distinguieron cordones de células poco diferenciadas rodeados por una fina lámina basal, los cuales presentaron una transformación a células esteroideogénicas, las que establecen un estrecho contacto con su lámina basal que es continua por un tiempo y posteriormente se comienza a disgregar en algunos puntos del cordón celular. En el citoplasma de estas células poco diferenciadas, que ya se empiezan a transformar a esteroideogénicas, se distinguieron estructuras tales como el aparato de Golgi, mitocondrias de diferentes tamaño y tipos de crestas, inclusiones lipídicas y abundante RER. En algunas regiones se distinguieron terminaciones y fibras nerviosas que llegaban tanto a vasos sanguíneos como a los cordones de células poco diferenciadas. En el interior de estas fibras nerviosas, se observaron abundantes microvesículas de centro denso, probablemente correspondientes a vesículas de neurotransmisores, de igual manera en estas fibras axonales se observaron mitocondrias, microtúbulos y microfilamentos característicos (Fig. 11 y 12).

En la teca externa fibrosa se encontraron islotes de nuevas generaciones de células poco diferenciadas limitados por una lámina basal, los cuales se ubican en el tejido conectivo tecal más periférico, en ese sitio se localizaron vasos sanguíneos periféricos de mayor calibre, así como nuevas generaciones de islotes de células poco diferenciadas que se encontraron cerca de la matriz extracelular. Las células esteroideogénicas típicas ubicadas entre el tejido tecal van siendo empujadas hacia afuera de la teca externa y no participan en la formación del folículo (Fig. 10, 12 y 13).

FOLÍCULOS DE 3 A 4 mm.

Los cortes semifinos de estos folículos mostraron en el ovocito gránulos de vitelo, la capa granulosa se mantuvo conservando la estructura de un epitelio pseudoestratificado, delimitado por la membrana basal. Ultraestructuralmente esta membrana se observó en relación tanto con la membrana perivitelina como con la zona radiada, a través de las especializaciones de membrana conocidas como transosomas, que son proyecciones de membrana emitidas por las células de la capa granulosa en su región apical, las cuales atraviesan desde la granulosa hasta el ovocito. En las membranas laterales de las células

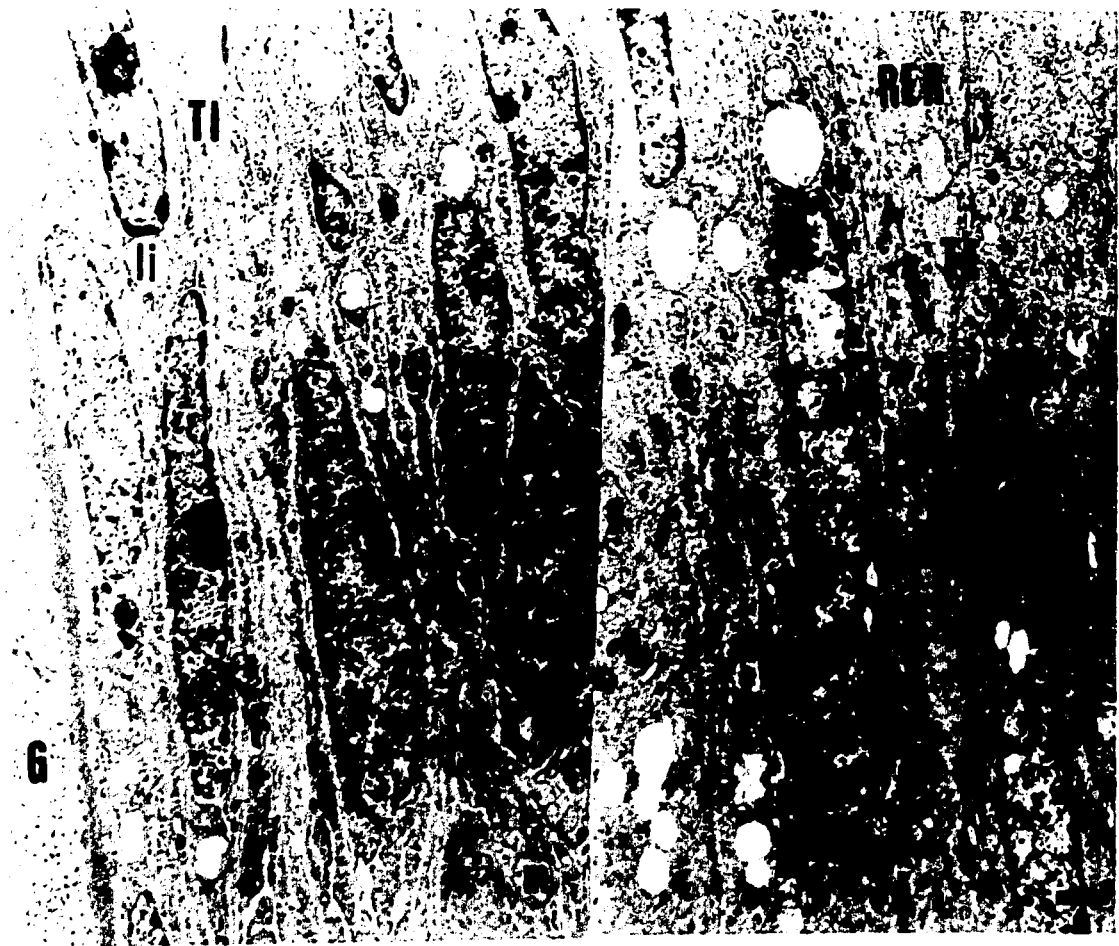


Fig. 12 Detalle ultraestructural de un folículo de 2 mm. Se identifica la teca interna (TI) en la que se encuentran fibroblastos (F) y cordones de células en transformación a esteroidogénicas (CT), en cuyo citoplasma se distinguen mitocondrias (m), inclusiones lipídicas (li) y aparato de Golgi (g). La teca externa (TE) contiene islotes de células poco diferenciadas (CP) en las que se aprecia RER. Bar=1.3 μ m



Fig. 13 Ultramicrografía de un folículo de 2 mm. En la teca externa (TE) se observan cordones de células poco diferenciadas (CP), limitados por una lámina basal (Lb), cerca de los cuales se distingue una terminación nerviosa (N). Bar=1.3 μ m

granulosas se distinguieron indentaciones que corresponden a microvellosidades, las cuales se identificaron entre las células contiguas de la membrana granulosa (Fig. 14 y 15).

En la teca interna se encontraron vasos sanguíneos estableciendo comunicaciones vasculares de trecho en trecho, los cuales participan en la circulación sanguínea. También se observaron cordones celulares, cuyas células mostraban una marcada transformación de poco diferenciadas a esteroideogénicas, distinguiéndose alrededor de estos, restos de la lámina basal que los compartimentalizaba, ya que ellos se encuentran en vías de desintegración, a estas células esteroideogénicas transicionales se asocian fibras de colágena y terminaciones nerviosas. En el citoplasma de estas células, se notó un incremento de las inclusiones lipídicas, sus mitocondrias presentaron crestas de tipo tubular y cerca de ellas se observó una gran cantidad de RER, polirribosomas, una pobre cantidad REL, así como también ocasionalmente se pudieron distinguir cilios intracitoplásmicos (Fig. 16).

En la teca externa se encontró un incremento en los cordones de células poco diferenciadas, los cuales se observaron delimitados por una lámina basal, también se distinguieron algunos vasos sanguíneos hacia la periferia de esta zona tecal (Fig. 14). En el citoplasma de las células esteroideogénicas se apreciaban mitocondrias con crestas transversales, abundante RER e inclusiones de lípido, así como cilios y uniones celulares desmosómicas. Las células esteroideogénicas intersticiales han sido empujadas hacia el estroma ovárico, quedando por fuera de los folículos de manera que ellas no se encontraban participando en la formación de los mismos (Fig. 17).

Entre la teca interna y la teca externa se lograron observar paquetes axonales rodeados y compartimentalizados por células nerviosas tipo Schwann, los cuales se encontraron estableciendo una relación con la irrigación sanguínea a través de estructuras vasculares particulares denominadas "black holes" localizadas en la teca externa, las cuales se identificaron ultraestructuralmente como depresiones evidentes que interrumpían la continuidad del tejido tecal (Fig. 14 y 17).

FOLÍCULOS DE 5 A 6 mm.

La microscopía de luz en estos folículos permitió observar la capa granulosa constituida por un epitelio cúbico alto, encontrándose en el límite de ella una membrana basal bien

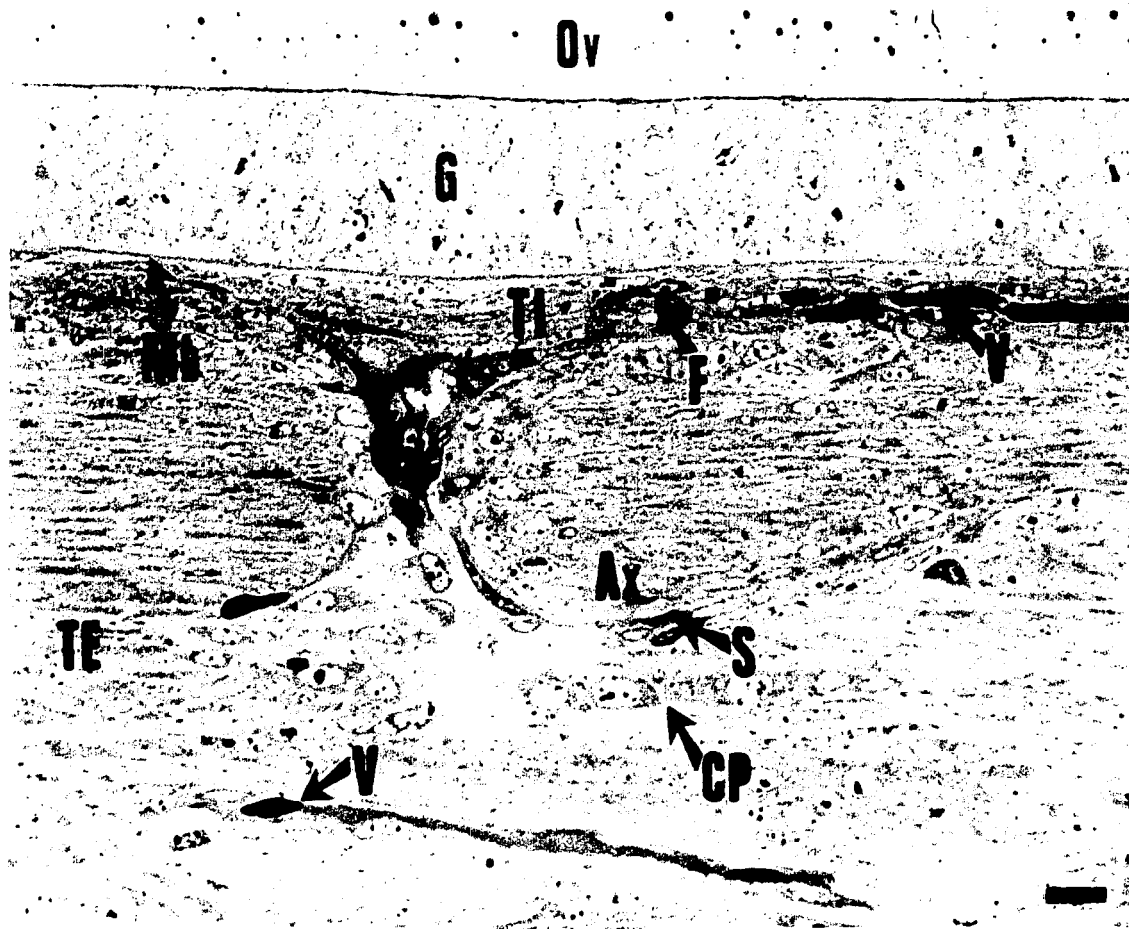


Fig. 14 Microscopía de luz de un folículo de 3.5 mm. Se observa el ovocito (Ov) rodeado por la capa granulosa (G), limitada por la membrana basal (Mb). La teca interna (TI) muestra una capa fina de fibroblastos (F) y vasos sanguíneos (V). En la teca externa (TE) se encuentran cordones de células poco diferenciadas (CP), así como "black holes" (*) y algunos vasos sanguíneos (V) en la periferia. Entre la teca interna y la teca externa se distinguen paquetes de fibras axonales (Ax) delimitados por células de Schwann (S). Bar=5 μ m

