

## Caracterización de la población folicular ovárica en ovejas prepúberes de raza Frisona

### Characterization of the ovarian follicular population in Friesian prepubertal sheep

Dioguardi GH<sup>1</sup>, Saban I<sup>1</sup>, Pieruzzini G<sup>1</sup>, Ferreyra E<sup>1</sup>, Fernandez B<sup>1</sup>, Luque EH<sup>2</sup>, Rivera OE<sup>1</sup>

[gdioguardi@agrarias.unlz.edu.ar](mailto:gdioguardi@agrarias.unlz.edu.ar) [ivandsaban@gmail.com](mailto:ivandsaban@gmail.com)  
[gladyspieruzzini@yahoo.com.ar](mailto:gladyspieruzzini@yahoo.com.ar) [litoferre@yahoo.com.ar](mailto:litoferre@yahoo.com.ar)  
[mbredafernandez@gmail.com](mailto:mbredafernandez@gmail.com) [enriquehluque@gmail.com](mailto:enriquehluque@gmail.com) [oeivera@yahoo.com](mailto:oeivera@yahoo.com)

<sup>1</sup>Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria, Ambiente y Salud (IIPAAS), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

Recibido 22/03/2024. Aceptado: 19/06/2024

**Resumen:** La foliculogénesis es el proceso mediante el cual los folículos ováricos inmaduros (primordiales) se desarrollan y se convierten en folículos preovulatorios. En las hembras prepuberales, el desarrollo folicular hasta estadio de folículo antral generalmente se produce en ausencia de estímulo gonadotrófico basal. Los análisis morfométricos son muy útiles para cuantificar los cambios foliculares estructurales que se producen en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de las hembras (prepuberal, pubertad, madurez sexual y senilidad) así como en los diferentes estadios del ciclo estral en animales adultos. Los principales objetivos de nuestro estudio fueron: a) establecer la dinámica folicular ovárica describiendo el porcentaje de folículos de cada una de las distintas poblaciones foliculares (primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales pequeños); b) determinar el porcentaje de folículos antrales atrésicos y la incidencia de FMOs y c) cuantificar el diámetro del ovocito, diámetro nuclear, diámetro folicular, espesor de las capas de células de la granulosa y de la teca y determinar la profundidad promedio de localización de los diferentes

tipos foliculares. Se utilizaron 10 (diez) corderas de la raza Frisona. En el día postnatal 45 se realizó la ovariectomía bilateral bajo anestesia general. Los ovarios se disecaron, se pesaron y procesaron hasta su inclusión en parafina para ser finalmente teñidos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio permitirían un mejor conocimiento del mecanismo de foliulogénesis y aportarían información para entender qué factores necesitan ser controlados para, por ejemplo, producir ovocitos de calidad para Fertilización in vitro (FIV) y Transferencia Embrionaria (TE) a partir de hembras púberes -MOET- o prepúberes -JIVET-, así como para la implementación de técnicas de Ingeniería genética en pequeños rumiantes.

**Palabras-clave:** ovario; población folicular; oveja

**Abstract:** Folliculogenesis is the process by which immature (primordial) ovarian follicles develop and become preovulatory follicles. In prepubertal females, follicular development up to the antral follicle stage generally occurs in the absence of basal gonadotrophic stimulation. Morphometric analyzes are very useful to quantify the structural follicular changes that occur in the different stages of the reproductive cycle of females (prepubertal, puberty, sexual maturity and senility) as well as in the different stages of the estrous cycle in adult animals. The main objectives of our study were to: a) establish the ovarian follicular dynamics, describing the percentage of follicles of each of the different follicular populations (primordial, transitional, primary, small preantral, large preantral and small antral); b) determine the percentage of atretic antral follicles and the incidence of FMOs, and c) quantify the diameter of the oocyte, nuclear diameter, follicular diameter, thickness of the granulosa and theca cell layers and determine the average depth of location of the different follicular types. Ten (10) lambs of the Friesian breed were used. On postnatal day 45, bilateral oophorectomy was performed under general anesthesia. The ovaries were dissected, weighed and processed until they were embedded in paraffin to be finally stained. The results obtained in our study allow a better knowledge of the folliculogenesis mechanism and provide information to understand what factors need to be controlled to, for example, produce quality oocytes for In Vitro Fertilization (IVF) and Embryo Transfer (ET) from females. pubertal -MOET- or pre-pubertal -JIVET-, as well as for the implementation of genetic engineering techniques in small ruminants.

**Keywords:** ovary; follicle population; sheep

## 1. Introducción

### 1.1. La oveja como modelo animal de investigación en reproducción

La gran mayoría de los trabajos científicos biomédicos se realizan en animales de laboratorio, utilizando especialmente como modelo animal a la rata o el ratón por las ventajas que ofrece su manejo sencillo y sus ciclos reproductivos y vital cortos.

El feto ovino muestra una secuencia y un tiempo de desarrollo ovárico similar al observado en el humano (Pryse-Davies y Dewhurst, 1971; Juengel *et al.*, 2002;

Sawyer *et al.*, 2002; De Felice *et al.*, 2005). A diferencia de los roedores, el ovario fetal ovino sintetiza estrógenos (Eg) que cumplen un rol importante en el desarrollo de las células germinales (Pannetier *et al.*, 2006). Además, algunas especies de rumiantes son susceptibles de padecer, de forma natural, afecciones reproductivas similares a las de la mujer. Por estas y otras razones, la oveja es utilizada como uno de los modelos animales de elección para estudiar patologías reproductivas tales como el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) (Steckler *et al.*, 2005; Padmanabhan *et al.*, 2006). A este interés se le agrega la importancia que tienen los estudios en ovinos para mejorar aspectos de la producción animal tanto de esta misma especie como de la de otros rumiantes.

