

Análisis estructural e inmunohistoquímico de la atresia folicular de *Vanellus chilensis* (Charadriidae) e *Himantopus melanurus* (Recurvirostridae)

Structural and immunohistochemical analysis of the follicular atresia of *Vanellus chilensis* (Charadriidae) and *Himantopus melanurus* (Recurvirostridae)

Mirian Bulfon¹ y Noemí Bee de Speroni¹

¹ Departamento de Diversidad Biológica y Ecología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Correspondencia: Cátedra de Anatomía Comparada. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Avda. V. Sársfield 299, Córdoba CP-5000, República Argentina. Email Mirian Bulfon: mbulfon@com.uncor.edu

Resumen

Se estudiaron los aspectos estructurales e inmunohistoquímicos de la atresia folicular en el ovario de *Vanellus chilensis* e *Himantopus melanurus*. Fueron utilizadas cinco hembras adultas de cada especie en fase de recrudescencia gonadal; las gónadas se extrajeron, pesaron, fijaron y procesaron con la técnica de inclusión en parafina. Las secciones se colorearon con hematoxilina-eosina, tricrómico de Mallory, reacción nuclear de Feulgen y para la marcación de células apoptóticas se usó la técnica de TUNEL. De acuerdo a las características morfohistológicas de los folículos atrésicos analizados, en ambas aves fueron identificados dos tipos de atresia: a) no bursting o pared folicular intacta que comprende la atresia lipoidal (ovocitos primordiales) y lipoglandular (folículos previtelogénicos y vitelogénicos pequeños) y b) bursting con ruptura de la pared folicular (folículos vitelogénicos mayores de 500 µm). En la fase gonadal estudiada se observaron folículos atrésicos lipoidales y lipoglandulares, siendo escasos los folículos bursting. La apoptosis, se detectó al inicio de la involución en las células granulosa de los folículos atrésicos lipoglandulares con la reacción de Feulgen y se corroboró con la técnica de TUNEL. Por el contrario los estadios finales de los diferentes tipos involutivos de las dos especies se caracterizaron por una notoria necrosis. En base a estos resultados se infiere que, la muerte celular es un mecanismo fisiológico normal en la remodelación del ovario de las aves estudiadas y que los procesos de apoptosis y necrosis están estrechamente relacionados con la involución de los folículos ováricos de estas aves.

Palabras claves: Ovario, estructura e inmunohistoquímica, regresión folicular, muerte celular.

Abstract

We studied the structural and immunohistochemical aspects of the follicular atresia and interpreted the process of cell death in the ovary of *Vanellus chilensis* and *Himantopus melanurus*. We used five female adults of each species at the stage of gonadal recrudescence. The gonads were removed, weighed, fixed and processed with the technique of inclusion in paraffin. The sections were stained with Hematoxylin - Eosin, Trichromic Mallory, Nuclear Reaction Feulgen. The technique TUNEL was employed for marking apoptotic cells. According to the morphohistologic characteristics of analyzed atretic follicles we identified two kinds of atresia in both bird species: a) Non-bursting atresia, where follicular walls remain intact, including lipid atresia of primordial oocytes and lipid glandular atresia of previtellogenic and small vitellogenic follicles and b) Bursting atresia, characterized by the breakdown of the follicular walls of vitellogenic follicles higher than of 500 µm. In the gonadal phase, we observed lipid and lipid-glandular follicles, while bursting follicles were scarce. Apoptosis was detected at the start of involution in the granulosa cells of the lipid glandular follicles by employing the nuclear reaction of Feulgen, and was corroborated with the TUNEL technique. However, a notorious necrosis marked the final stages of the different types of involutive follicles of the two species. Based on these results, we infer that cell death is a normal physiological mechanism in the remodeling of ovaries in *V. chilensis* and *H. melanurus* and that the processes of apoptosis and necrosis are closely related to the involution of the ovarian follicles of these birds.

Keyword: Ovary, structure and immunohistochemical, follicular regression, cell death.

Presentado: 12/12/2008
Aceptado: 30/08/2009
Publicado online: 12/01/2010

Introducción

El ovario de las aves es una estructura compleja constituida por numerosos folículos en diferentes estadios de desarrollo, cuya principal función es la de proveer, desarrollar y optimizar el número de óvulos viables que asegurarán la propagación de la especie.