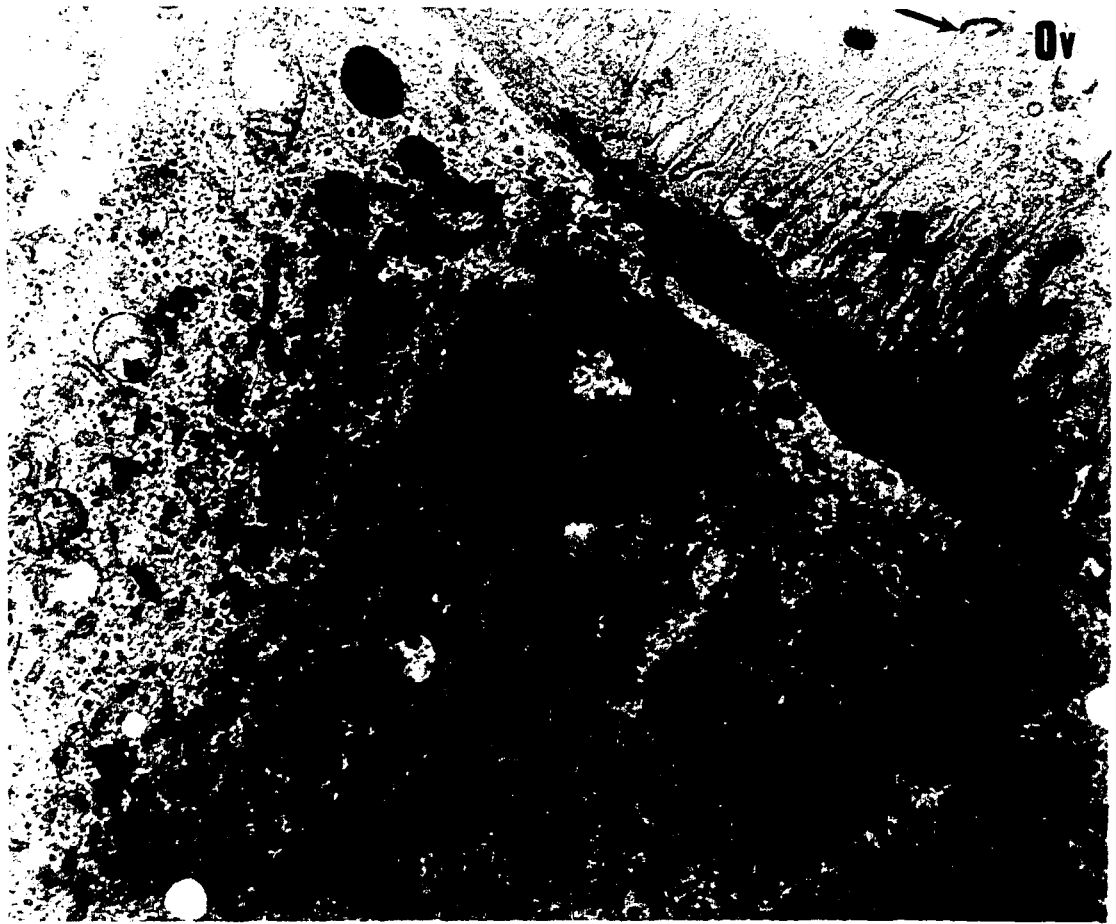


Fig. 15 Imagen de MET de un folículo de 3.5 mm. Se identifica al ovocito (Ov) con su zona radiada (ZR), en la que se distinguen extensiones (e) de las células de la granulosa (G) hacia el ovocito, las cuales se relacionan con los "lining bodies" (↓). Las membranas de las células granulosas muestran indentaciones laterales que corresponden a microvellosidades (mv). Entre la zona radiada y la capa granulosa se localiza la membrana perivitelina (Pv). Bar=0.5 μ m



Fig. 16 Ultraestructurta de un folículo de 3 mm. En la teca interna (TI) se encuentran cordones de células transformadas a esteroidogénicas (CT), delimitados por una lámina basal (Lb) discontinua. Estas células se ven cerca de fibras colágenas (Fc) y vasos sanguíneos (V), están en contacto con terminaciones nerviosas (N) y en su citoplasma se distinguen cilios (c), mitocondrias (m), polirribosomas (pr), inclusiones lipídicas (li) y RER. Bar=0.5 μ m

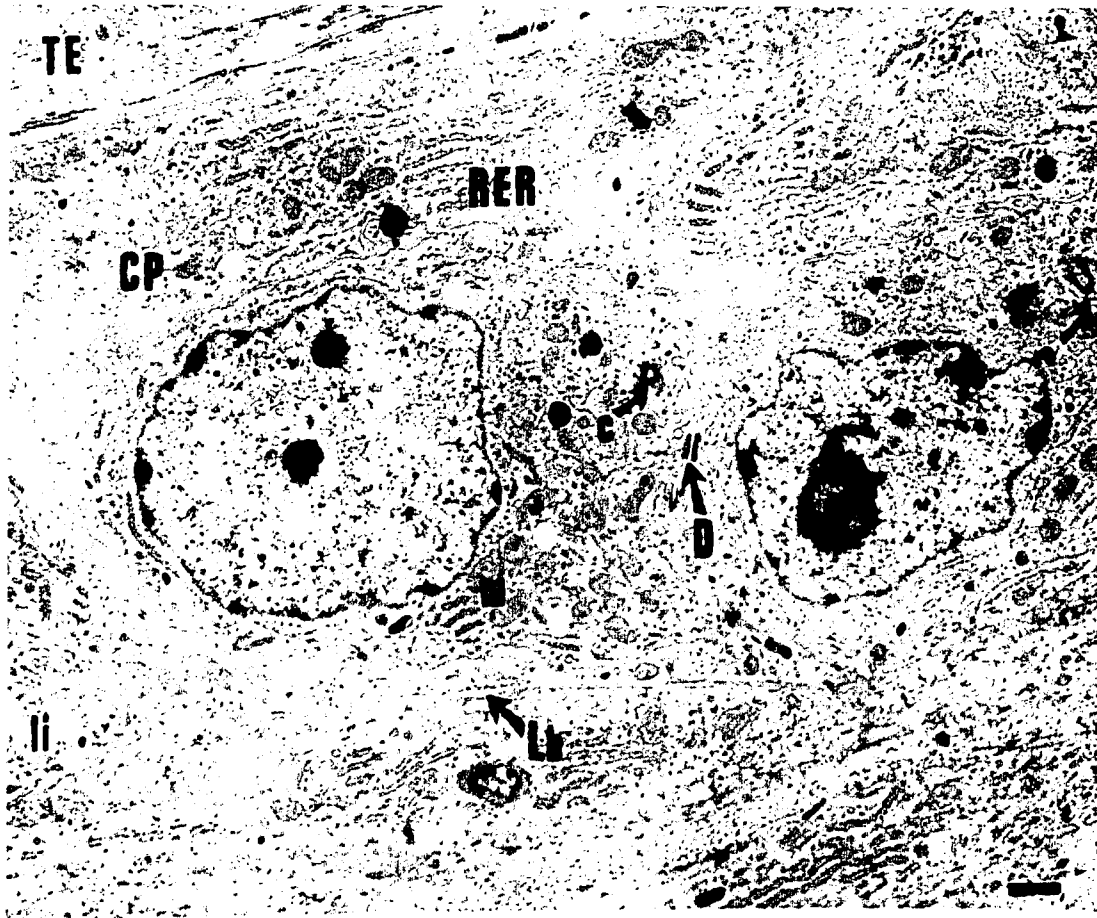


Fig. 17 Ultramicrografía de un folículo de 3.5 mm. En la teca externa (TE) se observa un cordón de células poco diferenciadas (CP) rodeado por una lámina basal (Lb). En el citoplasma de las células se distinguen mitocondrias (m), inclusiones lipídicas (li), cilios (c), RER y uniones celulares de tipo desmosoma (D). Bar=0.5 μ m

integrada, asociada a fibroblastos (Fig.18).

Ultraestructuralmente se logró distinguir al ovocito con su zona radiada, encontrándose entre ésta y la capa granulosa, la membrana perivitelina. Las células granulosas contenían estructuras intracitoplásmicas tales como mitocondrias de diversos tamaños, lípidos, así como abundantes polirribosomas y RER (Fig.19).

En la teca interna se encontraron algunos vasos sanguíneos, así como cordones de células en transformación hacia esteroideogénicas, los cuales con MET se observó que estaban rodeados por una lámina basal discontinua, asociada a una matriz extracelular. Las células de dichos cordones, contenían abundantes inclusiones lipídicas, polirribosomas, RER y algunas uniones celulares desmosómicas (Fig. 18 y 20).

En la teca externa se distinguieron entre el tejido conectivo que la conforma, cordones de células poco diferenciadas, en el citoplasma de cuyas células se observaron abundantes inclusiones lipídicas, mitocondrias de gran tamaño, abundante RER y polirribosomas, así como terminaciones nerviosas (Fig. 18 y 21).

FOLÍCULOS DE 7 A 8 mm.

Este grupo de folículos constituyen la frontera entre los folículos pequeños inmaduros y los de la línea amarilla, debido a que entre los folículos grandes de la línea blanca y los SYF que son los de menor tamaño de la línea amarilla, caracterizados por presentar un crecimiento rápido, así como porque son los que entrarán a la jerarquía folicular, se presentan grandes similitudes tanto estructurales como funcionales.

Con microscopía óptica en este tipo folicular se apreció un incremento en los gránulos de vitelo del ovocito (Fig. 22). Por lo que se refiere a la membrana vitelina, la región perivitelina y la zona radiada, se encontraron completamente estructuradas, visualizándose numerosas proyecciones de las células granulosas, que se ponen en contacto con el ovocito a través de las especializaciones de membrana o "lining bodies".

