

ASPECTOS ESTRUCTURALES Y CUANTITATIVOS DEL OVARIO DEL CUERVILLO DE LA CAÑADA *Plegadis chihi* (AVES: Threskiornithidae). RECRUDESCENCIA GONADAL TEMPRANA

Bulfon, Mirian, Esther¹ y Noemí Bee de Speroni²

- 1 Cátedra de Anatomía Comparada. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales Universidad Nacional de Córdoba. Avda. Vélez Sársfield 299. CP 5000. Córdoba. República Argentina.
- 2 Profesora Emérita. Universidad Nacional de Córdoba. Avda. Vélez Sársfield 299. CP 5000. Córdoba. República Argentina.

mbulfon@com.uncor.edu

RESUMEN

Se estudiaron los aspectos morfohistológicos y cuantitativos del ovario de *Plegadis chihi* durante la recrudescencia gonadal temprana, a fin de aportar conocimientos a la biología reproductiva de esta especie. Se utilizaron cinco hembras adultas provenientes del Arroyo Chucul (Pcia. de Cba), Argentina (agosto a setiembre de 2011). Las gónadas fueron extraídas, fijadas y procesadas con la técnica de inclusión en parafina. Las secciones se colorearon con Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Casson y PAS. Se estimaron los porcentajes de todos los folículos ováricos.

El análisis morfohistológico reveló diferentes estructuras ovocitarias: Ovocitos primordiales rodeados por un epitelio simple de células granulosas; folículos previtelogénicos con epitelio pseudoestratificado y un notorio cuerpo de Balbiani. Los folículos vitelogénicos blancos y amarillos > de 2mm mostraron una compleja pared folicular constituida por la zona radiada, el epitelio folicular estratificado y

las envolturas tecales bien definidas, además, numerosos gránulos de vitelo en el ovoplasma. En los folículos vitelogénicos amarillos > de 3 mm se observaron células granulosa cúbicas y muy basófilas. No fueron localizados folículos vitelogénicos amarillos > a 4 mm, preovulatorios ni postovulatorios. Se identificaron dos tipos de atresia folicular: 1) no *bursting*, involución en el interior del folículo, comprende a la atresia lipoidal (Ovocitos primordiales) y lipoglandular (folículos previtelogénicos y vitelogénicos pequeños) y la atresia por ruptura de la pared o *bursting* (folículos vitelogénicos > 2mm). La reacción positiva al PAS, reveló la presencia de mucopolisacáridos en diferentes estructuras ovocitarias. Se determinó un alto porcentaje de folículos pequeños ≤ 3 mm.

La morfohistología del ovario, los diferentes tipos foliculares y los datos porcentuales están en concordancia con la fase de recrudescencia gonadal temprana del Cuervillo de la Cañada, analizada en este trabajo.

Palabras clave: Aves silvestres, ovario, variaciones estructurales y cuantitativas.

Subsidiado por SECyT.UNC.Resol.162

INTRODUCCION

Las características estructurales de la gónada femenina y las variaciones cuantitativas que experimentan los folículos ováricos durante el ciclo reproductivo, han sido estudiadas en diferentes especies de aves silvestres como *Acridotheres tristis* y *Corvus splendens* (9), *Spheniscus magellanicus* (2), *Columbina talpacoti* (16), *Columba livia* (17), *Nothura maculosa* (5), *Columbina picui* (1), *Patagioenas maculosa* (13), *Struthio camelus* (12), *Fulica armillata* (4), entre otras.

Durante la fase de recrudescencia gonadal, el ovario exhibe notorios cambios morfológicos, su aspecto es irregular y arracimado por la presencia de numerosos folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo. La maduración de los ovocitos está estrechamente relacionado a los procesos de foliculogénesis y vitelogénesis, los cuales participan en las modificaciones de la pared folicular y en la distribución e incorporación de diferentes macromoléculas que provocarán un considerable incremento del tamaño folicular.

No obstante la gran cantidad de ovocitos en desarrollo, sólo pocos de ellos son seleccionados para la ovipostura, debido a que la mayoría serán eliminados por el proceso de atresia folicular. La atresia folicular es un proceso normal en el ovario de las aves y se expresa por notables cambios estructurales en las envolturas foliculares y en el ovoplasma de los folículos afectados los cuales involucionan paulatinamente. Este mecanismo, así como las etapas involutivas ha sido estudiado en diferentes especies de aves silvestres tales como *Sturnus contra contra* (8), *Spheniscus magellanicus* (2), *Nothura maculosa* (5), *Vanellus chilensis* e

Himantopus melanurus (3), *Fulica armillata* (4), o domésticas como *Gallus domesticus* (7; 18; 10), *Anser anser* (6; 11) y *Coturnix coturnix japonica* (14).