## 1.2. Foliculogénesis. Generalidades

Se llama folículo ovárico a la estructura formada por un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas. La foliculogénesis es el proceso mediante el cual los folículos ováricos inmaduros (primordiales) se desarrollan y se convierten en folículos preovulatorios (Oktem y Urman, 2010). Este proceso se inicia durante la vida embrionaria y continúa a lo largo de la vida reproductiva de la oveja; los folículos pasan por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produce la ovulación o entran en atresia (Picazo y López, 1995).

Durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano, se cumplen dos procesos importantes en el ovario (Driancourt, 2001; Skinner, 2005):

- ensamblado folicular (formación de folículos primordiales)
- activación folicular o reclutamiento inicial (transición de folículos primordiales a folículos primarios)

### *Ensamblado folicular*

Esta fase está regulada por factores de crecimiento paracrinos e influenciada por concentraciones locales de hormonas esteroideas. Durante la etapa prenatal, los ovocitos están en grupos denominados "nidos o clusters". Luego, dependiendo de la especie animal, el ensamblado ocurre durante la gestación (ej.: oveja, vaca, mujer) o luego del nacimiento (ej.: rata, ratón). Durante este proceso un grupo de ovocitos muere por apoptosis y los que sobreviven se rodean de una capa simple de células somáticas planas (células inmaduras de la granulosa o también llamada pregranulosa) formando los folículos primordiales (Kezele y Skinner, 2003). Se cree que la supervivencia de un ovocito depende de la capacidad de ensamblarse para construir un folículo primordial (Martins da Silva *et al.*, 2004). Los ovocitos que no completan el ensamblado permanecen en grupos de dos o más rodeados de una capa simple de células planas y se los conoce como folículos multiovulares (FMOs). Teniendo en cuenta que los FMOs son ovocitos que no se separan y que quedan incluidos en los nidos (clusters), (Pepling, 2006), la proporción de FMOs puede ser usada como un índice del grado de éxito en el proceso de ensamblado folicular y de inhibición de la ruptura de los nidos (nest breakdown) (Tilly, 2003; Tingen *et al.*, 2009). La mayor incidencia de FMOs tiene consecuencias directas

sobre la fertilidad de la hembra. Se considera que la población de folículos primordiales (reserva de folículos ováricos) en la oveja se forma durante la vida fetal y neonatal y que una vez establecida, esta población no prolifera. En la oveja el ensamblado comienza alrededor del día 75 de gestación (McNatty *et al.*, 1995; 2000; Hussein *et al.*, 2005).

#### *Activación folicular*

La transición de folículo primordial a primario, o activación, es un proceso irreversible que se inicia alrededor del día 100 de gestación en la oveja e incluye la transformación de las células de la granulosa, de planas a cuboides.

Esta fase incluye el crecimiento de algunos folículos primordiales mientras que otros permanecen quiescentes por meses, años o décadas dependiendo de la especie (Hirshfield, 1991). De esta forma, los folículos primordiales que inicialmente se mantienen quiescentes son gradualmente reclutados a lo largo de la vida reproductiva de la hembra.

Los mecanismos de ensamblado y activación están regulados localmente por factores de crecimiento celular y hormonas esteroides (ej.: progesterona, estrógenos, andrógenos) y son independientes de la acción de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) en todas las especies de mamíferos estudiadas (Driancourt, 2001). De modo que en esta etapa temprana, la foliculogénesis es estimulada por otros factores, muchos de los cuales son aún desconocidos (Fortune, 2002).

### **1.3. Formación de folículos preantrales y antrales**

En el día 120 de desarrollo embrionario de la oveja se verifica la presencia de folículos preantrales caracterizados por contener varias capas de células de la granulosa; a partir del día 135 empiezan a observarse folículos antrales (McNatty *et al.*, 1995). En este periodo el ovocito comienza a crecer en diámetro, la capa de células de la granulosa prolifera y se hace evidente la presencia de las células de la teca, que provienen de las células del estroma y constituyen la capa más externa de la estructura del folículo. Si bien los folículos preantrales son sensibles a la FSH, en ausencia de ésta, son capaces de seguir madurando hasta el estadio de folículo antral.

Durante el periodo postnatal temprano pueden observarse en el ovario de la cordera, un número variable de folículos antrales (McNatty *et al.*, 1995). Específicamente, a los 30 días de edad se observa un pico en el número de folículos antrales distribuidos por todo el ovario (Tassel *et al.*, 1978).

#### **1.4. Desarrollo ovárico postnatal: etapa prepuberal**

Se define a la etapa prepuberal como el periodo comprendido entre el nacimiento y la pubertad. Los ovarios de las corderas jóvenes incrementan su tamaño paulatinamente, dependiendo de la raza y presentan numerosos folículos activos de diferentes tamaños. Los folículos continúan su crecimiento a lo largo de toda la vida o al menos hasta que la reserva se agota. Desde el nacimiento y hasta la pubertad las corderas no muestran conducta de estro ni ocurre ovulación, aunque se han observado secreción pulsátil de LH en corderas de 11 semanas de edad y concentraciones crecientes de FSH desde las semanas 3 a 11 de vida (Foster y Karsch, 1975). Varios experimentos realizados en corderas han demostrado un número elevado de folículos antrales al nacimiento (Kennedy *et al.*, 1974; Land, 1978). En observaciones realizadas cada 4 semanas (desde el nacimiento hasta la semana 24 y 33) se halló que el número de folículos antrales es alto y constante entre las 4 y 8 semanas de edad, y que luego disminuye manteniéndose relativamente estable hasta la primera ovulación en la pubertad (aproximadamente 180 días de edad), (Kennedy *et al.*, 1974). Durante la etapa prepuberal, el número de folículos primordiales se reduce a un tercio debido a las ondas de crecimiento folicular que terminan en la atresia (Fortune, 2003).

#### **1.5. Objetivos**

##### *Objetivo general:*

- Describir la morfología ovárica de hembras de *Ovis aries* (oveja doméstica) prepuberales (día 45 postnatal) de la raza Frisona.

##### *Objetivos específicos:*

- Determinar los pesos de las corderas y ovarios.

