

---

---

*Universidad de Guadalajara*

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



"ATRESIA Y PERSISTENCIA FOLICULAR EN RATONAS  
HORMONALMENTE SOBREESTIMULADAS"

---

---

T E S I S  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
MAGDALENA SANCHEZ RESENDIZ  
GUADALAJARA, JAL., 1989

---

---

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA

ASESORES DE TESIS

BIOL. NESTOR MANUEL DELGADO PONCE

M. EN C. ROSALINA REYES LUNA

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCION  
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL -  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

## DEDICATORIAS

A MIS PADRES: JOSE JUAN Y ESPERANZA

No existen palabras para agradecerles el haberme engendrado, el enseñarme lo que es el amor a mí misma y a los demás y el apoyo que me ofrecieron, no importando los sacrificios y sinsabores para que yo alcanzara esta meta.

Los quiero.

A MIS HERMANOS:

ALBERTO,  
GABRIELA  
JOSE JUAN

Por su cariño,  
comprensión y  
su alegría.

A MIS MAESTROS Y AMIGOS

AL QUIM. ARMANDO CARRANCO,  
Por el ánimo que inculcó  
en mí.

## C O N T E N I D O

INTRODUCCION

OBJETIVO

HIPOTESIS

MATERIALES Y METODO

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

FIGURAS Y TABLAS

BIBLIOGRAFIA

CARTA DE ACEPTACION DEL PROYECTO DE TESIS

CARTA DE VISTO BUENO DEL DIRECTOR DE TESIS

## INTRODUCCION

El ovario es el órgano de la reproducción propio de las hembras y cumple con 2 funciones principales: A) Producción cíclica de óvulos fertilizables (Ovogénesis) y B) Producción de una frecuencia equilibrada de hormonas esteroidales que mantienen el desarrollo del aparato genital (1). El folículo es el compartimento ovárico más grande que capacita al ovario para cumplir con la función de ovogénesis y proporciona además el medio ambiente necesario para la maduración y la expulsión del óvulo. También participa en la síntesis de hormonas esteroides que regulan su crecimiento y estimulan a los órganos reproductores para transportar los gametos y para la implantación del huevo fertilizado. Los folículos adquieren capacidad funcional progresivamente conforme ellos maduran, siguiendo una serie de cambios en su desarrollo (2). (Fig. 1). Para que se lleve a cabo el crecimiento folicular, las células de la granulosa sufren repetidas divisiones celulares. Estas divisiones son estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH), además de que es necesaria para la formación del antrum. El efecto estimulatorio de la FSH sobre la división de las células de la granulosa puede ser mediada a través de una síntesis acelerada de estrógenos, porque la hormona induce a las enzimas aromatasas y aumentan la síntesis de estrógeno dentro de las células antes mencionadas (3).

En el ratón, el intervalo de tiempo entre su nacimiento y su madurez es de 5 a 7 semanas, durante este lapso el ovario se desarrolla de una manera uniforme, de ser un órgano simple a uno multiforme y altamente diferenciado.

El ovario al nacimiento, consiste principalmente de 2-tipos de células: 1) Los oocitos altamente especializados y 2) Las células del estroma multipotenciales, que son células indistinguibles morfológicamente, que más tarde darán origen a las células de la granulosa, de la teca, células lúteas y otras, además del líquido folicular (4).

Su ciclo estral está dividido en fases o estadios que son: proestro, estro, metaestro (I y II) y diestro (Fig. 2). Los dos primeros (Proestro y estro) son estadios anabólicos durante los cuales el crecimiento es activo y se lleva a cabo en varias partes del tracto genital. Ellos culminan en la ovulación, en donde se puede llevar a cabo el apareamiento y como consecuencia la fertilización del óvulo. El tercero, metaestro I y metaestro II, son estadios catabólicos-característicos, donde existen cambios generalmente de degeneración en el tracto genital. El último estadio (diestro) es un período de inactividad o de lento crecimiento. La duración promedio de los ciclos individuales son usualmente - considerados de 4 a 5 días; pero ésto es ampliamente variable y aparentemente influenciado con facilidad por algunos-efectos del medio ambiente como es el stress, etc.

Algunas investigaciones establecieron datos relativos a la duración de los diferentes estadios del ciclo, donde el promedio de tiempo utilizado para cada fase fue: proestro temprano 11 Hrs, proestro tardío 21.4 Hrs, diestro 21.8 Hrs, estro 20.7 Hrs, y metaestro 21.8 Hrs, para un total de 104 Hrs, es decir 4.3 días. En lo que respecta al tamaño del oocito, éste logra medir 70 nm de diámetro comparado con los 125 nm del folículo. La medida promedio de los folículos es de 380 nm de diámetro al comienzo del ciclo estral y alcanza una medida máxima de cerca de 550 nm justo antes de la ovulación. La mayoría de estos cambios ocurren en las últimas 48 Hrs. del ciclo (5).

Una vez que el proceso de crecimiento comienza, el folículo está destinado a ovular o volverse atrésico (6). La atresia folicular es un fenómeno ampliamente extendido en el ovario de los vertebrados (7). Este proceso exhibe muchas variaciones en diferentes especies tales como peces, anfibios, reptiles y aves que han descrito varios autores (8). Sin embargo, en mamíferos existen muy pocos estudios acerca de dicho proceso. Aunque la mayoría de los folículos ováricos sufren degeneración, los mecanismos involucrados en el inicio de la atresia no eran muy conocidos (9), hasta que estudios morfológicos se realizaron en el ratón.

Byskov 1974, distinguió entre folículos en diferentes etapas de atresia los siguientes parámetros:

1. Un porcentaje de núcleos picnóticos entre las células de la granulosa.
2. Presencia de leucocitos polimorfonucleares en los folículos.
3. Cavidades en folículos que tienen menos de 200 células - en un corte transversal grande (10).

En estados tempranos usando microscopía de luz, fue sugerido que en la atresia folicular, los primeros cambios ocurren en el oocito, mientras que otros estudios concluyeron que las células de la granulosa son las inicialmente afectadas. Después en etapas más avanzadas, la fragmentación extensiva del citoplasma de las células de la granulosa fue asociada con la pérdida de microvello y la vacuolización citoplasmática en oocitos. Con estos hallazgos se concluye que la atresia comienza con alteraciones en las células de la granulosa y más tarde en los oocitos (11). Aunque los mecanismos involucrados en la atresia no están bien definidos, es probable que la influencia hormonal tenga particular importancia. Otros factores como la sustancia inductora de la meiosis (MIS), el inhibidor de la maduración del oocito (OMI) y las sustancias que previenen la meiosis (MPS), pueden influenciar en el desarrollo del oocito (12).

Los receptores de hormonas esteroideas están presentes en células de la granulosa, las cuales también son sensibles a gonadotropinas. En los folículos atrésicos, la capacidad de las células de la granulosa para unir gonadotropi-

nas varía como una función en esta degeneración (11). Sin embargo todos los estudios no nos permiten describir cambios en el orden cronológico de los folículos que sufren atresia (13).

En algunos estudios se encontraron 2 hipótesis concernientes a los estadios vulnerables en el crecimiento folicular. Varios autores sostienen que la atresia puede ocurrir en cualquier etapa de desarrollo, sugiriendo que los folículos que ovulan han escapado de la degeneración muchas veces durante el curso de crecimiento.

Otros autores mantienen que el fenómeno de atresia está limitado a un estadio particular de desarrollo y éste es un período sencillo de vulnerabilidad durante su proceso de desarrollo (14).

Un modelo matemático (15) ha demostrado que es posible para un número pequeño de folículos madurar periódicamente en una población folicular interactuante, mientras que los otros miembros de la población sufren atresia. Estas poblaciones foliculares que gradualmente se separan en 2 grupos: ovulatorio y atrésico, asumen un plan de desarrollo heredado interactuante con otros miembros de la población a través de la retroalimentación circulatoria. En este modelo, el estradiol es tomado como mensajero químico usado por los folículos durante el proceso de selección para comunicar su maduración a la pituitaria y por lo tanto a cada uno de los

folículos. Cambiando uno u otro de los 2 parámetros, la ecuación de desarrollo puede ajustarse al número de folículos que se desarrollan completamente y el tiempo en que maduran. Una reciente generalización del modelo, muestra que la teoría puede tomarse en cuenta para la regulación del número de ovulación, aunque sea inducida o espontánea (15).