Gran cantidad de folículos inician su crecimiento y diferenciación pero sólo unos pocos llegan a ovular debido a que la mayoría degeneran por atresia folicular, este es un proceso degenerativo normal en el ovario de las aves y juega un importante papel en el balance, entre la proliferación celular, el desarrollo de los folículos y la involución de los mismos. Con distinta intensidad, el mecanismo regresivo se produce durante todo el ciclo reproductivo aviario (Gilbert et al. 1983; Forgó et al. 1988; Bulfon y Bee de Speroni 2001, 2003; Bulfon 2008).

El papel que desempeña la atresia folicular en la economía reproductiva de las aves, y la naturaleza de los factores que la regulan aún no han sido explicadas totalmente. Gilbert et al. (1983), analizando el ciclo ovulatorio de *Gallus domesticus*,

postularon que la atresia estaría involucrada en la jerarquía folicular del ovario, mientras Forgó et al. (1988) mencionan que son diversos los factores que intervienen en la regresión folicular de *Anser anser*.

Las características del proceso de atresia folicular fue extensamente estudiado sólo en aves domésticas (Gilbert et al. 1983; Forgó et al. 1988; Erches 1990; Kovács et al. 1992), siendo en especies silvestres escasa la información de la regresión folicular (Gupta et al. 1988; Guraya 1989). No obstante, Bulfon y Bee de Speroni (2003) estudiaron aspectos estructurales del ovario de *Spheniscus magellanicus* y Bulfon (2008) analizó las características ultraestructurales de los folículos ováricos atrésicos, así como también las variaciones histoquímicas que experimentan las sustancias lipídicas durante el proceso regresivo en *Myiopsitta monachus* y *Zenaidura macroura*, aves silvestres que comprometen la producción agrícola (Pergolani de Costa 1961; Bucher et al. 1977).

Un proceso estrechamente relacionado a la involución folicular es el de muerte celular que representa la pérdida irreversible

de las funciones celulares y constituye un mecanismo normal para el mantenimiento, regeneración y crecimiento de tejidos y órganos; asimismo es parte del proceso de maduración y envejecimiento celular (Wyllie et al. 1980).

En la atresia folicular, la muerte celular se expresa en dos procesos diferentes: necrosis y apoptosis. La primera se manifiesta en los seres vivos por una alteración provocada por un fenómeno patológico, asociada a condiciones fisiológicas extremas, cambios de temperatura en el medio ambiente y exposición a toxinas o injurias severas en los tejidos, entre otras. Por el contrario la apoptosis es un proceso fisiológico normal, programado genéticamente y parcialmente conservado a través de la evolución de los vertebrados; siendo una de sus funciones la activa participación en la remodelación de los tejidos adultos (Steller 1995; Thompson 1995; Bulfon 2008).

Considerando que aún es poco conocida la implicancia de la apoptosis en el ovario de las aves, y sobre todo en el proceso de atresia folicular, en este trabajo se analizaron las características estructurales e inmunohistoquímicas de la gónada femenina a los fines de interpretar el mecanismo de muerte celular en *Vanellus chilensis* (Charadriidae) e *Himantopus melanurus* (Recurvirostridae) ambas aves representantes de la Fauna Neotropical y ampliamente distribuidas en Sudamérica.

Materiales y métodos

El material biológico provino de cinco hembras adultas de *V. chilensis* e igual número de *H. melanurus*, capturadas entre agosto y noviembre de los años 2006 y 2007, en el sistema del Arroyo Chucul, (33°07'52" S; 63°35'05" W), en Córdoba, Argentina.

En el laboratorio, las aves fueron anestesiadas y perfundidas intracardiácamente con formalina neutra 4%, luego se pesaron y disecaron. La ausencia de la Bursa de Fabricius, observada bajo microscopio estereoscópico (0,7 x), se utilizó como indicador del estado adulto de las aves (Wight 1959). Las gonadas completas fueron removidas y medidas con un calibrador vernier (0,05 mm) y pesaron con una balanza de precisión (0,1 mg).