- Establecer la dinámica folicular ovárica, describiendo el porcentaje de folículos de cada una de las distintas poblaciones foliculares (primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales pequeños).

- Determinar el porcentaje de folículos antrales atrésicos y la incidencia de FMOs.

- Cuantificar el diámetro del ovocito, diámetro nuclear, diámetro folicular, espesor de las capas de células de la granulosa y de la teca y determinar la profundidad promedio de localización de los diferentes tipos foliculares.

## **2. Materiales y métodos**

Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité Institucional Asesor de Ética, Cuidado y Utilización de Animales para Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

### **2.1 Selección de animales**

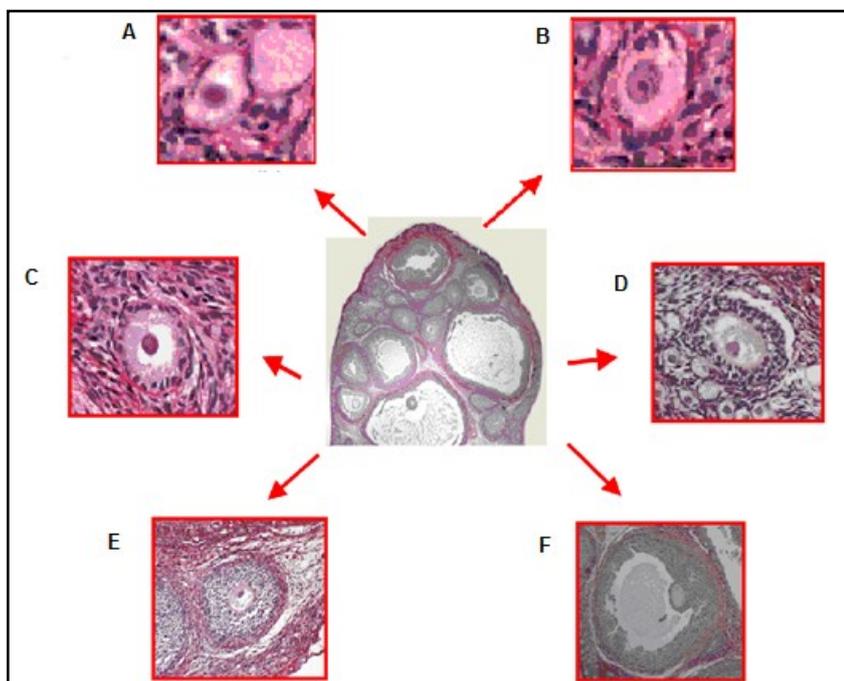
Se utilizaron 10 (diez) corderas de la raza Frisona, nacidas en primavera, provenientes del establecimiento Don Daniel (Roque Pérez, prov. de Buenos Aires). Las corderas fueron criadas al pie de sus madres sobre pastura natural. Las ovejas preñadas fueron separadas y al parto se seleccionaron sólo aquellas corderas nacidas de partos únicos. No se utilizaron mellizos para evitar la eventual influencia sobre los fetos que podría producir un ambiente hormonal uterino distinto, producto de una gestación múltiple (vom Saal y Bronson, 1978). Todos los animales estudiados fueron pesados al momento del nacimiento y posteriormente al día 45, previo a la ovariectomía.

### **2.2 Obtención de ovarios**

En el día postnatal 45 (DPN45) se realizó la ovariectomía bilateral bajo anestesia general según protocolo oportunamente aprobado (Rivera *et al.*, 2011; 2015; Rivera 2014). Los ovarios se disecaron bajo lupa y posteriormente se pesaron en balanza analítica. Éstos fueron seccionados longitudinalmente en dos mitades iguales y se fijaron por inmersión en una solución de formol al 4% tamponada a pH 7,5 con una solución de fosfato 0,05 M (PBS, Phosphate Buffer Solution). El procedimiento hasta su inclusión en tacos de parafina se realizó según fuera descrito por Junqueira y Junqueira (1983): deshidratación en alcoholes de graduación creciente, clarificación en xilol e inclusión en parafina.

### **2.3 Clasificación de los folículos ováricos**

Los folículos fueron clasificados de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos establecidos previamente por Lundy *et al.*, (1999): folículos primordiales (Tipo 1), ovocitos rodeados con una capa de células planas de la granulosa; folículos de transición, con una capa de una mezcla de células planas y cuboides de la granulosa (Tipo 1a); folículos primarios, de una a menos de dos capas completas de células cuboides de la granulosa (Tipo 2); folículos preantrales pequeños, de dos a menos de cuatro capas completas de células cuboides de la granulosa (Tipo 3); folículos preantrales grandes, de cuatro a menos de seis capas completas de células de la granulosa (Tipo 4) y folículos antrales pequeños, con más de seis capas de células cuboides y un antro completamente formado (Tipo 5), (Figura 1).



**Figura 1.** Clasificación morfológica de los folículos ováricos de la cordera de acuerdo a la población de células de la granulosa (Lundy *et al.*, 1999). (A) Folículos primordiales (Tipo 1), (B) folículos de transición (Tipo 1a), (C) folículos primarios (Tipo 2), (D) folículos preantrales pequeños (Tipo 3), (E) folículos preantrales grandes (Tipo 4) y (F) folículos antrales pequeños (Tipo 5). Microfotografías: Dioguardi, 2020.

Para evitar que un mismo folículo fuera contado más de una vez en diferentes cortes histológicos, sólo se contaron aquellos folículos que contenían el ovocito con su núcleo.

El porcentaje de folículos de los diferentes estadios de maduración fue calculado en relación al número total de folículos en la muestra (Tilly, 2003; Rodríguez *et al.*, 2010)

También se evaluó el ensamblado de folículos primordiales (“nest breakdown”) de acuerdo a criterios establecidos con anterioridad (Suzuki *et al.*, 2002; Britt *et al.*, 2004). Para ello, se contaron aquellos folículos con más de un ovocito incluido dentro de la capa de células de la granulosa, definidos como folículos multiovulares (FMOs) y que identifican un ensamblado folicular incompleto. La incidencia de FMOs se expresó en relación al número total de folículos.

