



**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**Comparación de la foliculogénesis ovárica en hembras adultas jóvenes y de edad avanzada del “ratón cola de pincel” *Octodon degus* (Molina, 1782) (Rodentia, Octodontidae)**

Seminario de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Autor: Karina Pino Moya

Profesor Guía: Donald Brown González

2016

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, hermanos y otros miembros de mi familia por el apoyo incondicional brindado durante mis años en la universidad.

A mis amigos, quienes constituyeron un gran apoyo durante los años de estudio.

A mi profesor guía, Donald Brown, por darme la oportunidad de realizar la tesis a su cargo, por el conocimiento entregado, por la paciencia y estar siempre receptivo a mis dudas.

## RESUMEN

El *Octodon degus* es un roedor autóctono de la zona central de Chile. Se ha utilizado como animal de laboratorio en estudios del ciclo circadiano en animales diurnos y en enfermedades como el Alzheimer, diabetes mellitus y cataratas, que desarrollan de forma natural. Además, se postula como un buen modelo animal para estudios del ciclo reproductivo femenino ya que su ciclo estral tiene una duración de 17-21 días, similar al de grandes mamíferos y, a diferencia de otros roedores de laboratorio, tiene una fase lútea verdadera.

En este trabajo se comparó la foliculogénesis en ovarios de hembras adultas jóvenes (4 meses, 6-7 meses) y de edad avanzada (2-6 años). Las muestras fueron fijadas en Bouin acuoso y procesadas por técnica histológica de rutina, empleando el método tricrómico de Arteta como tinción. Se realizó una descripción morfológica de los folículos, un recuento y medición del diámetro, así como de los cuerpos lúteos. Para la detección de caspasa-3 como indicador de apoptosis, se realizó inmunohistoquímica con diaminobencidina como cromógeno. Al comparar los tres grupos etarios, no hay diferencias morfológicas importantes en los folículos sanos y atrésicos, y cuerpos lúteos. El número de folículos primordiales disminuyó con la edad, el número de folículos primarios es mayor en hembras de 6-7 meses de edad. El número de cuerpos lúteos fue mayor en las hembras de edad avanzada. No hay diferencias significativas en: el número de folículos atrésicos, el diámetro de los tipos foliculares y de los cuerpos lúteos. Hay inmunotinción en los cuerpos apoptóticos de folículos terciarios atrésicos, en ovocitos en degeneración y en cuerpos lúteos. La morfología de los folículos y cuerpos lúteos es similar a la de otros mamíferos. El diámetro folicular aumenta durante la foliculogénesis, consistente con un aumento del diámetro del ovocito y vesícula germinativa a medida que avanza el proceso; el crecimiento ovocitario se da desde los folículos primarios hasta detenerse en los secundarios. La edad de las hembras influyó en el número de folículos (primordiales y primarios). Las condiciones de cautiverio (jaulas sólo de hembras) y probablemente animales en distintas etapas del ciclo ovárico, influyó en el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios.

Palabras clave: *Octodon degus*, ovario, foliculogénesis, ovocito, histología

# ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Ovario .....	1
1.2 Gametogénesis .....	2
1.3 Foliculogénesis .....	2
1.4 Ovulación.....	5
1.5 Luteinización .....	6
1.5.1 Generalidades.....	6
1.5.2 Desarrollo del cuerpo lúteo .....	6
1.6 Regulación de la foliculogénesis .....	8
1.6.1 Regulación intraovárica del desarrollo folicular .....	8
1.6.2 Regulación endocrina del desarrollo folicular .....	9
1.7 Atresia .....	10
1.7.1 Generalidades.....	10
1.7.2 Atresia folicular.....	11
1.8 Foliculogénesis en ratones .....	12
1.8.1 Desarrollo folicular del nacimiento a la madurez reproductiva .....	12
1.8.2 Ciclo estral en ratones .....	14
1.9 <i>Octodon degus</i> .....	15
1.9.1 Generalidades.....	15
1.9.2 Ciclo estral del <i>Octodon degus</i> .....	15
1.9.3 <i>Octodon degus</i> y la investigación .....	16

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo general.....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
3.1 Materiales.....	18
3.2 Método .....	18
3.2.1 Selección de muestra.....	18
3.2.2 Selección de variables .....	19
3.2.3 Procesamiento histológico .....	19
3.2.4 Descripción morfológica y recuento folicular.....	20
3.2.5 Medición folicular .....	20
3.2.6 Estudio inmunohistoquímico .....	21
3.2.7 Análisis estadístico.....	22
CAPÍTULO 4: RESULTADOS .....	23
4.1 Descripción morfológica y diámetro folicular.....	23
4.1.1 Folículos sanos .....	23
4.1.2 Ovocito y vesícula germinativa en los folículos sanos .....	25
4.1.3 Cuerpo lúteo.....	26
4.1.4 Folículos atrésicos.....	27
4.2 Recuento folicular.....	36
4.2.1 Porcentaje de folículos sanos y atrésicos .....	36
4.2.2 Variación en el número de los distintos tipos foliculares sanos.....	36

4.2.3 Variación en el número de cuerpos lúteos .....	36
4.2.4 Variación en el número de los distintos tipos foliculares atrésicos .....	37
4.3 Estudio inmunohistoquímico .....	40
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN .....	42
5.1 Morfología .....	42
5.2 Diámetro folicular.....	42
5.3 Recuento folicular.....	44
5.4 Estudio inmunohistoquímico .....	47
5.5 Comparación con hembra pre púber.....	47
5.6 Volumen ovárico.....	48
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	52
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....	54
ANEXO .....	60
Anexo 1: Protocolo procesador de tejidos .....	60
Anexo 2: Protocolo desparafinación e hidratación .....	61
Anexo 3: Protocolo método tricrómico de Arteta.....	62
Anexo 4: Protocolo técnica inmunohistoquímica.....	63

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema de la foliculogénesis .....	5
Figura 1.2	Desarrollo del cuerpo lúteo .....	8
Figura 4.1	Fotomicrografía de folículos normales en cortes histológicos de ovarios de <i>Octodon degus</i> , teñidos con tricrómico de Arteta.....	30
Figura 4.2	Fotomicrografía de cuerpos lúteos en cortes histológicos de ovarios de <i>Octodon degus</i> , teñidos con tricrómico de Arteta.....	31
Figura 4.3	Fotomicrografía de folículos atrésicos en cortes histológicos de ovarios de <i>Octodon degus</i> , teñidos con tricrómico de Arteta.....	32
Figura 4.4	Diámetro de los folículos sanos presentes en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	33
Figura 4.5	Diámetro de cuerpos lúteos presentes en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	33
Figura 4.6	Diámetro de los folículos atrésicos presentes en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	34
Figura 4.7	Porcentaje de folículos sanos y atrésicos en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	37
Figura 4.8	Recuento de folículos sanos en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	37
Figura 4.9	Recuento de cuerpos lúteos en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	38
Figura 4.10	Recuento de folículos atrésicos en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	38
Figura 4.11	Fotomicrografía de cortes histológicos de ovarios de <i>Octodon degus</i> , inmunotinción para capsasa-3 .....	40
Figura 5.1	Desarrollo de la glándula intersticial en cortes histológicos de ovarios de <i>Octodon degus</i> , teñidos con tricrómico de Arteta.....	49
Figura 5.2	Volumen del ovario de hembras de <i>Octodon degus</i> .....	50

## INDÍCE TABLAS

Tabla 4	Diámetro del ovocito y vesícula germinativa en ovarios de <i>Octodon degus</i> .....	35
---------	--	----

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1.- EL OVARIO

El ovario de los mamíferos es un órgano reproductivo y endocrino, que tiene dos principales funciones: 1) la producción de gametos (gametogénesis) necesarios para la continuidad de la especie y 2) la síntesis de esteroides (esteroidogénesis), principalmente estrógenos y progesterona, hormonas necesarias para la función ovárica, la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el desarrollo de las características sexuales secundarias y el mantenimiento del embarazo [1]. El ovario adulto está cubierto por un epitelio cúbico simple, plano en algunas zonas. Estas células están unidas a una delgada lámina basal a la cuál subyace un tejido conectivo colagenoso, llamado túnica albugínea, que rodea todo el ovario y constituye una capa protectora [2].

Al corte se distinguen dos zonas [3, 4]:

- La corteza es la zona ubicada en la periferia del ovario, formada por los folículos ováricos en distintas etapas de desarrollo, folículos atrésicos y cuerpo lúteo, inmersos en el estroma ovárico (tejido conectivo muy celular) que contiene, además de los componentes normales de cualquier tejido conectivo, células intersticiales secretoras.
- La médula es la zona ubicada en el centro del ovario, corresponde a un tejido conectivo laxo que incluye vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios.

El ovario es un tejido heterogéneo, no sólo presenta cambios en su morfología a lo largo del ciclo ovárico, sino también a lo largo de la vida de la hembra.

## 1.2.- GAMETOGÉNESIS

En la mayoría de los mamíferos, la gametogénesis comienza durante la vida intrauterina cuando las células germinales primordiales (CGP) migran hacia la corteza de la gónada embrionaria, allí se diferencian en gonocitos, los que darán origen a las ovogonias, células germinales a partir de las cuales se originarán los gametos femeninos. Las ovogonias aumentarán su número por mitosis, y de su última división generarán los ovocitos primarios, que eventualmente serán capaces de entrar en profase meiótica, y se detendrán en la etapa de diploteno, volviendo a su condición de núcleo interfásico, que recibe el nombre de vesícula germinativa [5]. No todas las ovogonias darán origen a ovocitos, ya que un número importante de estas células muere por apoptosis [6]. Los ovocitos interactúan con las células somáticas pregranulosas dando paso a la formación de los folículos primordiales, unidad morfofuncional básica del ovario. Cuando las ovogonias se dividen quedan conectadas por puentes citoplasmáticos y los ovocitos a los que dan origen, también, se mantienen en grupos. Por lo anterior, cuando ocurre la formación de los folículos primordiales, estos pueden permanecer en “nidos de folículos” o aislados [6].

## 1.3.- FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es el proceso de crecimiento de un folículo e involucra su paso por distintos estadios de desarrollo hasta que ovula o muere (Figura 1.1). Este proceso ocurre en la corteza del ovario.

La foliculogénesis se inicia con la formación del folículo primordial cuando el ovocito es rodeado por una capa de células planas (pregranulosas) que derivan del epitelio celómico, cuya superficie queda cubierta por una lámina basal, aislando al folículo del tejido circundante. En esta etapa las células pregranulosas y la superficie del ovocito están en estrecho contacto, interacción que se da por la unión de una proteína de la superficie de las células foliculares, el Stem Cell Factor (SCF), y un receptor específico de membrana del ovocito, este contacto permitiría la adecuada formación del folículo [5]. Las células pregranulosas proveen de

nutrientes al ovocito a través de procesos protoplasmáticos, que contactan con la membrana plasmática del ovocito [4]. Los folículos primordiales se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, por debajo de la túnica albugínea.

En ratones, la formación de los folículos primordiales ocurrirá en los días siguientes al nacimiento. En los seres humanos será en la segunda mitad del desarrollo fetal, a partir del cuarto mes de gestación [1, 7]. El tamaño de la población de folículos primordiales determina la duración de la vida reproductiva de la hembra, será fijado durante su formación y dependerá de cada especie. En ratones se formarán cerca de 8.000 folículos, número que irá disminuyendo a casi la mitad en las primeras semanas de vida [8]. En la especie humana se estima que, al nacer, el ovario contiene alrededor de 2 millones de folículos, número que disminuye gradualmente, llegando a ser aproximadamente 400.000 en la pubertad y 1.000 a los 51 años de edad [4, 7]. La mayoría de los folículos irán muriendo a lo largo de los años en un proceso llamado atresia.

Los folículos primordiales pueden permanecer sin cambio o en reposo durante meses, incluso años, y se irán activando gradualmente a través de los años dando paso a un nuevo tipo folicular. Cuando inician su crecimiento las células foliculares se hacen cúbicas, dando origen a las células de la granulosa, y el folículo recibirá el nombre de folículo primario. En esta etapa el ovocito aumenta su tamaño, crecimiento que se extiende hasta el estadio de folículo secundario. El ovocito secreta una sustancia glicoproteica que lo rodea y constituye la zona pelúcida, cuya función durante la fecundación es el reconocimiento y adhesión del espermatozoide, estimular la reacción acrosómica y evitar la poliespermia. Las células de la granulosa continúan en contacto con el ovocito a través de proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la zona pelúcida [4, 5]. Conforme el folículo crece, se desplaza hacia interior de la corteza.

A través de continuas mitosis, las células de la granulosa constituirán un epitelio estratificado y el folículo recibirá el nombre de folículo secundario. En el estadio de folículo secundario, algunas células mesenquimales del estroma ovárico migran hacia la periferia del folículo y constituyen la capa de células tecales. Conforme el folículo sigue desarrollándose, estas células se diferenciarán en una teca interna y una teca externa. La primera es una capa muy vascularizada compuesta por células endocrinas de forma elongada que muestran características de células esteroideogénicas (numerosas mitocondrias de crestas vesiculares, abundante retículo endoplasmático agranular y vesículas lipídicas), la segunda capa está formada por un tejido

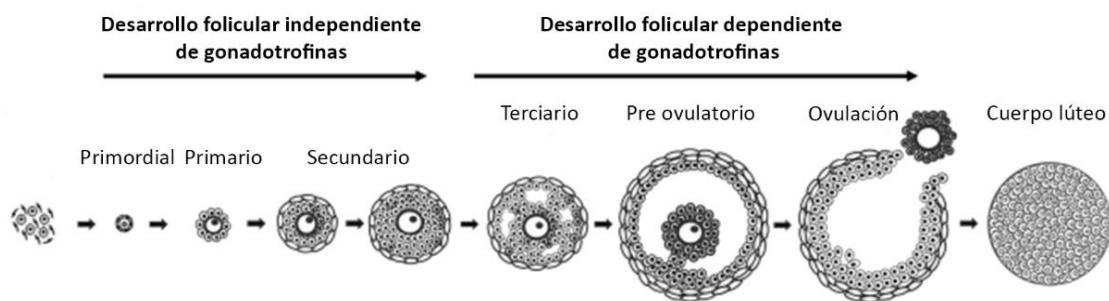
conectivo denso y algunas fibras colágenas. Coincidiendo con este evento, se forman pequeños vasos sanguíneos que penetran la teca externa y proveen de una red vascular a la teca interna, de esta forma el folículo entra en contacto con factores presentes en la circulación; aun así, los capilares no atraviesan la lámina basal y la capa de células de la granulosa permanece siempre avascular [2, 9, 10, 11]. Al final de esta etapa, el folículo adquiere la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas que, en la mayoría de los mamíferos, ocurre a través de un sistema de células-dos gonadotropinas. Las células de la granulosa adquieren receptores para la hormona folículo estimulante (FSH); y las células de la teca interna, receptores para la hormona luteinizante (LH). Estimuladas por la LH las células tecales producen andrógenos que serán convertidos en estrógenos, principalmente estradiol, por las células de la granulosa, estimuladas a su vez por la FSH [12]. El estradiol es una hormona fundamental ya que potencia el desarrollo folicular al inducir la proliferación de las células de la granulosa y la expresión de receptores de gonadotropinas en estas células, promueve la esteroidogénesis, la formación de uniones GAP (que permiten la transferencia de nutrientes al ovocito), inhibe la apoptosis de las células de la granulosa, y también participaría en la regulación y mantención del cuerpo lúteo [4, 13].

El siguiente estadio de crecimiento es el folículo terciario caracterizado por la aparición de espacios llenos de un líquido claro entre las células de la granulosa, que confluyen dando origen al antro folicular. Como las células de la granulosa siguen proliferando y el antro aumentando de tamaño, la capa granulosa queda dividida en dos grupos: las células de la granulosa murales, que rodean el antro, y las células del cúmulo oophorus o cúmulo ovígero, que quedan en contacto con el ovocito. Tras la ovulación algunas células del cúmulo permanecerán con el ovocito, se modifican y reciben el nombre de corona radiada [4, 9]. En la mayoría de los folículos antrales, el ovocito ya está capacitado para reanudar la meiosis ante el estímulo adecuado [14]. Con la formación del antro, los folículos pueden clasificarse en folículos pre antrales y folículos antrales.

De la cohorte de folículos antrales, algunos son seleccionados para continuar con su diferenciación y, potencialmente, ser ovulados. Los folículos destinados a ovular se conocen como folículos dominantes, ya que al ser seleccionados evitarían el crecimiento del resto de los folículos. Los folículos dominantes serían aquellos que tienen un determinado tamaño o mayor sensibilidad cuando hay concentraciones elevadas de FSH [15]. Estos folículos pueden seguir creciendo incluso después de la disminución de los niveles de FSH porque las células de la

granulosa adquieren receptores de LH, haciéndose sensibles a esta hormona, evento crucial para que el folículo llegue a ovular. Aquellos folículos que alcanzan el estadio pre antral antes de la estimulación de la FSH no continúan creciendo y, en cambio, mueren por atresia [16, 17].

Los folículos que alcanzan el máximo estadio de crecimiento y diferenciación se conocen como folículos pre ovulatorios. Estos folículos se caracterizan por un aumento de tamaño del antro, la baja tasa mitótica de las células de la granulosa, las altas concentraciones de esteroides en el antro y la dispersión de las células de la granulosa murales y del cúmulo ovífero [9].



*FIGURA 1.1: Esquema de la foliculogénesis.*

Esquema que muestra los distintos estadios del crecimiento folicular hasta la ovulación y formación del cuerpo lúteo. El crecimiento de los folículos pre antrales está regulado por factores intraováricos (independiente de gonadotrofinas), mientras que el crecimiento de los folículos antrales depende de las gonadotrofinas FSH y LH. Adaptado de Edson *et al*, 2009.