Cuatro muestras de ovario de cada individuo, 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 y tricrómico de Mallory (Romeis 1928). Para detectar el ADN en el núcleo de las células foliculares tanto de los folículos en desarrollo como de los atrésicos se utilizó la reacción de Feulgen (Pearse 1960). Los folículos atrésicos se distinguieron de los folículos normales y postovulatorios de acuerdo al criterio empleado por Bulfon y Bee de Speroni (2001, 2003). Todos los cortes histológicos fueron fotografiados.

Para revelar las células apoptóticas se utilizó una muestra de ovario de *V. chilensis* e igual número de *H. melanurus* ambas en fase de recrudescencia gonadal, las que se procesaron de acuerdo a la técnica que aplica los fundamentos del método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labelling) descrito por Gavrieli et al. (1992) y se utilizó el kit *In situ cell death detection*, POD (Boehringer Mannheim). Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% y embebieron en parafina. Las secciones de 4 a 6 µm se adhirieron a portaobjetos pretratados con una solución acuosa al 0,01% de poly-L-lysina (Sigma Co., St. Louis, MO) y se desparafinaron, hidrataron y lavaron dos veces con PBS. Luego se incubaron con

proteína K (20 µg/mL en tampón fosfato 0,041M pH 7,5) durante 15 minutos y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, los cortes fueron incubados en una mezcla conteniendo la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), dUTP unida a una molécula de detección como digoxigenina y dATP en cámara húmeda a 37 °C durante una hora y luego se lavó con PBS. En los controles se omitió la enzima TdT. Las secciones histológicas se observaron con un microscopio óptico equipado con un accesorio de fluorescencia de luz y filtros especiales y fueron fotografiadas.

Resultados

Aspectos estructurales de la atresia folicular en fase de recrudescencia gonadal

De acuerdo al tamaño y madurez de los mismos, como así también a los cambios estructurales detectados en estos folículos durante el proceso regresivo, se identifican dos tipos de atresia.

1) Atresia no *bursting* (las paredes foliculares se mantienen intactas y el vitelo se absorbe *in situ*). Comprende:

a) Atresia lipoidal. Es típica de los Ovocitos primordiales. Un signo evidente del inicio de la involución es la separación 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, con aspecto de "burbuja", de la cual deriva el nombre de esta regresión folicular (Fig. 1).

b) Atresia lipoglandular. Este proceso involutivo comprende a los folículos previtelogénicos y folículos vitelogénicos blancos pequeños entre 1500 y 2000 µm, y se caracteriza por la fagocitosis del ovoplasma *in situ*. Macroscópicamente los folículos atrésicos lipoglandulares se observan deformados, de tonalidad grisácea y con una notoria irrigación sanguínea en las envolturas foliculares. Las observaciones histológicas de los folículos atrésicos lipoglandulares permiten diferenciar en este proceso regresivo cuatro estadios de involución, muy similares en ambas especies aviarias.

Estadio 1: En el inicio, caracterizada por una marcada hiperplasia del epitelio folicular y fragmentación de la zona radiada. Los signos de atresia también se evidencian en el

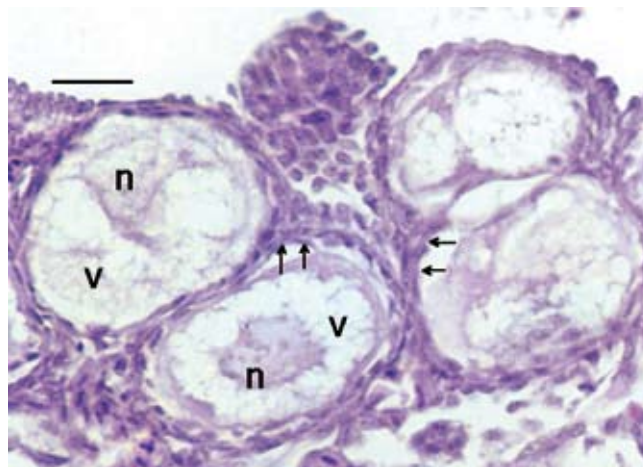


Figura 1. Ovario de *Vanellus chilensis*. Atresia lipoidal de los ovocitos primordiales. Las flechas señalan las desorganizadas células foliculares mientras que las abundantes vacuolas (v) le confieren un aspecto lipóide al ovoplasma. Núcleo (n). H/E. Barra: 20 µm.