La información morfológica del ovario proporciona datos valiosos al estudio de la biología reproductiva en especies silvestres. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se realizó un análisis estructural y cuantitativo a fin de aportar conocimientos sobre los procesos de crecimiento, diferenciación y regresión folicular que se desarrollan en el ovario del Cuervillo de la Cañada durante la fase de recrudescencia gonadal temprana.

El Cuervillo de la Cañada *Plegadis chihi* (Viellot, 1857) frecuenta esteros, bañados y campos cercanos al agua. Construye sus nidos con juncos doblados y oviponen hasta cuatro huevos de color turquesa. Esta especie de ave es muy abundante en la Llanura Chacopampeana de la R.Argentina (15).

MATERIALES Y METODOS

Cinco hembras adultas del Cuervillo de la Cañada se capturaron con redes de niebla en el Sistema del Arroyo Chucul, (Lat.S 33° 07' 52" Long.O 63° 35'05") (Pcia. De Cba), R. Argentina, entre los meses de agosto y setiembre de 2012. En el laboratorio se anestesiaron con éter sulfúrico y perfundieron intracardiamente con una solución de paraformaldehído y disecaron. La ausencia de la *Bursa de Fabricius* constituyó un buen indicador del estado adulto de las aves.

Las muestras de ovario se postfijaron en Formol Tamponado pH 7.0 y procesaron de acuerdo a la técnica de inclusión en parafina. Los cortes seriados de 6 µm de espesor se colorearon con Hematoxilina – Eosina (H/E), para la identificación de tejido conectivo se empleó la Técnica de Tricrómico de Casson (TC) y para revelar la presencia de carbohidratos, se utilizaron la técnica histoquímica de PAS, Periodic Acid Schiff (McManus, 1945), y PAS, luego de digestión con amilasa (Lison, 1960).

Las imágenes fueron captadas con una Cámara Nikon Digital Sight DS - Fi1 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse 50i.

Se tomaron 10 secciones histológicas mediales de cada ovario y en cada una se contaron, midieron y categorizaron todos los folículos ováricos utilizando el programa de digitalización de imágenes, "Módulo de procesamiento de imágenes y sistema de análisis" Axió Vision. 3.0 Carl Zeiss.

Los valores porcentuales se estimaron utilizando el promedio de lecturas realizadas en cada ovario.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran dos aves adultas del Cuervillo de la Cañada.

Análisis morfológico del ovario

El aparato genital femenino del Cuervillo de la Cañada presenta una marcada asimetría siendo funcional sólo el ovario y oviducto izquierdo, este último con forma de largo tubo.

En agosto y setiembre se inicia la recrudescencia y el ovario exhibe una superficie irregular por la presencia de folículos vitelogénicos $\geq$ a 3 mm y un peso de $(x\ 0,1870 \pm 0,055\text{ g})$.

Características histológicas

El examen de las secciones histológicas de la gónada coloreadas con H/E, revela un revestimiento superficial, constituido por células simples y cúbicas con núcleos redondos u ovals muy basófilos. Se destacan dos áreas, una periférica o corteza donde se localizan los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo y el tejido intersticial. La otra más profunda o médula constituye el estroma medular destacándose abundantes fibras colágenas con (T/C), espacios lacunares, nervios y vasos sanguíneos (Figura 2 y 4).

Folículos ováricos en desarrollo

Durante la recrudescencia gonadal temprana se reconocen los siguientes tipos foliculares en la corteza ovárica: cordones de Ovocitos primordiales (60 a 100 μm de diámetro), los cuales están constituidos por el ovocito o célula germinal y una capa simple y aplanada de células foliculares alrededor como única envoltura folicular. El citoplasma es acidófilo y exhibe gran cantidad de vacuolas; en el núcleo excéntrico se destaca un prominente nucleolo y los cromosomas en configuración diplotene.

Las células foliculares de los folículos previtelogénicos (100 a 1000 μm de diámetro) conforman un epitelio columnar alto, pseudoestratificado con incipientes envolturas tecales. El cuerpo de Balbiani y las granulaciones citoplasmáticas se disponen en la zona cortical del ovoplasma (Figura 2).