## 1.4.- OVULACIÓN

La ovulación ocurre como consecuencia del establecimiento de un marcado aumento de la concentración de la hormona luteinizante (LH) (“peak de LH”), estimulado por la elevación de las concentraciones de estrógenos por sobre el umbral. La LH induciría una reacción inflamatoria que involucraría tanto a las células de la granulosa como a las células tecales. En la teca interna se produce edema y las fibras colágenas se disocian. Mediante la actividad de las proteasas, producidas por las células de la granulosa, ocurre la degradación de la pared folicular y de la membrana basal. Se pierden las uniones entre las células de la granulosa, quedando en contacto

solo las células del cúmulo ovígeno. Como consecuencia de la ruptura del folículo y el aumento de la presión intrafolicular, el complejo cúmulo-ovocito es expulsado del folículo. La ovulación involucra, también, la ruptura de la superficie del ovario [2, 4].

Un evento crucial que ocurre tras alcanzar el peak de LH es el reinicio de la meiosis en el ovocito, caracterizado por la condensación de la cromatina, reorganizando los cromosomas y la desaparición de la membrana nuclear. El ovocito continúa su división meiótica hasta la metafase II de la segunda meiosis, donde queda detenida hasta la fecundación. Como el ovocito no tiene receptores para la LH, esta hormona actuaría a nivel de las células de la granulosa, y se cree que lo haría eliminando los factores inhibitorios de la meiosis o aumentando las señales de activación de la maduración ovocitaria [17].

## **1.5.- LUTEINIZACIÓN**

### **1.5.1.- Generalidades**

Como consecuencia del “peak de LH” y la ovulación, el folículo colapsa y las células de la granulosa y células tecales experimentan cambios morfológicos, dando origen al cuerpo lúteo (Figura 1.2). Esta estructura constituirá un órgano endocrino transitorio, es decir, será capaz de sintetizar progesterona por un periodo limitado. Esta hormona promueve la secreción del revestimiento mucoso del oviducto, necesario para nutrir al óvulo fecundado, y la capacidad secretora del endometrio como preparación del útero para la implantación del cigoto [5, 9].

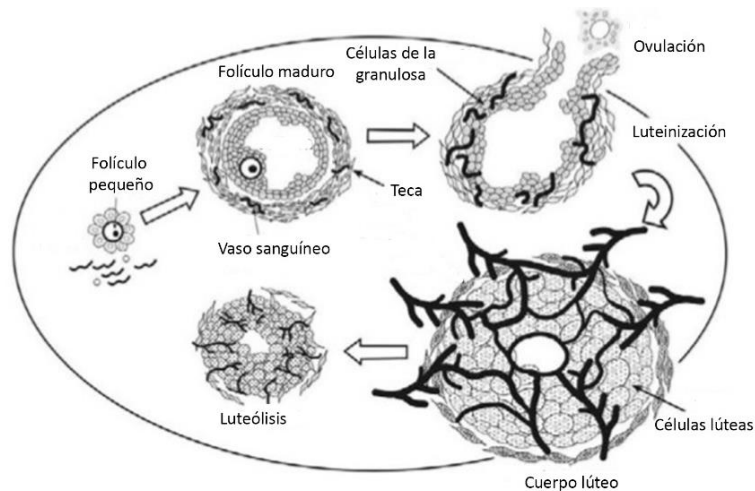
### **1.5.2.- Desarrollo del Cuerpo Lúteo**

Después de la ovulación, como consecuencia de la ruptura vascular, la cavidad antral es reemplazada por un coágulo de sangre, aislado de las células de la granulosa por fibroblastos. A esta estructura se le conoce como cuerpo hemorrágico. El coágulo se reabsorberá gradualmente y la cavidad será ocupada por las células lúteas, dando origen al cuerpo lúteo. Las células de la granulosa experimentan un proceso de luteinización, transformándose en las células lúteas grandes, en mamíferos no primates. Estas células, organizadas en cordones, son las más abundantes del cuerpo lúteo y se caracterizan por presentar inclusiones lipídicas en su citoplasma,

mitocondrias con crestas tubulares y retículo endoplasmático abundante. Por su parte, las células de la teca originan a las células lúteas pequeñas, en mamíferos no primates, que se caracterizan por presentar un retículo endoplasmático abundante. La principal hormona esteroidea que produce el cuerpo lúteo es la progesterona, algunas especies son capaces de producir estrógeno en menor cantidad. Otros tipos celulares presentes en el cuerpo lúteo son fibroblastos, células endoteliales y pericitos [18, 19].

Otros eventos importantes que ocurren durante el desarrollo del cuerpo lúteo son: 1) la proliferación e hipertrofia de las células lúteas que se refleja en un aumento considerable del tamaño del cuerpo lúteo y, 2) la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Además, en mamíferos no primates el cuerpo lúteo experimenta una reorganización importante, las células que los componen migran y se entremezclan, quedando células lúteas, fibroblastos y células endoteliales muy cercanas unas de otras. En cambio en primates las células granulosas y tecaes luteínicas, análogas de las células lúteas grandes y pequeñas respectivamente, quedan separadas por remanentes de la membrana basal [2, 18].

En ausencia de fecundación, las células lúteas involucionan en un proceso conocido como luteólisis que es iniciado, en roedores, por la Prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , factor secretado por el útero. La secreción de progesterona cesa y las células lúteas mueren por apoptosis. El cuerpo lúteo es invadido por macrófagos y fibroblastos, y, finalmente, involuciona en un proceso llamado luteólisis [9, 20].



*FIGURA 1.2: Desarrollo del cuerpo lúteo*

Tras la ovulación, el folículo colapsa y experimenta una serie de cambios, dando origen al cuerpo lúteo. Esta estructura constituirá un órgano endocrino transitorio, capaz de sintetizar progesterona. Adaptado de Knobil and Neill, 2006.

## 1.6.- REGULACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS

Según su respuesta ante las hormonas gonadotropinas, FSH y LH, podemos dividir la regulación de la foliculogénesis en una regulación intraovárica, en folículos pre-antrales, y una regulación hormonal, en los folículos antrales (Figura 1.1).

### 1.6.1.- Regulación intraovárica del desarrollo folicular

Es conocido que la foliculogénesis hasta la etapa de folículo pre antral, e incluso la de folículo antral temprano, es independiente de gonadotropinas [16]. Como esta etapa de la foliculogénesis no requiere de concentraciones adultas de FSH y LH, es posible encontrar desde folículos primordiales hasta folículos terciarios tempranos en ovarios de hembras pre púberes [2, 16, 21, 22]. Su regulación, en cambio, sería intraovárica, a través de la acción paracrina de diversos factores intraováricos y la interacción ovocito-granulosa-teca. Factores secretados por el ovocito serían fundamentales para el desarrollo de los folículos más allá del estadio primario, de ellos destaca el Factor de crecimiento y diferenciación-9 (GDF-9) [2, 14]. Existe evidencia que los folículos ováricos de ratones portadores de mutaciones en este gen se desarrollan sólo hasta

folículos primarios, haciéndolos infértiles [23]. Otro factor de importancia es la interacción entre el receptor KIT, ubicado en la superficie del ovocito, y su ligando KITL, producido por las células de la granulosa, estos serían fundamentales para el inicio del crecimiento folicular y su progresión más allá del folículo primario [2, 24, 25]. Por otra parte, la Hormona Antimülleriana inhibiría el crecimiento folicular evitando una disminución acelerada de los folículos primordiales [2, 25]. Factores secretados por las células de la granulosa y el GDF-9 estimularían el reclutamiento y diferenciación de las células tecales [26]. La interacción entre las células de la granulosa y la teca también potenciaría el desarrollo folicular temprano, el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF o FGF-7), producido por las células mesenquimales precursoras de la teca, amplificaría la expresión del ligando KITL, promoviendo el desarrollo de los folículos primordiales [27].

Si bien el desarrollo de los folículos pre antrales puede ocurrir independiente de las gonadotrofinas, ellos responden a estas hormonas, las que facilitarían su crecimiento y requerirían de su presencia para un óptimo desarrollo folicular [14, 25, 28, 29].

### **1.6.2.- Regulación endocrina del desarrollo folicular**

El desarrollo de los folículos antrales tempranos hasta la etapa de folículo preovulatorio es dependiente de los niveles circulantes de gonadotrofinas, FSH y LH, regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo libera la hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) hacia la hipófisis anterior, estimulando en ésta la secreción de gonadotrofinas, FSH y LH, que se unen a receptores ubicados en el ovario. Durante la fase folicular del ciclo ovárico la FSH actúa potenciando el crecimiento folicular al estimular la proliferación de las células de la granulosa, la expresión de receptores de la LH y la síntesis de estrógenos [30, 31, 32].

El estrógeno es una hormona esteroidea fundamental en la foliculogénesis ya que promueve el crecimiento folicular, la expresión de receptores de gonadotrofinas, la esteroidogénesis, la formación de uniones de comunicación (gap junctions) por parte de las células de la granulosa e inhibe las apoptosis de estas células. Los estrógenos, además, participarían en la formación y mantención del cuerpo lúteo [13]. Otro rol de los estrógenos es en la regulación de la secreción de las hormonas por parte del hipotálamo e hipófisis [13, 32]. El aumento de los niveles de estrógeno causará una disminución de la concentración de la FSH, ya

que tendría un efecto de retroalimentación negativa en la liberación de la FSH. Los niveles de FSH permanecen por debajo del umbral necesario para mantener el crecimiento de los folículos antrales tempranos pero suficiente para mantener el de los folículos pre ovulatorios, los que se hacen menos sensibles a esta hormona ya que adquieren receptores de LH y responden a esta hormona, pudiendo continuar con su crecimiento [16].

Los estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva en la liberación de la LH. Al alcanzar un peak de la LH ocurre la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, estructura encargada de la producción de progesterona. Si no ocurre la fecundación, el cuerpo lúteo involuciona ya que la progesterona inhibe la secreción de LH, hormona necesaria para su mantención. Al involucionar el cuerpo lúteo, disminuyen los niveles circulantes de progesterona y estrógenos, lo que estimula la secreción de FSH y una nueva fase folicular, situación que se aplica tanto para roedores como primates [30, 33].

Entre los últimos días de vida intrauterina y los primeros días de vida, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario experimenta un periodo de hiperactividad necesario para la diferenciación sexual y programación del sistema nervioso. Luego será reemplazado por un periodo de reposo que dura hasta la pubertad. El reposo se caracteriza por una disminución en la secreción de la GnRH y, por tanto, en un descenso de los niveles de gonadotrofinas y hormonas esteroideas. Siguiendo a esta etapa, al inicio de la pubertad, el eje vuelve a activarse y con ello aumenta la liberación de GnRH que estimula la secreción de gonadotrofinas y hormonas esteroideas, alcanzando la madurez reproductiva. En la pubertad, como consecuencia de la activación y maduración del eje, los folículos ováricos pueden completar su desarrollo y ovular [32, 34].

## **1.7.- ATRESIA**

### **1.7.1.- Generalidades**

Durante la vida intrauterina (en primates) o los primeros días de vida (en roedores) los ovocitos interactúan con las células somáticas para formar los folículos primordiales. Sólo un 10% de los ovocitos llega a formar parte de un folículo, el resto muere por apoptosis. Algo

similar ocurre con los folículos, la mayoría no llega a ovular. El proceso de muerte de los folículos se denomina atresia. Las células mueren por apoptosis cuando dejan de recibir los factores necesarios para su supervivencia, especialmente la FSH [4, 35].

Cabe recordar que la apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por la condensación de la cromatina, ruptura de la membrana nuclear y fragmentación del núcleo, con la formación de cuerpos apoptóticos que corresponden a fragmentos nucleares rodeados de una membrana [4].

### **1.7.2.- Atresia Folicular**

La atresia afecta tanto a las células somáticas como al ovocito primario. Si bien puede darse a cualquier nivel del desarrollo folicular, es poco frecuente en los folículos primordiales y primarios, y afecta, en mayor medida, a los folículos secundarios tardíos y folículos terciarios, en que las células de la granulosa al presentar una mayor tasa mitótica son más susceptibles a la muerte por apoptosis.

En el caso de los folículos primarios se ha observado que las células de la granulosa permanecen incluso después de la muerte del ovocito [36]. En folículos secundarios tardíos y terciarios, el primer signo de atresia es la presencia de cuerpos apoptóticos en las células de la granulosa más cercanas al antro. En estadios más avanzados de atresia se observa desprendimiento de las células granulosas de la membrana basal, fragmentación de la lámina basal y presencia de debris celular en el antro folicular [37].

El ovocito mostrará alteraciones en los estadios más avanzados de atresia. Entre los cambios que puede experimentar están la distorsión de su forma redonda, irregularidad de la membrana nuclear, reinicio de la meiosis (en folículos antrales) y, posteriormente, su fragmentación [37, 38]. El ovocito y la zona pelúcida pueden permanecer en el folículo atrésico incluso después de la desaparición de las células de la granulosa, siendo la zona pelúcida el último elemento folicular en desaparecer. Es normal encontrar una gran cantidad de remanentes de zona pelúcida en el estroma ovárico, aun en ausencia del folículo atrésico [36].

También se ven afectadas las células tecales que se hipertrofian para dar origen a la glándula intersticial. Si bien el desarrollo y distribución de esta estructura varía entre especies, en todas presenta características propias de células esteroideogénicas (gotas de lípidos en el

citoplasma, organelos bien desarrollados y las enzimas necesarias para la producción de hormonas esteroideas). En algunas especies, como el ser humano, la glándula intersticial es una estructura transitoria e involuciona a estroma ovárico normal, en otras especies esta estructura se acumula y ocupa la mayor parte del estroma [36].

## **1.8.- FOLICULOGÉNESIS EN RATONES**

### **1.8.1.- Desarrollo folicular del nacimiento a la madurez reproductiva**

Sabiendo que la regulación de la foliculogénesis es distinta según sea la etapa de crecimiento (preantral o antral) y que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario permanece en reposo hasta la pubertad, podemos entender que el ovario presentará distintas poblaciones foliculares a lo largo de la vida. En la etapa prepuberal los ovarios sólo se desarrollarán hasta folículos antrales tempranos, regulados por factores intraováricos, mientras que alcanzada la pubertad y reactivado eje hormonal, algunos folículos alcanzarán el estadio preovulatorio, ovularán y formarán el cuerpo lúteo, bajo influencia de la FSH y LH.

Según lo descrito por Peters [39], los ovarios de ratones recién nacidos presentan dos componentes; ovocitos, dispuestos en nidos, y estroma. Los ovocitos ya han comenzado su división meiótica, algunos se encuentran en etapas transitorias de la profase (paquiteno o inicio de diploteno) mientras que otros ya han entrado en dictioteno, fase en la que permanecen hasta la ovulación.

Los folículos primordiales no se empiezan a formar sino hasta el día 2 post natal y al tercer día ya se distinguen folículos primarios. A la primera semana de vida los ovarios presentan grandes cambios respecto al primer día de vida, son más grandes y un porcentaje importante de folículos (5%) ha empezado a crecer. Se observan folículos secundarios y se ha empezado a desarrollar la teca, la membrana basal e incluso pequeños vasos sanguíneos [39].

A la segunda semana de vida el ovario luce similar al día 7, hay un mayor número de folículos secundarios (de 2-3 capas de células de la granulosa) y se observa que los folículos primordiales se ubican en la parte más externa de la corteza ovárica mientras que los folículos en

desarrollo se encuentran en la parte más interna de la corteza. Por su parte el centro del ovario sigue siendo ocupado por estroma [39].

Entre la tercera y cuarta semana de vida se observan folículos de mayor tamaño, en algunos han empezado a aparecer espacios con líquido folicular. Como no existen los niveles gonadotróficos adecuados para sostener el crecimiento de los folículos, estos folículos se vuelven atrésicos. Los folículos atrésicos parecen encogerse y finalmente desaparecen quedando solamente la zona pelúcida inmersa en el estroma ovárico. En las hembras de 3 semanas será normal encontrar un gran número de folículos en crecimiento y, también, un gran número de folículos atrésicos [39, 40, 41].

Al mes de vida se ha formado un sistema capilar central bien desarrollado, el ovario pierde el aspecto sólido que tenía durante los primeros días de vida. Como consecuencia de la atresia de los folículos y la formación de la glándula intersticial, el estroma del ovario infante empieza a asemejarse al del ovario adulto [36, 39]. El ovario no solo experimenta cambios morfológicos, también ve reducido el número de folículos conforme la hembra envejece.

El crecimiento de los folículos antrales es dependiente de gonadotrofinas, por lo que en ausencia de los niveles adecuados de esta hormona no podrán continuar su crecimiento y se volverán atrésicos. Durante la transición a la pubertad se reestablece el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y aumentan los niveles de gonadotrofinas y estrógenos, lo que le permite a los folículos continuar con su crecimiento [4].

La duración de la vida reproductiva de las hembras está determinada por la población de folículos primordiales que se formen en los primeros días de vida. A lo largo de la vida de la hembra estos folículos iniciarán su crecimiento, algunos de ellos ovularán pero el destino de la mayoría es la atresia. Si bien el número de folículos disminuye con el tiempo, la mayoría de las especies de ratones no llegan a perder la totalidad de los folículos [2, 39]. El envejecimiento ovárico no está marcado solamente por la depleción folicular, sino también por cambios en el eje hormonal y la pérdida de la ciclicidad. Seguido al periodo de actividad y madurez del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (que se alcanza en la pubertad), le sigue un periodo de reposo y pérdida de función. En un principio los ciclos se hacen irregulares y de mayor duración, pero

luego ocurre que la hembra deja de ciclar, se mantiene en un periodo constante de estro y no hay ovulación [32, 42].

En ratas de edad avanzada hay una disminución de los folículos sanos y atrésicos en comparación con las hembras adultas. Mientras se mantenga la ciclicidad, las hembras siguen desarrollando folículos pre ovulatorios y ovulando, aun así la calidad de los ovocitos es deficiente, no son capaces de reanudar la meiosis in vitro [43, 44].

### **1.8.2.- Ciclo estral en ratones**

Una vez alcanzada la pubertad, el animal adulto experimenta ciclos estrales regulares (de 4-5 días). El ciclo estral se puede dividir en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Las fases de proestro y estro coinciden con la fase folicular del ciclo ovárico, mientras que las fases de metaestro y diestro, con la fase lútea.