La capa granulosa está constituida por epitelio pseudoestratificado, esta conformación estructural se encontró estable a partir de los folículos de 3 a 4 mm de diámetro, observándose que a partir de este momento no sufre cambios, permaneciendo estable hasta la etapa de folículo preovulatorio (Fig. 22). Con microscopía electrónica se apreció la



Fig. 18 Microscopía óptica de un folículo de 5 mm. La capa granulosa (G) está limitada por la membrana basal (Mb). En la teca interna (TI) se encuentran vasos sanguíneos (V) y cordones de células en transformación a esteroideogénicas (CT) que contienen inclusiones lipídicas (li). La teca externa (TE) presenta abundantes cordones de células poco diferenciadas (CP) entre el tejido conectivo que la constituye. Bar=12.5 μ m

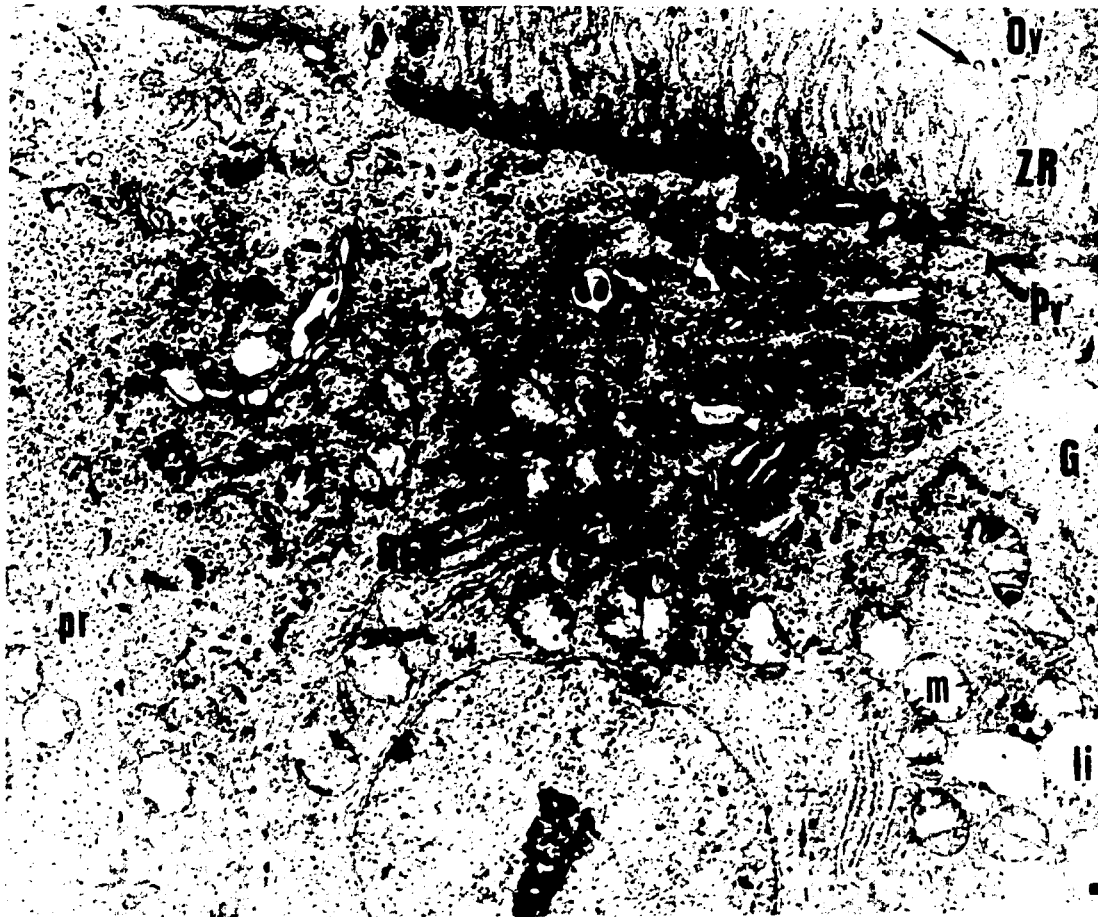


Fig. 19 Ultraestructura de un folículo de 5 mm. Se observa la zona radiada (ZR), notándose entre esta y la capa granulosa (G), la membrana perivitelina (Pv) con sus proyecciones hacia el ovocito (Ov), las cuales están relacionadas con los transosomas (↓). En el citoplasma de las células granulosa se ven numerosas mitocondrias (m), inclusiones lipídicas (li), abundante RER y polirribosomas (pr). Bar=0.8 μ m

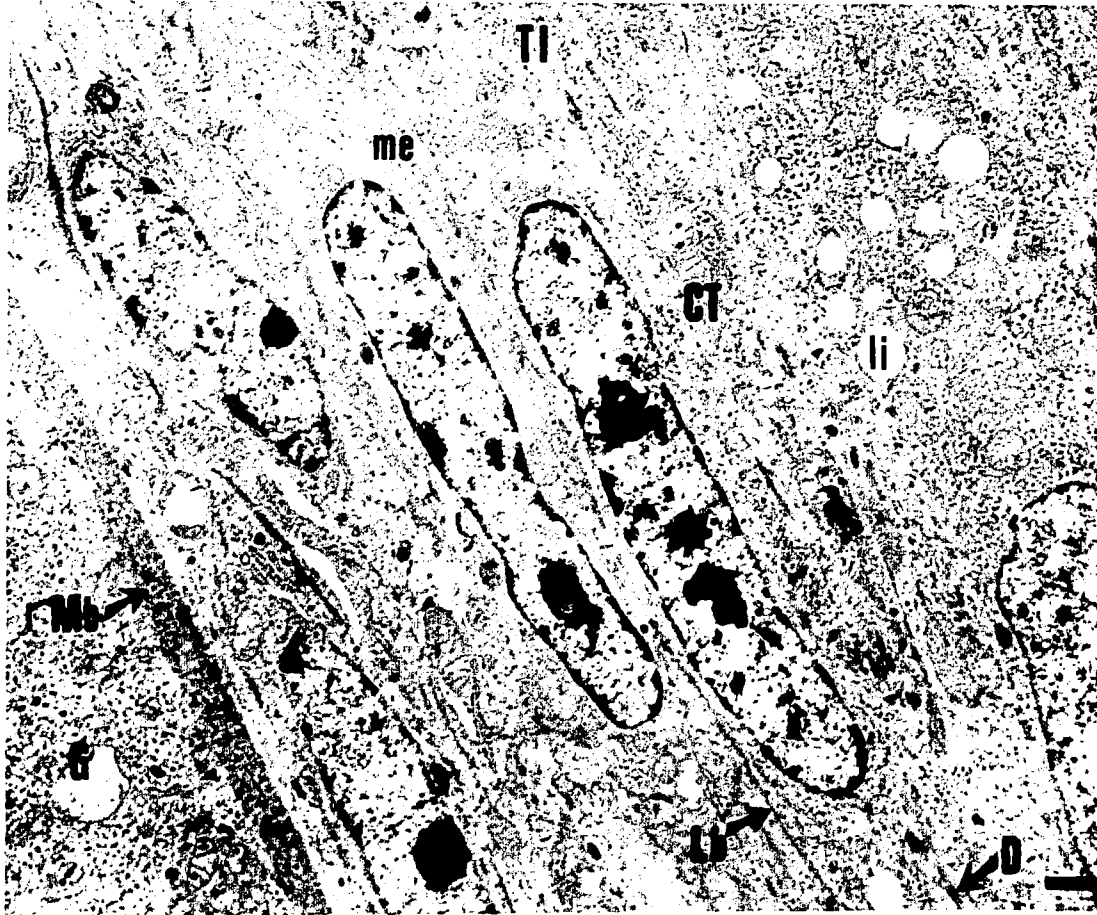


Fig. 20 Detalle de la ultraestructura de un folículo de 5 mm. Se observa la capa granulosa (G) relacionada con su membrana basal (Mb). En la teca interna (TI) se encuentran cordones de células en transformación a esteroidogénicas (CT), rodeados por una lámina basal (Lb) discontinua, en asociación con la matriz extracelular (me). En el citoplasma de éstas células hay numerosas inclusiones lipídicas (li) y entre ellas se aprecian uniones desmosómicas (D). Bar=2.5 μ m

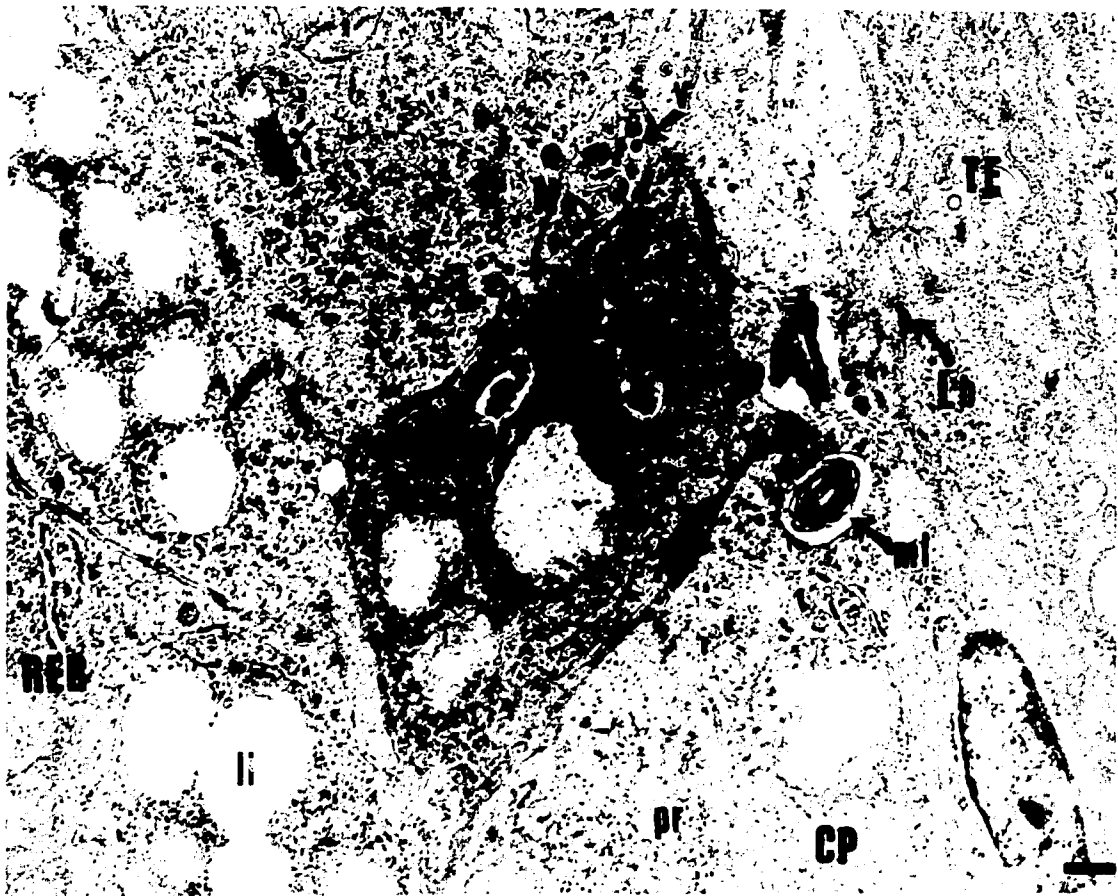


Fig. 21 Ultraestructura de un folículo de 5 mm. En la teca externa (TE) se distingue un cordón de células poco diferenciadas (CP) rodeado por una lámina basal (Lb). En el citoplasma celular se notan abundantes inclusiones lipídicas (li), un cuerpo mielínico (mi), RER y polirribosomas. En contacto con estas células se observan terminaciones nerviosas (N) con microvesículas en su interior (v). Bar=0.4 μ m

granulosa delimitada por la membrana basal, ya que la parte anhistia se engrosó quedando asociada a fibroblastos y a tejido conectivo, es bien sabido que al adquirir esta conformación se presentan en su composición química colágena y fibronectina. En las células granulosa se apreciaron numerosas mitocondrias, inclusiones lipídicas, RER y abundantes ribosomas (Fig. 23).

En la teca interna se distinguieron algunos vasos sanguíneos, así como cordones de células que se transformaron a esteroidogénicas. A mayor aumento estas células mostraron en su citoplasma mitocondrias, lípidos, RER y polirribosomas (fig. 22 y 23)

Las observaciones de la teca externa permitieron apreciar un incremento en los cordones de células poco diferenciadas, que hacia la periferia se encontraron asociadas a vasos sanguíneos de gran calibre (Fig. 22). Entre las células de los cordones poco diferenciados se localizaron uniones de tipo desmosómico, observándose en su citoplasma RER, vesículas de REL, abundantes polirribosomas, mitocondrias de diversos tamaños y complejo de Golgi en posición yuxtannuclear. La ultraestructura de esta capa tecal reveló la presencia de cordones de células poco diferenciadas compartamentalizadas por una lámina basal, así como células mioepiteliales ubicadas entre el tejido conectivo (Fig. 24).

Cabe hacer hincapié en que este grupo folicular continuará su desarrollo hacia la jerarquía folicular, dando lugar a los folículos preovulatorios que entrarán a la etapa de crecimiento rápido.