Los folículos vitelogénicos blancos (1000 y 2000 μm de diámetro), presentan una capa pluriestratificada de células foliculares y envolturas tecales bien diferenciadas. Se evidencia la zona radiada y en el interior del ovoplasma notorias estriaciones y gránulos de aspecto lipídico de variadas formas y tamaños.

La pared folicular de los folículos vitelogénicos amarillos ($\geq$ de 2 mm), es similar a la observada en los blancos del mismo tamaño, mientras que en los $\geq$ a 4 mm, las células foliculares se comprimen y constituyen capa de aspecto cuboidal (Figura 3). Las tecas son más engrosadas y fibrosas que las envolturas de los folículos

más pequeños. En el ovoplasma se incorporan gran cantidad de gránulos de vitelo coloreado. Se destacan 3 ó 4 folículos ($> 4 \text{ mm}$).

La membrana basal de todas las categorías de los folículos en desarrollo, el cuerpo de Balbiani en los Ovocitos Primarios y los gránulos citoplasmáticos de los folículos vitelogénicos amarillos evidencian una reacción positiva al PAS (Figura 5).

Durante los meses de agosto y setiembre no se observan folículos vitelogénicos amarillos $\geq 4 \text{ mm}$, folículos preovulatorios ni folículos postovulatorios.

Atresia folicular

Se identifican dos tipos: a) Atresia no *bursting* o regresión sin ruptura de las paredes foliculares, comprende a la atresia lipoidal, la cual es típica de los Ovocitos primordiales. Se caracteriza por el desprendimiento de las células granulosas de la membrana basal y la aparición de vacuolas en el interior del citoplasma, que le confieren a los ovocitos primarios atrésicos una apariencia lipóide. El otro tipo regresivo es la lipoglandular (folículos previtelogénicos y vitelogénicos pequeños), los primeros estadios se caracterizan por una marcada hiperestratificación de las envolturas foliculares, luego el proceso avanza hacia una colagenización progresiva del folículo, el cual termina como una cicatriz en el estroma ovárico (Figura 4 y 5).

b) Atresia *bursting* o por ruptura de la pared (folículos vitelogénicos $> 2 \text{ mm}$). En las proximidades del tallo folicular las paredes foliculares se abren y a través de ese orificio el contenido del ovoplasma se libera fuera del folículo. Luego el folículo se contrae y deforma y el epitelio folicular se hiperestratifica y vacuolizan las células granulosas. En los estadios finales y al igual que en la atresia lipoglandular hay una marcada tendencia a la colagenización que finalmente abarca a todo folículo atrésico (Figura 2).

La membrana basal de los folículos atrésicos exhibe una fuerte reacción al PAS (Figura 5).

Análisis cuantitativo

Los ovocitos primordiales ($49,54\% \pm 1,65$), folículos previtelogénicos ($26,80\% \pm 2,67$) y vitelogénicos blancos ($16,40\% \pm 0,940$) son los más abundantes, mientras que, los folículos vitelogénicos amarillos entre 2 y 4 mm ($2,76\% \pm 0,985$) son escasos. Las cifras porcentuales de los folículos atrésicos es de ($4,50\% \pm 0,050$).

CONCLUSIONES

- El análisis morfohistológico del ovario del cuervillo de la Cañada indica que, la fase de recrudescencia gonadal temprana marca el inicio de importantes variaciones morfológicas y cuantitativas en la gónada femenina.
- El mecanismo de foliculogénesis se inicia tempranamente, mientras que, sólo se desarrollan las fases iniciales de deposición de vitelo blanco y amarillo durante la vitelogénesis.
- La ponderación cuantitativa con un alto porcentaje de ovocitos primordiales, folículos previtelogénicos y vitelogénicos blancos y el bajo porcentaje de folículos vitelogénicos amarillos ≥ 4 mm corrobora que la etapa de deposición de vitelo es más activa a medida que avanza la recrudescencia gonadal.
- Las características morfohistológicas de los folículos atrésicos no *bursting* y *bursting* demuestran que el proceso involutivo se desarrolla en varias etapas. El número reducido de folículos atrésicos *bursting* señalan que este tipo de atresia afecta a los folículos vitelogénicos de mayor tamaño.
- La reacción positiva al PAS, en las membranas basales de los folículos en desarrollo y atrésicos, cuerpo de Balbiani y los gránulos de vitelo revelan la presencia de mucopolisacáridos en estas estructuras ovocitarias.
- Del estudio de las características morfohistológicas y cuantitativas del ovario del Cuervillo de la Cañada durante la fase de recrudescencia gonadal temprana se infiere que, los procesos de crecimiento, diferenciación y atresia folicular son similares a lo reportado en otras aves silvestres en idéntica fase del ciclo reproductivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba por el subsidio otorgado para la financiación de este trabajo. Se agradece, además al Biólogo Fernando Carezano por su colaboración en las tareas de campo para la recolección de las aves.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Altamirano.E. Bulfon,M y N.Bee de Speroni. 2009. Histología del ovario y ciclo