El proestro se caracteriza por ser la última fase de crecimiento de los folículos pre ovulatorios bajo influencia gonadotrófica. Aumentan los niveles de estrógenos que tienen un efecto de retroalimentación positiva en el hipotálamo e hipófisis, aumentando los niveles de LH. En el estro ocurre la ovulación y la hembra es receptiva a tener coito fecundante con el macho. Durante el metaestro ocurre la formación del cuerpo lúteo y la atresia de los folículos remanentes. En el diestro, si no ha habido apareamiento empieza la regresión funcional del cuerpo lúteo y al final de esta etapa, los folículos comienzan a crecer rápidamente. El cuerpo lúteo puede permanecer en el ovario durante 2-4 ciclos después de iniciada su regresión [30, 45].

En ratones la ovulación es espontánea pero en ausencia de coito el cuerpo lúteo no está totalmente desarrollado y se considera no funcional. Este cuerpo lúteo no secreta suficiente progesterona para mantener el embarazo, ya que ésta es metabolizada en un producto inactivo, la  $20\alpha$ -hidroxiprogesteroona [2].

En ratones la pubertad y el ciclo estral se inicia a las 5-6 semanas de vida. Al principio su frecuencia y duración es más corta que en una hembra adulta. La máxima frecuencia y duración del ciclo estral se alcanza entre el tercer y quinto mes de vida y dura hasta los 7-10 meses de edad. A medida que la hembra envejece los ciclos se hacen menos regulares y pierde ciclicidad a las 16 meses de vida aproximadamente [30].

## **1.9.- *OCTODON DEGUS***

### **1.9.1.- Generalidades**

El *Octodon degus* es un roedor autóctono de la zona central de Chile. Es un animal de pequeño tamaño (en su tamaño adulto pesa alrededor de 200 grs), sociable, diurno y de lenta maduración. Se adapta fácilmente a las condiciones de laboratorio, donde se reproduce con facilidad y puede llegar a vivir 5-7 años [46].

### **1.9.2.- Ciclo estral del *Octodon degus***

El ciclo estral del *Octodon degus* es regular, tiene una duración de 17-21 días que recuerda a la de grandes mamíferos como ovejas y primates. Son poliovuladores, de ovulación espontánea y desarrollan un cuerpo lúteo funcional, independiente de estimulación vaginal o apareamiento, que permanece por 12 a 14 días [47]. Se estima que las hembras empiezan a ciclar a las 12-16 semanas y la reproducción termina a los 4 – 4.5 años de edad [48].

En su hábitat natural se estima que las hembras empiezan a aparearse a los 8-9 meses de edad, se reproducen una vez al año (Mayo-Julio) y tienen camadas de 3-10 crías que nacen entre Septiembre y Octubre. En laboratorio este roedor se reproduce, por primera vez, a los 6 meses de edad, la primera camada consiste en 4-6 crías y las que le siguen en 6-10 crías. Puede dar a luz 3-4 camadas por año [46, 48]. La duración de la gestación es de 90 días [46].

No se cuenta con información detallada sobre la foliculogénesis en hembras de *Octodon degus*, pero pareciera ser similar a la de otros mamíferos, con la presencia de folículos en distintas etapas de crecimiento, folículos atrésicos y cuerpo lúteo inmersos en el estroma ovárico. Está descrito que el día del estro los ovarios de esta especie exhiben folículos pre ovulatorios, folículos secundarios y cuerpo albicans. Ovarios recogidos 6 días después del estro presentan un cuerpo lúteo bien desarrollado, además de folículos primarios. El día 16, poco antes del siguiente ciclo, los ovarios muestran folículos primarios y secundarios, y el cuerpo lúteo empieza a involucionar [47].

### 1.9.3.- *Octodon degus* y la investigación

En los últimos años se ha incrementado el uso del *Octodon degus* como modelo animal experimental. Se ha utilizado principalmente para el estudio del ciclo circadiano de mamíferos diurnos, ya que posee las ventajas de ser un animal sociable, presentar una función circadiana sexualmente dimórfica y tener un desarrollo más lento que otros roedores [48]. Además es un valioso modelo para el estudio de distintas áreas médicas ya que es capaz de desarrollar, espontáneamente, enfermedades análogas a las experimentadas por el ser humano, incluyendo enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer, diabetes mellitus, cataratas y cáncer [46, 49].

También se ha descrito a esta especie como un buen modelo biológico de estudios de ciclo reproductivo femenino, para enfrentarse experimentalmente a problemáticas de enfermedades y envejecimiento ovárico en la especie humana. Los estudios sobre ciclo reproductivo se han enfocado principalmente en ratas, hámsters y ratones, animales que tienen un ciclo estral de corta duración (4-5 días), espontáneo pero sin la formación de un cuerpo lúteo funcional o verdadero a menos que haya estimulación vaginal o apareamiento. Los ciclos reproductivos sin fase lútea verdadera están presentes en un pequeño número de especies de mamíferos y no es el que exhiben los seres humanos. El *Octodon degus* por su parte tiene un ciclo estral que recuerda al de grandes mamíferos, como los primates, con ovulación espontánea y formación de cuerpo lúteo funcional independiente de estimulación vaginal. Además su ciclo tiene una duración de 17-21 días, muy cercana a los 28 días que dura, en promedio, el ciclo menstrual de las mujeres. Sumado a su tipo reproductivo, este animal tiene las ventajas de ser más pequeño que una rata adulta, vivir por más tiempo, tener un desarrollo más lento que otros roedores y adaptarse fácilmente a las condiciones de laboratorio. Estas características hacen de esta especie un excelente modelo para el estudio de ciclos reproductivos con fase lútea verdadera [46, 47].

## CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

### 2.1.- OBJETIVO GENERAL

- Comparar la foliculogénesis ovárica en hembras adultas jóvenes y de edad avanzada de *Octodon degus*.

### 2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir morfológicamente los folículos ováricos de hembras adultas jóvenes y edad avanzada de *Octodon degus*.
- Describir el número de los tipos foliculares sanos y atrésicos presentes en los ovarios de hembras adultas jóvenes y edad avanzada de *Octodon degus*.
- Describir el diámetro de los tipos foliculares sanos y atrésicos encontrados en los ovarios de hembras adultas jóvenes y edad avanzada de *Octodon degus*.
- Describir el diámetro del ovocito y vesícula germinativa de los folículos sanos en ovarios de hembras adultas jóvenes y edad avanzada de *Octodon degus*.
- Describir el número y diámetro de los cuerpos lúteos en ovarios de hembras adultas jóvenes y de edad avanzada de *Octodon degus*.
- Describir la expresión de la proteína caspasa-3 de folículos atrésicos en ovarios de hembras adultas jóvenes y de edad avanzada de *Octodon degus*.
- Comparar los resultados obtenidos en los ovarios de hembras adultas jóvenes y de edad avanzada de *Octodon degus*.

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- MATERIALES

El estudio se realizó en dependencias del Laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, el cual contaba con la implementación necesaria para el procesamiento y análisis de las muestras.

### 3.2.- MÉTODOS

#### 3.2.1.- Selección de muestra

Para este estudio se utilizaron 11 ovarios de *Octodon degus*. Tres ovarios correspondieron a hembras de 4 meses de edad (en inactividad reproductiva), cuatro ovarios a hembras de 6-7 meses de edad (iniciando actividad reproductiva) y cuatro ovarios de hembras de 2-6 años de edad (hembras de mantención).

Se trabajó con bloques de archivo de ovarios de *Octodon degus*, fijados en Bouin acuoso e incluidos en paraplást. Estos ovarios eran remanentes de animales utilizados en el proyecto Fondecyt: “Neurobiology of Vision in the Retina of the Diurnal Rodent *Octodon degus*”, a cargo del Dr. Adrián Palacios perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Los animales provenían de una colonia del vivero de la Facultad de Ciencias de dicha universidad, se trata de animales nacidos y adaptados a las condiciones del vivero. Se mantuvieron a temperatura ambiente de 18-20°C, con un ciclo de 12-h luz/ 12-h oscuridad y, agua y comida a disposición ad libitum. Fueron anestesiados con vapores de halotano y decapitados. El uso de estos animales fue aprobado por el Comité de bioética y bioseguridad UV.

Los criterios de inclusión para la selección de las muestras fueron:

- Especie: *Octodon degus*
- Edad: Adultas jóvenes (4 meses , 6-7 meses) y edad avanzada (2-6 años)

Los criterios de exclusión a considerar fueron:

- Muestra mal fijada
- Ovario patológico

Ver protocolo del procesamiento de tejidos en Anexo 1.

### **3.2.2.- Selección de variables**

Las variables en estudio fueron la edad, tipo folicular y diámetro folicular.

Los valores que tomaron las variables fueron los siguientes:

- Edad:  
Hembras adultas jóvenes: 4 meses y 6-7 meses.  
Hembras de edad avanzada: 2-6 años.
- Tipo Folicular: Folículo primordial, folículo primario, folículo secundario, folículo terciario, folículos atrésicos y cuerpo lúteo.
- Diámetro Folicular y ovocitario: expresado en micrómetros ( $\mu\text{m}$ )

### **3.2.3.- Procesamiento histológico**

A cada ovario completo se le realizaron cortes seriados, de 6  $\mu\text{m}$  de grosor, con un micrótomos Leica BM1255. Los cortes fueron estirados en un baño termorregulado a una temperatura de  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ , y montados de forma seriada en portaobjetos utilizando albumina de huevo como medio de adhesión. Una vez montados, las preparaciones fueron colocadas en una estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  durante toda una noche. Los cortes fueron desparafinados en tres baños de xilol, hidratados en una batería de alcoholes de concentración decreciente y lavados en agua destilada. Una vez desparafinados e hidratados, los cortes se tiñeron con el método tricrómico de Arteta (hematoxilina, eritrosina-naranja G, azul de anilina) [50].

Ver protocolo de desparafinación e hidratación en Anexo 2.

Ver protocolo del método tricrómico de Arteta en Anexo 3.

### **3.2.4.- Descripción morfológica y recuento folicular**

Se describió la morfología de los tipos foliculares encontrados en cada ovario de las hembras adultas jóvenes y de edad avanzada. Los folículos fueron clasificados según un criterio morfológico basado en las características del ovocito, células de la granulosa y células tecales. De esta forma se distinguen folículos sanos (primordiales, primarios, secundarios y terciarios), folículos atrésicos (primarios atrésicos, secundarios atrésicos, terciarios atrésicos y atrésicos avanzados) y el cuerpo lúteo.

Para discriminar los folículos en crecimiento de folículos atrésicos se aplicaron los siguientes criterios: reinicio de meiosis (presencia de figuras de división meiótica), signos de degeneración del ovocito (pérdida parcial o total de los límites de la envoltura nuclear, pérdida de la forma y límites celulares irregulares), picnosis de los núcleos de las células granulosas, infiltración de células granulosas en la cavidad antral de los folículos terciarios, hipertrofia de la células tecales.

Respecto al cuerpo lúteo, sólo se consideraron las estructuras morfológicamente bien desarrolladas, se excluyeron del conteo y medición los cuerpos hemorrágicos.

Las fotomicrografías se obtuvieron con una cámara digital Leica DFC290 incorporada a un microscopio Leitz Leica DM RBE. La edición de las imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop CC.

La cuantificación folicular se realizó contando en un solo plano de foco todos aquellos folículos cuyo ovocito tuviera la vesícula germinativa (núcleo) conteniendo su nucléolo en foco, mediante el la observación de la totalidad de los cortes obtenidos de cada ovario, utilizando un microscopio óptico Leica DM2500. Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar (EE)

### **3.2.5.- Medición folicular**

Se determinó el diámetro de la sección mayor de cada folículo. Para esto se realizaron dos mediciones del diámetro folicular perpendiculares entre sí, de membrana basal a membrana basal, y, luego, se calculó el promedio de ambos. Se midieron los diámetros de 25 folículos primordiales, 50 folículos primarios y todos los folículos secundarios, terciarios, atrésicos y

cuerpos lúteos. Con el mismo método utilizado para los folículos se midieron los diámetros del ovocito y vesícula germinativa [51, 52, 53].

La medición de los diámetros se realizó en un microscopio óptico Leica DM2500 con una cámara CCD Cohu 4812- 5000/000. Las imágenes digitalizadas se analizaron en un computador Macintosh utilizando el programa NIH Image J de dominio público (desarrollado en el U.S. National Institutes of Health y disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>). Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  EE.

### **3.2.6.- Estudio inmunohistoquímico**

Con el fin de estudiar la apoptosis en los folículos atrésicos se identificó, a través de un estudio inmunohistoquímico, la expresión de la proteína caspasa-3. Esta proteasa es una de las caspasas efectoras responsables del clivaje de diversas proteínas durante la muerte celular.

Los ovarios a estudiar se cortaron de forma seriada, a 6  $\mu$ m de grosor, obteniéndose cintas de 15 cortes cada una. El primer corte de cada cinta se tiñó con el método tricrómico de Arteta y en base al estudio histológico se eligió la cinta más representativa, de la que se ocupó el segundo corte para estudio inmunohistoquímico.

Los cortes fueron estirados en un baño termorregulado Leica HI1210 a 40°C, montados en portaobjetos cubiertos con polisina y puestos a secar en una estufa a 40°C durante toda la noche, transcurrido este tiempo fueron desparafinados e hidratados hasta agua destilada. Los cortes fueron colocados en buffer TRIS (pH 7.6) por unos minutos y luego transferidos a buffer Tris EDTA (pH 9), calentado previamente, para realizar la recuperación antigénica en una vaporera durante 30 minutos.

Una vez realizada la recuperación, los cortes fueron enfriados a temperatura ambiente y lavados en tres baños de agua destilada. Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena por 30 minutos. Para el bloqueo de los sitios inespecíficos los cortes se incubaron con suero de cabra al 2% en buffer Tris (pH 7.6) durante 30 minutos, luego se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-caspasa 3 (dilución 1:200 en buffer Tris pH 7.6) durante toda la noche en un refrigerador a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron tres baños en buffer y los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti conejo hecho en cabra (dilución 1:500 en buffer Tris pH 7.6) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo los cortes fueron lavados en buffer Tris e incubados con el complejo ABC por 90 minutos. Seguido de los baños en buffer Tris los cortes se incubaron con el cromógeno Diamobencidina por 10 minutos. Finalmente se lavaron en buffer Tris y agua destilada, se tiñeron con Hematoxilina como contraste, se deshidrataron en baños de alcohol de concentración creciente, aclararon en xilol y cubrieron con cubreobjetos, utilizando entellán como medio de montaje.

Para más detalles del protocolo de inmunohistoquímica ver Anexo 4.

### **3.2.7.- Análisis de datos**

El recuento de los folículos y el diámetro folicular se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar (EE). Para el cálculo de estas variables y la confección de los gráficos se utilizó el programa Excel 2013.

Para el análisis comparativo de los datos se empleó el test de Kruskal-Wallis, prueba de contraste no paramétrica para k muestras independientes, estableciendo una probabilidad p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ) como criterio de significancia estadística. Este análisis se complementó con el test U de Mann-Whitney para contrastar 2 muestras independientes utilizando, también, un valor p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ) como criterio de significancia estadística. Estas pruebas se realizaron con el programa SPSS Statistics 17.0.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Se estudiaron ovarios de hembras de 4 meses, 6-7 meses y 2-6 años de edad. No se observaron diferencias en la morfología de folículos sanos, folículos atrésicos o cuerpos lúteos entre los grupos, por lo que a continuación se realiza una descripción general de los folículos.

#### 4.1.1.- Folículos sanos

Los folículos sanos (sin signos de atresia) fueron clasificados en folículos primordiales, primarios, secundarios y terciarios.

Los folículos primordiales corresponden a aquellos formados por el ovocito primario rodeado de una capa de células escamosas pregranulosas (Figura 4.1A). Este tipo folicular presenta dos disposiciones: 1) en grupos o “nidios de folículos” o 2) aislados. Se ubican en la región externa de la corteza. Los diámetros de los folículos primordiales fluctuaron entre 16.1 y 23.8  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 16.9 y 23.2  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 15.5 y 23.7  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. No se observan diferencias significativas en el diámetro de los folículos primordiales, en los tres grupos presenta un diámetro promedio cercano a 19  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4).

Se clasificaron como folículos primarios a aquellos en que el ovocito está rodeado de una capa de células cúbicas o células de la granulosa (Figura 4.1B). También se consideraron en esta clasificación a aquellos folículos que presentaban células planas y células cúbicas, pero con predominio de las últimas. Se observó el depósito de un material cianófilo (teñido con azul de anilina) rodeando al ovocito, que constituirá la zona pelúcida. Los diámetros de los folículos primarios fluctuaron entre 23.4 y 61.3  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 23.2 y 61.7  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 23.6 y 60.9  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. No se observan diferencias importantes en los diámetros de los folículos primarios, encontrándose estos entre 33 y 35  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4).

Los folículos secundarios se caracterizan porque el ovocito está rodeado de dos o más capas de células de la granulosa, o bien aquellos en los que es evidente la formación de una segunda capa de células (sin ser continua). En general, estos folículos estaban formados por un mínimo de

dos capas de células de la granulosa y un máximo de 6 capas de células. En estos folículos se observó un mayor desarrollo (grosor) de la zona pelúcida. En folículos de 2 capas de células de la granulosa empieza a aparecer una teca poco diferenciada alrededor del folículo (por fuera de la lámina basal), que se distingue como 2-3 capas de células fusiformes (Figura 4.1C). Los diámetros de los folículos secundarios fluctuaron entre 53.3 y 161.2  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 66.3 y 177.2  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 51.8 y 170.4  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. El diámetro de los folículos secundarios no presenta diferencias significativas entre grupos, bordeando estos entre 94 y 100  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4).