Estos estudios además de trabajos realizados en microscopía electrónica no han definido claramente la secuencia morfológica de los eventos que se llevan a cabo durante la atresia de los folículos (11).

El objetivo de la superovulación es aumentar la producción de óvulos viables (16). Este proceso es inducido en un gran número de mamíferos por un tratamiento con hormonas gonadotrópicas (17). Las gonadotropinas (FSH y LH) actúan en las glándulas sexuales y regulan la producción de hormonas sexuales. La FSH induce la maduración del folículo ovárico. Por otra parte, la LH tiene algunas acciones en la hembra, incluyendo la estimulación de la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la producción de progesterona, y esta misma hormona estimula la producción de testosterona en el macho (18). En ratas maduras y ratonas, el proceso inicial de inducción comienza cuando se aplican inyecciones subcutáneas o intramusculares de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) que actúa de manera similar que la FSH, a fin de estimular el crecimiento folicular adicional.

Este tratamiento se sigue de una administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) ó de LH durante algunos días después, para inducir la ovulación de los folículos (16). El número de oocitos ovulados es determinado por la raza del animal utilizado y la dosis de gonadotropinas administradas (17).

En ratonas en donde se ha estimulado la ovulación con hormonas gonadotrópicas, se podrá estudiar la atresia folicular, ya que la población de folículos en desarrollo estará aumentada y con ello se podrá determinar la secuencia-morfológica de los eventos que se llevan a cabo durante este fenómeno.

## OBJETIVO

Estudiar la persistencia y atresia folicular durante la fase post-ovulatoria en:

- a) Ratonas sin aparear (control),
- b) Ratonas apareadas,
- c) Ratonas tratadas con PMSG, hCG y apareadas.

## HIPOTESIS

La superovulación en las ratonas causada por el tratamiento con hormonas gonadotrópicas, permitirá determinar con claridad, en una mayor producción de óvulos, la persistencia y atresia folicular, así como la respuesta asimétrica ovulatoria en el ovario.

## MATERIAL Y METODOS

### INDUCCION HORMONAL

#### REACTIVOS

Hormona gonadotrópica sérica de yegua preñada (PMSG) (Sigma Chem. Co.).

El leofilizado de PMSG (que equivale a 2,000 Unidades) se solubilizó con 4 ml de agua destilada estéril. De esta solución se hace una dilución 1:10 para inyectar 100 microlitros que equivalen a 5 U.I. (19).

Hormona coriónica humana (hCG) (Sigma Chem. Co.).

El leofilizado de hCG (equivalente a 10,000 U) se solubilizó en 5 ml de agua destilada estéril. De esta solución se hizo una dilución 1:10 en donde 50 microlitros contienen 5 U.I. de la hormona. (19)

#### METODO

Se utilizaron 26 ratonas de la cepa Balb/c de 3 meses de edad, sexualmente maduras que se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y luz. Los animales procedieron del Bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social. Estos se dividieron en 3 grupos. El primer grupo sirvió -

como control (no inducción, no apareamiento), el segundo - solo fué apareada y el grupo restante fué estimulado hormonalmente para la ovulación y posteriormente apareado (inducidas). A este último grupo se le administró una dosis de 5 U.I. de PMSG y 48 Hrs más tarde se administró una segunda dosis de 5 U.I. de hCG. Las inyecciones se aplicaron - subcutáneamente en la parte inferior del abdomen de los - animales. Llevada a cabo la inducción se aparearon los 2- últimos grupos (apareadas e inducidas), colocando una hembra con un macho en jaulas individuales. Todas las ratonas fueron sacrificadas por dislocación cervical 48 Hrs - después de la inducción. El último grupo fué dividido en: 2: 14 animales fueron sacrificados en el tiempo establecido y los 4 restantes, 24 Hrs más tarde.

## OBTENCION DE OVARIOS Y RECUPERACION DE PRO-EMBRIONES\*

### EQUIPO

- Estuche de disección
- Microscopio estereoscópico Carl Zeiss
- Microscopio óptico Carl Zeiss

### METODO

Inmediatamente después de sacrificados los animales, se hace una incisión en la piel del abdomen, de abajo hacia arriba, teniendo cuidado de no cortar alguna vena o algún órgano. Con precaución se mueven los intestinos hacia arriba para poder observar el aparato reproductor de la hembra. Ya localizados los órganos, procedimos a cortar y separar el útero, las trompas de Falopio y los ovarios, éstos se lavaron con solución salina fisiológica y se les retiraron residuos de sangre y grasa. Con ayuda de una navaja de rasurar y del microscopio estereoscópico, fraccionamos finamente las trompas de Falopio y el útero, para liberar los óvulos y los pro-embriones que se recuperaron, registrando su presencia en cada caso.

\*PRO-EMBRION: Es una masa celular, sin una forma humana reconocible, la cual tiene una moderada oportunidad de implan

tarse en el útero y de llegar a término. Por ende, antes -  
de su implantación, todavía no ha desarrollado su individua  
lidad en el sentido de unidad, la cual se establece hasta -  
que la línea primitiva embrionario es formada.

## INCLUSION, CORTE Y TINCION DE LOS OVARIOS

### EQUIPO

- Microtomo de rotación Leitz
- Vernier
- Baño María
- Estufa de Incubación

### REACTIVOS:

#### Fijador de microscopía electrónica

Se pesó 1 gr de paramormaldehído que se disolvió en - 25 ml de agua desionizada a 60°C con 3 gotas de NaOH 1N. - Después de enfriar, se adicionaron 10 ml de glutaraldehído al 25% y 45 ml de cacodilato de sodio 0.2 M, se ajustó el pH a 7.3 y se llevó toda la mezcla a 100 ml con agua desionizada (20).

#### Solución de cacodilato de sodio 0.2 M pH 7.3

Se pesaron 3.2 gr de cacodilato de sodio, se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua desionizada, ajustándose el pH a 7.3 con NaOH 1N.

#### Albúmina-Glicerina (1:1)

Se midió un volumen de la clara de un huevo en una -- probeta y se le agregó este mismo volumen de glicerina. Se

agitó y se le adicionaron unas gotas de fenol para evitar-  
precipitados. Se filtró y se utilizó como adhesivo.

Xilol absoluto

Alcohol-Xilol (1:1)

Medir un volumen de alcohol y adicionar el mismo volu-  
men de Xilol.

Alcohol absoluto

Alcohol 96°

Medir 96 ml de alcohol absoluto y adicionar 4 ml de -  
agua desionizada.

Alcohol 70%

Medir 70 ml de alcohol absoluto y adicionar 30 ml de -  
agua desionizada.

Agua corriente

Hematoxilina de Harris 1%

Disolver 1 gr de Hematoxilina de Harris en 10 ml de -  
alcohol. Se pone a calentar 200 ml de agua destilada y po-  
co a poco disolvemos 20 gr de Alumbre de Potasio, tratando  
de evitar que el agua hierva. Ya hecha la solución, la re-  
tiramos del fuego y le adicionamos la hematoxilina y lenta-  
mente le añadimos 0.5 gr de óxido rojo de mercurio. Final-

mente ponemos toda la mezcla en un frasco color ambar, lo - tapamos y lo dejamos reposar por espacio de 8 días. Transcurrido este tiempo se filtra el colorante para poderlo utilizar (21).

#### Alcohol-Acido (100:1)

Se miden 100 ml de alcohol al 70% y 1 ml de HCL.

#### Eosina al 1%

Se pesa 1 gr de Eosina, se disuelve en 50 ml de alcohol de 96°C y se aforará a 100 ml con agua destilada.

#### Bálsamo de Canadá

Medir 3 ml de Bálsamo y agregarle 0.5 ml de Xilol (para evitar que esté muy espeso).