reproductivo de *Columbina picui* (Temminck, 1813) (Aves: Columbidae). *Rev. peru. bio.* 16 (1): 61-66.

2.- Bulfon, M. y N. Bee de Speroni. 2003. Atresia folicular de *Spheniscus magellanicus* Forster 1871 (Aves: Spheniscidae). *Ararajuba* 11(2):189 - 194.

3.-Bulfon, M. y N. Bee de Speroni. 2009. "Análisis estructural e inmunohistoquímico de la atresia folicular de *Vanellus chilensis* e *Himantopus melanurus*". *Rev. peru. bio.* 16 (2): 169-174.

4.- Bulfon, M. y N. Bee de Speroni. 2011. Aspectos estructurales, histoquímicos y cuantitativos del ovario de *Fulica armillata* (Aves: Rallidae). *Rev. peru. bio.* 180(3): 303-309

5.-Claver, J., J. Rosa; D. Lombardo y M. Soñéz. 2008. *Int. J. Morphol.* version On-Line. V. 26. n2.

6.-Forgó, V., G. Afanasiev y P. Péczely. 1988. Light microscopic, enzyme biochemical and steroid analytical investigations of follicular atresia in the ovary of domestic goose. *Acta Biol. Hung.* 39 (4): 377 - 401.

7.-Gilbert, A., M. Perry, D. Waddington and M. Hardie. 1983. Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen *Gallus domesticus*. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 221 - 228.

8.-Gupta, S. y B. Maití. 1986. Study of atresia in the ovary during the annual reproductive cycle of the pied myna. *J. Morph.* 190 (3): 285 - 296.

9.-Chalana, R. y S. Guraya (1979 a) Morphological and histochemical observations on the primordial and early growing oocytes of crow (*Corvus splendens*) and myna (*Acridotheres tristis*). *Poult. Sci* 58 (1): 225 - 231.

10.-Guraya, S. 1989. Follicular atresia. Pp. 201-270. In W. Burggren, S. Ishii, H. Langer, G. Neuweiler and D. J. Randall (eds.) *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds. Zoophysiology*. Vol. 24. Springer - Berlin Heidelberg. New York, London, Paris, Tokio.

- 11.-Kovács J., V. Forgó & P. Péczely. 1992. The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res.* 267: 561 - 589.

- 12.-Mdekurozwa ,M. and W. Kimaro. 2006. A morphological and immunohistochemical study of healthy and atretic follicles in the ovary of the sexually immature Ostrich (*Struthio camelus*). *Anat. Histol. Embryol.* 35, 253-258.

- 13.- Maron, C., M. Bulfon y N. Bee de Speroni. 2012. Aspectos estructurales y cuantitativos del ovario de *Patagioenas maculosa* (Aves: Columbidae). *Rev.peru.biol.* 19(1):43-49.

- 14.-Orostegui, P., Parraguez and R. Cepeda 1999. Ultraestructura del epitelio de folículos ováricos de la codorniz japonesa *Coturnix coturnix japonica*: Adaptaciones celulares que contribuyen a la formación del vitelo. *Avances en Medicina Veterinaria*, Vol 5 (2), Julio-diciembre. 1990

- 15.-Nores, M., D.Izurieta. 1980. Aves de ambientes acuáticos de Córdoba y Centro de Argentina. Secretaria de Estado de Agricultura Y Ganadería. Dirección de Caza, Pesca y Actividades Acuáticas. Academia Nacional de ciencias de Córdoba. Pp. 31

- 16.-Ribeiro, M., M. Teles y S. Maruch. 1991. Aspectos morfológicos do ovário da rolinha *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811), Columbidae, Columbiforme. *Rev. Bras.Cien.Morfol.* 8(2): 77 - 82.