Los folículos terciarios son aquellos que presentan la formación de espacios con líquido folicular entre las células de la granulosa o aquellos que exhiben un antro folicular propiamente tal. En estos folículos era evidente la presencia de una teca bien desarrollada, se observaron varias capas de células fusiformes rodeando al folículo (Figura 4.1D-E). Los diámetros de los folículos terciarios fluctuaron entre 145.6 y 545.7  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 122.1 y 541.9  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 116.9 y 657.9  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. El grupo que presenta los folículos terciarios de menor tamaño son las hembras de 6-7 meses de edad (233.1  $\mu\text{m}$ ), aunque el análisis estadístico indica que las diferencias entre los grupos no son significativas (Figura 4.4).

Los resultados indicaron que hay un aumento del diámetro folicular a través de las distintas etapas del desarrollo. El menor diámetro se obtuvo en los folículos primordiales y el mayor en los folículos terciarios (Figura 4.4).

Se observaron figuras mitóticas en las células de la granulosa de folículos secundarios y terciarios, siendo más abundantes en los últimos. También se observaron figuras mitóticas en folículos primarios, pero en menor cantidad y con menos frecuencia que en los folículos secundarios y terciarios (Figura 4.1).

En las hembras jóvenes la glándula intersticial se ve menos desarrollada que en las hembras de edad avanzada, donde ocupa casi la totalidad del estroma ovárico. La glándula intersticial es una estructura formada por células de citoplasma claro, de aspecto vacuolado (Figura 4.1E).

#### 4.1.2.- Ovocito y vesícula germinativa en los folículos sanos

En los folículos primordiales y primarios, la vesícula germinativa (núcleo) del ovocito destaca por exhibir un nucléolo único y prominente, de posición excéntrica. Por lo general, en los folículos primordiales y primarios, la cromatina es laxa ubicada en la periferia de la vesícula germinativa, cercana a la membrana nuclear. En algunos folículos la cromatina está más condensada, en ocasiones el grado de compactación es tal que no permite distinguir fácilmente el nucléolo, aun así la vesícula germinativa no presenta irregularidades en su membrana, la que se encuentra bien delimitada (Figura 4.1A-B).

No se observan diferencias significativas en el diámetro de los ovocitos en los folículos primordiales, bordeando estos entre las 14 y 15  $\mu\text{m}$ . Tampoco hay diferencias en el diámetro de la vesícula germinativa de estos folículos, encontrándose entre 8 y 9  $\mu\text{m}$ . Para ambas variables, el rango de mediciones es mínimo (Tabla 4).

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el diámetro de los ovocitos de folículos primarios entre las hembras de 6-7 meses (21.7  $\mu\text{m}$ ) y las de 2-6 años de edad (24.3  $\mu\text{m}$ ). Además, se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los diámetros de la vesícula germinativa rango de mediciones, siendo más marcado de estos folículos entre las hembras de 4 meses (11.2  $\mu\text{m}$ ) y 2-6 años (13.1  $\mu\text{m}$ ) de edad. Independiente de las diferencias entre grupos, para ambas variables se observa un amplio en los ovocitos que pueden ir de aproximadamente 16  $\mu\text{m}$  a alrededor de 35  $\mu\text{m}$  (Tabla 4).

Al igual que los folículos primordiales y primarios, la vesícula germinativa de los folículos secundarios y terciarios posee un nucléolo notorio de posición excéntrica. La cromatina se observa más condensada y se ubica, por lo general, rodeando al nucléolo (Figura 4.1C-D).

No se observan diferencias significativas en los diámetros de los ovocitos de folículos secundarios, bordeando estos entre 46 y 51  $\mu\text{m}$ . Tampoco hay diferencias en el diámetro de la vesícula germinativa de estos folículos, tomando valores entre 19 y 20  $\mu\text{m}$ . Para ambas variables, se obtuvo un amplio rango de mediciones. Este rango es más notorio en los ovocitos, los menores valores rondan las 30  $\mu\text{m}$  y los mayores alrededor de las 60  $\mu\text{m}$  (o más) (Tabla 4).

Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el diámetro del ovocito y vesícula germinativa de los folículos terciarios, siendo mayor en las hembras de 6-7 meses (65.8  $\mu\text{m}$  y 24.2  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Para ambas variables, el rango de mediciones es pequeño (Tabla 4).

En general, tanto en los diámetros del ovocito y de la vesícula germinativa se observó un aumento en relación al estadio de desarrollo folicular, el menor valor (para ambas variables) se obtuvo en los folículos primordiales y el mayor en los folículos terciarios. El mayor rango de diámetros, tanto del ovocito como de la vesícula germinativa, se observó en los folículos primarios y secundarios. El diámetro de la vesícula germinativa pareciera mantenerse desde el estadio de folículo secundario final.

#### **4.1.3.- Cuerpo Lúteo**

En dos ovarios, uno de una hembra del grupo de 6-7 meses y el otro de una hembra de 2-6 años de edad, se observaron cuerpos hemorrágicos. Estas estructuras se caracterizan por presentar un centro hemorrágico rodeado de células lúteas, de citoplasma claro y de aspecto vacuolado (Figura 4.2A)

En dos de los tres ovarios de hembras de 4 meses de edad se observaron cuerpos lúteos bien desarrollados. En dos ovarios de los cuatro ovarios de hembras de 6-7 meses de edad se observaron cuerpos lúteos bien desarrollados, en el resto se observaron cuerpos lúteos en regresión. Se observaron cuerpos lúteos bien desarrollados en todos los ovarios de hembras de 2-6 años de edad.

Los cuerpos lúteos están formados por células poligonales, de citoplasma abundante y claro con aspecto vacuolado. Estas células poseen un núcleo grande y redondo, y un nucléolo único. Se distingue un centro de colágeno y pequeños vasos sanguíneos al interior del cuerpo lúteo. Esta estructura ocupa gran parte del estroma ovárico (Figura 4.2B).

Los diámetros de los cuerpos lúteos fluctuaron entre 365.9 y 761.3  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses de edad, entre 305.6 y 659.1  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y, entre 290.3 y 813.0  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años de edad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de los cuerpos lúteos entre grupos, bordeando éstos entre 552 y 575  $\mu\text{m}$  (Figura 4.5).

#### 4.1.4.- Folículos atrésicos

De acuerdo a sus características morfológicas los folículos atrésicos fueron clasificados en primarios atrésicos, secundarios atrésicos, terciarios atrésicos, folículos atrésicos avanzados y remanentes de zona pelúcida.

Se clasificaron como folículos primarios atrésicos aquellos folículos cuyo ovocito presentaba evidentes signos de degeneración (pérdida de la forma, límites celulares poco definidos, núcleo irregular) pero células de la granulosa normales. También entraron en esta clasificación aquellos folículos donde sólo permanecían las células de la granulosa en ausencia del ovocito, en estos folículos la cavidad antes ocupada por el ovocito contenía remanentes de la zona pelúcida (ZP) (Figura 4.3A). Los diámetros de los folículos primarios atrésicos fluctuaron entre 34.1 y 71.8  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 33.6 y 71.8  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 28.5 y 64.1  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. No se observaron diferencias significativas en los diámetros de este tipo folicular entre los grupos (Figura 4.6). Se observó un aumento en el diámetro de los folículos primarios atrésicos (47.3, 48.1 y 45.8  $\mu\text{m}$ ) en comparación con su variante sana (35.1, 33.6 y 35.4  $\mu\text{m}$ ) en todos los grupos.

Se observaron dos patrones de folículos secundarios atrésicos. El primero corresponde a folículos secundarios tempranos (aquellos con 2 capas de células de la granulosa) que presentaban evidentes signos de degeneración del ovocito o bien aquellos folículos donde sólo persisten las células de la granulosa, similar a lo que ocurre con los folículos primarios atrésicos. En el segundo patrón se observaron núcleos hipercromáticos de forma irregular entre las células de la granulosa más cercanas al ovocito, en algunos folículos el ovocito exhibía irregularidades en el límite nuclear, en otros no se observó alteración nuclear aparente (Figura 4.3B). En ningún folículo secundario se observaron cuerpos apoptóticos. Los diámetros de los folículos secundarios atrésicos fluctuaron entre 41.4 y 217.3  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 53.9 y 178.3  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 40.0 y 164.7  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. No se observan diferencias significativas en el diámetro de este tipo folicular entre grupos (Figura 4.6). En el caso de los folículos secundarios atrésicos, sólo en el diámetro de las hembras de 4 meses (108.8  $\mu\text{m}$ ) hay un aumento importante en relación a los su variante sana (95.3  $\mu\text{m}$ ).

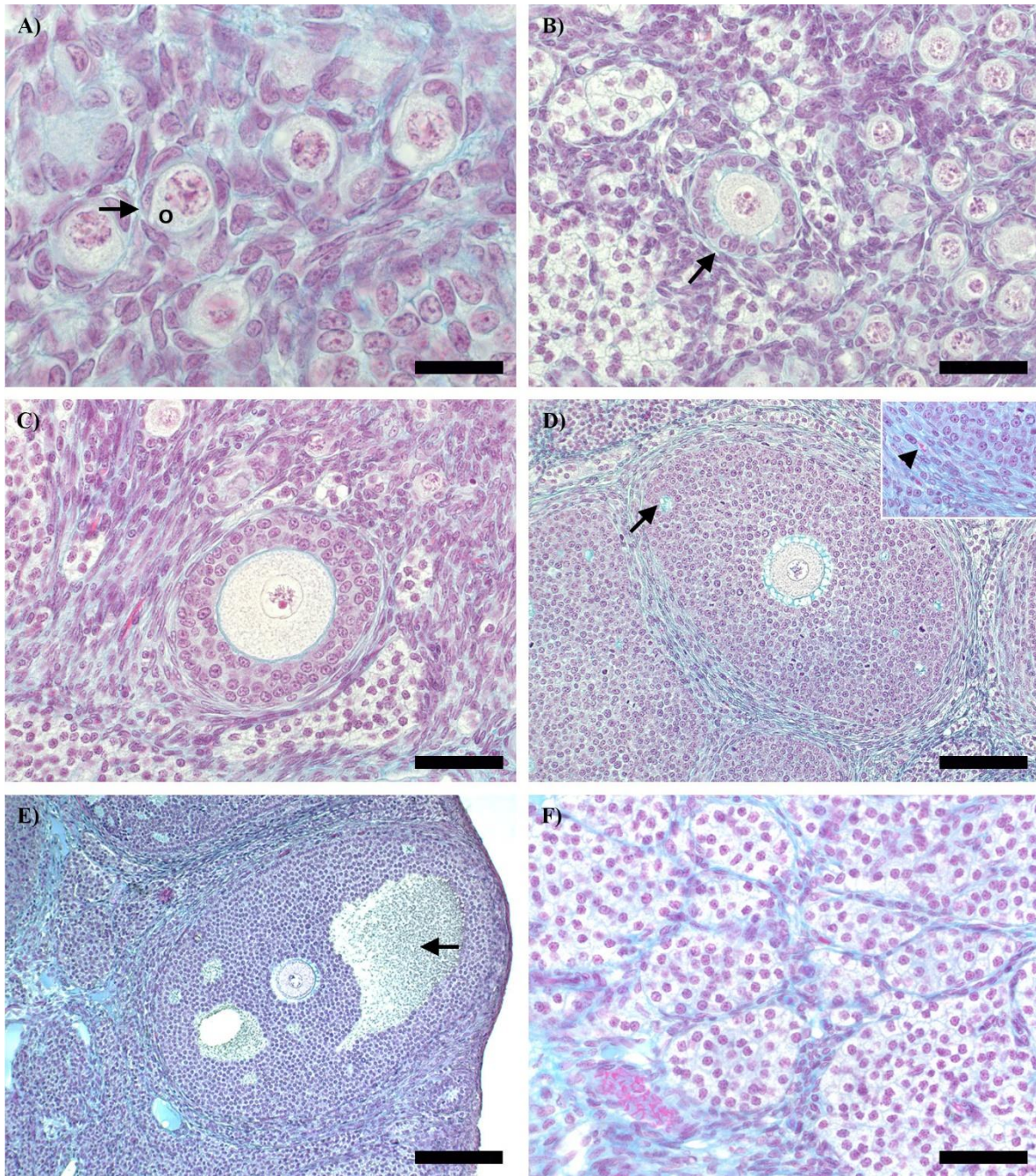
En los folículos terciarios (tempranos) atrésicos, aquellos que exhiben pequeños espacios con líquido folicular, se observaron núcleos hipercromáticos de forma irregular y el límite nuclear irregular en el ovocito. En los folículos terciarios atrésicos de mayor tamaño o con un antro más desarrollado es evidente la presencia de cuerpos apoptóticos entre las células de la granulosa, algunos hacia el antro folicular (Figura 4.3C). En los estados más avanzados de atresia disminuye el número de capas de células de la granulosa, como consecuencia de la apoptosis, se observa hipertrofia de las células tecales y el ovocito presenta alteraciones evidentes (irregularidad de la membrana nuclear, reinicio de meiosis, límites celulares irregulares) (Figura 4.3D). Los diámetros de los folículos terciarios atrésicos fluctuaron entre 154.0 y 541.7  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 128.5 y 586.7  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 135.6 y 578.4  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. No se observan diferencias significativas en el diámetro de los folículos terciarios atrésicos entre grupos (Figura 4.6). Los folículos atrésicos de las hembras de 6-7 meses (329.0  $\mu\text{m}$ ) muestran un aumento en relación a su variante sana (233.1  $\mu\text{m}$ ). Se destaca que el grupo de 6-7 meses de edad es el que presenta el mayor diámetro en los folículos terciarios atrésicos respecto de los folículos sanos

Cabe destacar que en los folículos primarios y secundarios tempranos el primer signo de atresia se observa en el ovocito, mientras que en folículos secundarios tardíos y terciarios la atresia afecta primero a las células de la granulosa.

Se clasificó como folículos atrésicos avanzados a los folículos que se caracterizan por la ausencia de células de la granulosa e hipertrofia de las células tecales. En algunos folículos el ovocito había experimentado reinicio de la meiosis, otros no evidenciaban la presencia de la vesícula germinativa o sólo quedaban restos celulares (Figura 4.3E). En otros folículos, ocupando la cavidad, se observaron células con aspecto luteinizado, de citoplasma claro. Estos folículos atrésicos parecieran ser folículos terciarios (antrales), en avanzados estados de atresia. Los diámetros de los folículos atrésicos avanzados entre 154.9 y 296.7  $\mu\text{m}$  en las hembras de 4 meses, entre 151.1 y 360.1  $\mu\text{m}$  en las de 6-7 meses y entre 119.2 y 266.8  $\mu\text{m}$  en las de 2-6 años. No se observan diferencias significativas el diámetro de estos folículos entre los grupos en estudio (Figura 4.6).

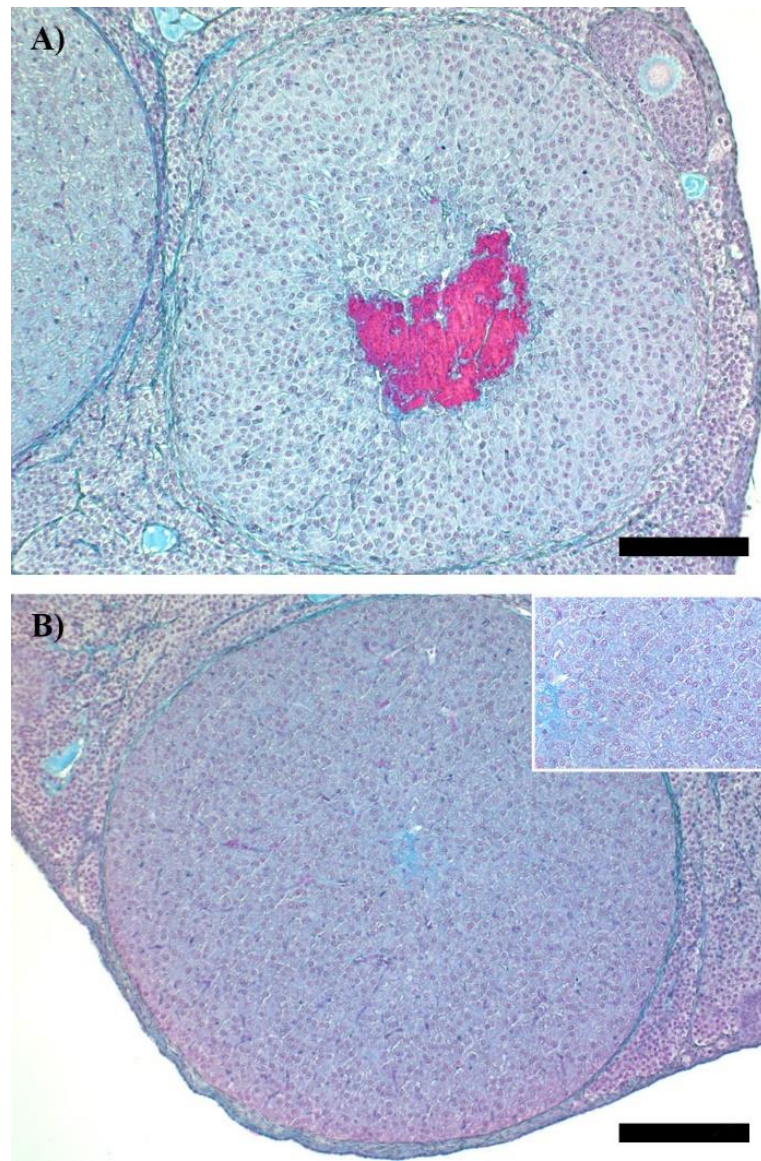
Si bien no observan diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de los folículos atrésicos, son las hembras de edad avanzada las que presentan el menor diámetro en todos los tipos foliculares atrésicos (Figura 4.6).

En todos los ovarios abundaban remanentes de zona pelúcida, que se distinguen como estructuras cianófilas (por su tinción con azul de anilina) inmersas en el estroma ovárico, a veces con aspecto plegado (Figura 4.3F). La zona pelúcida es la última estructura del folículo atrésico en desaparecer, esta permanece incluso después de la muerte de las células de la granulosa y del ovocito.