Fig. 22 Microscopía de luz de un folículo de 7 mm. En el ovocito (Ov) se observa un incremento de los gránulos de vitelo (Vi). La granulosa (G) continúa delimitada por la membrana basal (Mb). En la teca interna (TI) se encuentran vasos sanguíneos (V) y células que han sido transformadas a esteroidogénicas (CT). En la teca externa (TE) se aprecia un incremento de los cordones de células poco diferenciadas (CP) y en la periferia se distinguen vasos sanguíneos. Bar=14 μ m

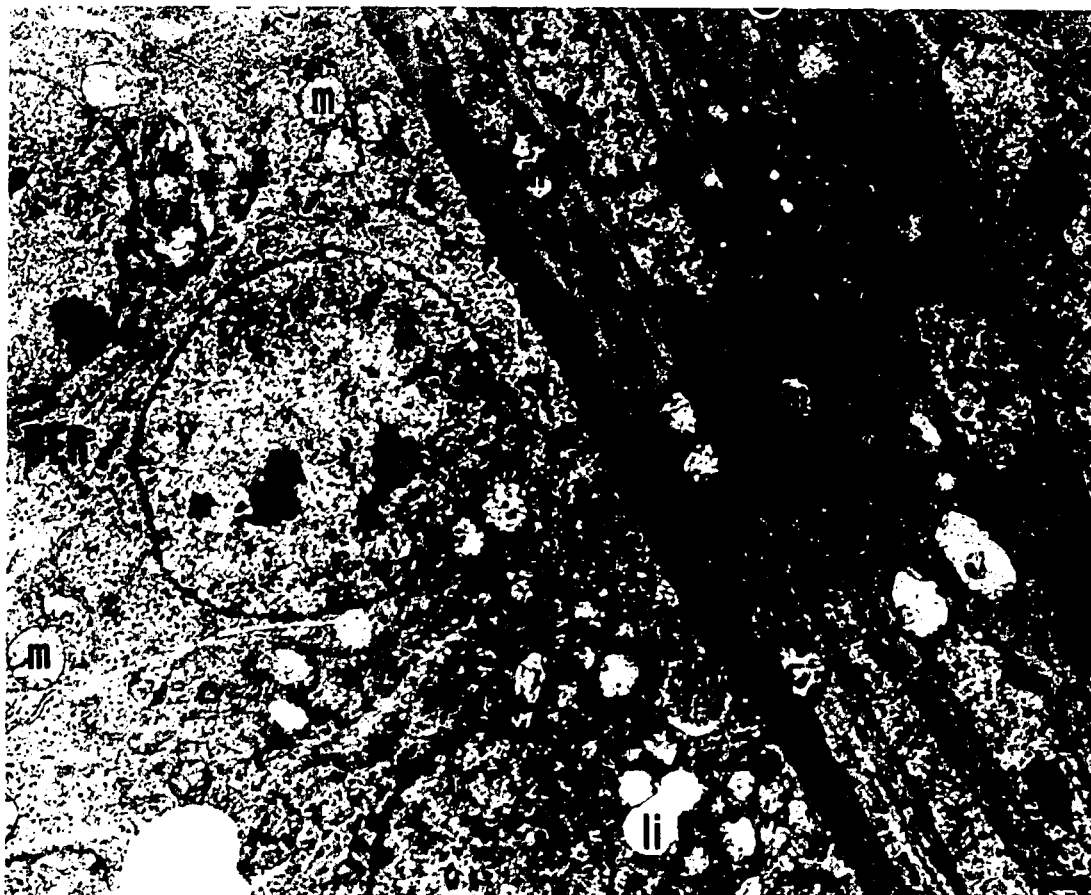


Fig. 23 Ultraestructura de un folículo de 7 mm. Se observa la capa granulosa (G), encontrándose en el citoplasma de sus células mitocondrias (m), inclusiones lipídicas (li), RER y polirribosomas (pr). La granulosa está delimitada por la membrana basal (Mb) y seguida de la teca interna (TI) en la que se distinguen cordones de células transformadas a esteroidogénicas (CT), en cuyo citoplasma hay inclusiones lipídicas (li), RER y mitocondrias (m). Bar=1 μ m

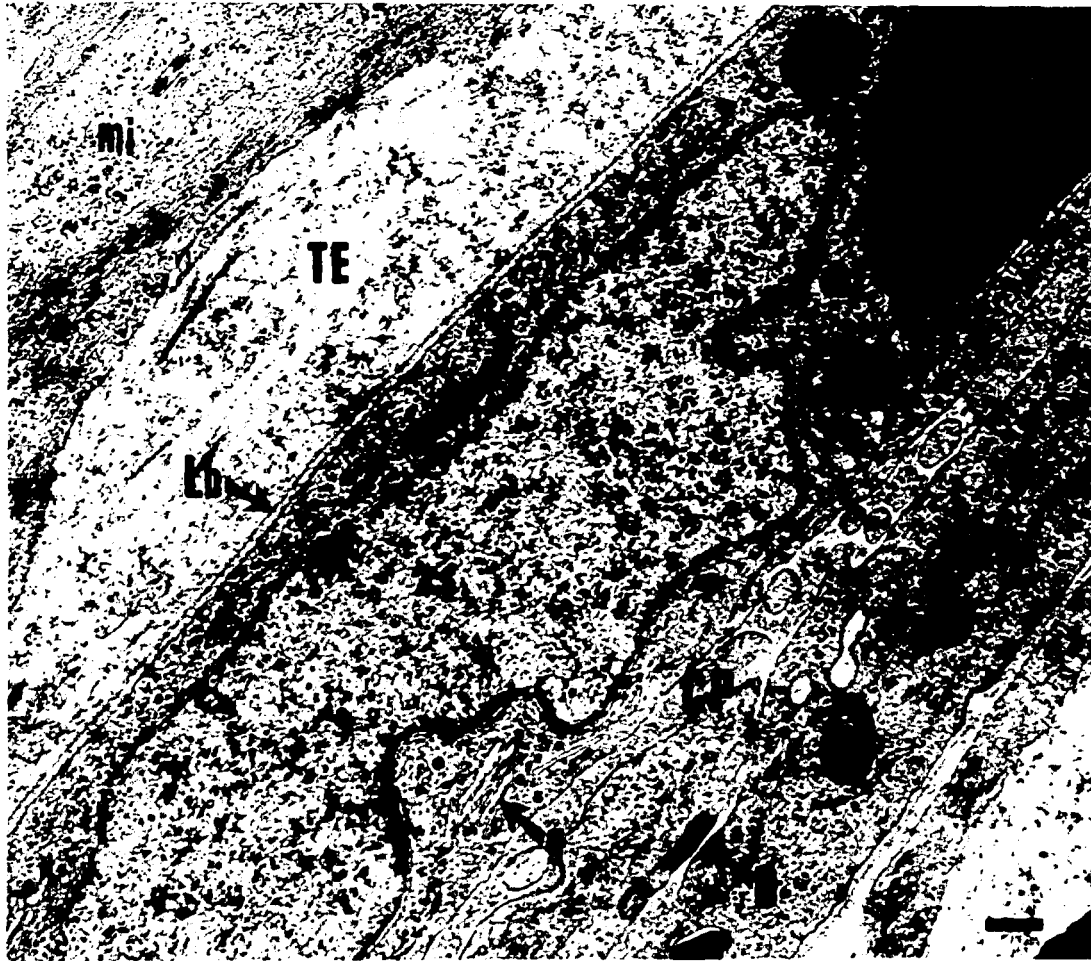


Fig. 24 Detalle de MET de un folículo de 7 mm. La teca externa (TE) muestra un cordón de células poco diferenciadas (CP), rodeado por su lámina basal (Lb). En el citoplasma de estas células se observa RER, vesículas de REL, mitocondrias (m), complejo de Golgi (g) y uniones celulares desmosómicas (D). Entre el tejido tecal se pueden apreciar células mioepiteliales (mi). Bar=0.4 μ m

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES ESTEROIDOGÉNICAS DE LOS FOLÍCULOS INMADUROS.

El análisis morfológico del presente estudio, se llevó a cabo con la finalidad de determinar los cambios relevantes que van sufriendo las poblaciones celulares esteroídogénicas de los folículos inmaduros de < 1 mm a 8 mm de diámetro de la gallina adulta, a través de su desarrollo para entrar posteriormente a la jerarquía folicular.

En la capa granulosa se observó, que inicialmente estaba conformada por una delgada capa de epitelio plano superficial delimitado por una lámina basal, el que más tarde se fue modificando primero en un epitelio cúbico alto y finalmente en un epitelio pseudoestratificado. Los cambios presentados en esta capa folicular, sugerían que podría haber cambios no solamente a nivel estructural, sino también en cuanto a su grosor, al hacer la medición de dicha capa y analizar estadísticamente los valores obtenidos se encontró una disminución significativa de $p < 0.05$ entre los grupos foliculares de 3 a 4 mm y 7 a 8 mm. Se pudo apreciar que a medida que va aumentando el diámetro folicular a lo largo del desarrollo, hay una disminución en el grosor de la granulosa, hecho que puede ser atribuido básicamente al mismo crecimiento del folículo (Tabla 1) (Gráfica 1).

Por lo que se refiere a la zona tecal, en los folículos corticales < 1 mm de diámetro aún no se ha formado, sin embargo se pueden distinguir alrededor de la lámina basal que limita a la capa granulosa, poblaciones celulares que más tarde intervienen en la estructuración de ésta misma, tales como una fina capa de fibroblastos, vasos sanguíneos y lacunares, cordones de células poco diferenciadas y en la parte más periférica cordones de células esteroídogénicas típicas, entre otras. Conforme se va desarrollando el folículo, esta zona se va definiendo, pudiéndose visualizar como tal a partir de los folículos de 2 mm de diámetro, en los cuales incluso se ha diferenciado hasta teca interna y teca externa.

En cuanto se refiere al desarrollo de estas dos capas, se pensó que podrían tener cambios significativos en su espesor, puesto que se van integrando nuevas poblaciones celulares durante su formación, por lo que se procedió a hacer la medición del espesor de ellas. Los valores obtenidos de la medición tanto de la teca externa como de la teca interna, fueron

AREAS ESTIMADAS EN MEMBRANA GRANULOSA, TECA INTERNA, TECA EXTERNA
E ISLOTES DE CELULAS POCO DIFERENCIADAS DE LA TECA EXTERNA

| n | DIAMETRO FOLICULAR | MEMBRANA GRANULOSA | TECA INTERNA | TECA EXTERNA | CELULAS POCO DIFERENCIADAS |
|---|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| | mm | μm^2 | μm^2 | μm^2 | μm^2 |