#### Parafina

## METODO

Inmediatamente después que han sido extraídos los ovarios, se tomaron medidas de su longitud y grosor con un Vernier y se dejaron en fijador de microscopía electrónica por espacio de 1 hr. Después las muestras fueron lavadas con cacodilato de sodio 0.2 M 4 veces y se dejaron en esta solución una noche. Al otro día se enjuagaron las muestras con agua destilada separándolas en viales (1 vial por ovario) en donde se procedió a la deshidratación. Primero se agregó alcohol 96° y se dejó durante 20 minutos, se retiró el alcohol y se le añadió alcohol absoluto en donde permaneció por espacio de 20 minutos. Esta operación, al igual que la anterior, se llevaron a cabo 2 veces. Una vez eliminado el alcohol, se adicionó Alcohol-Xilol (1:1) por 20 minutos, por último, se añade Xilol durante el mismo período de tiempo. Después de la deshidratación se retiró el Xilol y se llevó a cabo la primera inclusión en parafina, para ello se adicionó parafina previamente fundida a cada vial, incubándolos a 56°C durante 20 minutos, mientras tanto se elaboraron cajitas de cartoncillo (2.5 x 2.5 x 2.5 cm) en donde se colocaron los ovarios. Después cada cajita se llenó con parafina líquida dejándola solidificar un poco, mientras se sacaron las muestras de los viales que estaban en la estufa y se colocaron en las cajitas, tratando de que los ovarios quedaran en el fondo de éstas. Se dejó que la-

parafina solidificara totalmente. Al día siguiente se extrajeron los cuadritos de parafina, se etiquetaron y colocaron en el microtomo de rotación para realizar los cortes. - Se practicaron 3 ó 4 cortes seriados, se separan y colocan en Baño María a 50°C en donde se extienden completamente. - En un portaobjetos se hace un frotis con albúmina, éste lo introducimos al agua caliente para recuperar los cortes sobre la laminilla, se dejan secar y después en un portalaminillas se colocan en la estufa precalentada a 56°C, para de rretir y eliminar la parafina que rodea las muestras (22). - Una vez que las laminillas fueron sacadas de la estufa, se procedió a teñirlas. Inicialmente se introdujeron en Xilol 2 veces durante 10 minutos cada vez, para retirar los residuos de parafina.

Después se sumergieron en Alcohol-Xilol (1:1) por 5 mi minutos, Alcohol Absoluto 5 min; Alcohol 96° 5 min y finalmente se enjuagan con agua corriente para quitar el exceso de reactivos, después se introdujeron en Hematoxilina de Ha---rris por 3 min y se volvió a pasar por agua para eliminar - el exceso de colorantes. Para decolorar los organelos que están alrededor del núcleo y que éste permanezca coloreado en las células de los ovarios, se procede rápidamente a pasar las laminillas 2 veces en Alcohol-Acido y una vez en - agua tibia hasta que los cortes cambien a un tono rosado. - Después, estas preparaciones se tiñen con Eosina durante 2- minutos y se vuelve a pasar rápidamente por el tren de - -

deshidratación (Alcohol 96°, Alcohol Absoluto, Alcohol-Xilol (1:1) y dos pasos en Xilol). Para finalizar, se les agrega una capa fina de Bálsamo de Canadá y se les coloca el cubreobjetos. Ya seca la resina, las laminillas se limpiaron con Xilol y se enumeraron y marcaron para su observación (21).



OVARIOS  
Medición



FIJACION  
Glutaraldehido 2.5%, Paraformaldehido 1%  
en Cacodilato 0.1M, pH 7.3, por 1 Hr.



LAVADOS  
4 veces en Cacodilato 0.2 M, pH 7.3



DESHIDRATACION  
20 min Alcohol de 96°  
20 min Alcohol Absoluto  
(2 veces)  
20 min Alcohol-Xilol (1:1)  
20 min Xilol



INCLUSION  
Ovarios + Parafina líquida (56°C, 20 min)  
Formación de Bloques (2.5 x 2.5 x 2.5 cm)  
Etiquetación



CORTES  
Microtomo de Rotación Leitz  
(4 seriados)



BAÑO MARIA  
50°C



FROTIS  
En portaobjetos cubiertos con Albúmina  
Secar y calentar a 50°C

### TINCION

10 min en Xilol (2 veces)  
5 min en Alcohol-Xilol (1:1)  
5 min en Alcohol Absoluto  
5 min en Alcohol de 96°  
pasar los frotis por agua  
3 min con Hematoxilina de Harris  
pasar los frotis por agua  
pasar por Alcohol-ácido (100:1)  
2 veces.  
pasar los frotis por agua tibia  
2 min en Eosina.



### DESHIDRATAACION

-pasos rápidos-

Alcohol de 96°  
Alcohol Absoluto  
Alcohol-Xilol (1:1)  
Xilol 2 veces  
Agregar capa de Bálsamo de Canadá  
Colocar un cubreobjetos  
Secar y Marcar



### MICROSCOPIA OPTICA

Observar y anotar la presencia  
de folículos normales y atrésicos  
en todos los casos.

## RESULTADOS

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron los ovarios de 4 ratones como control, 4 ratonas apareadas (sin inducción hormonal), 18 ratonas inducidas hormonalmente para superovulación, de las cuales 14 se sacrificaron a las 48 Hrs después de la inducción y 4 a las 72 Hrs. Al analizar las dimensiones de los ovarios de las ratonas, observamos que los valores encontrados no fueron significativos estadísticamente entre ellos (Tabla 1).

Cuando se obtuvieron los óvulos liberados por el ovario y los pro-embriones de las trompas de Falopio y parte superior del útero, encontramos que las ratonas control tienen un promedio mayor de óvulos maduros ( $5 \pm 6$ ) mientras que de óvulos inmaduros el promedio mayor se presentó en las ratonas inducidas y sacrificadas a las 72 Hrs ( $6 \pm 5$ ) (Tabla 2). En cuanto al número de pro-embriones (2 y 4 células), sólo se recuperaron en las ratonas inducidas hormonalmente y los valores promedio más altos fueron en los animales sacrificados a las 48 y 72 Hrs ( $14 \pm 13$  y  $2 \pm 3$ ) respectivamente. Al analizar los folículos persistentes por medio de microscopía óptica en cortes delgados de ovarios, se encontró que la mayor población está en las ratonas apareadas y en las inducidas y sacrificadas a las 48 Hrs - - - ( $204 \pm 63$  y  $196 \pm 96$ ) (Tabla 2).

Los ovarios obtenidos se identificaron en izquierdo y derecho y en ellos se contaron los folículos presentes, estos últimos fueron clasificados por rangos de tamaño en 12 categorías.

En las 4 ratonas control se observaron 434 folículos - en total y de ellos más del 95% medía menos de 350 nm de diámetro, encontrándose una mayor incidencia en el rango de 101 a 150 nm de diámetro (Tabla 3 y 7). En el total de folículos por ovario podemos observar que el izquierdo posee más folículos que el derecho (Tabla 3). En las ratonas apareadas el total de folículos observados fué de 815, de los cuales el 97.5% midió menos de 350 nm de diámetro y se observó una mayor cantidad de éstos en el rango de 101 a 150 nm de diámetro (Tablas 4 y 7). En este caso se obtuvieron más folículos en el ovario derecho que en el izquierdo (Tabla 4).

En cuanto a las 14 ratonas inducidas hormonalmente y sacrificadas a las 48 Hrs., se obtuvieron 2737 folículos, donde el 95% de ellos se situaron en los rangos inferiores a 350 nm de diámetro, y la mayor incidencia se localizó en el rango de 101 a 150 nm (Tablas 5 y 7). La cantidad más grande de folículos encontrada se mantuvo en el ovario izquierdo (Tabla 5). En el último grupo (ratonas inducidas y sacrificadas a las 72 Hrs.), se obtuvieron un total de 509 folículos de los cuales el 95% midieron menos de 350 nm

de diámetro. En esta población se localizaron más folículos en el rango de 101 a 150 nm de diámetro (Tablas 6 y 7), encontrándose en éstos una mayor cantidad en el ovario derecho (Tabla 6).

Se estudiaron los folículos persistentes y se determinó si eran normales o atrésicos por la presencia de núcleos picnóticos en las células de la granulosa y la formación precoz del antro, al observarlos en cortes delgados de los ovarios por medio de microscopía óptica. En la Tabla 8 tenemos que del total de la población de folículos, más del 60% son folículos atrésicos (Fig. 3).

De los folículos normales, las ratonas apareadas tienen el promedio más alto seguido muy de cerca por las ratonas inducidas y sacrificadas a las 48 Hrs ( $52 \pm 18$  vs  $48 \pm 43$ ), mientras que en los folículos atrésicos las ratonas inducidas (48 Hrs) poseen el promedio más alto ( $148 \pm 65$ ) (Tabla 8).