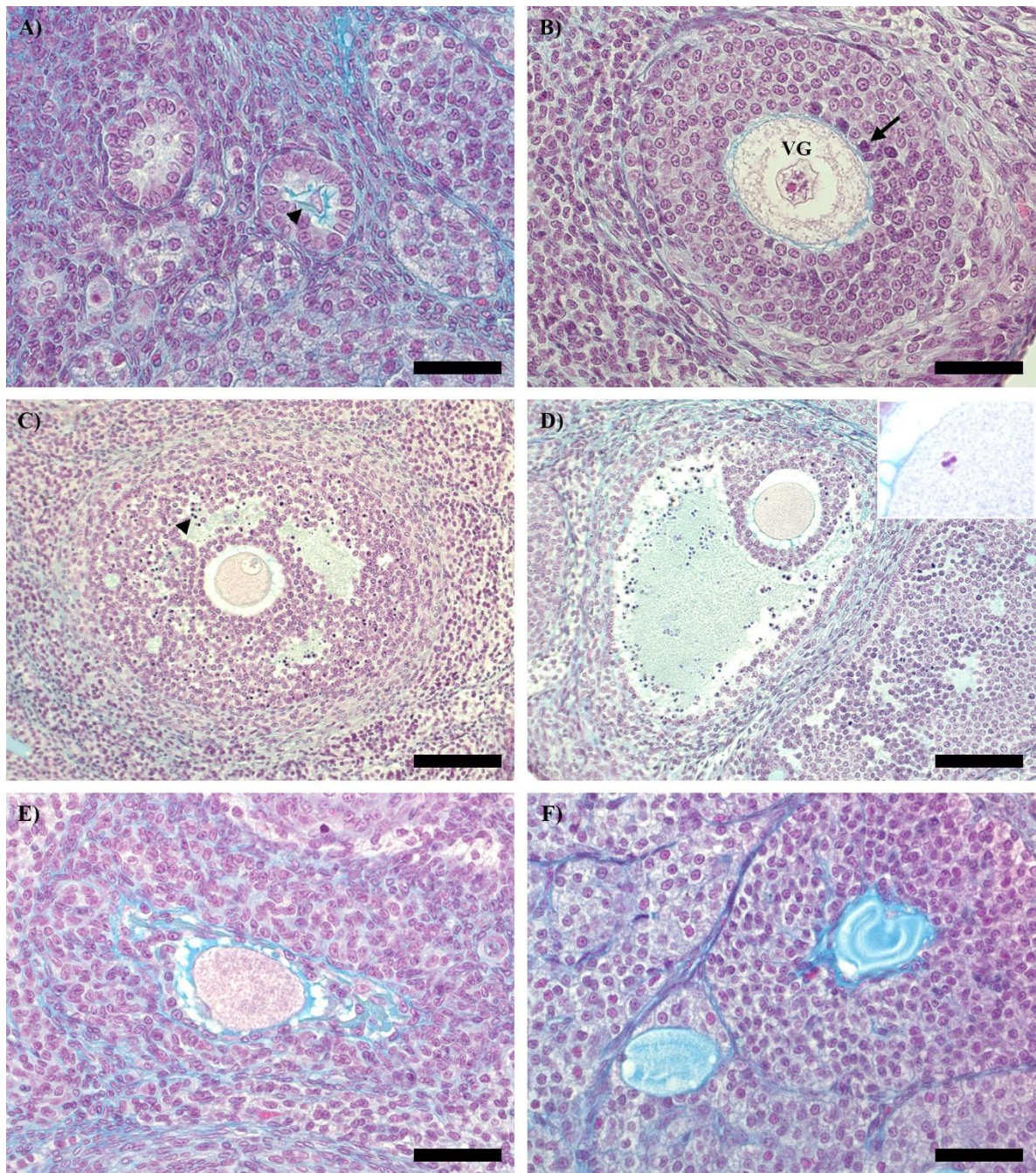
*FIGURA 4.1: Fotomicrografía de folículos normales en cortes histológicos de ovarios de Octodon degus, teñidos con tricrómico de Arteta.*

A) Folículos primordiales formados por el ovocito (O) rodeado de células planas pregranulósicas (flecha). B) Folículo primario que destaca por el ovocito rodeado de células de la granulosa cúbicas (flecha). C) Folículo secundario rodeado de varias capas de células de la granulosa. D) Folículo terciario, se evidencian la aparición de espacios con líquido (flecha) entre las células de la granulosa y la teca (punta de flecha, ver recuadro). E) Folículo terciario donde destaca la cavidad antral (flecha). F) Glándula intersticial formada por células de citoplasma claro. Barra de escala A= 20  $\mu\text{m}$ , B= 40  $\mu\text{m}$ , C= 50  $\mu\text{m}$ , D= 100  $\mu\text{m}$ , E= 160  $\mu\text{m}$ , F= 50  $\mu\text{m}$ .



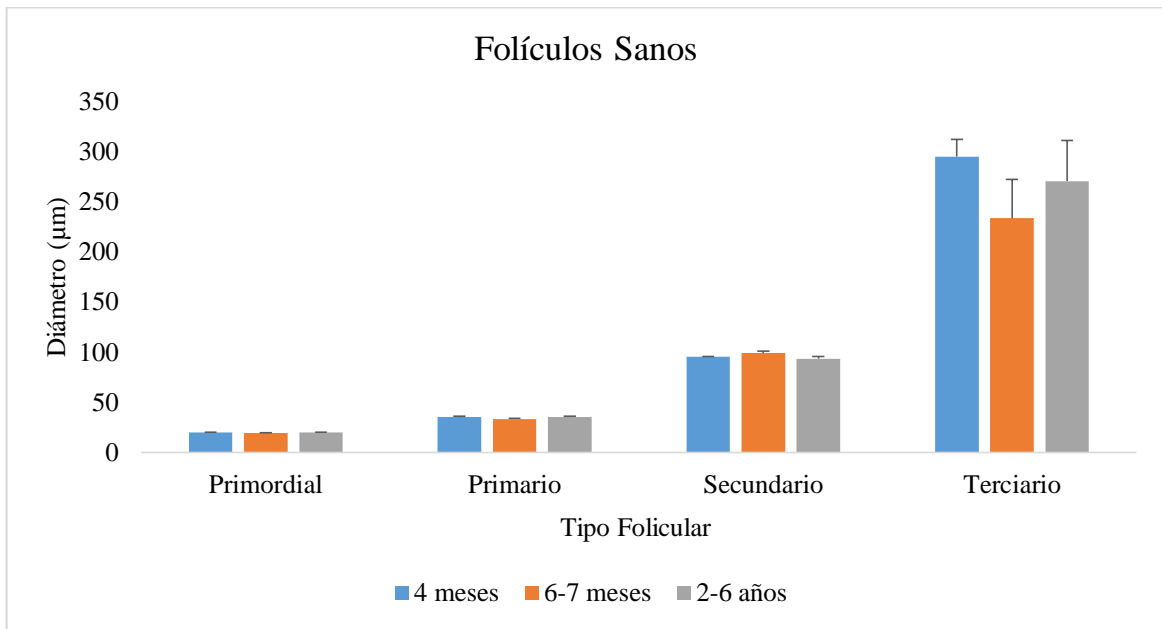
*FIGURA 4.2: Fotomicrografía de cuerpos lúteos en cortes histológicos de ovarios de Octodon degus, teñidos con tricrómico de Arteta.*

A) Cuerpo hemorrágico, se caracteriza porque su centro está ocupado por un coágulo sanguíneo. B) Cuerpo lúteo formado por células de citoplasma abundante y claro con aspecto vacuolado (ver recuadro). Barra de escala: A= 160  $\mu\text{m}$ , B= 200  $\mu\text{m}$ .



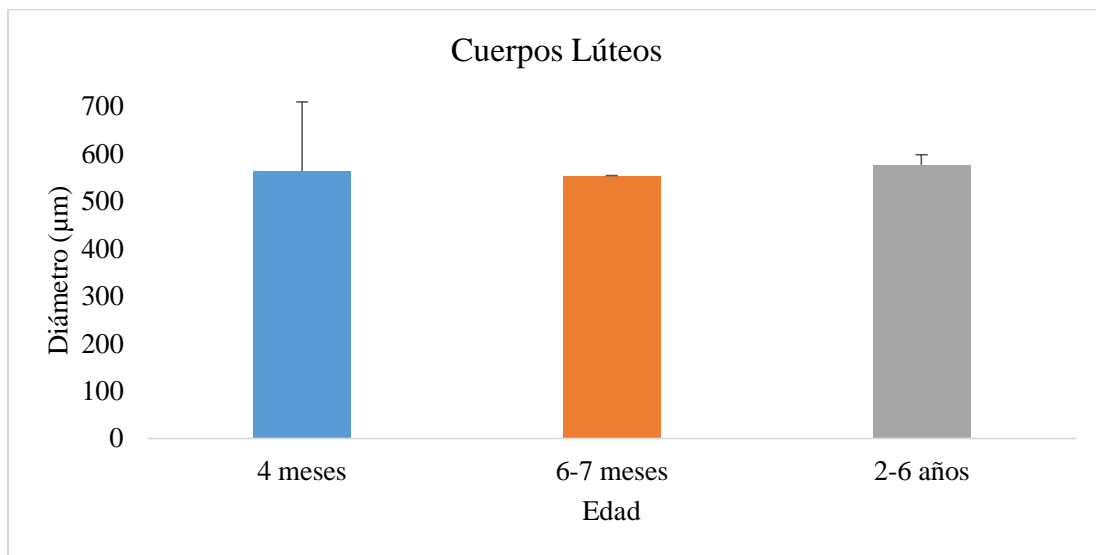
**FIGURA 4.3:** Fotomicrografía de folículos atrésicos en cortes histológicos de ovarios de *Octodon degus*, teñidos con tricrómico de Arteta.

A) Folículo primario atrésico. En este folículo persisten sólo las células de la granulosa y en la cavidad antes ocupada por el ovocito se observan restos de ZP (punta de flecha). B) Folículo secundario atrésico. En la capa granulosa se observan núcleos hiper Cromáticos e irregulares (punta de flecha) y la vesícula germinativa (VG) exhibe límites irregulares. C) Folículo terciario atrésico con cuerpos apoptóticos (flecha) entre las células normales. D) Folículo terciario atrésico que destaca por los cuerpos apoptóticos hacia el antro (flecha) y el reinicio de la meiosis en el ovocito (ver recuadro). E) Folículo atrésico avanzado. Se observa el ovocito en estado de degeneración rodeado de células hipertrofiadas. F) Remanentes de zona pelúcida inmersas en la glándula intersticial. Barra de escala: A= 40  $\mu$ m, B= 50  $\mu$ m, C= 100  $\mu$ m, D= 100  $\mu$ m, E= 50  $\mu$ m, F= 50  $\mu$ m.



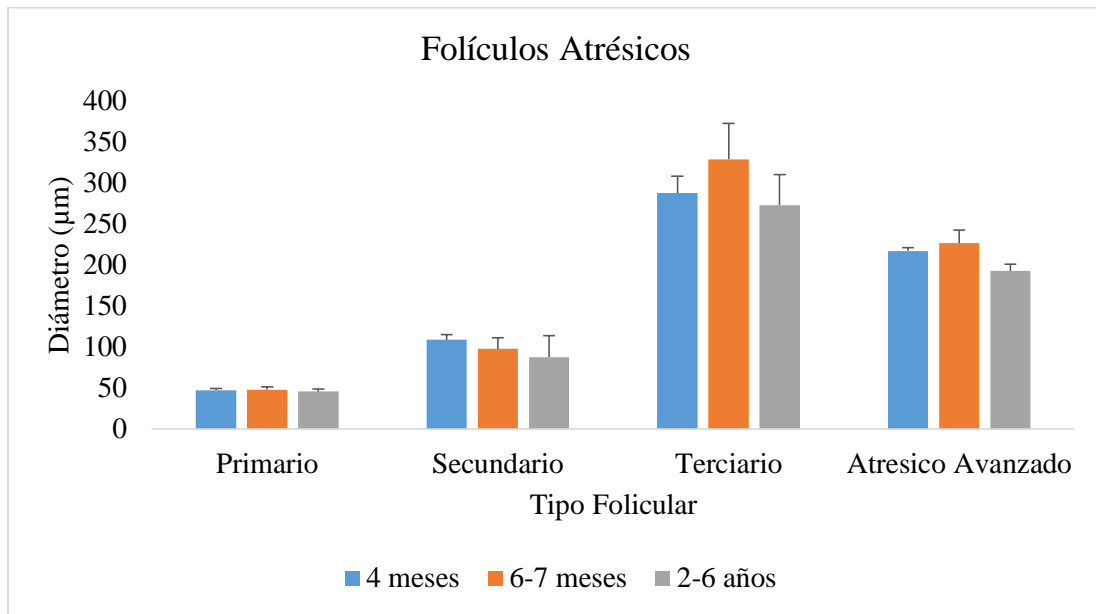
*FIGURA 4.4: Diámetro de los folículos sanos presentes en ovarios de Octodon degus.*

Se midieron dos diámetros foliculares perpendiculares entre sí de la sección mayor de los folículos sanos. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  EE



*FIGURA 4.5: Diámetro de cuerpos lúteos presentes en ovarios de Octodon degus.*

Se midieron dos diámetros perpendiculares entre sí de la sección mayor del cuerpo lúteo. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  EE.



*FIGURA 4.6: Diámetro de los folículos atrésicos presentes en ovarios de Octodon degus.*

Se midieron dos diámetros perpendiculares entre sí, de la sección mayor de los folículos atrésicos. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  EE

TABLA 4: Diámetro del ovocito y vesícula germinativa en ovarios de *Octodon degus*

		Folículo primordial		Folículo primario		Folículo secundario		Folículo terciario (*)	
		O v (μm)	VG (μm)	O v (μm)	VG (μm)	O v (μm)	VG (μm)	O v (μm)	VG (μm)
4 meses	$\bar{X}$	14.6	8.8	22.1	11.2 (*)	47.5	20.1	61.7	22.5
	Mín	12.6	7.7	16.3	8.0	30.6	13.2	56.6	20.4
	Máx	17.8	10.9	35.9	16.3	60.0	24.7	67.2	24.7
6-7 meses	$\bar{X}$	15.0	9.3	21.7 (*)	12.1	51.6	20.1	65.8	24.2
	Mín	12.6	7.7	16.3	9.3	37.9	14.6	61.5	22.1
	Máx	17.2	10.9	36.4	14.9	69.2	25.2	69.4	25.8
2-6 años	$\bar{X}$	14.2	9.0	24.3 (*)	13.1 (*)	46.3	19.0	61.5	22.8
	Mín	11.4	7.4	16.9	10.0	29.1	13.2	55.4	20.0
	Máx	16.1	10.9	34.3	16.9	59.4	23.5	66.9	25.0

## **4.2.- RECUENTO FOLICULAR**

### **4.2.1.- Porcentaje de folículos sanos y atrésicos**

En los tres grupos de hembras se notó un considerable predominio de folículos sanos por sobre los folículos atrésicos. En las hembras adultas jóvenes (4 meses y 6-7 meses de edad) los folículos atrésicos bordean el 4 y 5%, respectivamente. En el caso de las hembras de edad avanzada (2-6 años de edad) los folículos atrésicos representan un porcentaje mayor, alrededor del 20% del total de población folicular (Figura 4.3). En el caso de las hembras de edad avanzada la población total de folículos es menor lo que contribuye a que los folículos atrésicos representen un porcentaje mayor del total.

### **4.2.2.- Variación en el número de los distintos tipos foliculares sanos**

Los folículos primordiales son la población numéricamente más importante en los tres grupos, se observa una disminución de estos folículos con la edad, siendo las hembras de edad avanzada las que presentan el menor número de ellos. Al comparar la población de folículos primordiales se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las hembras de 4 meses con las de 2-6 años de edad, igual diferencia se encontró entre las hembras de 6-7 meses de edad con las de 2-6 años de edad; sin embargo, aun cuando disminuye el número entre las hembras jóvenes, esta diferencia no es significativa.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de folículos primarios ( $p < 0.05$ ), siendo mayor el número de estos folículos en las hembras de 6-7 meses de edad y menor en las hembras de 4 meses y 2-6 años de edad. El promedio de folículos secundarios fue de 47.6 en las hembras de 4 meses, de 35.7 en las de 6-7 meses y de 50 en las 2-6 años. El promedio de folículos terciarios fue de 15 en las hembras de 4 meses, de 6 en las de 6-7 meses y de 14.5 en las de 2-6 años. No se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre los grupos (Figura 4.4).