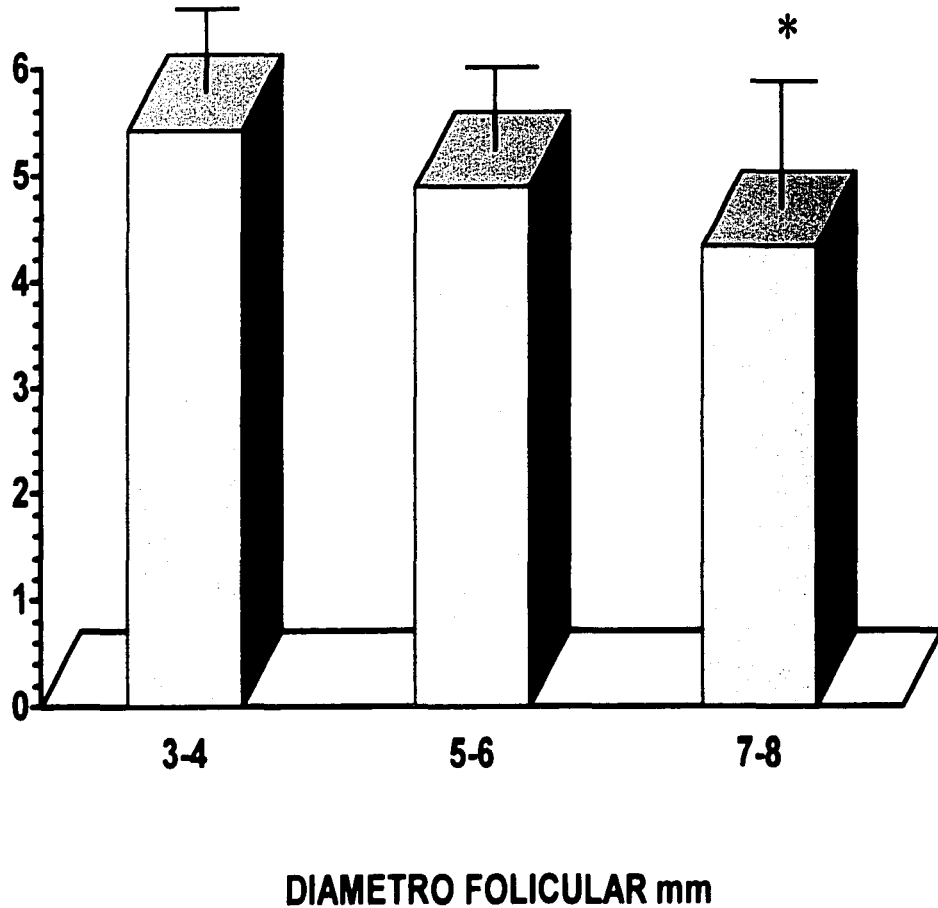
| | | | | | |
|---|-------|------------------|----------------|------------------|---------------|
| 8 | 3 - 4 | 5426 \pm 557* | 3319 \pm 462 | 14530 \pm 1389 | 197 \pm 57 |
| 7 | 5 - 6 | 4895 \pm 523 | 3382 \pm 332 | 13132 \pm 806 | 218 \pm 73 |
| 7 | 7 - 8 | 4336 \pm 1016* | 3309 \pm 769 | 15955 \pm 3757 | 282 \pm 123 |

Tabla 1.- \pm DE de las subpoblaciones estudiadas en los folículos inmaduros de ovario de gallina adulta. El * indica los grupos foliculares en los que se encontró una diferencia significativa en la capa granulosa.

Nota. El área se calculó en un segmento determinado para cada tipo folicular.

MEMBRANA GRANULOSA

AREA $10^3 \mu\text{m}^2$ *



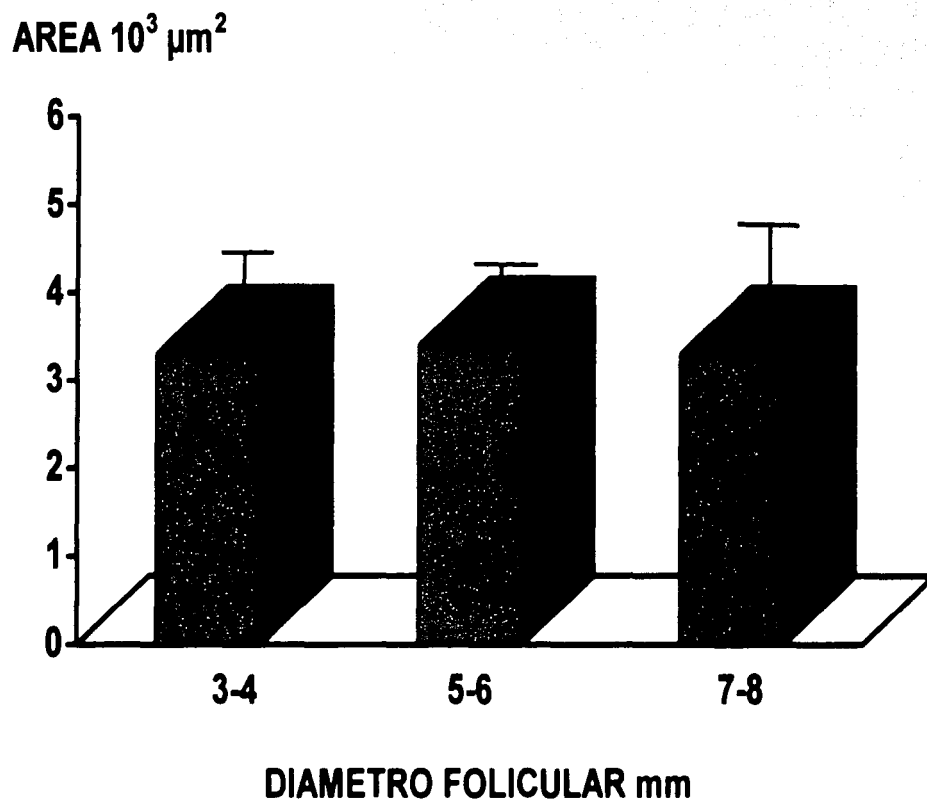
I.- Area de membrana granulosa de los folículos inmaduros de la gallina. Las barras representan la \pm DE (n=7). Las medias muestran una diferencia significativa de $p < 0.05$ entre 3-4 y 7-8.

analizados estadísticamente y no revelaron ninguna diferencia significativa entre los grupos estudiados (Tabla 1) (Gráficas I y II).

También se hizo la medición de los cordones de células poco diferenciadas de la teca externa, los valores obtenidos también fueron analizados estadísticamente, pero ellos tampoco mostraron ninguna diferencia significativa entre los grupos considerados para este estudio. Sin embargo en éstos valores se nota una tendencia de los cordones a incrementarse en número a través del desarrollo folicular, este hecho puede deberse al aumento del diámetro folicular a través de la maduración del mismo (Tabla 1) (Gráfica IV).

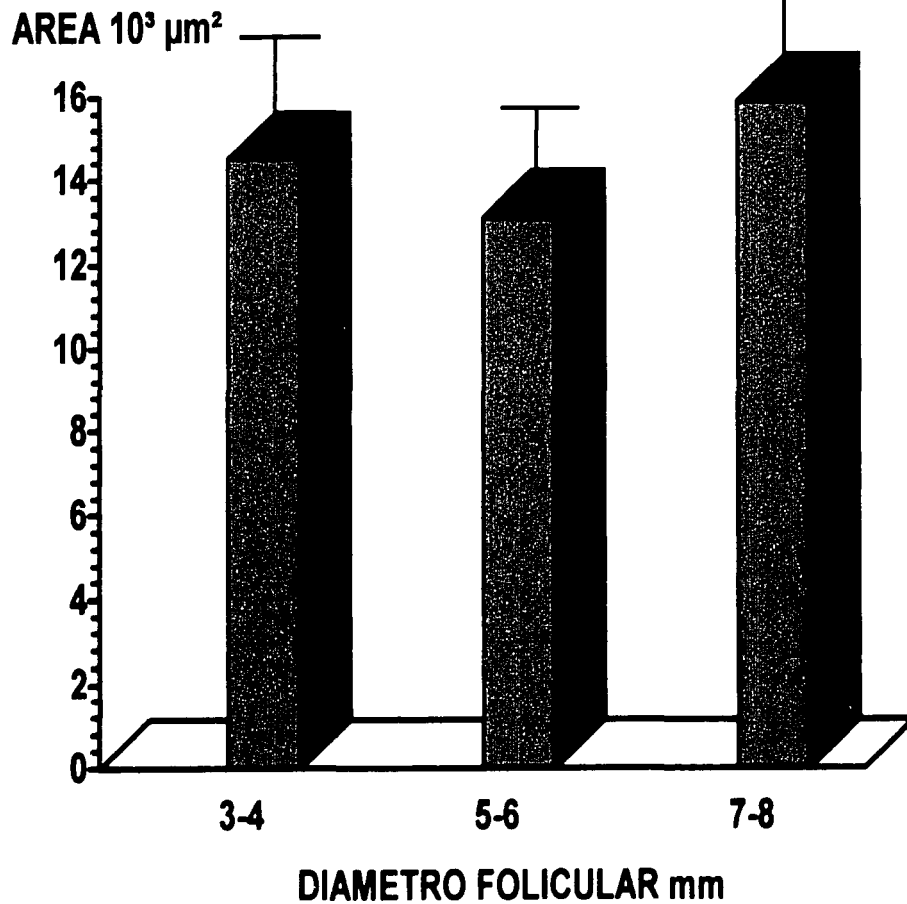
Los resultados obtenidos del análisis morfométrico que se llevo a cabo en este estudio, permiten sugerir que los cambios cuantitativos encontrados, pueden ser atribuidos al aumento en el tamaño del volumen folicular, debido al crecimiento que presentan ellos a través del proceso de foliculogénesis, previo a su entrada en la jerarquía folicular.

TECA INTERNA



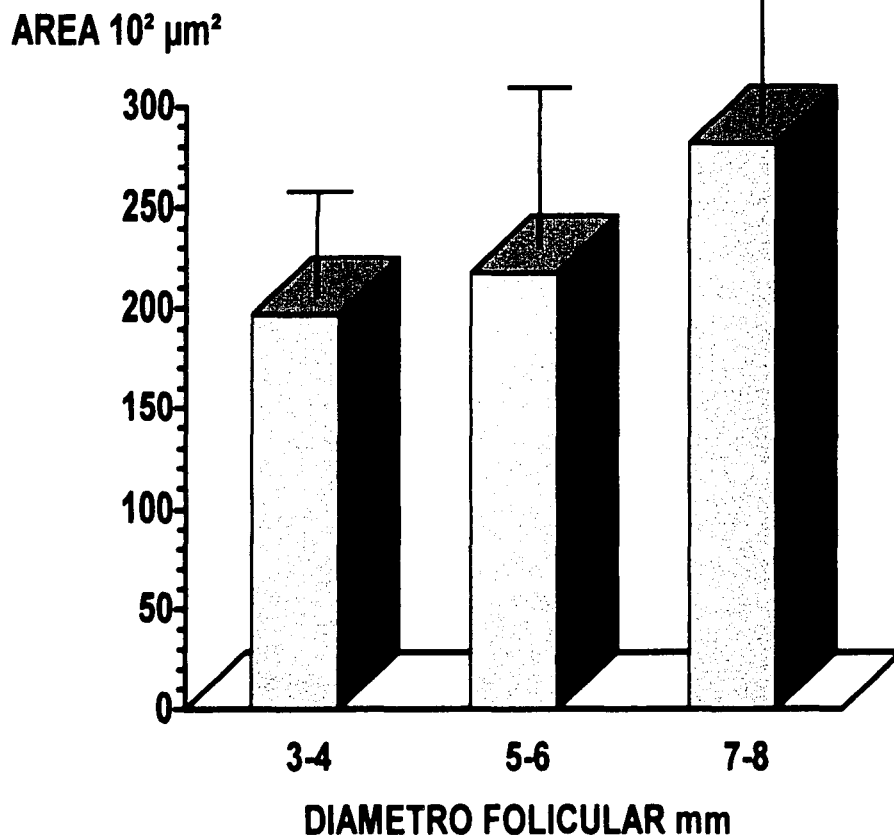
II.- Area de teca interna de los folículos inmaduros de la gallina. Las barras representan la \pm DE (n=7). Las medias no muestran una diferencia significativa.

TECA EXTERNA



III.- Area de teca externa de los folículos inmaduros de la gallina. Las barras representan la \pm DE (n=7). Las medias no muestran una diferencia significativa.

CELULAS POCO DIFERENCIADAS



IV.- Area de islotes de células poco diferenciadas. Las barras representan la \pm DE (n=7). Las medias no muestran una diferencia significativa.

DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis se realizó en los folículos pequeños inmaduros de la línea blanca, clasificándolos como ya se citó anteriormente en: 1) folículos < 1 mm de diámetro, 2) folículos de 1 a 2 mm, 3) folículos de 3 a 4 mm, 4) folículos de 5 a 6 mm y 5) folículos de 7 a 8 mm de diámetro.