## DISCUSION

De los resultados obtenidos, se puede observar que en las ratonas inducidas hormonalmente se recuperaron una mayor cantidad de óvulos y pro-embriones (Tabla 2). Datos que concuerdan con los reportados en la literatura (23). Más aún, la experiencia en el apareamiento de ratones Balb/c en el Bioterio de la U.I.B.O. es de que el promedio de productos recuperados en 5 años fué de  $7.0 \pm 1.0$  ratones y a pesar de que en este trabajo no fué factible la sincronización del ciclo estral de las ratonas, debido a las dificultades técnicas, los resultados obtenidos en la inducción hormonal de la superovulación se pueden considerar como excelentes (Tabla 2).

Sin embargo, cuando se analizaron los 4,495 folículos-persistentes de los 4 grupos, se puede observar un incremento del 100% en el grupo de las ratonas apareadas (grupo 2) y en el de las inducidas hormonalmente y sacrificadas a las 48 Hrs (grupo 3) con respecto al grupo control (grupo 1), mientras que prácticamente no existe diferencia entre este último grupo y el grupo 4 de las ratonas con ciclo inducido y sacrificadas a las 72 Hrs. A pesar de que la respuesta de los folículos varía enormemente al estímulo hormonal, se puede sugerir que este comportamiento de persistencia hormonal entre las ratonas del grupo 2 contra las de los grupos 3 y 4 es de que en el primero (grupo 2) el macho estimula -

la producción de hormonas tan efectivamente como el PMSG y la hCG empleadas en los otros dos grupos. Además, tanto en el grupo 2 como en el 3, el sacrificio de las ratonas se realizó al mismo tiempo, mientras que el cuarto grupo fué sacrificado 24 Hrs más tarde donde la persistencia folicular fué prácticamente similar al control (108 folículos en el control vs 127 folículos en el grupo 4). Este último resultado posiblemente se deba a que ha transcurrido el 60% de la duración del ciclo estral o bien, a la falta de una inducción hormonal sostenida, puesto que en este esquema de inducción solamente se utilizaron dosis únicas de cada una de las hormonas.

Con respecto a la simetría de los folículos persistentes (4495 folículos) se observa el mismo comportamiento anteriormente analizado salvo que existe un 2.4% más de folículos persistentes en los ovarios derechos (2,300 folículos) que en los del lado izquierdo (2,195 folículos). Este efecto se puede explicar parcialmente al hecho a que en las ratonas del grupo 4 el 61.4% de folículos por ratona persisten en el ovario derecho y nunca alcanzan a disminuir al nivel del grupo control (51 folículos/ratona).

En lo referente al análisis detallado de los folículos persistentes, se puede sugerir una clasificación de los folículos en base a su tamaño ( $\emptyset$  nm), formándose 3 categorías:

a) folículos pequeños (0.150 nm  $\emptyset$ ; b) folículos medianos --

(151-350 nm  $\emptyset$ ) y c) folículos grandes (351-550 nm  $\emptyset$ ). Más aún, de nuestros resultados se puede hacer notar la similitud en los tamaños de los folículos persistentes en los 4 grupos de ratonas (4,495 folículos en total) puesto que el 95% de ellos miden menos de 350 nm  $\emptyset$ . Sin embargo, de esta población se encontró que 27% de ellos son folículos pequeños (9 folículos de 0-150 nm  $\emptyset$ /ratona), mientras los 225 folículos restantes 95% del total son folículos grandes que posiblemente puedan alcanzar la madurez (37 folículos de 351-550 nm  $\emptyset$ /ratona) (Tabla 8).

Sin embargo, cuando se analiza esta población, se puede observar que en los grupos 1 y 4 el grado de atresia alcanza 81 al 90%, mientras que para el grupo 2 y 3 la atresia solamente alcanza de 74 a 76% de los folículos persistentes.

Por lo tanto, posiblemente se puede explicar este fenómeno al hecho de que en los grupos 2 y 3 la inducción hormonal permite que una mayor cantidad de folículos permanezca sin alteración alguna, lo cual nos permite sugerir el empleo de la FSH en una dosificación constante con el objeto de disminuir el porcentaje de atresia y poder obtener una mayor población de folículos maduros.

## CONCLUSIONES

1. La inducción hormonal fué excelente a pesar de la falta de sincronización del ciclo y de la aplicación de dosis únicas de hormona.
2. La ovulación fué mayor para los ovarios derechos.
3. Clasificación de folículos persistentes en 3 categorías: folículos pequeños (0-150 nm $\emptyset$ ), folículos medianos (151-350 nm $\emptyset$ ) y folículos grandes (351-550 nm $\emptyset$ ).
4. La población de folículos persistentes fué menor de los 350 nm $\emptyset$  y de éstos el 27% fueron menores de 151 nm $\emptyset$ .
5. El porcentaje de folículos grandes 350 nm $\emptyset$  fué satisfactorio (37 folículos/ratonas).
6. En las ratonas cuyos ciclos fueron inducidos hormonalmente, solamente se encontró el 75% de atresia, mientras que en las otras ratonas fué del 90%.
7. Por lo tanto, se corrobora el efecto protector de la hormona para impedir la atresia que se ha observado en otras especies de animales.

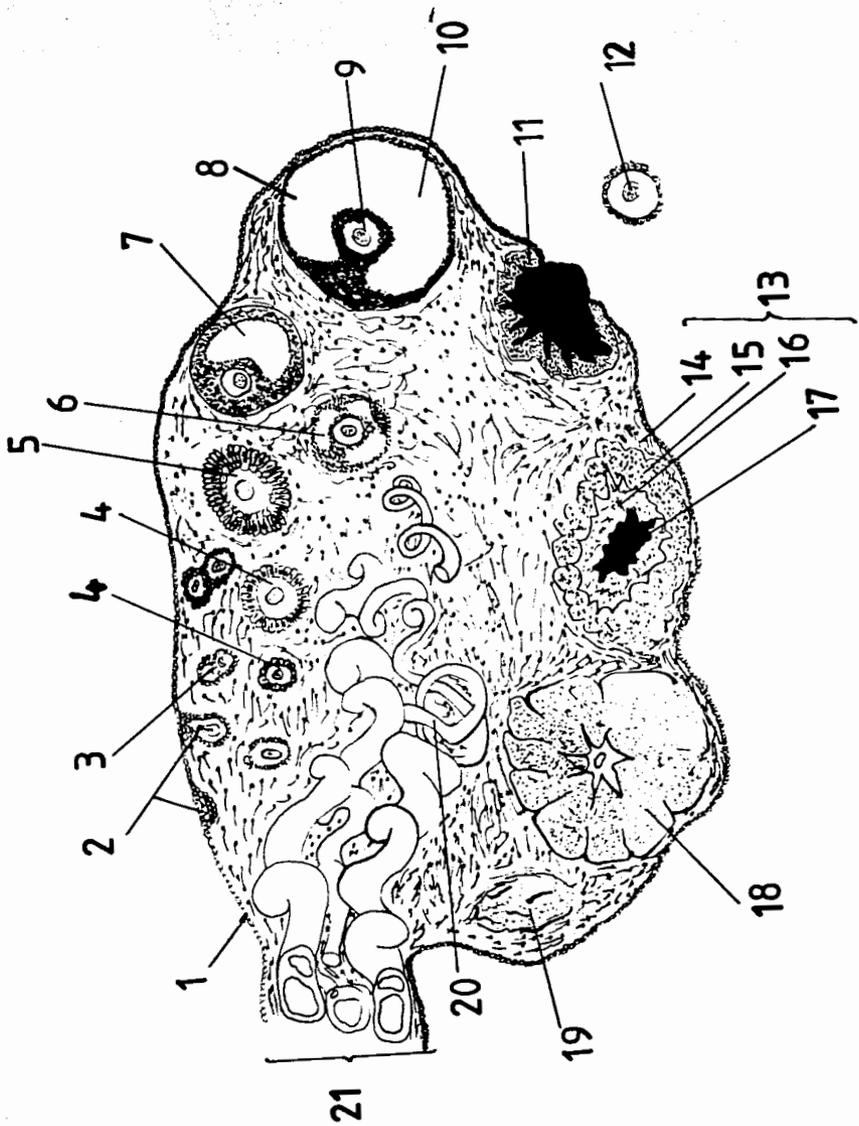


FIG 1

DIAGRAMA DE UN OVARIO DE MAMIFERO QUE PRESENTA EL CICLO DE VIDA DE UN OVULO Y SU FOLICULO.