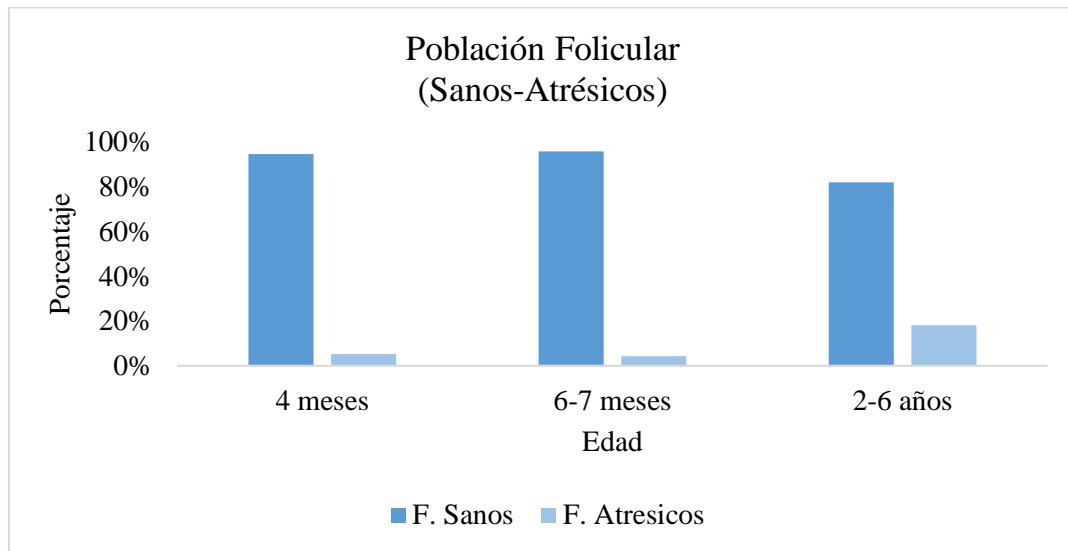
### **4.2.3.- Variación en el número de cuerpos lúteos**

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el número de cuerpos lúteos, específicamente entre las hembras las hembras jóvenes y las de edad avanzada. Fueron las

hembras de edad avanzada (2-6 años) las que presentaron el mayor número de cuerpos lúteos, en promedio 12. Es importante destacar que una de las hembras de 4 meses no presentó cuerpos lúteos, mientras que las otras dos presentaron 2 y 3 CL, respectivamente. En el caso de las hembras de 6-7 meses sólo dos presentaron CL bien desarrollados, una de ellas presentó 10 CL pero como otra sólo exhibió 2 CL y el resto de los especímenes exhibieron cuerpos lúteos en regresión, el promedio fue más bajo

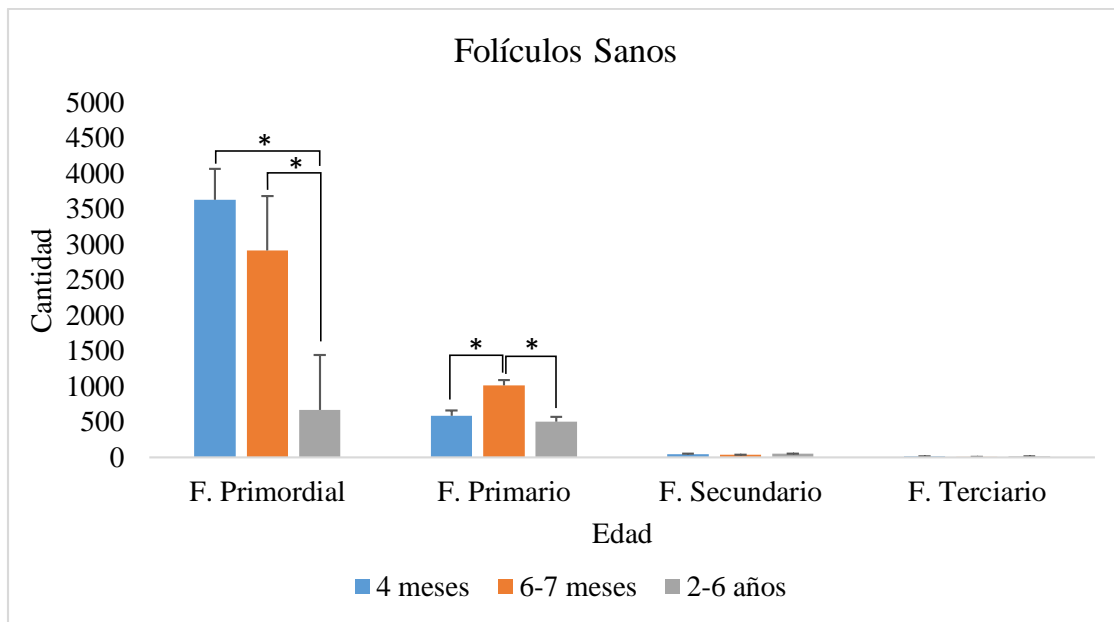
#### **4.2.4.- Variación en el número de los distintos tipos de folículos atrésicos**

El tipo folicular atrésico menos frecuente fue el folículo primario. No se observaron diferencias significativas en el número de folículos primarios, secundarios y terciarios atrésicos y atrésicos avanzados entre los grupos. Se destaca que son los folículos terciarios atrésicos los que están presentes en mayor cantidad en todos los grupos.



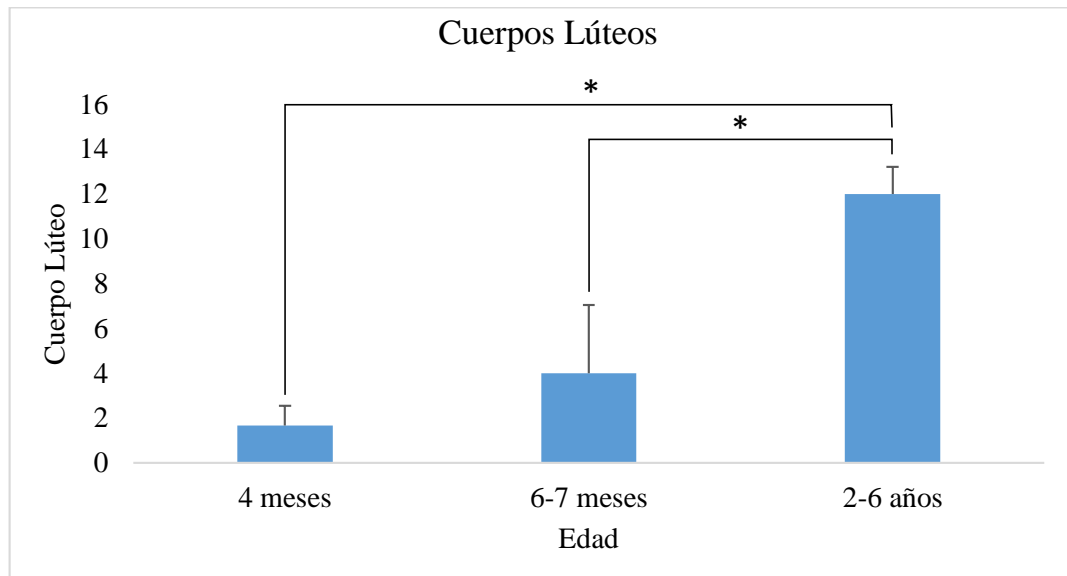
*FIGURA 4.7: Porcentaje de folículos sanos y atrésicos en ovarios de Octodon degus.*

En los tres grupos de hembras se evidencia un predominio de folículos sanos sobre los folículos atrésicos.



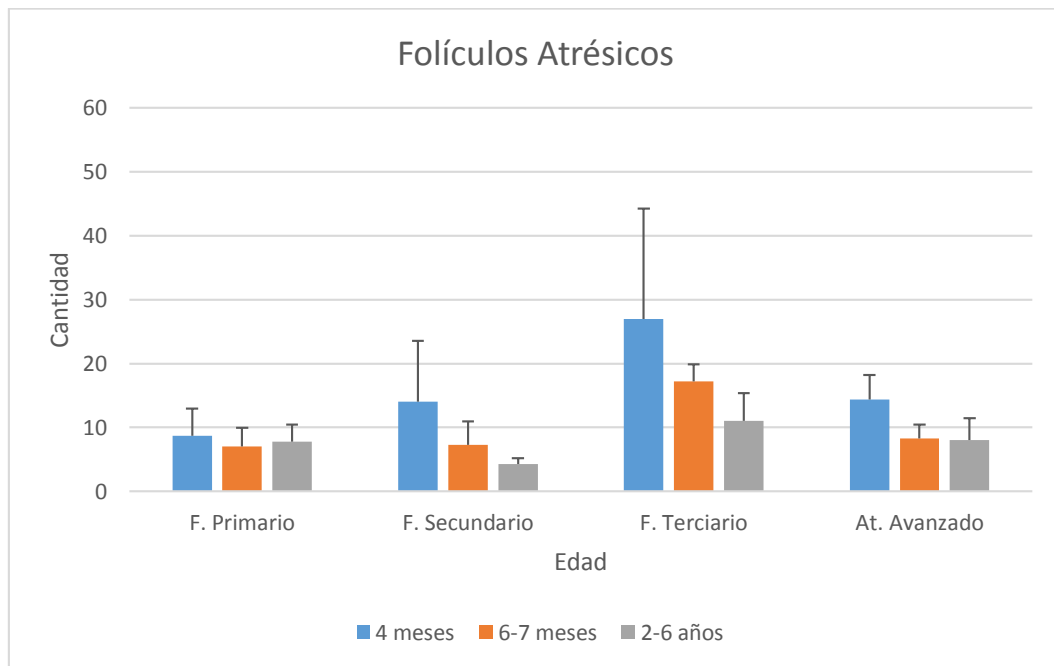
*FIGURA 4.8: Recuento de folículos sanos en ovarios de Octodon degus.*

Los folículos sanos se clasificaron como primordiales, primarios, secundarios y terciarios. Los datos se expresaron como el promedio de cada tipo folicular  $\pm$  EE. (\*:  $p < 0.05$ ).



**FIGURA 4.9:** Recuento de Cuerpos lúteos en ovarios de *Octodon degus*

Se cuantificaron los cuerpos lúteos bien desarrollados, excluyéndose cuerpos hemorrágicos o cuerpos albicans. Los datos se expresaron como el promedio ± EE. (\*: <math><0.05</math>).



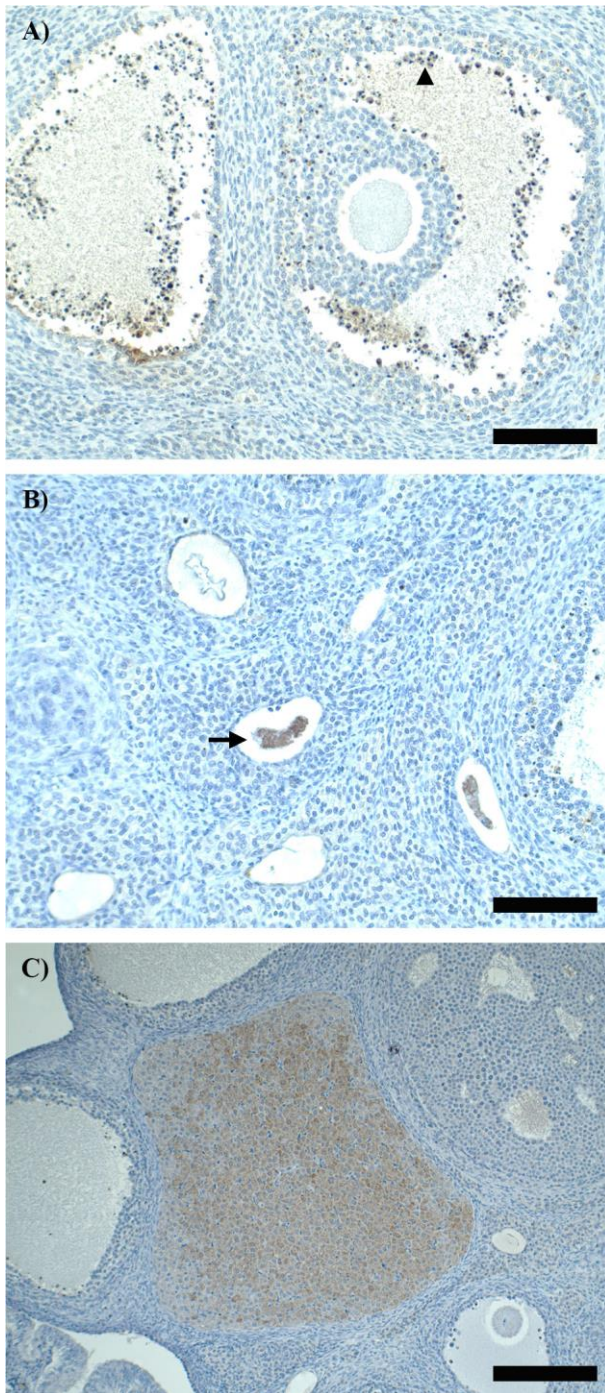
**FIGURA 4.10:** Recuento de folículos atrésicos en ovarios de *Octodon degus*.

Los folículos atrésicos se clasificaron como primarios, secundarios, terciarios, atrésicos avanzados y remanentes de zona pelúcida. Los datos se expresaron como el promedio ± EE.

### **4.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

Con el fin de estudiar el grado de apoptosis en los folículos atrésicos se detectó, a través de un estudio inmunohistoquímico, la expresión de la proteína caspasa-3, una de las caspasas efectores responsables del clivaje de proteínas durante la muerte celular por apoptosis.

En hembras de los tres grupos etarios se observó inmunotinción en el citoplasma de los cuerpos apoptóticos de folículos terciarios atrésicos. En los folículos terciarios tempranos la inmunotinción, en los cuerpos apoptóticos, se detectó entre las células de la granulosa normales, mientras que en aquellos folículos con un antro bien desarrollado los cuerpos apoptóticos inmunoteñidos se observaron hacia el antro (Figura 4.11A). En algunos folículos positivos para caspasa-3 se observó reinicio de meiosis o alteraciones en la membrana nuclear. En algunos cortes se detectó inmunotinción en ovocitos en estado de degeneración (Figura 4.11B). En los ovarios de las hembras de 4 meses y en el de la hembra de 2-6 años de edad se observó inmunotinción en los cuerpos lúteos (Figura 4.11C).



**FIGURA 4.11:** Fotomicrografía de folículos en cortes histológicos de ovarios de *Octodon degus*, inmunotinción para caspasa-3.

A) Folículo terciario atrésico con abundantes cuerpos apoptóticos hacia el antro, con marcación positiva para caspasa-3 (punta de flecha). B) Se observó inmunotinción en ovocitos, en estado de degeneración, inmersos en el estroma (flecha). C) Cuerpo lúteo con inmunotinción en gran parte de sus células poligonales. Barra de escala: A-C= 100  $\mu$ m.

## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN**

### **5.1.- MORFOLOGÍA**

En este trabajo se ha estudiado la foliculogénesis en tres grupos etarios, comprobándose que los distintos tipos de folículos sanos, folículos atrésicos y cuerpos lúteos tienen similares características. Como casi todas las hembras han alcanzado la madurez reproductiva y mantienen la ciclicidad, no se observan diferencias importantes en los tipos foliculares encontrados en las hembras. La morfología de estas estructuras parece ser similar a la descrita en otros mamíferos [19, 36, 51, 52, 53, 54, 55].

En la histología se observó que la glándula intersticial estaba menos desarrollada en las hembras adultas jóvenes (4 meses y 6-7 meses de edad) que en las hembras de edad avanzada. El estroma ovárico no es un componente estático del ovario, su aspecto está relacionado con el desarrollo y atresia folicular. En roedores el destino de las células tecales de los ovarios atrésicos es la formación de la glándula intersticial, cuyas principales características son la presencia de gotas de lípidos en el citoplasma, organelos bien desarrollados y enzimas necesarias para la producción de hormonas esteroideas [36]. A diferencia de otros mamíferos, en roedores la glándula intersticial no es una estructura transitoria, al contrario, se acumula y pasa a ocupar el lugar del estroma ovárico [36]. En las hembras de edad avanzada, un mayor número de folículos ha experimentado atresia a lo largo de su vida, en comparación a las hembras jóvenes, y ha dado origen a esta estructura que ocupa gran parte del estroma.

### **5.2.- DIÁMETRO FOLICULAR**

No se observaron diferencias significativas en los diámetros de los folículos sanos, folículos atrésicos y cuerpos lúteos, entre grupos. Aun cuando no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento y diámetros de los folículos terciarios, las hembras de 6-7 meses presentaron valores menores en comparación a los otros grupos, posiblemente

porque los animales de este grupo no estaban en la misma fase del ciclo estral y/u ovárico. En ese grupo en particular hay un ovario que tiene folículos terciarios más pequeños (en promedio 139  $\mu\text{m}$ ) que el resto de los ovarios del mismo grupo, contribuyendo al menor promedio, esta diferencia podría deberse a que las hembras no hayan estado cursando la misma fase del ciclo estral y ovárico. Como el tamaño de la población fue pequeño, las muestras que poseen un número o diámetro folicular considerablemente menor al resto tienen una gran influencia en el promedio final del grupo.

En general, se observa un aumento del diámetro en relación al estadio del desarrollo folicular siendo menor en los folículos primordiales y mayor en los folículos terciarios, esta diferencia se debe a que a lo largo de su desarrollo el folículo experimenta el crecimiento del ovocito, cambio de forma y proliferación de las células de la granulosa, y formación del antro, variables que determinan su tamaño. Se determinó que el diámetro folicular aumenta de aproximadamente 19  $\mu\text{m}$  (folículo primordial) hasta más de 600  $\mu\text{m}$  (folículo terciario). Además, se observó un amplio rango de diámetros en un mismo tipo folicular, debido al crecimiento del ovocito, proliferación de las células de la granulosa y acumulación de líquido folicular según el estadio de desarrollo (por ejemplo, un folículo secundario podría tener un diámetro de 50  $\mu\text{m}$  hasta 170  $\mu\text{m}$ ). El aumento de tamaño de los folículos primarios está dado principalmente por el crecimiento del ovocito que ocurre durante toda esta etapa. En los folículos secundarios influye mayoritariamente la proliferación de las células de la granulosa, estos folículos tienen de 2 a 6 capas de células, además, continúa el crecimiento del ovocito. En el caso de los folículos terciarios, el crecimiento se debe, en un principio, a la proliferación de las células de la granulosa y en los folículos terciarios avanzados, a la acumulación de líquido folicular.

Se observó un aumento del diámetro del ovocito y la vesícula germinativa a través de los distintos estadios de desarrollo folicular, el menor promedio se obtuvo en los folículos primordiales y el mayor en los folículos terciarios. El diámetro ovocitario aumentó de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  a alrededor de 60  $\mu\text{m}$ . Se detectó que el crecimiento de los ovocitos fue mayor en los estadios de folículo primario y folículo secundario, en estos tipos foliculares la mayor medición podía llegar a doblar el valor de la mínima medición. Cuando los folículos primordiales salen del reposo e inician su crecimiento, el ovocito comienza a aumentar su tamaño considerablemente, a la vez que las células somáticas que lo rodean se hacen cúbicas y se dividen

[56]. El aumento de tamaño del ovocito se acompaña de un aumento en la activación de genes, en el contenido de ARN, en la velocidad de síntesis de proteínas e hiperplasia de los organelos [2, 57]. Los ovocitos habrán completado gran parte de su crecimiento al llegar al estadio de folículos terciario/antral, además de adquirir la capacidad de reanudar la meiosis, aunque sólo lo hará ante el pico ovulatorio de LH, en que ocurre un aumento notorio en los niveles circulantes de esta hormona [14]. En la fase de folículo antral hay un mínimo crecimiento del diámetro del ovocito, pero éste se traduce en un aumento significativo del volumen ovocitario [14].