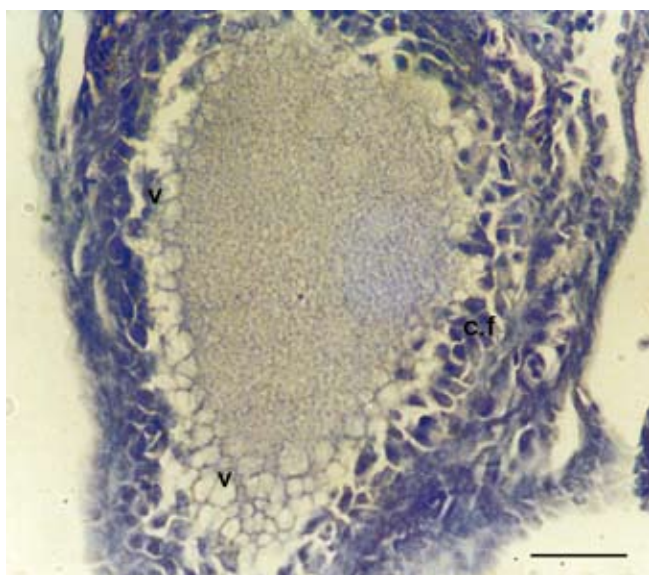


Figura 2. Ovario de *Vanellus chilensis*. Inicio de atresia lipoglandular en un folículo previtelogénico. Notoria hiperplasia de las células foliculares (c.f) y presencia de vacuolas (v) en la zona cortical del ovoplasma. H/E. Barra 150 μ m.

ovoplasma por la presencia de numerosas vacuolas de diferentes tamaños (Fig. 2).

Estadio 2: La hiperplasia del epitelio folicular es muy evidente, las células foliculares exhiben núcleos picnóticos y el ovoplasma disminuye de tamaño a causa de la contracción de los folículos atrésicos (Fig. 3). En este estadio regresivo, la teca interna se hipertrofia y las células presentan abundantes vacuolas, en tanto la teca externa aún no muestra cambios importantes y se mantiene fibrosa.

Estadio 3: Las células foliculares se unen débilmente entre ellas y presentan gran cantidad de vacuolas que les provee al folículo una apariencia glandular característica. Estas células se entremezclan con elementos de tejido conectivo y son

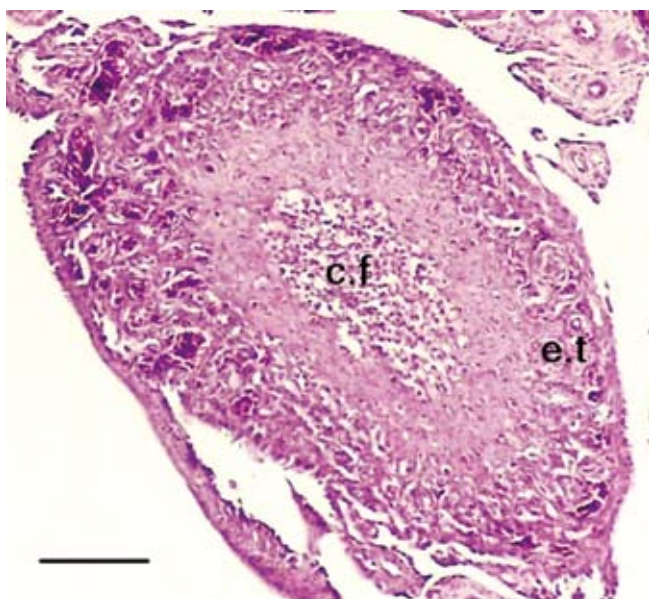


Figura 3. Ovario de *Himantopus melanurus*. Folículo vitelogénico blanco menor de 2 mm en estadio 2 de atresia lipoglandular. En el centro del folículo atrésico se visualizan las células foliculares (c.f) rodeadas de las envolturas tecales (e.t) notoriamente hipertrofiadas. H/E. Barra: 200 μ m.