La clasificación dada en éste trabajo, concuerda con algunos autores como Bellairs (1965), sin embargo, desde el punto de vista de Kikuchi (1992) y Nitta (1991a), se agrupan en: folículos corticales < 1 mm de diámetro embebidos en el estroma ovárico, folículos blancos pequeños que miden 1 mm de diámetro, folículos blancos grandes que miden de 3 a 5 mm de diámetro y folículos SYF que miden de 6 a 10 mm de diámetro. Probablemente esta diferencia de apreciación se debe a que el primer autor reporta su trabajo con un enfoque ultraestructural, en cambio los trabajos de los otros dos autores están encaminados a aspectos citoquímicos, son estudios en los que el objetivo es detectar la presencia de actividad esteroideogénica en los grupos celulares que integran a los folículos.

El enfoque dado al presente trabajo, fue morfológico y morfométrico, con la finalidad de cuantificar las modificaciones que se van dando en el grosor de las capas que conforman al folículo a través de las diferentes etapas de su diferenciación. Esto nos permite hacer el seguimiento de cómo se lleva a cabo la estructuración del folículo en desarrollo, así como la variación tanto de los componentes histológicos que constituyen a estas capas, como de la complejidad de ellas acorde a su grado de desarrollo, tratando de hacer con estos elementos una correlación con la actividad esteroideogénica de las poblaciones celulares participantes en dicha estructuración folicular, apoyándonos para esto en datos bibliográficos reportados por diversos autores, cuyos trabajos se refieren a la síntesis hormonal que se lleva a cabo en las diferentes etapas de este proceso (Dahl, 1970; Lee, 1994; Nitta et al., 1991a y 1991b).

En este estudio se observó que los folículos corticales < 1 mm de diámetro, embebidos en el estroma ovárico están constituidos por la capa granulosa formada por una delgada capa de epitelio cúbico bajo limitado por una membrana basal, alrededor de la cual se encuentra una zona conformada por células provenientes de tejido conectivo a partir de la cual se formará

posteriormente la teca.

A pesar de que no existen en la literatura reportes de la inervación en estos folículos, en las observaciones realizadas en este trabajo tanto de microscopía óptica como de electrónica, se puso de manifiesto en el estroma ovárico la presencia de fibras y terminaciones nerviosas asociadas a vasos sanguíneos y lacunares, así como paquetes de fibras nerviosas en las cercanías de estos folículos corticales, que aparentemente participan en la inervación de la teca en formación (Fig.7).

Por otro lado, estudios realizados acerca de la producción de esteroides en la capa granulosa ponen de manifiesto que no hay síntesis de progesterona en los folículos < 1 mm de diámetro, sin embargo a medida que se va llevando a cabo la maduración folicular, desde los folículos de 6 a 8 mm hasta los preovulatorios se muestra la síntesis de dicha hormona, lo cual se explicaría por la entrada de los folículos de 6 a 8 mm de diámetro a la jerarquía folicular y posteriormente de los preovulatorios a la ovulación (Johnson, 1993; Nitta et al., 1991b).

En este estudio morfológico se identificaron en la región más periférica de la teca en formación, cordones de células esteroidogénicas típicas, cuyas células contienen elementos histológicos característicos de células productoras de esteroides, como son la presencia en su citoplasma de abundantes inclusiones lipídicas y mitocondrias con crestas tubulares.

Tratando de hacer una correlación de estas estructuras con trabajos publicados, en los cuales se han puesto de manifiesto las poblaciones esteroidogénicas presentes en las células intersticiales de la médula ovárica del folículo, se encontró que hay referencias en las cuales no queda muy claro cuál es el destino de dichas células y cómo es que ellas se incorporan a la capa tecal (Narbaitz et al., 1968).

También se ha propuesto que las células intersticiales se desplazan desde la médula del ovario, avanzando sobre la capa granulosa del folículo para situarse finalmente en la teca interna una vez que esta se constituye, aunque no se menciona en que tipo de folículos se llevó a cabo este estudio (Dahl, 1970; 1971). Del mismo modo Dahl (1970) cita que los folículos están rodeados por la teca interna, en la cual se encuentra la llamada "glándula tecal", formada por cúmulos de células epiteliales que están relacionadas con terminaciones nerviosas rodeadas de células de Schwann. Este autor establece en la glándula tecal la

presencia de dos tipos celulares: a) células productoras de esteroides que contienen en su citoplasma numerosas inclusiones lipídicas, mitocondrias con crestas tubulares, aparato de Golgi yuxtannuclear, abundante REL y escaso RER, y b) células envolventes que se encuentran rodeando a las primeras, con una morfología completamente diferente a las anteriores, éstas células no contienen en su citoplasma inclusiones lipídicas, sus mitocondrias son pequeñas con crestas transversales y presentan RER (Dahl, 1970; Nitta et al., 1991b).

Tomando en consideración los resultados morfológicos obtenidos en este estudio, es importante resaltar que en la teca interna de los folículos inmaduros, se observó la presencia de una población de células poco diferenciadas en transformación a esteroideogénicas, que no corresponde a los cúmulos de células intersticiales típicas descritas anteriormente en la literatura (Dahl, 1970 y 1971). Estos cúmulos de células intersticiales se localizaron periféricamente cerca de los folículos en crecimiento, pero no participan en la formación de los citados folículos, por lo que es incorrecta la denominación de esta estructura como glándula tecal.

Es importante hacer notar que la población correspondiente a la teca interna, lleva células que se van a transformar a esteroideogénicas a través de la maduración folicular y los islotes de células intersticiales se mantienen con sus características definidas y se localizan en el estroma ovárico, estando fuera de la estructura folicular. De tal manera que no deben confundirse las células esteroideogénicas en transformación de la teca interna, con los islotes de células intersticiales, aunque en un principio pueda ser similar su morfología y aún su fisiología, de tal forma que deben considerarse como dos poblaciones celulares distintas.

En los folículos preovulatorios, en los que la teca externa ya está bien definida, las células intersticiales del ovario permanecen en el estroma ovárico por fuera del folículo y tampoco forman parte de la teca externa.

A este respecto, recientemente se ha descrito que en los folículos < 1 mm de diámetro existen dos poblaciones celulares esteroideogénicas (Nitta et al., 1991a): las células intersticiales localizadas en la periferia de la teca en formación, en las cuales ha sido comprobada su actividad esteroideogénica mediante la localización de la enzima P450, ya que éstas células han mostrado inmunoreactividad a las enzimas P450_{sec} y P450_{C17}.

involucradas en la síntesis de pregnenolona y andrógenos respectivamente, por otro lado, rodeando a las células intersticiales, se describe al otro tipo de células denominadas envolventes que también son esteroideogénicamente activas, puesto que presentan inmunoreactividad a la enzima P450arom. Por el contrario en la granulosa de éstos folículos incipientes, no se ha reportado haber encontrado actividad esteroideogénica. Las imágenes ultraestructurales encontradas en los cortes realizados en este estudio, muestran que la capa granulosa está constituida por un epitelio cúbico monoestratificado (Fig. 5), lo cual indica que ésta capa aún no presenta características de una población celular esteroideogénica, concordando con la falta de actividad esteroideogénica citada anteriormente, para este tipo folicular. Por el contrario, en las observaciones de dichos cortes, en la zona tecal en formación, se encontraron tanto cordones de células poco diferenciadas, como células intersticiales, ambas poblaciones celulares con numerosas inclusiones lipídicas, RER abundante, escaso REL y mitocondrias que tienen crestas tubulares y transversales (Fig. 6 y 9), características que permiten identificarlas como típicas poblaciones celulares con actividad esteroideogénica, la morfología encontrada para dichos linajes celulares, nos permite correlacionarla con la actividad esteroideogénica reportada en la bibliografía mencionada (Nitta et al., 1991a), respecto a la actividad esteroideogénica de las poblaciones celulares que están estructurando a los folículos < 1 mm.

Por otro lado, en la literatura se pone de manifiesto que la corteza ovárica tiene una extensa red de fibras nerviosas relacionadas con vasos sanguíneos en los folículos en desarrollo (Sisson et al., 1986), éste hallazgo concuerda con las observaciones hechas en este trabajo de la ultraestructura de los folículos, ya que se observó inervación a partir de los folículos inmaduros < 1mm, dicha inervación se localizó entre el tejido conectivo que conforma al estroma ovárico, a partir del cual se empieza a estructurar la zona tecal.

Otro hallazgo importante que se percibió al realizar este trabajo, fue el hecho de que en los folículos de 1 a 2 mm y de 3 a 4 mm de diámetro, la teca interna se apreció constituida por una fina capa de fibroblastos y por células poco diferenciadas que presentan una clara transformación a células esteroideogénicas, lo cual concuerda con lo propuesto en la literatura respecto la existencia de una población de células productoras de esteroides, situada entre la granulosa y los fibroblastos (Wells et al., 1984), aunque no se define a partir

de que tipos celulares se originan dicho linaje celular. En este trabajo se pone en evidencia la transformación de esta población de células esteroideogénicas a partir de islotes de células poco diferenciadas, que cambian paulatinamente, adoptando características morfológicas de tipo esteroideogénico.

Es importante mencionar que la teca externa se conforma a partir del tejido conectivo, donde van apareciendo cordones de células poco diferenciadas a medida que crecen y maduran los folículos. Estos cordones de células que se ubican en la teca externa, llevan a las denominadas células aromatasa positivas, que son productoras de estrógenos en las aves (Nitta et al., 1991). Cabe mencionar que en otros grupos animales, como en los mamíferos, las células que presentan actividad enzimática para la aromatasa se encuentran en la capa granulosa (Carlson, 2000).

Los canales lacunares se han encontrado como estructuras características en los grupos de las aves y los reptiles, sin embargo no se sabe a ciencia cierta cual es el papel y el origen de estos. A través de este trabajo, en el desarrollo de los folículos ováricos se pudo apreciar que algunas células de la población de las poco diferenciadas, se encuentran delimitadas por una lámina basal, comenzando a formarse una luz entre dichas células, la cual posteriormente dará lugar a la formación de los canales lacunares. Por otro lado, recientemente en la literatura, los canales lacunares han sido relacionados con la digestión y absorción de la yema, junto con las especializaciones de membrana denominadas "lining bodies", también se ha visto que las conexiones de estos sistemas se van modificando en las diferentes etapas del desarrollo folicular. Los transosomas se aprecian a partir de los folículos pequeños de 1 a 2 mm de diámetro y se ven incrementados en los folículos de 3 a 6 mm, notándose que en los folículos de 8 mm hay una marcada reducción de estas estructuras (Kovacs et al., 1992; Nili et al., 1995), lo que hace pensar que en estos folículos, la conexión de los transosomas con el ovocito deja de ser importante, debido a que ellos se acercan a la etapa preovulatoria. La pérdida de los transosomas y la acumulación de gotas de lípidos son eventos característicos que se manifiestan en la atresia folicular, proceso que ha sido descrito a través de la foliculogénesis para todos los tipos foliculares. Las observaciones ultraestructurales llevadas a cabo en este trabajo, concuerdan con lo propuesto en la literatura, ya que en las muestras estudiadas se encontró la presencia de los

transosomas de una manera similar a lo descrito, viéndose estos cambios a través del desarrollo en los diferentes tipos foliculares.

En los folículos pequeños inmaduros de 1 a 2 mm (Fig.11), se observó que la presencia de los "lining bodies" es menor, respecto a los folículos de 3 a 6 mm diámetro, en donde estas especializaciones de membrana son más abundantes (Fig.15), decreciendo su número en los folículos de 7 a 8 mm, que son de mayor tamaño (Fig. 19).

En cuanto a la teca externa, hay estudios en los que se proponen dos poblaciones celulares esteroideogénicamente activas, las células intersticiales y las células aromatasa positiva adyacentes o envolventes que rodean a la teca, situadas en la zona periférica. A éste respecto en el estudio morfológico llevado a cabo, se observaron cordones de células poco diferenciadas, en cuyo citoplasma se apreciaron abundantes inclusiones lipídicas, así como numerosas mitocondrias de diversos tamaños y escaso REL, lo cual sugiere que este linaje celular tiene una actividad esteroideogénica. Las células llamadas aromatasa positiva, de acuerdo a las observaciones hechas, corresponderían a los cordones de células poco diferenciadas anteriormente citadas (Nitta et al., 1991b).