Resulta difícil distinguir signos morfológicos de atresia en la mayoría de las categorías foliculares estudiadas, a excepción de la categoría de mayor grado de desarrollo (antrales pequeños). Para esta última categoría, el criterio utilizado para

distinguir a los folículos saludables de los atrésicos fue morfológico. Los folículos clasificados como saludables mostraron una capa de células de la granulosa de apariencia compacta y bien organizada, con numerosas figuras mitóticas y ocasionales o raras células picnóticas. En contraste, la atresia folicular está caracterizada por una amplia desintegración de la capa de células de la granulosa y rara presencia o ausencia de células mitóticas. En los folículos antrales pequeños atrésicos el resto de la capa de células de la granulosa consistió casi completamente de núcleos picnóticos y cuerpos apoptóticos.

#### **2.4 Caracterización morfométrica de los folículos ováricos**

Para la determinación de la dinámica folicular, se obtuvieron 4 cortes seriados de 5  $\mu$ m de espesor cada 200  $\mu$ m de cada hemiovario, paralelos al eje mayor del órgano, luego fueron teñidos con picrosirius-hematoxilina y evaluados con microscopio óptico de transmisión Arcano.

Para realizar las mediciones de los diámetros de los folículos, ovocitos y núcleo del ovocito, del espesor de las capas de granulosa y teca y ubicación de los folículos de los distintos tipos de folículos del ovario, se utilizó un sistema computarizado de análisis de imágenes, Image Pro Plus 3.0.1. Las observaciones se realizaron tras seleccionar dos cortes histológicos de dos profundidades distintas de cada hemiovario y se tomaron microfotografías de folículos de las diferentes categorías, donde el núcleo y el nucléolo eran claramente observables. Las mediciones de cada variable se realizaron como se detalla a continuación. En el caso de los diámetros, el valor fue el promedio de la longitud media de los diámetros mayor y menor (eje perpendicular).

- Diámetro del folículo: el tamaño de cada folículo se estableció midiendo desde la pared externa de las células de la teca (si se encontraba presente) o bien desde la capa externa de las células de la granulosa (en aquellas categorías en las cuales las células de la teca se encontraban ausentes), (Figura 2, A).

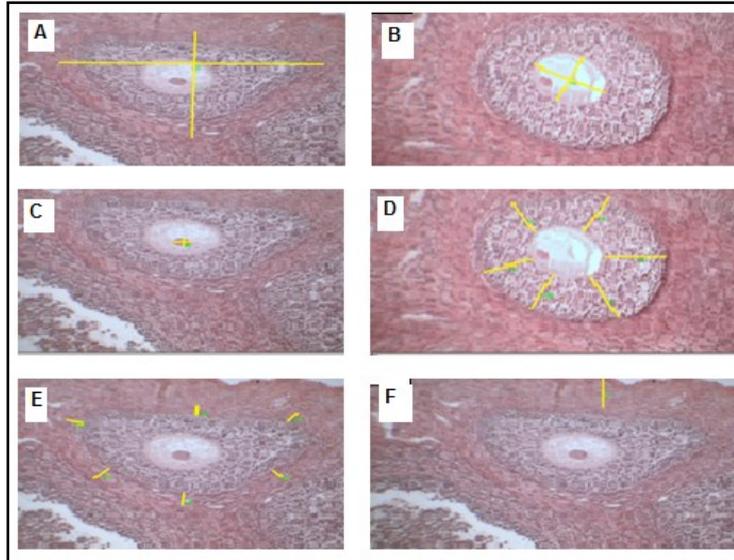
- Diámetro del ovocito: se midió sin zona pelúcida (Figura 2, B).

- Diámetro del núcleo del ovocito: se midieron los núcleos de los ovocitos que presentaron una forma redondeada (Figura 2, C).

- Espesor de granulosa y teca: se midió el espesor de las capas de la granulosa y de la teca en 6-8 puntos equidistantes alrededor del perímetro de cada folículo (Figura 2, D y E).

- Ubicación de los folículos: la ubicación en la que se encuentra el folículo dentro del ovario consistió en la longitud de la línea recta desde la túnica albugínea hasta la pared externa de las células de la teca (si estuviera presente) o de la capa

externa de las células de la granulosa (cuando las células de la teca estuvieran ausentes), (Figura 2, F).



**Figura 2.** Medición de parámetros morfométricos. A, medición del diámetro folicular; B, medición del diámetro del ovocito; C, medición del diámetro del núcleo; D, medición del espesor de la granulosa; E, medición del espesor de la teca (interna + externa); F, profundidad de localización del folículo. Microfotografías: Dioguardi, 2020.

## 2.5 Análisis estadístico

Los datos del peso de los ovarios derechos e izquierdos fueron calculados como el promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un análisis de Mann-Whitney para comparar los pesos de los ovarios derechos vs. izquierdos. Como significativo fue aceptado un valor de  $P < 0,05$ . El resto de las variables fueron analizadas mediante estadística descriptiva (promedio y SEM).

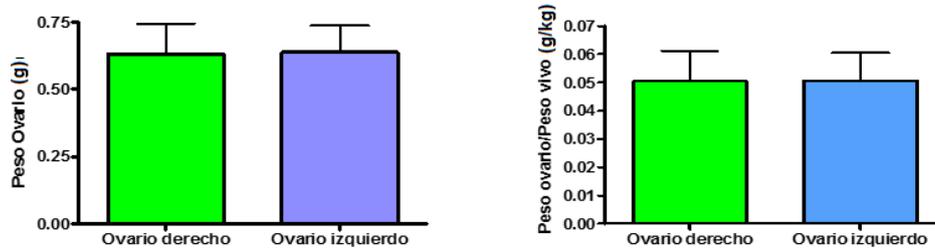
## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Peso de corderas y ovarios

Las corderas mostraron un peso vivo promedio al nacimiento de  $4,29 \pm 0,25$  kg. En DPN45, las corderas evidenciaron un peso vivo promedio de  $14,03 \pm 1,53$  kg.