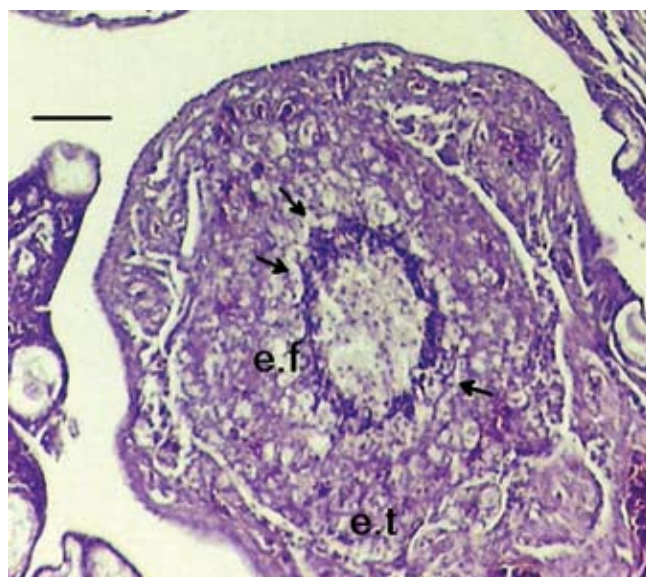


Figura 4. Ovario de *Himantopus melanurus*. Folículo vitelogénico blanco menor de 2 mm en estadio 3 de atresia lipoglandular. Se incrementan las vacuolas (flechas) en las células del epitelio folicular (e.f) y el folículo toma un aspecto glandular en este estadio regresivo. Envolturas tecales (e.t). H/E. Barra: 200 μ m.

observadas de color azul con tricómico de Mallory. Sólo quedan restos del ovoplasma debido a que sus componentes son gradualmente fagocitados por las células foliculares. Las hipertrofiadas envolturas tecales son notorias en este estadio, la teca interna presenta abundante tejido conectivo que se dispone alrededor del folículo involutivo mientras que la externa aún es muy fibrosa (Fig. 4).

Estadio 4: Durante el estadio atrésico más avanzado, los folículos disminuyen considerablemente de tamaño y el tejido conectivo cubre prácticamente toda la superficie folicular. Al final de este estadio regresivo, el aspecto de los folículos es similar a una cicatriz de tejido conectivo intensamente azulada con tricómico de Mallory reduciéndose paulatinamente de tamaño hasta su completa reabsorción en el parénquima cortical del ovario.

2) Atresia *bursting* o por ruptura de la pared folicular

Este tipo de involución es típica de los folículos vitelogénicos mayores de 2 mm. El examen de las secciones histológicas del ovario de ambas especies de aves, coloreadas con hematoxilina-eosina revela que, en los primeros estadios de involución de los folículos atrésicos *bursting* de las dos especies de aves, el hipertrofiado epitelio folicular ocupa paulatinamente el área de la cavidad folicular. Los núcleos de las células foliculares son muy basófilos y con escasa actividad mitótica, mientras que en el citoplasma se destacan numerosas vacuolas.

Con el avance de la atresia se inicia la ruptura del epitelio folicular, que culmina con la formación de una apertura simple y pequeña en cualquier zona de la superficie folicular exceptuando el área del estigma; este proceso afecta primero a las células granulosa y a *posteriori* a las envolturas tecales (Fig. 5). A través de la zona de ruptura de las paredes foliculares, el ovoplasma es liberado al exterior del folículo sobre el estroma del ovario o en la cavidad peritoneal donde la masa ectópica será digerida posteriormente (Fig. 6). Finalmente la cavidad central del FAB es ocupada por células muy vacuoladas, similares a las células luteales, gran cantidad de fibroblastos y fibras colágenas.