Los datos morfológicos encontrados en el presente trabajo, permiten sugerir que las células intersticiales son removidas paulatinamente, a través del desarrollo, hacia el exterior del folículo y en su lugar se van diferenciando nuevas poblaciones celulares que entran en proceso de transformación, ellas se mantienen rodeando externamente a los folículos y no parecen participar en la formación de estos. Posteriormente se generan nuevas poblaciones de células poco diferenciadas arregladas en cordones celulares bien delimitados por una lámina basal, las cuales junto con células del tejido conectivo, así como con células mioepiteliales forman la teca externa, éstos cordones se van colocando en la zona más periférica de la teca externa.

Los folículos de 5 a 7 mm de diámetro no sufren cambios estructurales sobresalientes, una vez que su conformación histológica ha sido adquirida es muy estable, solo se puede percibir en este tipo folicular el crecimiento y la maduración. Es importante mencionar que en esta etapa se apreció la inervación, al igual que en otros tipos foliculares, observándose en las imágenes analizadas tanto de la teca interna como de la teca externa (Fig. 13, 14 y 21), apreciándose tanto fibras como terminales nerviosas en las diferentes etapas del desarrollo.

En los folículos de 8 mm de diámetro, contrario a lo que sucede en los folículos menos desarrollados, se empiezan a presentar cambios importantes que los conducirán a su transformación en folículos preovulatorios de la línea amarilla, adquiriendo poco a poco las características típicas de folículos que entrarán a la jerarquía folicular de crecimiento rápido, entre las cuales, una de las más sobresalientes es la formación de la yema o vitelo en el que se almacenan gran cantidad sustancias nutritivas, siendo este el principal factor que determina el tamaño del ovocito en las aves. Otro cambio importante detectado en estos folículos, es el que se refiere a su actividad hormonal, ya que como se ha descrito anteriormente va cambiando acorde a los cambios morfológicos presentados a través del desarrollo folicular (Dahl, 1970; Lee, 1994; Nakabayashi et al., 1998; Nitta et al., 1991a y 1991b).

En folículos de 1 a 10 mm de diámetro, en los cuales la zona tecal ya se encuentra estructurada, han sido observadas células intersticiales tanto en teca interna como en teca externa, en las que se han detectado las enzimas P450_{sec} y P450_{C17}, y la P450_{arom} se ha encontrado únicamente en teca externa. En cuanto a la granulosa, los estudios realizados en los folículos pequeños inmaduros, no refieren haber encontrado actividad esteroidogénica (Nakabayashi et al., 1998; Nitta et al., 1991b), aunque es bien conocido que los folículos preovulatorios ya presentan actividad esteroidogénica en la granulosa (Porter, 1989).

La literatura citada, refiere que la posición anatómica entre las células intersticiales y las células aromatasa positiva, va cambiando conforme se va estructurando el folículo a través del desarrollo, encontrándose cada vez más alejadas entre sí a medida que los folículos van incrementando su diámetro. Este cambio estructural también fue percibido en las observaciones llevadas a cabo el presente trabajo, hecho que representa un cambio importante en la morfogénesis de las poblaciones celulares esteroidogénicas que conforman el folículo en crecimiento.

Es importante subrayar que al presentarse el desarrollo y la transformación de los folículos inmaduros en preovulatorios, cada uno de estos folículos se va a compartamentalizar como una entidad independiente, pero a la vez establecen comunicación con el estroma ovárico y no pierden su relación con el ovario.

X. CONCLUSIONES

- ◆ Tomando en consideración la estructura encontrada en los folículos pequeños inmaduros en este estudio, se les clasificó de acuerdo a su tamaño en los siguientes grupos: 1) Folículos corticales < 1 mm de diámetro, 2) Folículos de 1 a 2 mm de diámetro, 3) Folículos de 3 a 4 mm de diámetro 4) Folículos de 5 a 6 mm de diámetro y 5) Folículos de 7 a 8 mm de diámetro.
- ◆ En los folículos corticales < 1 mm de diámetro se observó que la capa granulosa está constituida por un epitelio cúbico, delimitado por una lámina basal. La zona tecal en estos folículos aún no se ha formado, encontrándose solo tejido conectivo asociado a cordones de células poco diferenciadas y vasos lacunares.
- ◆ En los folículos de 1 a 2 mm de diámetro la capa granulosa se ha transformado de un epitelio cúbico alto a un epitelio pseudoestratificado, rodeado por una membrana basal ya que la parte anhistá se ha engrosado, quedando asociada a tejido conectivo y a fibroblastos. En éstos folículos ya se ha formado el tejido tecal, diferenciándose en dos capas, la teca interna y la teca externa.
- ◆ En los folículos de 3 a 6 mm la capa granulosa no sufre cambios morfológicos sobresalientes, la teca interna muestra una clara transformación de las células de los cordones de células poco diferenciadas, hacia células esteroideogénicas. En la teca externa se empiezan a distinguir nuevas generaciones de células poco diferenciadas, así como células intersticiales productoras de andrógenos, las que van siendo empujadas paulatinamente hacia la periferia, hasta que son ubicadas en el estroma ovárico, hacia fuera del folículo.
- ◆ En los folículos de 7 a 8 mm de diámetro se apreció un incremento de los gránulos vitelo en el ovocito. En la teca interna se observó que las células poco diferenciadas de los cordones, se transformaron a esteroideogénicas y en la teca externa se percibió un incremento en los cordones de células poco diferenciadas, respecto a los grupos de folículos menos desarrollados.
- ◆ Los datos morfométricos demostraron una diferencia significativa entre los grupos de los folículos de 3 a 4 mm, con respecto a los de 7 a 8 mm, observándose que el grosor de capa granulosa disminuyó conforme fue aumentando el tamaño folicular.
- ◆ A pesar de que las células poco diferenciadas de la teca externa no reflejan en los datos morfológicos obtenidos un incremento significativo, se observa una tendencia marcada en el aumento de número de cordones, probablemente debido al crecimiento del diámetro folicular en la maduración.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. M. and Dietschy, J. M. (1978). Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary and testis in the rat. *J. Biol. Chem.* 253: 9024-9030.
- Armstrong, D. G. (1984). Ovarian aromatase activity in the domestic fowl. (Gallus domesticus). *J. Endocr.* 100: 81-86.
- Avila, R. E. Samar, M. E., and De Fabro, S. P. (1991). Interstitial cells of the ovaries of the chick embryo: ultrastructural aspects of their innervation. *Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Med. Univ.* 49: 13-17.
- Avila, R. E. Samar, M. E., and De Fabro, S. P. (1987). Ultrastructural changes of left and right ovaries from chick embryo. *Comunic. Biol. Fac. Cien. Med. Univ. Med. Univ.* VI 1:63-72.
- Bahr, J. M., Wang, S. C., Huang, M. Y. and Calvo, F. O. (1983). Steroid concentration in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol. Reprod.* 29: 326-334.
- Ballaris, R. (1965). The relationship between oocyte and follicle in the hen's ovary as shown by electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morph.* 13: 215-233.
- Boyd, J. D. and Hamilton, W. J., (1952). Cleavage, early development and implantation of the egg. In Parkes A. S. *Physiol. of Reprod.* 2: 358-365.
- Bradley, O. C. (1960). The structure of the fowl. Ed. Oliver and Boyd. Edinburgh and London. 111-115.

- Brodie, A. M. H. (1983). Biosynthesis, metabolism and secretion of ovarian steroid hormones. En "The Ovary" .G. B. Sevia Ed. Raven Press. New York. 1-17.
- Callebaut, M. (1968a). (³H)Uridine incorporation during previtellogenesis and early vitellogenesis in the oocytes of the chick (*Gallus gallus*). J. Embryol. Exp. Morphol. 20:169-174.
- Callebaut, M. (1988). The ovarian chondrolacunar system in birds. Arch. Biol. 99: 1-15
- Callebaut, M., Sijens, R. J. and Van Nassauw, L. (1990). Evolution of the avian ovarian follicle wall during its expansion. Eur. Arch. Biol. Bruxelles. 101:77-87.
- Carlson B. M. (2000). Gametogénesis y fecundación. En "Embriología Básica de Patten". Interamericana. Mc Graw-Hill. México. 2, 64, 377.
- Clinton, M. (1998). Sex determination and gonadal development: a view. J. Exp. Zool. 281:457-465.
- Dahl, E. (1970). Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue 2. The ultrastructure of the thecal gland of the domestic fowl. Z. Zellforsch. 109: 195-211.
- Dahl, E. (1971). Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue 1. A comparative study of the fine structure of the ovarian interstitial tissue in the rat and the domestic fowl. Z. Zellforsch. 108: 275-290.
- Díaz Zagoya, J. C. and Hicks, J. J. (1988). Bioquímica e inmunología. Vol. I Cap. 23 y Vol. II Cap. 5 y 6. Ed. Prensa, UNAM. México.
- Elbrecht A. and Smith, R. G. (1992). Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. Science. 255: 467-470.

- Etches, R. J. and Cunningham, F. J. (1976a). The interrelation-ship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulation cycle of the hen (Gallus domesticus). J. Endocrinol. 71, 51.
- Eyal-Giladi H., Ginsburg M. and Farbarou, A. (1981). Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. J. Embriol. Exp. Morph. 65:139-147.
- Freedman, S. L. and Sturkie, P. D. (1963b). Extrinsic nerves of the chicken's uterus (shell gland). Anat. Rec. 147:431-437.
- Ganong F. W. (1991) Fisiología Médica. Ed. Manual Moderno. México. 22: 349-362.
- García, M. L., Ocaña C. A. and Cuellar G. A. (1987). Sistema Urogenital. UNAM. México. 3: 231-240; 4: 326-340.
- Gilbert, A. B. and Lake, P. E. (1963). Terminal innervation of the uterus and vagina of the domestic hen. J. Reprod. Fétil. 5:41-48.
- Gilbert, A. B. (1965). Innervation of the follicle of the domestic hen. Quart. J. Exp. Fisiol. 50: 437-445.
- Gilbert, A. B. (1969). Innervation of the ovary of the domestic hen. Quart. J. Exp. Fisiol. 54: 404-411.
- Gilbert, A. B. (1971a). The ovary. En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl". D. J. Bell and B. M. Freeman, ed. Academic Press. London and New York. Vol. 3, 1163-1209
- Gilbert, A. B. (1971b). The endocrine ovary in reproduction. En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl". D. J. Bell and B. M. Freeman, ed. Academic Press. London and New York. Vol. 3: 1449-1468.

- Gilbert, A. B. (1979). Female genital organs. En "Form and Function in Birds". A. S. King and J. McLelland, Ed. London and New York. Academic Press. Vol. 1, Chapter 5: 273-360.
- Gilbert, A. B., Davidson, M. F., Hardie, M. A. and Wells, J. W. (1981). The induction of atresia in the domestic fowl (Gallus domesticus) by ovine LH. Gen. Comp. Endocrinol. 44: 344.
- Gilbert, S. F. (2000). Early development in birds. En "Developmental Biology". Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. 345-354, 593-595.
- Godden, P. M. M. and Scanes C. G. (1975). Studies on the purification and properties of avian gonadotrophins. Gen Comp. Endocrinol. 27:258.
- González del Pliego, M., González-Moran, G., and Pedernera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human corionic gonadotropin. Cell and Tissue Res. 253: 665-670.
- Gore-Langton, R. E. and Armstrong D. T. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. En "The Physiology of Reproduction". Ed Raven Press, Ltd., New York. Vol. I: 331-385.
- Guichard A., Cedard A., Mignot T-M., Sheib D. and Haffen K. (1979). Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors. Gen. Comp. Endocrinol. 39: 9-19.
- Guraya, S. S. (1978). Maturation of the follicular wall of nonmammalian vertebrates. En "The Vertebrate Ovary". Comparative Biology and Evolution. Richard E. Jones ed. Plenum. Press, New York and London. 261-329.
- Hales, D. B., Sha, L. and Payne, A. H. (1987). Testosterone inhibits cAMP-induced of novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450_{17 α} by an androgen receptor-

mediated mechanism. J. Biol. Chem. 262: 11200-11206.