Se intentó establecer si existen similitudes entre las mediciones obtenidas para el *Octodon degus* y el diámetro folicular en otros ratones de laboratorio, para esto se consideraron los valores obtenidos en las hembras de edad avanzada ya que en este grupo todas las animales estaban en la misma fase del ciclo ovárico (fase lútea). Respecto a los folículos primordiales ( $19.91 \pm 0.12$   $\mu\text{m}$ ) el *Octodon degus* se asemeja a lo descrito en otros ratones (B6D2/F1) ( $17 \mu\text{m}$ ) [53]. El tamaño de los folículos primarios ( $35.44 \pm 0.64 \mu\text{m}$ ) es similar a lo descrito en otros ratones ( $31 \pm 2 \mu\text{m}$ ) [58]. El tamaño de los folículos secundarios ( $93.73 \pm 2.17$ ) es menor a lo descrito en la literatura ( $104 \mu\text{m}$ ) [53]. El diámetro de los folículos terciarios en el *Octodon degus* ( $270.16 \pm 40.62$ ) es mayor a lo encontrado en la bibliografía ( $200 \pm 6.5 \mu\text{m}$ ) [58]. Puede ser que esta comparación no sea exacta, dado que el número de animales de ambos grupos no es el mismo, además que pueden estar cursando distintas fases del ciclo estral.

### 5.3.- RECUENTO FOLICULAR

Se observó un mayor porcentaje de folículos atrésicos en las hembras de edad avanzada (alrededor del 18% de la población folicular), en relación al menor número total de folículos en estas hembras. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el número de folículos primordiales y folículos primarios. En el caso de los folículos primordiales, el mayor número lo presentaron las hembras de 4 meses de edad, mientras que el menor número fue de las hembras de 2-6 años. En ratones los folículos primordiales se forman en los días posteriores al nacimiento, el número de folículos que se formen será fijo y determinará la reserva de folículos en reposo para toda la vida reproductiva [1]. Conforme la hembra envejece estos folículos salen del reposo

y comienzan su crecimiento, pero sólo un pequeño número de ellos ovulará, la mayoría de los folículos morirá, población representada por los folículos atrésicos, por ello la reserva de folículos primordiales se verá disminuida con los años [35]. Las hembras de 6-7 meses de edad, presentan un número estadísticamente mayor de folículos primarios que los otros dos grupos. Esta diferencia podría deberse a que si bien el crecimiento de los folículos pre-antrales no depende de las gonadotropinas, la concentración de FSH, al menos, favorecerían su crecimiento [14]. Esta hormona tendría un efecto en la maduración folicular, específicamente en la transformación de las células pre granulosas planas en células de la granulosa cúbicas. Por ello altas concentraciones de la FSH, alcanzadas una vez establecida la madurez reproductiva, estarían relacionadas con una mayor activación de los folículos en reposo (y por tanto, un mayor formación de folículos primarios) [29, 59, 60, 61]. Además la salida del reposo de los folículos primordiales depende de la edad de la hembra, será mayor el número de folículos reclutados que inicien su crecimiento en hembras jóvenes en comparación con hembras de edad avanzada que tienen un menor número de estos folículos [62].

La ausencia de diferencias importantes en el número y diámetro de los folículos secundarios y terciarios entre los grupos se puede deber, principalmente, a que todas las hembras habían comenzado a ciclar y mantenían sus ciclos (incluso las de edad avanzada).

Se observaron diferencias significativas en el número de cuerpos lúteos (CL), que fueron considerablemente mayores en las hembras de edad avanzada. En el grupo de 4 meses, dos de los tres ovarios utilizados tenían cuerpos lúteos, pero pocos (2 y 3 en cada ovario); en el grupo de 6-7 meses, dos hembras exhibieron CL en regresión, las otras exhibieron dos y diez CL, respectivamente. El menor número de cuerpos lúteos presentes en algunos ovarios podría deberse a las condiciones de cautiverio y/o al estar cursando distintas fases del ciclo ovárico al momento de ser sacrificadas. Es importante mencionar que las hembras utilizadas en este estudio fueron mantenidas en jaulas con miembros de su mismo sexo (solo hembras), y a los 6 meses, cuando habían alcanzado el tamaño adulto, se cruzaron hembras y machos. Si bien está descrito que el *Octodon degus* comienza a ciclar alrededor de las 12-16 semanas de vida, se sabe que el inicio de la pubertad en roedores puede verse afectado por factores como el contacto con el macho, la duración del día y la temperatura [63]. Incluso en roedores que son ovuladores espontáneos, la ovulación se ve favorecida por el contacto con el macho, la exposición de hembras jóvenes a

machos adultos o su orina puede apresurar el inicio de la pubertad, mientras que la exposición a hembras adultas o su orina puede retardarla, además la ausencia del estímulo masculino contribuye a que los primeros ciclos sean irregulares e, incluso, anovulatorios [63, 64]. En hembras mantenidas en jaulas con miembros del mismo sexo, se ha observado que la ovulación espontánea es irregular y, cuando se presenta, se liberan menos ovocitos que en hembras que se mantienen en jaulas aisladas. Por otra parte, hembras que eran puestas en contacto con la orina del macho, muestran un aumento de los ovocitos liberados [65]. De hecho en este estudio una de las hembras de 7 meses fue la única del grupo 6-7 meses que presentó un número mayor (10) de cuerpos lúteos, podría suponerse que el contacto con el macho favoreció la regularidad de la ovulación. Se desconoce en qué etapa del ciclo ovárico (fase folicular o fase lútea) se encontraban las hembras al momento de ser sacrificadas, pero en el caso de las hembras de 6-7 meses podemos suponer que pasaban por distintas etapas (fase folicular o fase lútea), ya que en algunos ovarios no se encontraron CL bien desarrollados.

La edad estimada de las hembras de edad avanzada es entre 2 y 6 años. Según la bibliografía el *Octodon degus* mantiene sus ciclos hasta los 4-4.5 años, por lo que se esperaba que algunas hembras de ese grupo hubiesen perdido la ciclicidad pero esto no ocurrió [48]. Todas las hembras de este grupo presentaron cuerpos lúteos y en similar cantidad, de ello se desprende que aún son reproductivamente maduras, aunque se desconoce si sus ciclos son regulares. Independiente de que todas mantengan la madurez reproductiva, se estimó que animales eran de mayor edad (6 años) según la población de folículos primordiales, los menores recuentos fueron de 263 y 330 folículos.

El promedio de cuerpos lúteos en las hembras de edad avanzada fue de 12, a partir de esta información podemos inferir que el *Octodon degus*, alcanzada la madurez reproductiva, ovula en promedio 12 folículos. Si bien no se encontró información bibliográfica sobre el número de folículos ovulados por ciclo en esta especie, si se sabe que dan a luz hasta 10 crías por camada, número que puede servir como indicador sobre cuantos folículos son ovulados en cada ciclo.

#### **5.4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

El estudio inmunohistoquímico reveló marcación en los cuerpos apoptóticos de los folículos terciarios atrésicos, único tipo folicular que mostró la presencia de cuerpos apoptóticos en la histología y no se detectó diferencias importantes entre las distintas edades. Se intentó detectar la actividad de las enzimas aromatasas y 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) pero no se obtuvo marcación. Se descartaron problemas con los reactivos utilizados o el protocolo de la técnica, ya que los controles (ovarios de hámster y conejo) sí marcaron. Por otra parte los anticuerpos utilizados estaban indicados para su uso en ratón, por lo que esa variable también se descartó. Se infirió que el problema fue la fijación, los ovarios utilizados en este estudio estaban fijados en Bouin acuoso mientras que los controles en Bouin Hollande (fijador recomendado: formalina 3%). Por disponibilidad de muestra no fue posible intentar otros métodos de fijación para determinar el más indicado para el uso de estos anticuerpos en el *Octodon degus*, pero al menos se tiene como referencia que el Bouin acuoso no sería la mejor opción; sin embargo, esto debe someterse a prueba.

#### **5.5.- COMPARACIÓN CON HEMBRA PRE PÚBER**

De forma adicional a los objetivos planteados se realizó el recuento folicular de un ovario de una hembra de 2 meses, edad a la que aún no han empezado a ciclar. Las características morfológicas de los folículos son iguales que las descritas para los grupos en estudio. Tal como se esperaba, el número de folículos primordiales (5169) fue mayor a los grupos de este estudio. El número de folículos primarios (662) fue similar a las hembras de 4 meses y 2-6 años, y menor que las hembras de 6-7 meses. El número de folículos secundarios (12) fue considerablemente menor que en los grupos en estudio. El número de folículos terciarios (8) fue levemente mayor que en el grupo de 6-7 meses (6) y menor que en los otros dos grupos. Es destacable la ausencia de cuerpos lúteos, relacionado con que a esta edad no hay ovulación. Respecto a los folículos atrésicos, el número de folículos primarios atrésicos (9) es similar a los grupos en estudio, no se observaron folículos secundarios atrésicos, mientras que el número de folículos terciarios

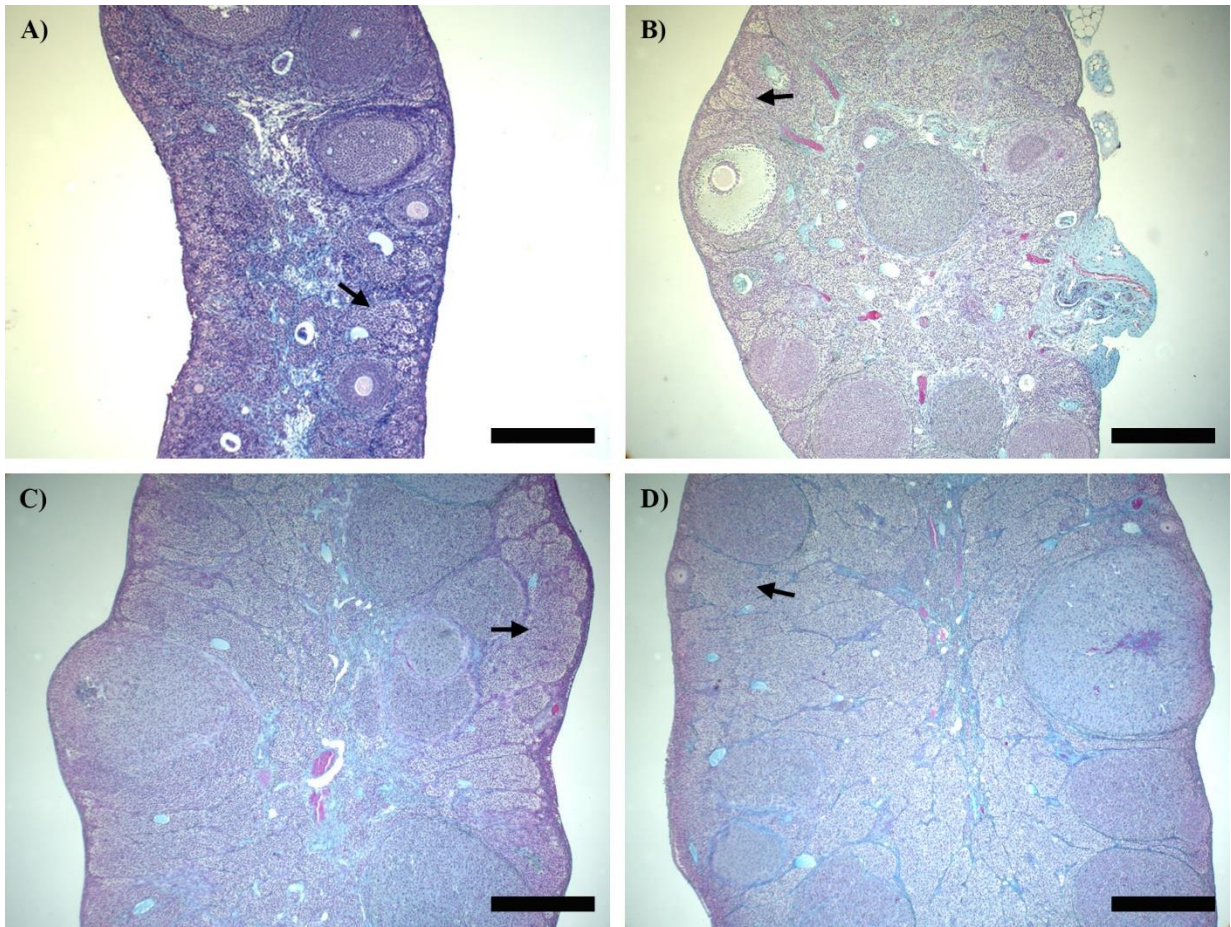
atrésicos (10) y folículos atrésicos avanzados (5) fueron menores, en relación a que hay un menor número de folículos en crecimiento. Es destacable el poco desarrollo de la glándula intersticial en comparación con las hembras de mayor edad (Figura 5.1).

## 5.6.- VOLUMEN OVÁRICO

Se estableció si existe alguna relación entre el número de folículos/edad de la hembra y el volumen del ovario. El volumen del ovario se calculó utilizando la fórmula para un elipsoide prolato o alargado ( $\text{largo} \times \text{ancho} \times \text{alto} \times 0.523$ ) y fue expresado en  $\text{ml}^3$  [66]. Se observó un aumento del volumen ovárico a mayor edad de la hembra y a menor número de folículos primordiales (Figura 5.2). Consecuentemente, la hembra de 2 meses, reproductivamente inmadura (pre púber), tiene el menor volumen ovárico. En este grupo si bien hay un mayor número de folículos primordiales, los folículos en crecimiento parecen estar menos desarrollados (no se realizó medición del diámetro folicular en este ovario) y no hay cuerpos lúteos. Por su parte las hembras de 2-6 años, si bien presentan el menor número de folículos primordiales, tienen el mayor volumen ovárico coincidiendo con un mayor número de cuerpos lúteos. Las hembras de 4 meses y 6-7 meses de edad, presentan volúmenes intermedios en relación a los otros dos grupos, ya que si bien han alcanzado la pubertad la cantidad de cuerpos lúteos que exhiben es menor. Si bien a medida que la hembra envejece el ovario cuenta con menos folículos primordiales, el desarrollo folicular alcanza estadios más avanzados (terciario temprano v/s terciario avanzado) y al haber ovulación se desarrollan cuerpos lúteos, factores que contribuyen al aumento del tamaño del ovario con la edad, al menos mientras la hembra este reproductivamente madura. Una vez alcanzada la senescencia reproductiva debiese haber una disminución del volumen ovárico, ya que el crecimiento folicular se ve limitado (al disminuir el estímulo de las gonadotrofinas), no hay ovulación y, por tanto, no se forman cuerpos lúteos.

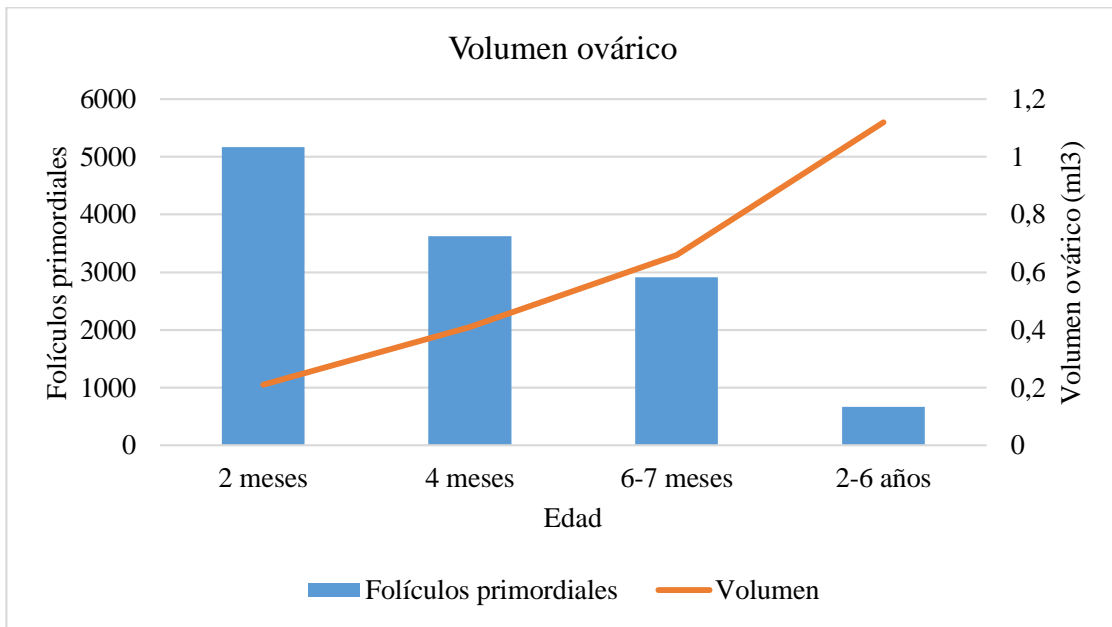
Este trabajo da una idea general de la foliculogénesis en el roedor *Octodon degus*. Se observó que las características morfológicas de los folículos se mantienen en las distintas edades, y son similares a otros mamíferos. Como era de esperarse el número de folículos primordiales disminuye considerablemente a medida que las hembras envejecen. Debido a que todas las

hembras habían alcanzado la pubertad y mantenían sus ciclos estrales/ováricos, no se observaron diferencias importantes en los diámetros foliculares. Para una mejor caracterización de la foliculogénesis en esta especie y la obtención de diferencias más marcadas, sería interesante realizar un estudio que incluya un mayor tamaño de muestra, hembras que cursen la misma fase del ciclo estral, y de edades más “extremas” (hembras pre púberes, hembras que hayan alcanzado la madurez reproductiva y tengan ciclos regulares, y hembras de edad avanzada que hayan perdido la ciclicidad). Además se realizar un estudio inmunohistoquímico para detectar la expresión de las enzimas aromatasa y  $3\beta$ -HSD, y establecer el mejor método de fijación para estas especies.