1. Epitelio germinal.
2. Tubos ovígeros.
3. Cohorte de óvulos
4. Folículo primario (óvulo con una capa simple de células foliculares).
5. Folículo con capa doble de células
6. Folículo que inicia la formación del antro.
7. Folículo aproximándose a la madurez.
8. Folículo maduro.
9. Ovulo.
10. Antro lleno de líquido folicular.
11. Cuerpo hemorrágico.
12. Ovulo descargado.
13. Cuerpo lúteo joven.
14. Tejido conectivo.
15. Células lúteas.
16. Fibrina.
17. Coágulo sanguíneo.
18. Cuerpo lúteo (completamente formado).
19. Cuerpo albicans.
20. Vasos sanguíneos.
21. Mesovarium.

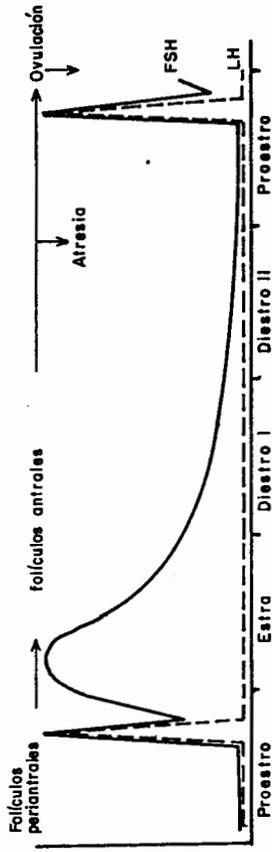


Fig. 2  
CICLO ESTRAL DEL RATON

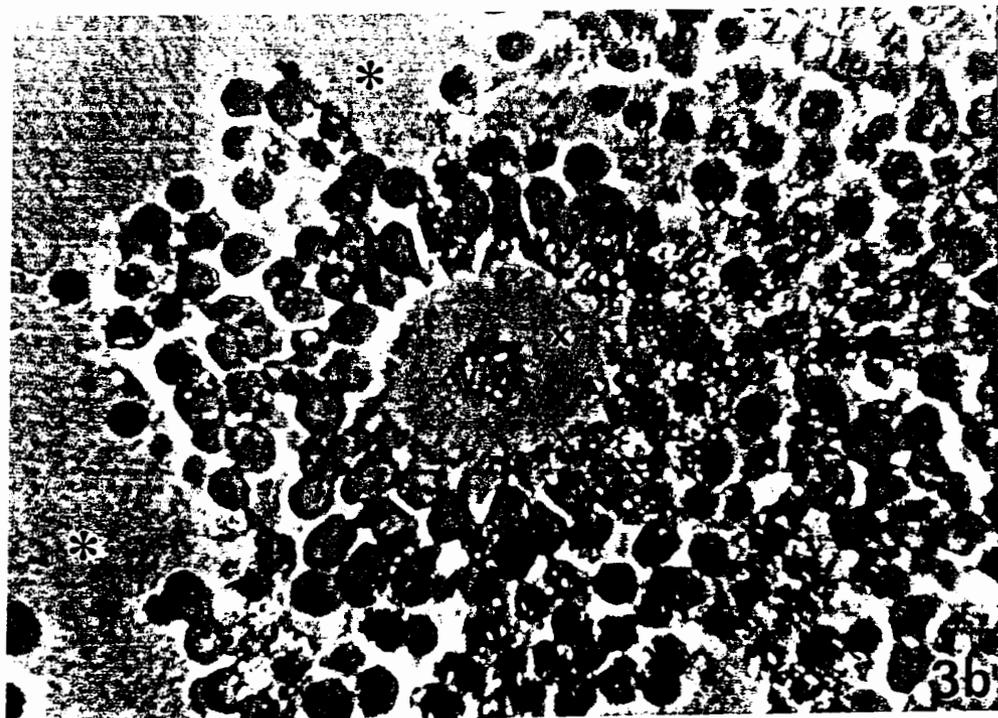
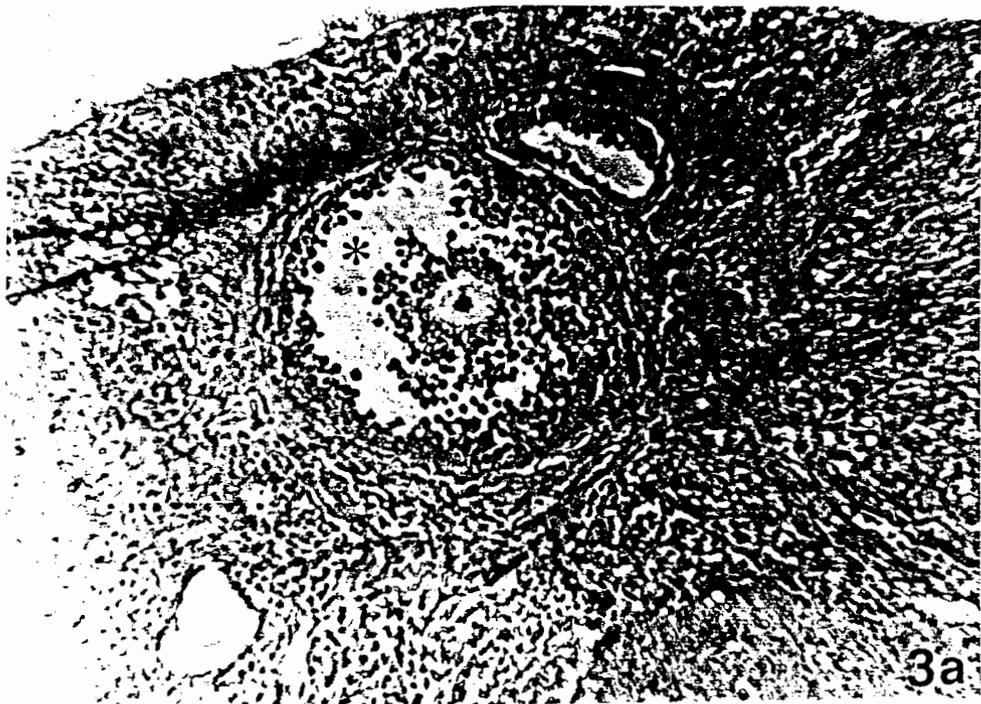


FIG. 3

MICROFOTOGRAFIAS DE CONTRASTE DE FASE DE FOLICULOS ATRESICOS

SIMBOLOGIA

- (\*) ANTRO ANORMAL
- (V) CROMATINA VACUOLADA
- (X) CROMATINA DIFUSA
- (R) CROMATINA RETICULADA
- (M) CELULAS NECROTICAS
- (P) CELULAS PICNOTICAS

FIG. 3a:

FOLICULO EN AVANZADO ESTADO DE DEGENERACION CON MUCHAS CELULAS DE LA GRANULOSA ALREDEDOR DE UN ANTRO ANORMAL, CROMATINA DIFUSA Y NUCLEO VACUOLADO.

FIG. 3b:

AMPLIFICACION DE LA REGION NUCLEAR DEL OVULO EN FORMACION - DE LA MICROFOTOGRAFIA (a).