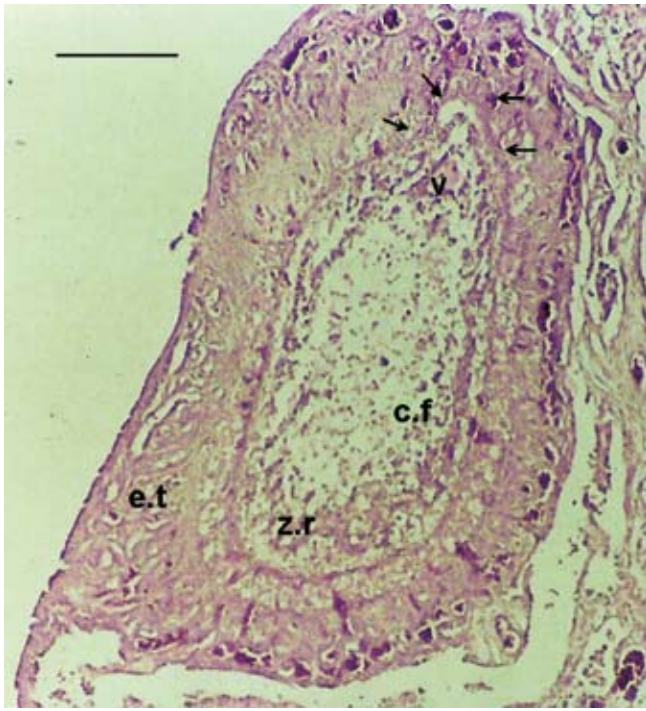


Figura 5. Ovario de *Himantopus melanurus*. Atresia *bursting* o por ruptura de las paredes foliculares de un folículo vitelogénico amarillo mayor de 2 mm. Las flechas indican el inicio de la abertura característica de este tipo involutivo. Se observan células foliculares (c.f.) necrosadas y restos de la zona radiada (z.r). Envolturas tecales (e.t); vitelo (v). H/E. Barra 300 µm.

Características morfológicas de las células apoptóticas

Algunas de las células apoptóticas identificadas en el epitelio folicular de los folículos atrésicos no *bursting* (lipoglandular mayor de 2 mm, exhiben con la tinción hematoxilina y eosina y la coloración nuclear de Feulgen, núcleos picnóticos con cromatina dispuesta en las márgenes del mismo, mientras que otras, núcleos densamente teñidos. Sólo ocasionalmente se observan restos celulares con pequeños fragmentos nucleares en su interior o cuerpos apoptóticos (Fig. 7).

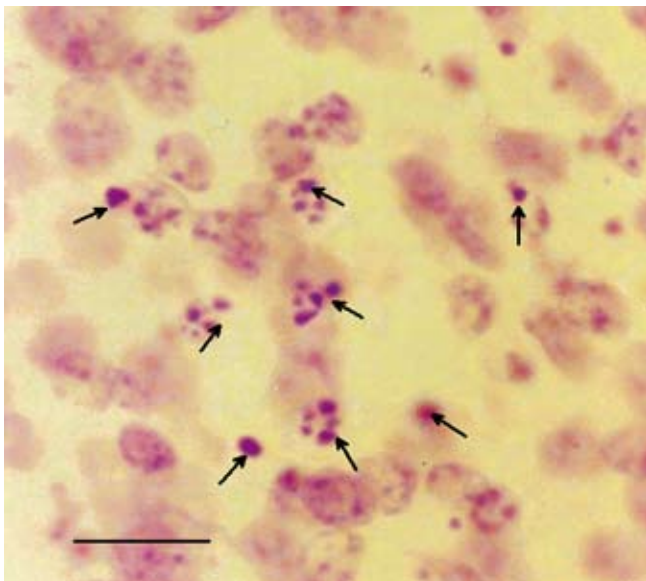


Figura 7. Ovario de *Vanellus chilensis*. Las flechas indican la presencia de células apoptóticas en el epitelio folicular de un folículo atrésico lipoglandular. Coloración nuclear de Feulgen. Barra 16 µm.