No hubo diferencia significativa entre los pesos de los ovarios derecho e izquierdo al DPN45 (ovario derecho:  $0,63 \pm 0,11$  g; ovario izquierdo:  $0,64 \pm 0,09$  g); cuando

el peso de los ovarios se ajustó por el peso de cada cordera, tampoco mostró diferencias significativas (ovario derecho:  $0,05 \pm 0,01$  g/kg; ovario izquierdo:  $0,05 \pm 0,01$  g/kg), (Figura 3).



**Figura 3.** Peso promedio de ovarios (g) y relación peso ovario/peso vivo (g/kg) en corderas de raza Frisona, en el DPN45.

### 3.2. Dinámica folicular

En la Figura 4 se grafican los resultados de la dinámica folicular observados en las corderas en el DPN45.

En referencia al número total de folículos contabilizados (7.587), el  $90,58 \pm 3,01$  % correspondió a folículos primordiales (Tipo 1), los folículos de transición (Tipo 1a) representaron el  $3,71 \pm 0,67$ % del total, los folículos primarios (Tipo 2), el  $1,29 \pm 0,32$ %, los folículos preantrales pequeños (Tipo 3), el  $1,63 \pm 0,72$ %, los folículos preantrales grandes (Tipo 4), el  $1,52 \pm 1,02$ % y la población de folículos antrales pequeños (Tipo 5) correspondió al  $1,24 \pm 0,83$ %.

### 3.3 Folículos multiovulares (FMOs)

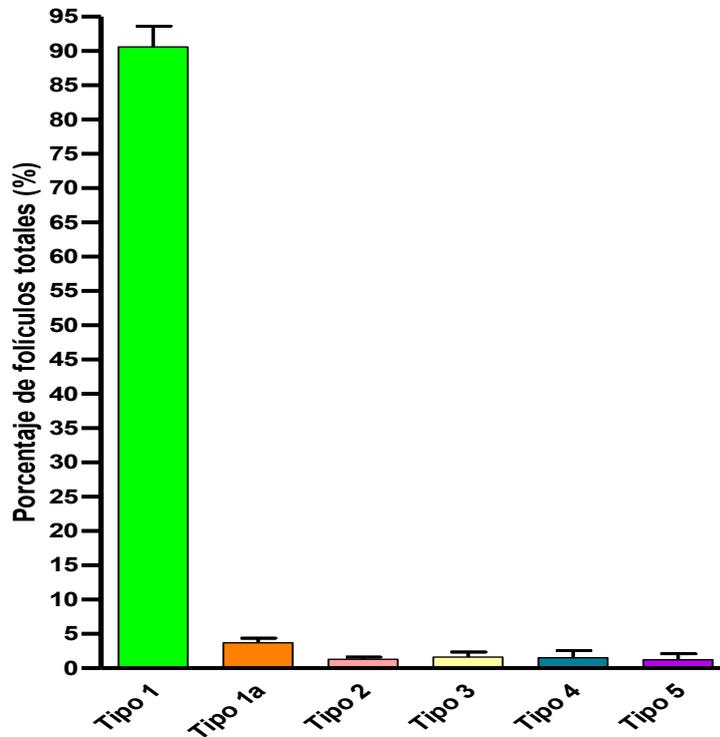
La gran mayoría de las veces se los encontró en estadio de folículo primordial rodeados de una capa plana de células de la granulosa y fue menos frecuente observarlos en otros estadios de crecimiento folicular. Durante la evaluación, se detectó que el porcentaje de FMOs representó el  $0,18 \pm 0,07$ % del total de folículos ováricos (Figura 5).

### 3.4 Folículos antrales atrésicos

El porcentaje de folículos antrales atrésicos fue de 25% respecto del total de folículos antrales pequeños contabilizados (Figura 6).

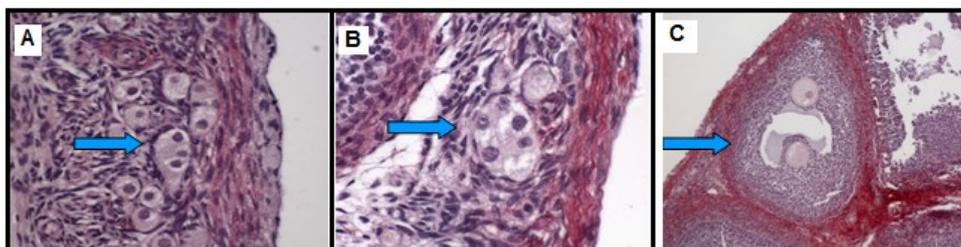
**Figura 4.**

Porcentaje de cada tipo de folículo en corderas de raza Frisona en el DPN45.



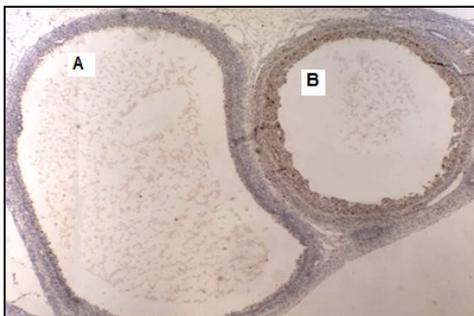
**Figura 5.**

Ovarios de corderas mostrando los tipos de folículos multiovulares más frecuentes. A - B tres y cinco ovocitos en un mismo folículo; C, dos ovocitos en estadio de folículo antral pequeño. Magnificación: 400X. Microfotografías: Dioguardi, 2020.



**Figura 6.**

A, folículos antrales pequeños atrésicos; B, folículo antral saludable. Magnificación 40X. Microfotografías: Dioguardi, 2020.



**3.5. Análisis morfométrico**

En la Tabla 1 se detallan los valores morfométricos hallados de las distintas estructuras foliculares estudiadas.