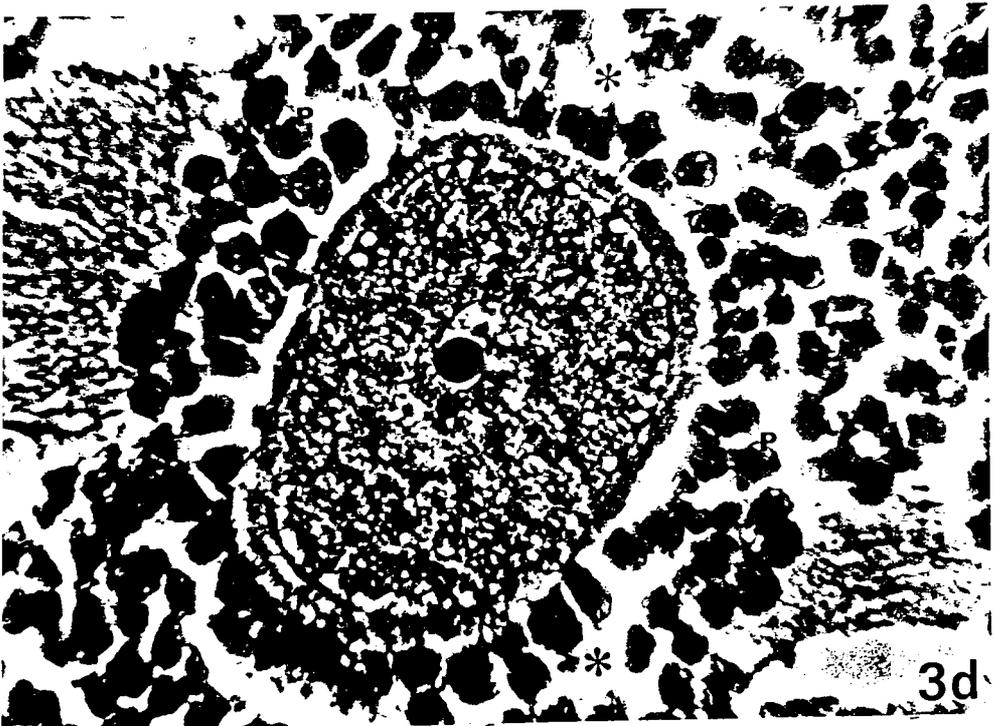
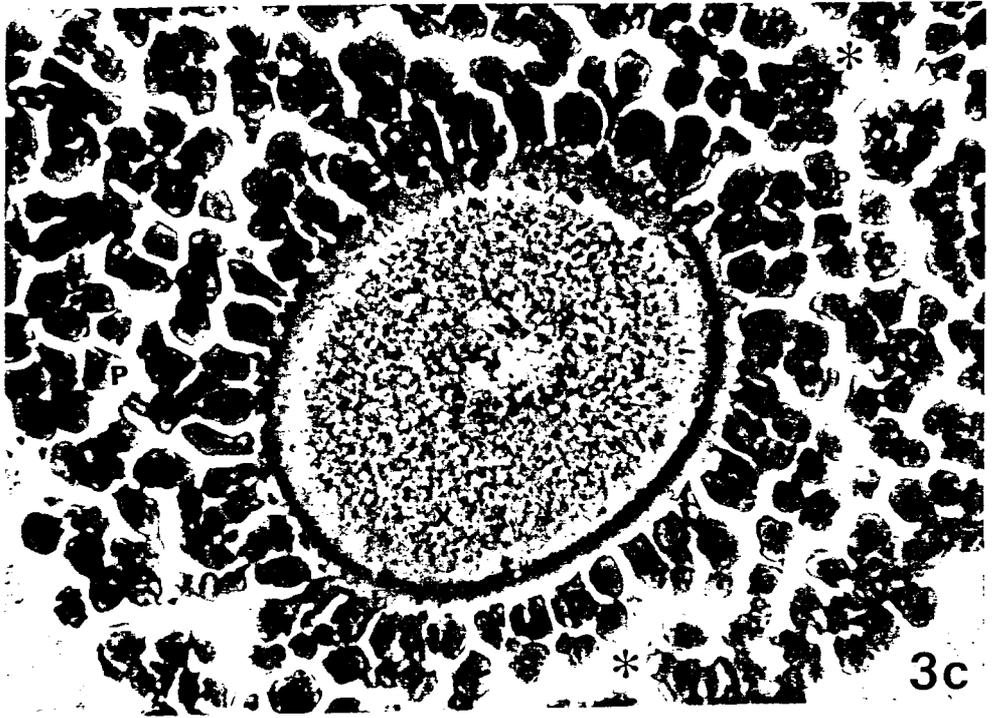


FIG. 3c:

FOLICULO DEGENERADO CON ESPACIOS ENTRE LAS CELULAS DE LA -  
GRANULOSA PICNOTICAS Y CROMATINA DIFUSA.

FIG. 3d:

FOLICULO CON NUCLEO EN FORMA RETICULADA, ALGUNAS CELULAS -  
PICNOTICAS Y SEPARACION DE LAS MISMAS PARA FORMAR UNA CAVI-  
DAD.

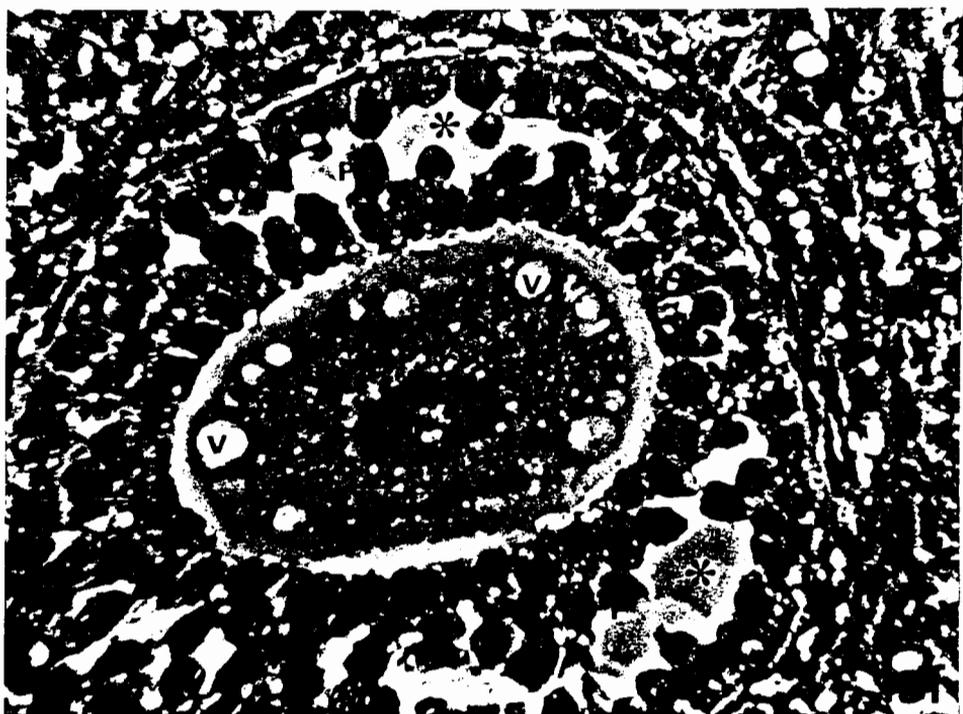
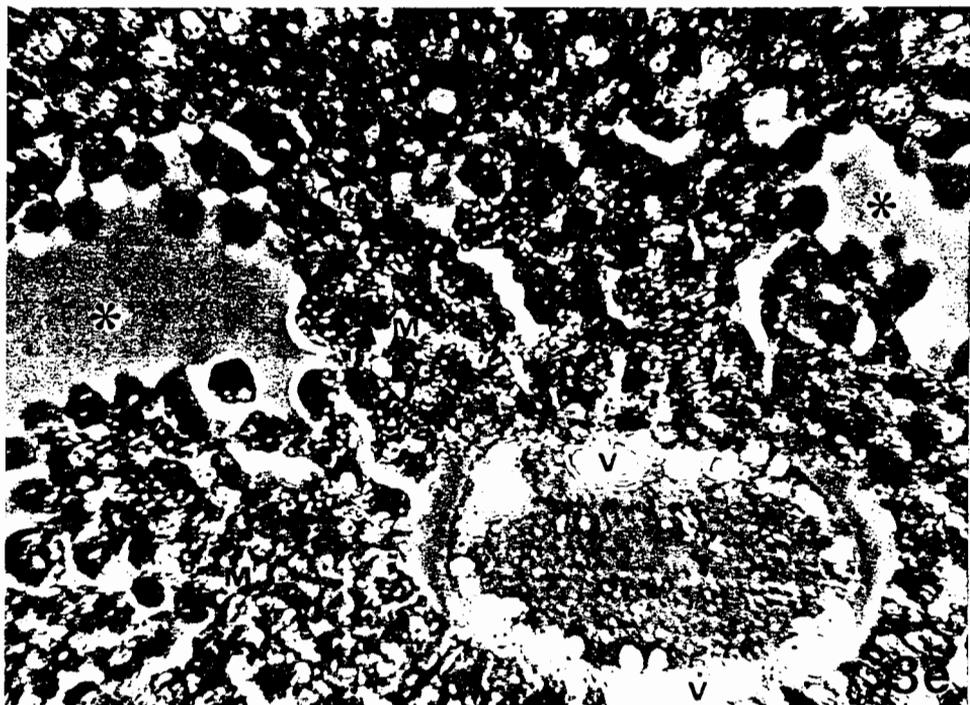


FIG. 3e:

FOLICULO EN ESTADO AVANZADO DE DEGENERACION, CON MUCHAS CELULAS NECROTICAS Y CROMATINA VACUOLADA. Y LA FORMACION TEMPRANA DE UN ANTRO.