*FIGURA 5.1: Desarrollo de la glándula intersticial en cortes histológicos de ovarios de Octodon degus, teñidos con tricrómico de Arteta*

La glándula intersticial (flecha) está menos desarrollada en el ovario de la hembra de 2 meses (A) que en los ovarios de las hembras de 4 meses (B), 6-7 meses (C) y 2-6 años de edad (D). Barra de escala: A= 320  $\mu$ m, B-D= 400 micras.



*FIGURA 5.2: Volumen del ovario en hembras de Octodon degus*

El volumen del ovario se calculó utilizando la fórmula para un elipsoide prolato o alargado (largo x ancho x alto x 0.523).

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron los siguientes hallazgos:

- No existen diferencias en la morfología de los distintos tipos foliculares (sanos y atrésicos) y cuerpo lúteo entre las hembras de los tres grupos en estudio.
- La glándula intersticial está menos desarrollada en las hembras adultas jóvenes.
- La morfología de los folículos y el cuerpo lúteo es similar a la de otros mamíferos.
- Hay una disminución notoria de folículos primordiales a medida que la hembra envejece, relacionado a que un mayor número de estos folículos ha iniciado su crecimiento y al no ser ovulados, experimentan atresia.
- Hay un menor número de folículos primarios en las hembras de 4 meses y en las de 2-6 años de edad que en las de 6-7 meses, porque la salida de los folículos del reposo depende de la edad de la hembra.
- No hay diferencias en el diámetro de los folículos sanos, folículos atrésicos o cuerpos lúteos.
- Hay un aumento del diámetro de los folículos a medida que avanza el desarrollo folicular por transformación de las células somáticas de planas a cúbicas, crecimiento del ovocito, proliferación de las células de la granulosa y formación del antro.
- El diámetro ovocitario aumenta a medida que avanza el desarrollo folicular principalmente en los folículos primarios y secundarios, consecuente con la salida de los folículos del reposo e inicio de su crecimiento, que alcanza la madurez (tamaño máximo) en la transición de folículo pre-antral a antral.
- El volumen de los ovarios aumentó con la edad de las hembras. A pesar que las hembras de edad avanzada tienen un menor número de folículos, poseen un mayor número de cuerpos lúteos que determinan el mayor volumen/tamaño de sus ovarios.

En base a lo anterior, se concluye que la foliculogénesis en el *Octodon degus* es similar al de otros mamíferos, incluido el ser humano. Estos hallazgos sumado a los antecedentes de la duración del ciclo estral (17-21 días) y presentar fase lútea verdadera hacen de este animal un buen modelo de investigación del ciclo reproductivo femenino. Con este trabajo se logra dar una primera mirada a la foliculogénesis en el *Octodon degus*, pero se hace necesario seguir estudiándolo.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Edson M, Nagaraja A, Matzuk M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr Rev.* 2009 Oct; 30(6): 624-712.
2. Neill J, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. San Diego, U.S.A: Elsevier Academic Press; 387-389,427-428
3. Ross M, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5<sup>a</sup> Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2008, 838-839.
4. Griffin JE, Ojeda S. *Textbook of Endocrine Physiology*. Fourth Edition. Oxford University Press Inc, New York, U.S.A, 2000, p 18-19.
5. Vantman D, Vega M. Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Rev. Med. Clin. Condes.* 2010; 21(3):348-362.
6. Arrau J, Bustos-Obregón E, Hoecker G, Ramos A. *Biología de la reproducción animal*. Ed. Andrés Bello, Santiago, Chile, 1981. p. 91-111.
7. Zheng W. *Determine the Development Dynamics of Primordial Follicles in the Mouse Ovary* [Gothenburg, Sweden]: University of Gothenburg; 2014. 38 p.
8. Fox J, Davisson M, Quimby F, Barthold S, Newcomer C, Smith A, editors. *The Mouse in Biomedical Research*. 2nd Ed. New York: Academic Press, 2006
9. Irusta G. *Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: Relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis*. [Buenos Aires]: Universidad de Buenos Aires; 2008. 180 p
10. Magoffin D. Ovarian Theca Cell. *Int J Biochem Cell B.* 2005 July; 37(7):1344-1349
11. Young JM, Neilly AS. Theca: the Forgotten Cell of the Ovarian Follicle. *Reproduction.* 2010 Oct; 140(4):489-509.

12. Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian Steroids: The Good, the Bad, ante signals that raise them. *Cell Cycle*. 2006 June; 5(11):1178-1183
13. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian Actions of Oestrogen. *Rep*. 2001 Aug; 122(2):215-226.
14. Eppig J. Oocyte Control of Ovarian Follicular Development and Function in Mammals. *Reprod*. 2001 Dec; 12(6):829-838.
15. Fortune JE. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biol Reprod*. 1994 Feb; 50(2):225-232.
16. Zeleznik AJ. The Physiology of Follicle Selection. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004 June; 16(2):31.
17. Zhang M, Ouyang H, Xia G. The Signal Pathway of Gonadotrophins-induced Mammalian Oocyte Meiotic Resumption. *Mol. Hum. Reprod*. 2009 May; 15(7):399-409.
18. Niswender G, Juengel J, Silva P, Rollyson M, McIntush E. Mechanism controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev*. 2000 Jan; 80(1):1-29.
19. Petculescu- Ciochină L, Dumitrescu G, Păcală N. Morphological Aspects in Corpus Luteum Formation in Mice. *SPAS*. 2012; 45(2):193-196.
20. Tomac J, Cekinović D, Arapović J. Biology of the Corpus Luteum. *Period Biol*. 2011 Mar; 113(1):43-49
21. Peters H, Byskov AG, Himmelstein-Braw R, Faber M. Follicular Growth: The Basic Event in the Mouse and Human Ovary. *J. Reprod*. 1975 Dec; 45(3):559-566.
22. Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario V. Morphometric Study of the Human Neonatal Ovary. *Anat Rec*. 1991 Oct; 231(2):201-108
23. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Mumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth Differentiation Factor-9 is required during Early Ovarian Folliculogenesis. *Nature*. 1996 Oct; 383(6600):531-535.

24. Epifano O, Dean J. Genetic Control of Early Folliculogenesis in Mice. *Trends Endocrin Met.* 2002 May-Jun; 13(4):169-173.
25. Fortune J. The Early Stages of Follicular Development: Activation of Primordial Follicles and Growth of Preantral Follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003 Oct; 78(3-4):135-163
26. Orisaka M, Tajima K, Tsang B, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca Cell Interactions during Preantral Follicular Development. *J Ovarian Res.* 2009 Jul; 2(1):2-9
27. Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte Growth Factor as a Mesenchymal Factor that promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition. *Biol Reprod.* 2005 Nov; 73(5):967-973.
28. Hsueh A, Kawamura K, Cheng Y, Fauser B. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015 Feb; 36(1):1-24.
29. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr Rev.* 2000 Apr; 21(2):200-214.
30. Croy B, Yamada A, DeMayo F, Adamson S, editors. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* City: Elsevier Academic Press. 2014; 88-90.
31. Erickson G, Shimasaki S. The Physiology of Folliculogenesis: the Role of Novel Growth Factors. *Fertil Steril.* 2001 Nov; 76(5):943-949.
32. Maffucci J, Gore A. Hypothalamic Neural Systems controlling the Female Reproductive Life Cycle: Gonadotropin-releasing Hormone, Glutamate, and GABA. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009; 274:69-127.
33. Falcone T, Hurd W. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery.* Philadelphia: Mosby Elsevier. 2007; 10-12.
34. Sisk C, Foster D. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci.* 2004 Sep; 7(10):1040-1047.
35. Kaipia A, Hsueh A. Regulation of Ovarian Follicle Atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59:349-363.

36. Guraya S. Follicular Atresia. Proc. Indian nat. Sci. Acad. Vol. 39 B, Plate XXX
37. Sluyser M. Apoptosis in Normal Development and Cancer. CRC Press, London, UK, 2002. p 178.
38. Guraya S. Biology of Ovarian Follicles in Mammals. First Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 1985.
39. Peters H. The Development of the Mouse Ovary from Birth to Maturity. Acta Endocrinol. 1969 Sep; 62(1):98-116.
40. Pedersen T. Follicle Growth in the Immature Mouse Ovary. Acta Endocrinol. 1969 Sep; 62(1):117-132.
41. Oakberg EF. Follicular Growth and Atresia in the Mouse. In vitro. 1979 Jan; 15(1):41-49.
42. Wu J, Zelinski M, Ingram D, Ottinger M. Ovarian Aging and Menopause: Current Theories, Hypotheses, and Research Models. Ex Biol Med. 2005 Dec; 230(11):818-828
43. Peluso JJ, StegerRW, Huang H, Meites J. Pattern of Follicular Growth and Steroidogenesis in the Ovary of Aging Cycling Rats. Ex Aging Res 1979 Aug; 5(4):319-333.
44. Peluso JJ, Downey C. Patter of Follicular Development during the Estrous Cycle of Aged Rats. Cell Tissue Res. 1982; 225(1): 229-234.
45. Fox J, Davisson M, Quimby F, Barthold S, Newcomer C, Smith A, editors. The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models. 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 2006.
46. Suckow M, Stevens K, Wilson R, editors. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and other Rodents. 1st Ed. Elsevier, U.S.A, 2012. p 1032.
47. Mahoney M, Rossi B, Hagenauer M, Lee T. Characterization of the Estrous Cycle in *Octodon degus*. Biol Reprod. 2011 Nov; 84(4):664-671.
48. Lee T. *Octodon degus*: A diurnal, Social, and Long-lived Rodent. ILAR J. 2004; 45(1):14-24.

49. Ardiles A, Ewer J, Acosta M, Kirkwood A, Martinez A, Ebensperger L, *et al.* *Octodon degus* (Molina, 1782): A Model in Comparative Biology and Biomedicine. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013 Apr; 2013(4):312-318.
50. López M, Leyton C, Graf M. Técnicas de histología y citología. Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, 242 p, 1982
51. Hirshfield A, Midgley R. Morphometric Analysis of Follicular Development in the Rat. *Biol Rep.* 1978 Oct; 19(3):597-605.
52. Knigge K, Leatham J. Growth and Atresia of Follicles in the Ovary of the Hamster. *Anat Rec.* 1956 Apr; 124(4):679-707.
53. Griffin J, Emery B, Huang I, Peterson C, Carrel D. Comparative Analysis of Follicle Morphology and Oocyte Diameter in Four Mammalian Species (Mouse, Hamster, Pig and Human). *J Exp Clin Assist Reprod.* 2006 Mar; 3:2
54. Felipe AE, Masson PG. Un modelo descriptivo del sistema reproductor hembra del coipo (*Myocastor coypus*) I: el ovario. *REDVET.* 2005 Dic; 6(12).
55. Boubekri A, Gernigon-Spychalowicz T, Khammar F, Exbrayat JM. Morphometry and Immunohistochemistry of Follicles Growth and Steroidogenesis in saharian wild sand rat, *Psammomys obesus*, ovary. *Folia Histochem Cyto.* 2009; 47(5): S59-S66
56. Eppig JJ, Viveiros MM, Bivens CM, De la Fuente R. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In: Leung PC, Adashi EY, editors. *The Ovary.* 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004. P 113-129.
57. Liu K, Rajareddy A, Lui L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, *et al.* Control of Mammalian Oocyte Growth and Early Follicular Development by the Oocyte PI3 Kinase Pathway: New Role for and Old Timer. *Dev Biol.* 2006 Nov; 299(1):1-11.
58. Balla A, Danilovich N, Yang Y, Sairam MR. Dynamics of Ovarian Development in the FORKO Immature Mouse: Structural and Functional Implications for Ovarian Reserve. *Biol Reprod.* 2003 Oct; 69(4):1281-1293.

59. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-Related Changes of the Population of Human Ovarian Follicles: Increase in the Disappearance Rate of Non-Growing and Early-Growing Follicles in Aging Women. *Biol Reprod.* 1994 Mar; 50(3):653-663.
60. Lintern-Moore S. Initiation of Follicular Growth in the Infant Mouse Ovary by Exogenous Gonadotropin. *Biol Reprod.* 1977 July; 17:635-639
61. Arendsen E. Influence of Gonadotropins on Early Follicle Cell Development and Early Oocyte Growth in the Immature Rat. *J Reprod Fert.* 1982 Nov; 66(2):537-542.
62. Adhikari D, Liu K. Molecular Mechanisms underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocrine Rev.* 2009 Aug; 30(5):438-364.
63. Foster H, Small D, Fox J, editors. *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Immunology, and Husbandry.* New York: Elsevier Academic Press; 1983
64. Stiff M, Bronson F, Stetson H. Plasma Gonadotropins in Prenatal and Prepubertal Female Mice: Disorganization of Pubertal Cycle in the Absence of a Male. *Endocrinol.* 1974 Feb; 94(2):492-496.
65. Morè L. Mouse Major Urinary Proteins Triggers Ovulation via the Vomeronasal Organ. *Chem Senes.* 2006 Mar; 31(5):393-401.
66. Pavlik EJ, DePriest PD, Gallion HH, Ueland GR, Reedy MB, Kryscio RJ, et al. Ovarian volume related to age. *Gynecol Oncol.* 2000 June; 77(3):410-412.

## ANEXO

### ANEXO 1: PROTOCOLO PROCESADOR DE TEJIDOS

<b>N° de estación</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Tiempo</b>
1	ETOH 80	1 hr 15 min
2	ETOH 95 I	1 hr 15 min
3	ETOH 95 II	1 hr 15 min
4	ETOH 95 III	1 hr 15 min
5	Mezcla I	1 hr 15 min
6	Mezcla II	1 hr 15 min
7	Butanol I	8 hrs
8	Butanol II	8 hrs
9	Butanol III	8 hrs
10	Paraplast Plus I	10 hrs
11	Paraplast Plus II	10 hrs
12	Paraplast Plus III	10 hrs

## **ANEXO 2: PROTOCOLO DESPARAFINACIÓN E HIDRATACIÓN**

- 1.- Tres cambios de xilol por 5 minutos cada uno.
- 2.- Tres cambios de alcohol 100° por 5 minutos cada uno.
- 3.- Dos cambios de alcohol de 95° por 5 minutos cada uno.
- 4.- Un cambio de alcohol de 80° por 5 minutos.
- 5.- Un cambio de alcohol 70° -  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  por 5 minutos.
- 6.- Un cambio de alcohol 70° por 5 minutos.
- 7.- Hidratar en dos cambios de agua destilada por 5 minutos cada uno

### **ANEXO 3: PROTOCOLO MÉTODO TRICRÓMICO DE ARTETA**

Soluciones:

- Hematoxilina de Harris
- Solución Eritrosina 0.5%- Orange G 0.5%
- Ácido fosfotúngstico 0.5%
- Azul de anilina 1%

- 1.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 2.- Tinción nuclear con Hematoxilina de Harris por 75 segundos.
- 3.- Lavado en agua corriente por 10 minutos.
- 4- Lavado en agua destilada por 5 minutos.
- 5.- Tinción con Orange G-Eritrosina por 30 minutos.
- 6.- Lavado en agua destilada por 5 minutos.
- 7.- Colocar en ácido fosfotúngstico al 0.5% por 10 minutos.
- 8.- Lavado en agua destilada por 5 minutos.
- 9.- Tinción con azul de anilina por 75 segundos.
- 10.- Tres cambio en alcohol 95° por 1 minuto cada uno.
- 11.- Tres cambios de alcohol absoluto por 5 minutos cada uno.
- 12.- Tres cambios de xilol por 5 minutos cada uno.
- 13.- Montar en Entellán.

## **ANEXO 4: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA**

- 1.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 2.- Precalear la solución buffer Tris EDTA (pH 9) hasta que alcance una temperatura cercana a los 100°C.
- 3.- Recuperación antigénica con buffer Tris EDTA (pH 9) en vaporera durante 30 minutos.
- 4.- Enfriar los cortes a temperatura ambiente en un agitador por 20 minutos.
- 5.- Tres lavados en agua destilada por 5 minutos cada uno.
- 6.- Incubar en peróxido de hidrógeno al 20% en metano por 30 minutos.
- 6.- Un lavado en agua destilada por 5 minutos.
- 8.- Transferir los portaobjetos a la bandeja de tinción para inmunohistoquímica y marcar con lápiz hidrófobo.
- 9.- Tres lavados con buffer Tris por 5 minutos cada uno.
- 10.- Incubar en suero de cabra al 2% en buffer Tris (200 µl/portaobjetos) por 30 minutos.
- 11.- Incubar en el anticuerpo primario 1:200 (200 µl/portaobjetos) a 40°C durante toda la noche.
- 12.- Tres lavados en buffer Tris por 5 minutos cada uno.
- 13.- Incubar en el anticuerpo secundario: anti conejo hecho en cabra 1:500 (200 µl/portaobjetos) por 1 hora.
- 14.- Tres lavados en buffer Tris por 5 minutos cada uno.
- 15.- Incubar en el complejo ABC (200 µl/portaobjetos) por 90 minutos.
- 16.- Tres lavados en buffer Tris por 5 minutos cada uno.
- 17.- Incubar en Diaminobencidina (200 µl/portaobjetos) por 10 minutos.
- 18.- Dos lavado en buffer Tris por 5 minutos cada uno

- 19.- Transferir portaobjetos a un canastillo.
- 20.- Dos lavados en agua destilada por 5 minutos cada uno.
- 21.- Teñir con Hematoxilina de Harris por 10 segundos.
- 22.- Lavar en agua corriente por 10 minutos.
- 23.- Sumergir rápidamente en agua destilada.
- 24.- Dos lavados en agua destilada por 5 minutos cada uno.
- 25.- Un cambio de alcohol 50° por 5 minutos.
- 26.- Un cambio de alcohol de 70° por 5 minutos.
- 27.- Un cambio de alcohol de 80° por 5 minutos.
- 28.- Dos cambios de alcohol de 95° por 5 minutos cada uno.
- 29.- Tres cambios de alcohol absoluto por 5 minutos cada uno.
- 30.- Tres cambios de xilol por 5 minutos cada uno.
- 31.- Montar en entellán.