Los folículos Tipo 5 presentaron los diámetros foliculares del más amplio rango de variación (274,6 a 1.087  $\mu$ ). En cuanto al diámetro del ovocito, en nuestro estudio, la zona pelúcida (formada por glicoproteínas), estuvo completamente visible a partir de los folículos Tipo 3.

La pared tecal comenzó a visualizarse a partir del folículo Tipo 3 y estuvo formada por una o dos capas de células con un espesor promedio de  $9,82 \pm 0,20 \mu$ , mientras que en el Tipo 4 ( $23,50 \pm 4,80 \mu$ ) y 5 ( $40,73 \pm 3,70 \mu$ ) su grosor aumentó (Tabla 1).

Cuando fue analizado el grosor de la capa de la granulosa, se observó el rango más estrecho de variación en el Tipo 5 (55,8 - 120,2  $\mu$ ) en comparación con el rango de variación de espesor de la granulosa de los Tipos 3 y 4 (10,1 - 35  $\mu$  y 30,9 - 133  $\mu$ , respectivamente).

En cuanto a la localización de folículos en la estructura ovárica, aquellos del Tipo 1, 1a y 2 se localizaron en regiones corticales superficiales, mientras que los Tipo 3, 4 y 5 se ubicaron principalmente en regiones más profundas de la estructura ovárica (Tabla 1).

En la oveja prepúber no se observa un límite claro entre médula y corteza ovárica, por lo que la distribución de los folículos no es la clásica de otros mamíferos. Esta observación ya había sido informada por otros autores (Zukerman *et al.*, 1962; Fawcett, 1993). En la cordera Frisona, como en la mayoría de los mamíferos, los folículos menos desarrollados (primordiales, de transición y primarios) se

encuentran en la corteza, próximos a la túnica albugínea, pero aquellos que han alcanzado mayor grado de desarrollo (folículos preantrales y antrales) pueden observarse distribuidos por todo el órgano. Resultados similares hemos encontrado al estudiar ovarios de corderas cruce Corriedale x Hampshire Down de 30 días de edad (Rivera *et al.*, 2011).

**Tabla 1.**

Características morfométricas de los folículos ováricos en corderas de raza Frisona prepúberes (DPN45). Folículos primordiales (Tipo 1), folículos de transición (Tipo 1a), folículos primarios (Tipo 2), folículos preantrales pequeños (Tipo 3), folículos preantrales grandes (Tipo 4) y folículos antrales pequeños (Tipo 5). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM.

	Tipo 1	Tipo 1a	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5
<b>Diámetro del folículo (<math>\mu</math>)</b>	26,74 $\pm$ 1,06	30,83 $\pm$ 1,10	44,80 $\pm$ 3,21	106,80 $\pm$ 9,16	253,70 $\pm$ 23,56	569,30 $\pm$ 72,22
<b>Diámetro del ovocito (<math>\mu</math>)</b>	21,61 $\pm$ 1,06	24,18 $\pm$ 0,93	32,59 $\pm$ 1,97	55,83 $\pm$ 3,57	85,30 $\pm$ 4,84	108,00 $\pm$ 3,68
<b>Diámetro del núcleo (<math>\mu</math>)</b>	9,14 $\pm$ 0,25	9,48 $\pm$ 0,42	10,78 $\pm$ 0,68	16,39 $\pm$ 0,84	21,71 $\pm$ 1,03	24,35 $\pm$ 1,44
<b>Espesor de la granulosa (<math>\mu</math>)</b>	2,59 $\pm$ 0,12	4,62 $\pm$ 0,47	6,48 $\pm$ 0,61	23,19 $\pm$ 2,84	64,37 $\pm$ 5,08	81,99 $\pm$ 7,95
<b>Espesor de la teca (<math>\mu</math>)</b>				9,82 $\pm$ 0,20	23,50 $\pm$ 4,8	40,73 $\pm$ 3,70
<b>Profundidad de localización (<math>\mu</math>)</b>	47,37 $\pm$ 4,15	49,46 $\pm$ 4,55	64,30 $\pm$ 7,5	90,55 $\pm$ 16,01	112,60 $\pm$ 29,01	112,80 $\pm$ 15,85

El aumento en el diámetro de los folículos, ovocitos y núcleos de las distintas categorías de desarrollo ha sido estudiado en diferentes especies de mamíferos, especialmente en la etapa postpuberal: oveja (Lundy *et al.*, 1999), cabra (Ariyaratna y Gunaward, 1997; Sánchez y Ocampo, 1998), vaca (Braw-Tal y Yossefi, 1997), nutria (Felipe *et al.*, 1999), coneja (Zitny *et al.*, 2004), gata (Reynaud *et al.*, 2009) y perra (Songsasen *et al.*, 2009). La dinámica folicular ha sido menos estudiada en animales prepúberes (Driancourt 2001; Rivera *et al.*, 2011; Oberlender *et al.*, 2014). Nuestro estudio es el primero realizado para evaluar la morfometría de la población folicular en hembras prepúberes de la raza

ovina Frisona. Nuestros resultados en corderas de esta raza a los 45 días de edad son comparables con los observados al estudiar corderas cruza Corriedale x Hampshire Down de 30 días de edad (Rivera *et al.*, 2011), con algunas diferencias atribuibles probablemente a la raza y edad de los animales.

En nuestro estudio determinamos que el aumento progresivo en el diámetro del ovocito está estrechamente ligado al aumento del diámetro folicular. Observaciones similares fueron realizadas con anterioridad en otros mamíferos como cerdo (Mobeck *et al.*, 1992), perro (Songsasen *et al.*, 2009) y lobo marino (Katz y Johansson, 2013).