FIG. 3f:

FOLICULO EN ESTADO PRIMARIO DE DEGENERACION POR LA FORMACION PRECOZ DEL ANTRO, ALGUNAS CELULAS PICNOTICAS Y CROMATINA CON VACUOLAS.

TABLA No. 1

## PARAMETROS MORFOMETRICOS DE LOS OVARIOS DE LAS RATONAS ESTUDIADAS BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

TRATAMIENTO	No. DE OVARIOS	ANCHO (mm)	LARGO (mm)
CONTROL	8	2.4 ± 0.4	3.4 ± 0.2
APAREADAS	8	2.6 ± 0.4	3.6 ± 0.3
INDUCIDAS ( 48 Hrs )	28	2.9 ± 0.3	4.2 ± 0.4
INDUCIDAS ( 72 Hrs )	8	2.6 ± 0.2	4.0 ± 0.2

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de las dimensiones de los ovarios expresados en mm.

TABLA No. 2

PROMEDIO DE OVULOS, PRO-EMBRIONES Y FOLICULOS PERSISTENTES OBTENIDOS DE LAS RATONAS TRATADAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES.

TRATAMIENTO	O V U L O S			P R O - E M B R I O N E S			FOLICULOS	
	Mad.	Inm.	TOTAL	2 cel.	4 cel.	TOTAL	PERSISTENTES	TOTAL
CONTROL ( 4 )	5 ± 6	0	19 <sup>a</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	108 ± 55	434 <sup>c</sup>
APAREADAS ( 4 )	0	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0 <sup>b</sup>	204 ± 63	815 <sup>c</sup>
INDUCIDAS 48 Hrs ( 14 )	2 ± 4	2 ± 3	63 <sup>a</sup>	14 ± 13	1 ± 3	221 <sup>b</sup>	196 ± 96	2737 <sup>c</sup>
INDUCIDAS 72 Hrs ( 4 )	2 ± 3	6 ± 5	30 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.5	2 ± 3	10 <sup>b</sup>	127 ± 31	509 <sup>c</sup>

a,b,c) Número total de óvulos, pro-embriones y folículos persistentes respectivamente observados en los ovarios de las ratonas de cada grupo.

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de los óvulos, pro-embriones y folículos persistentes observados. Los valores en paréntesis indican el número de ratonas en cada grupo.

TABLA No. 3

NUMERO DE FOLICULOS PERSISTENTES OBSERVADOS EN LOS OVARIOS IZQUIERDO Y DERECHO POR RANGOS DE TAMANO DE CADA UNA DE LAS RATONAS CONTROL ESTUDIADAS.

RANGO (nm $\beta$ )	OVARIO	RATONAS				TOTAL DE FOLICULOS POR RANGO	
		1	2	3	4		
20 - 50	A	1	-	6	2	9	26
	B	1	-	16	-	17	
51 - 100	A	14	8	13	10	45	82
	B	4	5	26	2	47	
101 - 150	A	19	14	26	7	66	123
	B	15	11	22	9	57	
151 - 200	A	6	18	15	11	50	87
	B	10	8	17	2	37	
201 - 250	A	4	6	7	9	26	51
	B	3	3	14	5	25	
251 - 300	A	4	4	-	1	9	24
	B	5	1	7	2	15	
301 - 350	A	-	4	8	1	13	27
	B	5	2	4	3	14	
351 - 400	A	1	1	5	-	7	9
	B	-	1	1	-	2	
401 - 450	A	-	-	1	2	3	4
	B	-	-	1	-	1	
451 - 500	A	-	-	-	-	0	0
	B	-	-	-	-	0	
501 - 550	A	-	-	-	-	0	1
	B	-	-	1	-	1	
551 - 600	A	-	-	-	-	0	0
	B	-	-	-	-	0	
TOTAL DE FOL POR OVARIO	A	49	55	81	43	228	434
	B	43	31	109	23	206	

A = Ovario Izquierdo

B = Ovario Derecho

TABLA No. 4

NUMERO DE FOLICULOS PERSISTENTES OBSERVADOS EN LOS OVARIOS IZQUIERDO Y DERECHO POR RANGOS DE TAMAÑO EN CADA UNA DE LAS RATONAS APAREADAS ESTUDIADAS.

RANGO (nm $\phi$ )	OVARIO	1	2	3	4	TOTAL DE FOLICULOS POR RANGO	
20 - 50	A	-	6	-	9	15	32
	B	-	4	4	9	17	
51 - 100	A	8	27	6	28	69	154
	B	13	22	17	33	85	
101 - 150	A	30	47	8	36	121	236
	B	24	29	24	38	115	
151 - 200	A	14	17	13	23	67	157
	B	22	22	20	26	90	
201 - 250	A	7	13	9	13	42	95
	B	13	11	11	18	53	
251 - 300	A	10	6	5	14	35	70
	B	12	5	9	9	35	
301 - 350	A	6	2	8	9	25	51
	B	3	2	11	10	26	
351 - 400	A	-	1	-	3	4	14
	B	-	1	2	7	10	
401 - 450	A	-	-	-	2	2	4
	B	-	1	-	1	2	
451 - 500	A	-	-	2	-	2	2
	B	-	-	-	-	0	
501 - 550	A	-	-	-	-	0	0
	B	-	-	-	-	0	
551 - 600	A	-	-	-	-	0	0
	B	-	-	-	-	0	
TOTAL DE FOL. POR OVARIO	A	75	119	51	137	382	815
	B	87	97	98	151	433	

A = Ovario Izquierdo

B = Ovario Derecho

TABLA No. 5

NUMERO DE FOLICULOS PERSISTENTES OBSERVADOS EN LOS OVARIOS IZQUIERDO Y DERECHO POR RANGOS DE TAMAÑO EN CADA UNA DE LAS RATONAS HORMONALMENTE INDUCIDAS Y SACRIFICADAS A LAS 48 HRS.

RANGO (nm Ø)	OVARIO	RATONAS														TOTAL DE FOL. POR RANGO	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
20 - 50	A	11	2	2	29	14	2	10	10	2	10	8	-	1	-	109	187
	B	2	12	3	22	-	10	6	9	7	3	4	-	-	-	78	
51 - 100	A	32	14	12	36	52	12	20	24	11	20	31	-	6	1	271	528
	B	22	21	8	63	5	22	14	24	37	14	18	6	2	1	257	
101 - 150	A	59	28	11	38	49	18	26	42	9	27	42	10	6	13	378	750
	B	30	42	24	69	10	27	21	26	36	22	35	13	9	8	372	
151 - 200	A	24	19	8	29	47	15	20	26	8	20	23	11	8	6	264	541
	B	26	29	15	48	15	22	15	16	19	13	33	15	5	6	277	
201 - 250	A	13	7	7	18	26	5	16	22	6	8	12	8	3	6	157	320
	B	15	19	9	27	9	7	14	15	12	9	13	6	5	3	163	
251 - 300	A	13	8	7	3	9	6	1	8	-	11	8	3	2	1	80	164
	B	12	6	4	8	3	5	3	4	13	8	10	4	3	1	84	
301 - 350	A	4	11	5	3	10	6	3	4	6	8	7	3	1	-	71	129
	B	4	3	2	7	2	8	1	5	7	6	8	2	1	2	58	
351 - 400	A	1	3	2	2	1	6	1	1	2	3	5	1	-	2	30	60
	B	4	2	2	2	-	2	2	-	6	3	3	-	4	-	30	
401 - 450	A	-	3	-	1	-	2	3	3	1	1	-	1	-	16	34	
	B	2	2	-	2	1	-	1	2	-	2	3	2	1	-	18	
451 - 500	A	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	2	3	1	1	11	18
	B	2	-	-	2	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	7	
501 - 550	A	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
551 - 600	A	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	
TOTAL DE FOL. POR OVARIO	A	157	95	54	159	211	72	108	140	46	109	139	39	29	32	1390	2737
	B	119	136	67	250	45	104	79	101	138	80	128	49	30	21	1547	

A = Ovario Izquierdo

B = Ovario Derecho

TABLA No. 6

NUMERO DE FOLICULOS PERSISTENTES OBSERVADOS EN LOS OVARIOS IZQUIERDO Y DERECHO POR RANGOS DE TAMAÑO EN CADA UNA DE LAS RATONAS HORMONALMENTE INDUCIDAS Y SACRIFICADAS A LAS 72 HRS.