- 17.-Ribeiro, M. M.Oliveira Teles y S. Maruch. 1995. Morphological aspects of the ovary of *Columba livia* (Gmelin) (Columbidae, Columbiformes). *Revta bras. Zool.* 12 (1): 151-157.

- 18.-Waddington,D., M. Perry, A. Gilbert y M. Hardie. 1985. Follicular growth and atresia in the ovaries of hens (*Gallus domesticus*) with diminished egg productions rates. *J.Reprod.Fert.* 74:399 -405.

ANEXOS:

Figura 1: Aves adultas del Cuervillo de la Cañada. Fotografía tomada por Ramón Moller Jensen.

Figura 2: Vista general del ovario. Se destacan cordones de Ovocitos primordiales (OP); Folículos previtelogénicos (FPV) y un Folículo atrésico tipo *bursting* (FA). Estroma cortical (EC); vasos sanguíneos (VS). H/E. Barra: 150 μm .

Figura 3: Pared folicular de un Folículo vitelogénico amarillo (FVA). Las flechas indican las envolturas tecales y el epitelio folicular estratificado. Gránulos de vitelo (GV) en el ovoplasma. Ovocitos primordiales (OP). Vasos sanguíneos (VS). H/E. Barra: 100 μm .

Figura 4: Cordones de Ovocitos primordiales (OP). Folículo atrésico de tipo liploglandular (FA), presenta abundante fibras de tejido conectivo en su interior. T/C. Barra: 60 μm .

Figura 5: Vista general del ovario. Las flechas indican la marcación PAS (+) en la membrana basal y en el cuerpo de Balbiani de los Ovocitos primordiales (OP), membrana basal de los Folículos previtelogénicos y Folículo atrésico (FA). PAS. Barra: 100 μm .



Figura 1

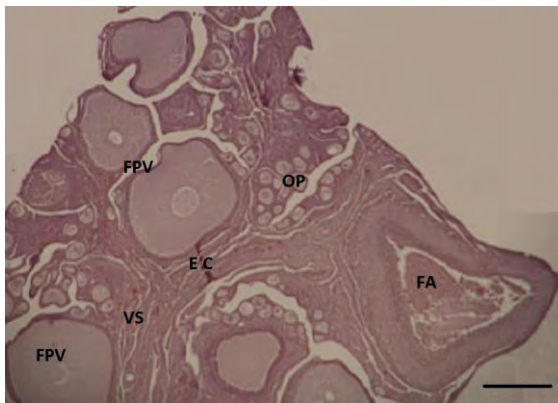


Figura 2

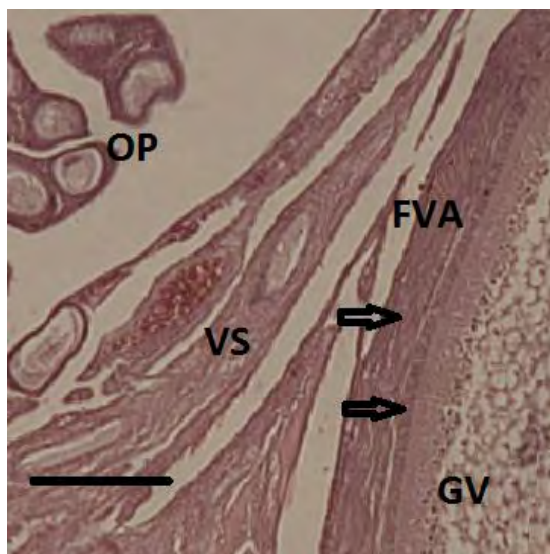


Figura 3



Figura 4

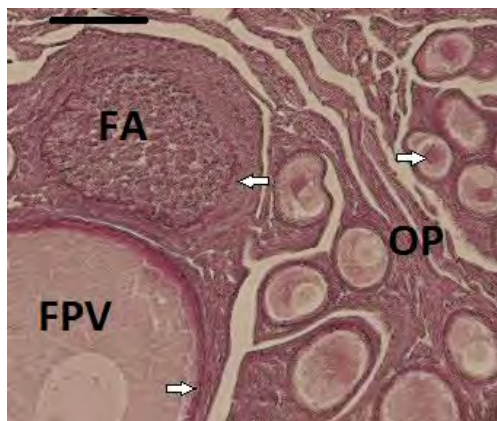


Figura 5