Generalmente, la zona pelúcida está completamente formada alrededor del ovocito en el estadio de folículo secundario, aunque en algunas especies (gato, ratón, humano) ya se la observa desarrollada en estadio de folículo primario (Himmelstein-Braw *et al.*, 1976; Oakberg, 1979; Braw-Tal y Yossefi, 1997). En especies como la cabra (Lucci *et al.*, 2001), búfalo (Mondadori *et al.*, 2007), cerdo (Silva-Santos y Seneda, 2011) y perro (Jivago, 2012) recién es visible en forma de fragmentos de zona pelúcida en formación en estadio de folículo secundario (Paulini *et al.*, 2014). En el presente trabajo, la presencia de la zona pelúcida resulta evidente y visible por microscopía óptica en estadios foliculares de Tipo 4 y 5, equivalente a folículo secundario.

En la oveja (como en otros mamíferos) la diferencia de espesor en la granulosa y teca entre las distintas categorías de folículos responde a un proceso de proliferación y diferenciación. El rango de variación en el espesor de la granulosa y de la teca en las distintas categorías de folículos ha sido poco estudiado (Katz y Johansson, 2013). En nuestro trabajo, la descripción de esta última variable aporta mayor detalle al proceso de foliculogénesis en esta especie. En la oveja, la formación de la teca se hace evidente a partir de folículo preantral pequeño, de una manera similar a lo que ocurre en la vaca (Braw-Tal y Yossefi, 1997).

## 5. Conclusiones

El conocimiento acerca de los mecanismos de desarrollo folicular en las diferentes especies resulta de suma importancia para diseñar métodos que permitan controlar su reproducción (Evans, 2003). Un mejor conocimiento de estos mecanismos aportará las claves para entender qué factores necesitan ser controlados para, por ejemplo, producir ovocitos de calidad para Fertilización *in vitro* (FIV) y Transferencia Embrionaria (TE) a partir de hembras púberes -MOET- o prepúberes -JIVET-, así como para la implementación de técnicas de Ingeniería genética en pequeños rumiantes.

Además, en los últimos años se ha demostrado la importancia del ovario, particularmente del desarrollo folicular, como “blanco” de los efectos de distintos contaminantes ambientales (ej: bisfenol A, dietilestilbestrol, glifosato), (Rodríguez *et al.*, 2010; Rivera *et al.* 2011; Rivera *et al.* 2015; Alarcón *et al.*, 2019). Conocer en detalle el proceso de foliculogénesis en las distintas especies contribuirá al

estudio y comprensión de estas alteraciones producidas por químicos con actividad de perturbadores endocrinos.

## 6. Referencias bibliográficas

- Alarcón, R.; Ingaramo, P.; Rivera, O.E.; Dioguardi, G.H.; Repetti, M.R.; Demonte, L.D.; Milesi, M.M.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque E.H. (2019). Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 482: 45-56.
- Ariyaratna, H.B.S.; Gunawardana, V.K. (1997) Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. *Small Rumin. Res.* 26:123-129.
- Braw–Tal, R.; Yossefi, S. (1997) Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 109:165-171.
- Britt, K.L.; Saunders, P.K.; McPherson, S.J.; Misso, M.L.; Simpson, E.R.; Findlay, J.K. (2004). Estrogen actions on follicle and early follicle development. *Biol. Reprod.* 71: 1712-23.
- De Felice, M.; Scaldaferri, M.L.; Farini, D. (2005) Adhesion molecules for mouse primordial germ cells. *Front. Biosci.* 10: 541-551.
- Dioguardi, G.H. (2020) Efectos de la exposición neonatal a un formulado de glifosato sobre el ovario de la oveja (*Ovis aries*). Tesis de Maestría. Biblioteca virtual-UNL <https://hdl.handle.net/11185/5701>.
- Driancourt, M.A. (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.
- Evans, A.C.O. (2003) Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reprod. Domest. Anim.* 38:240-246.
- Fawcett, D.W. (1993) Tratado de Histología (Bloom-Fawcett). Interamericana-McGraw Hill.
- Felipe, A.; Cabodevila, J.; Callejas, S. (1999) Anatomicohistological characteristics of ovary of the coypu (*Myocastor coypus*). *Anat. Histol. Embryol.* 28:89–95.
- Fortune, J.E. (2002) Activation of primordial follicles. En: Eppig J, Hegele-Hartung C.H.; Less I.M. (Eds.) *The future of the oocyte, basic and clinical aspects.* Springer, Nueva York, EEUU. 11-21.
- Fortune, J.E. (2003) The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 135-163.

- Foster, D.L.; Karsh, F.J. (1975) Development of mechanism regulating preovulatory surge of luteinizing-hormone in sheep. *Endocrinol.* 97: 1205-1209.
- Himmelstein-Braw, R.; Byskov, A.G.; Peters, H.; Faber, M. (1976) Follicular atresia in the infant human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 46:55–59.
- Hirshfield, A.N. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124: 43–101.
- Hussein, T.S.; Froiland, D.A.; Amato, F.; Thompson, J.G.; Gilchrist, R.B. (2005) Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.* 118: 5257-5268.
- Jivago, J.L.P.R. (2012) Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas. Master of Science Thesis. University of Brasilia: Graduation Program in Animal Biology.
- Juengel, J.L.; Sawyer, H.R.; Smith, P.R.; Quirke, L.D.; Heath, D.A.; Lun, S.; Wakefield, S.J.; McNatty K.P. (2002) Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191: 1-10.
- Junqueira, L.C.U.; Junqueira M.M.S. (1983) Técnicas básicas en citología e histología. (Eds: Livraria Editora Santos) São Paulo, Brasil.
- Katz, H.; Johansson, O. (2013) Ovarian Follicular Morphometry of South American Fur Seal Pups (*Arctophoca australis*) *Anat. Rec.* 296:1658–1663.
- Kennedy, J.P.; Worthington, C.A.; Cole, E.R. (1974) The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J. Reprod. Fertil.* 36: 275-82.
- Kezele, P.; Skinner, M.K. (2003) Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. *Reprod. Dev.* 144: 3329.
- Land, R.B. (1978) Reproduction in young sheep - some genetic and environmental sources of variation. *J. Reprod. Fert.* 52: 427-436.
- Lucci, C.M.; Silva, R.V.; Carvalho, C.A.; Figueiredo, R.; Bão, N. (2001) Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin. Res.* 41:61–69.
- Lundy, T.; Smith, P.; O'Connell, A.; Hudson, N.L.; McNatty, K.P. (1999) Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115: 251-62.