RANGO (nm $\phi$ )	OVARIO	RATONAS				TOTAL DE FOL. POR RANGO	
		1	2	3	4		
20 - 50	A	6	-	2	1	9	15
	B	2	2	1	1	6	
51 - 100	A	13	2	12	14	41	102
	B	20	8	11	22	61	
101 - 150	A	14	18	11	15	58	138
	B	20	14	19	27	80	
151 - 200	A	6	5	7	9	27	90
	B	16	17	9	21	63	
201 - 250	A	7	9	9	7	32	79
	B	17	8	7	15	47	
251 - 300	A	1	3	7	4	15	41
	B	7	6	6	7	26	
301 - 350	A	-	-	2	-	2	17
	B	2	3	-	10	15	
351 - 400	A	1	2	-	1	4	10
	B	-	2	2	2	6	
401 - 450	A	-	-	-	3	3	4
	B	-	-	-	1	1	
451 - 500	A	-	-	-	1	1	6
	B	3	-	1	1	5	
501 - 550	A	-	-	-	1	1	3
	B	-	-	1	1	2	
551 - 600	A	-	-	-	2	2	4
	B	-	-	-	2	2	
TOTAL DE FOL. POR OVARIO	A	48	39	50	58	195	509
	B	87	60	57	110	314	

A = Ovario Izquierdo

B = Ovario Derecho

TABLA No. 7

NUMERO TOTAL DE FOLICULOS PERSISTENTES OBSERVADOS EN LOS DIFERENTES RANGOS DE TAMARO EN LAS RATONAS CONTROL, APAREADAS Y HORMONALMENTE INDUCIDAS (SACRIFICADAS A LAS 48 Y 72 HRS.)

RANGO (nm Ø)	T R A T A M I E N T O			
	CONTROL	APAREADAS	INDUCIDAS 48 Hrs.	INDUCIDAS 72 Hrs
20 - 50	26	32	187	15
51 - 100	82	154	528	102
101 - 150	123	236	750	138
151 - 200	87	157	541	90
201 - 250	51	95	320	79
251 - 300	24	70	164	41
301 - 350	27	51	129	17
351 - 400	9	14	60	10
401 - 450	4	4	34	4
451 - 500	0	2	18	6
501 - 550	1	0	3	3
551 - 600	0	0	3	4
TOTAL	434 (4)	815 (4)	2737 (14)	509 (4)

En los paréntesis se indica el número de animales estudiados en cada caso.

TABLA No. 8

NUMERO DE FOLICULOS NORMALES Y ATRESICOS OBSERVADOS POR RATONA BAJO LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ESTUDIADOS.

TRATAMIENTO	No. DE RATONA	FOLICULOS		TOTAL
		NORMALES	ATRESICOS	
CONTROL	4	21 ± 12	87 ± 46	108 ± 55
APAREADAS	4	52 ± 18	151 ± 44	204 ± 63
INDUCIDAS 48 Hrs	14	48 ± 43	148 ± 65	196 ± 96
INDUCIDAS 72 Hrs	4	13 ± 6	114 ± 25	127 ± 31

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de los folículos ováricos por ratona.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hafez E.S.E. (1986). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (4a. Ed.) Editorial Interamericana.
2. Lunenfeld B., Kraiem Z., and Eshkol Aliza (1975). The function of the growing follicle. J. Reprod. Fert. 45, 567-574.
3. Peluso J.J., Stenger R.W. (1978) Role of FSH in regulating granulosa cell division and follicular atresia in rats. J. Reprod. Fertil. 54 (2) 275-278.
4. Peters Hannah (1969) The development of the mouse ovary from birth to maturity. Act. Endocrinology 62; 98-116.
5. The Jackson Laboratory (1966); Biology of the Laboratory Mouse Cap. 11 Reproduction.
6. Peluso J.J., Stenger R.W. and Hafez E.S.E. (1977). Sequential changes associated with the degeneration of preovulatory rat follicles. J. Reprod. Fertil. 49: 215-218.
7. Varma S.K. and Guraya S.S. (1973) Histochemical observations on the follicular atresia in the Garden Lizard Ovary. Act. Morphol. Nerl. Scand. 11: 241-252.
8. Saidapur S.K. and Nadkarni V.B. (1973) Follicular atresia in the Ovary of the Rana Cyanoplystis (Schmider) Act. Anat. (Basel).

9. Carson R., Finaly J., Mattner Ph., and Brown B.; - -  
1986) Relative level of the thecal blood flow in  
atretic and non-atretic ovarial follicles of the  
conscious sheep. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 64  
(pt 4) 381-387.
10. Byskov A.G. (1974) Cell kinetic studies of follicular  
atresia in the Mouse Ovary. J. Reprod. Fertil. 37:  
277-285.
11. Gondos Bernard (1982) Ultrastructure of follicular in  
the rat. Gamete Research 5; 199-206.
12. Hoffman D.A.; Tonetta S.A. and di Zerega G.S. Ovarian  
hyperstimulation in normally menstruating women results  
in asynchronous follicular maturation and dysmature  
follicles. In: The control of follicle development,  
ovulation and luteal function: Lessons from In Vitro  
fertilization. Serono Symposia Publications from  
Raven Press New York 1987 pp. 9-20.
13. Uilenbroek J. TH., Woutersen P.J.A. and Schoot P(1980)  
Atresia of preovulatory follicles: Gonadotropin  
bindings and steroidogenic activity. Biol. Reprod. 23;  
219-229.
14. Hirshfield Anne N. (1988) Size-frecuency analysis of  
atresia in cycling rats. Biol. Reprod. 38; 1181-1188.
15. Meuli L. Erb., Lacker H.M., Tabiu R.B. (1987) Experi-  
mental evidence supporting a mathematical theory of  
the physiological mechanism regulating follicle  
development and ovulation number. Biol. Reprod. 37

589-594.

16. Hafez E.S.E. (1984) *Transplantes de embriones* Cap. 29. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (4a. Ed.) Edit. Interamericana.
17. Neal P., Challoner S. (1975) The development of the mouse ovary and its response to exogenous gonadotropins *J. Reprod. Fertil.* 45; 449-454.
18. Montgomery R., Dryer R.L., Conway T.H. and Spector A. (1974) *Hormonal regulation in Biochemistry (a case-oriented approach)* The C.V. Mosby Company Saint Louis.
19. Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers B.J. (1976) The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15; 471-476.
20. Zetterqvist A.H. (1956) The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis Karolinska Institutet, Stockholm.
21. Histopatology Laboratories Armed Forces Institute of Pathology Washington C.D. 20305.
22. Menzies D.W. (1962) Paraffin-beeswax, stearic acid: An embedding mass for thin sections; *Stain Tech* 37: 235-238
23. Peters H., Byskov A.G. Himmelstein-Braw R. and Faber M (1975) Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fert.* 45: 559-566.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

Expediente .....

Número 624/89 .....

SRITA. MAGDALENA SANCHEZ RESENDIZ  
 P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ATRESIA Y PERSISTENCIA FOLICULAR EN RATONAS HORMONALMENTE SOBRESTIMULADAS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega.

A T E N T A M E N T E  
 "PIENSA Y TRABAJA"  
 Guadalajara, Jal., Junio 9 de 1989  
 EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.



**FACULTAD DE CIENCIAS**

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director de Tesis.-Pte.  
 c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Guadalajara, Jal., Septiembre 11 de 1989.

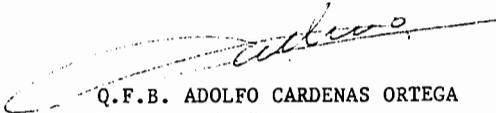
ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS  
Director de la Facultad de Ciencias  
Universidad de Guadalajara  
P r e s e n t e.

Por medio de la presente comunico a usted que la C. MAGDALENA SANCHEZ RESENDIZ, Pasante de la Licenciatura en Biología, con número de registro 080497091, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: ATRESIA Y PERSISTENCIA FOLICULAR EN RATONAS - HORMONALMENTE SOBRE ESTIMULADAS.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo y no encuentro ningún inconveniente para que se imprima, solicitándole permita se realicen los trámites necesarios para su examen correspondiente.

Quedo de usted como su Seguro Servidor.

A t e n t a m e n t e ,



Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA  
Director de Tesis