- Hall, P. (1984). Cellular organization for steroidogenesis. Int. Rev. Cytol. 86: 53-58.
- Hanukoglu, Y. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J. Steroid Biochem Mol. Biol. 43: 779-804.
- Herlant, M., Benoit, J., Tixier-Vidal, A. and Assenmacher I. (1960). Modifications Hypophysaires au cours du cycle annuel chez le canard Pekin. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris. 250:2936.
- Hernández -Vertíz, A., González del Pliego, M., Velázquez, P. and Pedernera, E. (1993). Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (Gallus domesticus). Gen. Comp. Endocrinol. 92: 80-87.
- Hodges, R. D. (1974). The histology of the fowl. Academic Press Ed. New York, 326-346.
- Huang, E. S., Kao, K. J., and Nalbandov, A. V. (1979). Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. Biol. Reprod. 20: 442-453.
- Hughes, G. C. (1963). The population of germ cells in the developing female chick. J. Embryol. Exp. Morph. 11: 513-536.
- Johnson, P. A., Stoklosowa, S. and Bahr, J. M. (1987) Interaction of granulosa and theca layers in the control of progesterone secretion in domestic hen. Biol. Reprod. 37: 1149-1155.
- Johnson, P. A., Wang, S. Y., and Brooks, C. (1993). Characterization of a source and levels of plasma immunoreactive inhibin during the ovulatory cycle of the domestic hen. Biol. Reprod. 48: 262-267.

- Jones, R. E. (1978b). Ovarian cycles in nonmammalian vertebrates. En "The Vertebrate Ovary". Comparative Biology and Evolution. Richard E. Jones Ed. Plenum Press. New York and London. 731-762.
- Kawashima, M., Takahashi, T., Tadashi, Y., Michiharu, K. and Katuhide, T. (1995). A vasoactive intestinal peptide binding component in hen granulosa cells. *Soc. Exp. Biol. and Medic.* 387-391.
- Karp, G. (1996). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.* Mc Graw Hill Interamericana Ed. Mex. 239-246.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H. and Koopman, P. (1996). A male specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 112: 2813-2822.
- Kikuchi, M. and Ishii, S. (1992). Changes in luteinizing hormone receptors in granulosa and theca layers of the ovarian follicle during follicular maturation in the Japanese quail. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 124-137.
- Kimura, T. (1981). ACTH stimulation on cholesterol side chain cleavage activity of adrenocortical mitochondria. *Molec. Cell. Biochem.* 36: 105-111.
- Kovacs, J., Forgo, V. and Péczely P. (1992). The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res.* 267:561-569.
- Kowalski, K. I., Tilly, J. L. and Johnson, A. L. (1991). Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) in the hen ovary I. Regulation of P450_{scc} messenger RNA levels and steroidogenesis in theca cells of developing follicles. *Biol. Reprod.* 45: 955-966.
- Kumiko, Y., Kiyoshi S. and Noboru S. (1996). Expression of P450_{17α} hydroxylase and

P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 233-240.

Kuwana, T. (1993). Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Dev. Growth Diff.* 35: 237-243.

Lance, V. and Callard, I. P. (1978). Hormonal control of ovarian steroidogenesis in nonmammalian vertebrates. En "The Vertebrate Ovary". *Comparative Biology and Evolution*. Richard E. Jones, Ed. Plenum Press. New York. 361-407.

Lee, H. T. and Bahr, M. B. (1990). Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-cleavage by testosterone and estradiol- 17β in hen granulosa cells. *Endocrinol.* 126: 779-786.

Lee, K. A. and Bahr J. M. (1994). Utilization of substrates of testosterone and estradiol- 17β produced by small follicles of the chicken ovary. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11: 307-314.

Lee, K. A., Volentine, K. K. and Bahr J. M. (1998). Two steroidogenic pathways present in the chicken ovary, theca layer prefers Δ^5 pathway and granulosa layer prefers Δ^4 pathway. *Domest. Animal. Endocrinol.* Elsevier. Vol. 15(1): 1-18.

Lehrman, O. S., and Brody P. (1961). Does prolactin induce incubation behavior in the ring dove? *J. Endocrinol.* 22: 269.

Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M. and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell.* 82: 803-814.

Ma, R. E. S. and Nalbandov, A. V. (1963). Discussion on the transplanted hypophysis. En "Advances in Neuroendocrinology". Ed. A. V. Nalbandov. University

- Marrone, B. L., and Hertelendy, F. (1983). Steroidogenesis by avian ovarian cells: effects of luteinizing hormone and substrate availability. *Am. J. Physiol.*, 224: E487- E493.
- Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian Differentiation. En: "The Vertebrate Ovary". *Comparative Biology and Evolution*. Richard E. Jones, Ed. Plenum Press. New York. 47-81.
- Müller-Marschhausen, V., Grothe, C., Kaveri, S., Strosberg, A. D., Verhofstad, A. A. J. and Unsicker, K. (1998). Catecholaminergic nerves in the embryonic chick ovary: co-localization with β_2 -adrenoceptor-bearing steroidogenic cells. *Cell Tissue Res.* 254-262.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. (1994). Hormonas de las gónadas. En: "Bioquímica de Harper". Ed. Manual Moderno. México. 50: 643-659.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, T. and Mizuno, S. (1998). Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinol.* 20: 193-202.
- Narbaitz, R. and Robertis, E. M. (1968). Postnatal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. *Histochem.* 15: 187-193.
- Nili, H. and Kelly, W. R. (1996). Form and function of lacunae in the ovary of the laying hen. *The Anatomic Rec.* 2244:165-174.
- Nitta, H., Osawa, Y., and Bahr, J. M. (1991a). Immunolocalization of steroidogenic cells in small follicles of the chicken ovary: anatomical arrangement and location of steroidogenic cells change during follicular development. *Domest. Anim.*

- Nitta, H., Osawa, Y., and Bahr, J. M. (1991b). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinol.* 129:2033-2040.
- Nitta, H., Mason, J. I., and Bahr, J. M. (1993). Localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. *Biol. Reprod.* 48: 110-116.
- North, M. O. (1986). *Manual de producción agrícola*. Ed. El Manual Moderno. México. 367.
- Paczoska-Eliasiewicz, H. and Rzasa, J. (1998). Distribution of histamine laying hen ovary. *Anat. Med.* 45: 491-497.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velásquez, P., Juárez-Oropeza, M. A. and González del Pliego, M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 153-162
- Pedernera, E. A. (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: "Comunicación neuroendocrina". Bases celulares y moleculares. 1ª ed. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 33-46.
- Phillips, J.G. (1987). Reproduction in nonmammalian vertebrates. En: "Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology". Ed. I. Chester-Jones. Plenum Press, New York. 185-180.
- Porter, T. E., Hargis, B. M., Silsby, J. L., and El Halawani, M. E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: A three cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology.* 125: 109-116.

- Quieseberry, J. H. (1963). Light control for growing pullets and laying hens. Compilatio of publications appearing in Poultry Science and British Poultry Science 1959 to date. Mimeographed material from Texas A. & M. College.
- Robinson, F. E. and Etches, R. J. (1986). Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (Gallus domesticus). Biol. Reprod. 35: 1096-1105.
- Rodríguez Maldonado, E. (1995). Metabolismo de hormonas esteroides en las células de la teca externa de folículos preovulatorios del ovario de gallina. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biomédicas. U. N. A. M. México.
- Rodríguez-Maldonado, E., Velázquez, P. N., Juárez-Oropeza, M. A. and Pedernera, E. (1996). Steroid metabolism in the theca externa cells from preovulatory follicles of domestic hen (Gallus domesticus). Gen. Comp. Endocrinol. 101:173-179.
- Romanoff, A. L. and Romanoff, A. J. (1949). "The avian egg". Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 913- 918.
- Saeki, Y. and Tanabe, Y. (1955). Changes in prolactin content of fowl pituitary during broody periods and some experiments on the induction of broodiness. Poultry Sci. 34: 909.
- Saidapur, S. K. (1982). Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of nonmammalian vertebrates. Int. Rev. Cytol. 75: 243-285.
- Scheib, D. (1970). Sur la presence de cellules interstitielles primaires dans les cordons du testicule de l'embryon de poulet. C. R. Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat. 270:123-125.
- Scheib, D. (1983). Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. Diff. Suppl. 23: 87-92.

- Smith, C. A., Andrews, J.E. and Sinclair, A. H. (1997). Gonadal sex differentiation in chick embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 60: 295-302.
- Sisson, S. and Grossman, J. D. (1986). Sistema urogenital de las aves. En: "Anatomía de los Animales Domésticos". Ed. Salvat. México. II 65:2104-2158.
- Stahl, A. and Carlon, N. (1973). Morphogénésie des cordons sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade chez l'embryon de poulet. *Acta Nat. (Basel)*. 85:248-274.
- Sturkie, P. D. (1967). Reproducción en la hembra y formación del huevo. Anatomía e histología del sistema reproductor de la hembra. En "Fisiología Aviar". Ed. Acribia. Zaragoza, España. 359-469.
- Sturkie, P. D. (1986). Pituitary gland. Reproduction in the female. En "Avian Physiology". Ed. Springer-Verlag. New York. 383-431.
- Teng, C. T. and Teng, C. S. (1979). Studies on sex organ development. Separation and culture of steroid-producing cell from growing and regressing embrionic ovaries. *Endocrinol.* 104: 1337-1343.
- Tokars, R. R. (1978). Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. En: "The Vertebrate Ovary". Comparative Biology and Evolution. Edited by Richard E. Jones. Ed. Plenum Press. New York 145-179.
- Tuckey, R. C. and Atkinson, H. C. (1989). Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's serum gonadotropin and human choriogonadotropin. *Eur. J. Biochem.* 186: 255-259.

- Van Nassauw, L. and Callebaut, M. (1994). Contractile activity of ovarian follicles. Assisted Reproductive Technology Andrology. VI (issues 1, 2): 113-127.
- Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M. and Pedernera, E. (1991). Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. Gen. Comp. Endocrinol. 83:243-248.
- Velázquez, P. N., Pedernera, E., Peralta, D. I., González del Pliego, M. and Nieto, B. A. (1993). Efecto de la hormona folículo estimulante en la división celular de ovarios de embriones de pollos. En XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. C171
- Wells, J. W. and Gilbert, A. B. (1984). Steroid hormone production by the ovary. En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl". B. M. Freeman, Ed. Academic Press, London. 5: 323-343.
- Woods, J. E. and Erton, L. H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick. Embryo. Gen Comp. Endocrinol. 36: 360-370.
- Woods, J. E., Menella, J. A. and Thommes, R. C. (1981). The hypothalamic adenohipofyseal gonadal axes in the developing chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 45: 66-73.
- Wyburn, G. M., Aitken, R. N. C. and Johnston, H. S. (1965). The ultrastructure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl. J. Anat. 99: 469-484.
- Wylie, C. C. (1972). Nuclear morphology and nucleolar DNA synthesis during meiotic prophase in oocytes of the chick (*Gallus domesticus*). Cell Differ. 1: 325-334.
- Yasuda, M. (1953). Citological studies of the anterior pituitari of broady fowl. Proc. Japan Acad. 29: 256.

Yoshida, K., Shimada, K. and Saito N. (1996). Expression of P450 (17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102 (2): 233-240.

Young, W. C. (1961). *Sex and internal secretions.* Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1:11609.