- Martins da Silva, S.J.; Bayne, R.A.; Cambray, N.; Hartley, P.S.; McNeilly, A.S.; Anderson, R.A. (2004) Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev. Biol.* 266: 334-345.
- McNatty, K.P.; Quirke, L.D.; Fidler, A.; Smith, P.; Heath, D.A.; Tisdall D. (2000) Ovarian Development: Fetus to Puberty. In: *Hormones and Women's Health*. Ed. L.A. Salamonsen, Harwood Academic Publishers, The Netherlands, 9-22.
- McNatty, K.P.; Smith, P.; Hudson, N.L.; Heath, D.A.; Tisdall, D.J.; O, W.S.; Braw-Tal, R. (1995) Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity. *J. Reprod. Fertil.* 49: 123-35. Review.
- Mobeck, D.E.; Esbenshade, K.; Flowers, W.L.; Britt, J.H. (1992) Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol. Reprod.* 47:485-491
- Mondadori, R.G.; Luque, M.C.; Santin, T.R.; Bao, S.N. (2007) Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 97:323-333.
- Oakberg, E.F. (1979) Follicular growth and atresia in the mouse. *In Vitro* 15:41-49.
- Oberlender, G.; Pontelo, T.; Miranda, J.; Miranda, D.; Zangeronimo, M.; Silva, A. Menezes, T.; Rocha, L. (2014) Morphological and morphometric evaluation of prepubertal gilt ovaries, uterine tubes and uterus at different oestrus cycle stages. *Pesq. Vet. Bras.* 34. 83-90.
- Oktem, O.; Urman, B. (2010) Understanding follicle growth in vivo. *Hum. Reprod.* 25: 2944-2954.
- Padmanabhan, V.; Manikkam, M.; Recabarren, S.; Foster, D. (2006) Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246: 165-174.
- Pannetier, M.; Fabre, S.; Batista F.; Kocer, A.; Renault, L.; Jolivet, G.; Mandon-Pepin, B.; Cotinot, C.; Veitia, R.; Pailhoux, E. (2006) FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 399-413.
- Paulini, F.; Silva, R.C.; Jivago, J.L.; Lucci, C.M. (2014) Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J. Ovarian Res.* 7:102
- Pepling, M.E. (2006) From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44: 622-32.

- Picazo, R.A.; López, A.S. (1995) Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Invest. Agrar.: Prod. Sanid. Anim.* 10: 77-93.
- Pryse-Davies, J.; Dewhurst, C.J. (1971) The development of the ovary and uterus in the foetus, newborn and infant: a morphological and enzyme histochemical study. *J. Pathol.* 103: 5.
- Reynaud, K.; Gicquel, C.; Thoumire, S.; Chebrou, M.; Ficheux, C.; Bestandji, M.; Chastant-Maillard, S. (2009). Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. *Reprod. Domest. Anim.* 44:174–9.
- Rivera, O.E.; Varayoud, J.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2011) Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod. Toxicol.* 32 (3): 304– 312.
- Rivera, O.E. (2014) Efectos de la exposición neonatal a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) sobre el desarrollo folicular en ovejas. Tesis Doctoral. Biblioteca virtual-UNL <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/111185/674>
- Rivera, O.E.; Varayoud, J.; Rodríguez, H.A. (2015). Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction* 149(6):645-55.
- Rodríguez, H.A; Santambrosio, N.; Santamaría, C.G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2010) Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod. Toxicol.* 30: 550-557.
- Sánchez, G.C.; Ocampo, M.B. (1998) Follicular dynamics in upgraded indigenous Philippine goat. In 35th. Annual Convention of the Philippine Society of Animal Science, Manila. Philippines.
- Sawyer, H.T.; Smith, P.; Heath, D.A.; Juengel, J.L.; Wakefield, S.J.; McNatty, K.P. (2002) Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66: 1134-50.
- Silva-Santos, K.C.; Seneda, M.M. (2011) Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries. *Anim. Reprod.* 8: 58-67.
- Skinner, M.K. (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update* 11: 461-71.
- Songsasen, N.A.; Fickes, B.S.; Pukazhenth, D.E. (2009) Follicular Morphology, Oocyte Diameter and Localization of Fibroblast Growth Factors in the Domestic Dog Ovary. *Wild Reprod. Domest. Anim.* 44(Suppl 2): 65–70.
- Steckler, T.; Wang, J.; Bartol, F.F.; Roy, S.K.; Padmanabhan, V. (2005) Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth

retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 146: 3185-3193.

- Suzuki, A.; Sugihara, A.; Uchida, K.; Sato, T.; Ohta, Y.; Katsu, Y.; Watanabe, H.; Iguchi, T. (2002) Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod. Toxicol.* 16: 107-116.
- Tassel, R.; Chamley, W.A.; Kennedy, J.P. (1978) Gonadotrophin levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb. *Aust. J. Biol. Sci.* 31: 267-273.
- Tilly, J.L. (2003) Ovarian follicle counts – not as simple as 1, 2, 3. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 11.
- Tingen, C.; Kim, A.; Woodruff, T.K. (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol. Hum. Reprod.* 15: 795–803.
- vom Saal, F.; Bronson, F. (1978) In utero proximity of female mouse fetuses to males: Effect on reproductive performance during later life. *Biol. Reprod.* 19: 842-853.
- Zitny, J.; Massanyi, P.; Trakovicka, A.; Rafaj, J. (2004) Toman R. Quantification of the ovarian follicular growth in rabbits. *Bull Vet. Inst. Pulawy.* 48:37–40.
- Zukerman, S.; Mandl, A.M.; Eckstein, P. (1962) *The ovary*. Vol. 1. NewYork, London: Academic Press.