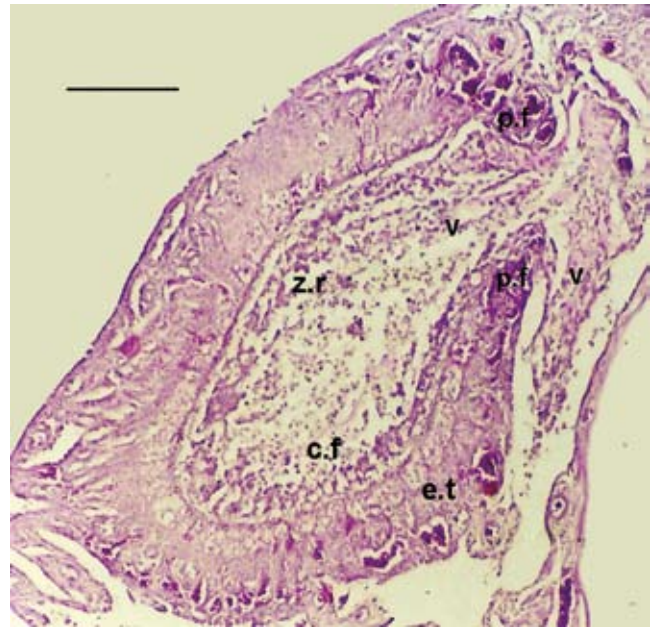


Figura 6. Ovario de *Himantopus melanurus*. Atresia *bursting* de un folículo vitelogénico amarillo mayor de 2 mm. A través de la zona de ruptura de la pared folicular (p.f) el vitelo (v) es liberado fuera del folículo. Células foliculares (c.f); zona radiada (z.r); envolturas tecales (e.t) H/E. Barra: 300 µm.

Valoración de la apoptosis por la técnica de TUNEL

Las marcaciones realizadas en los folículos ováricos atrésicos de *V. chilensis* e *H. melanurus* revela que, las células apoptóticas o los cuerpos apoptóticos, se observan en ambas especies, durante los primeros estadios de atresia lipoglandular en los folículos de aproximadamente 2 mm. Estas células en diferentes estadios de muerte celular programada se localizan en forma aislada o formando pequeños grupos en el epitelio folicular junto a células foliculares de apariencia normal (Fig. 8).

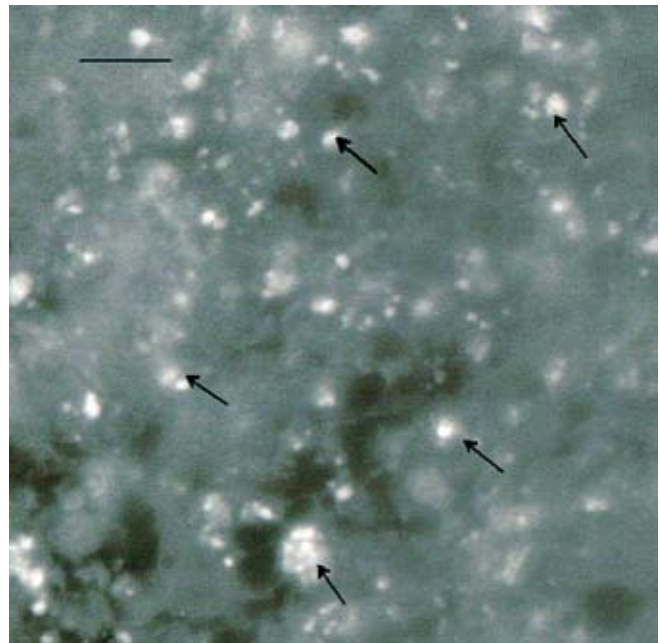


Figura 8. Ovario de *Vanellus chilensis*. Identificación de apoptosis mediante inmunofluorescencia en el epitelio folicular de un folículo atrésico lipoglandular. Las flechas indican las células con núcleo marcado positivamente (ADN-fragmentado-TUNEL). Barra 16 µm.

Cabe acotar que, tanto en *V. chilensis* como en *H. melanurus* no se observan células apoptóticas en las envolturas tecales. La mayor densidad de células apoptóticas se localizó en los extremos apicales de los folículos atrésicos lipoglandulares, de las dos especies analizadas.

Características morfológicas de la necrosis en los folículos atrésicos lipoglandulares y *bursting*

En los últimos estadios de involutivos de los folículos no *bursting* y *bursting* de las dos especies de aves, una notoria necrosis afecta la organización de los folículos atrésicos. Este tipo de muerte celular se evidencia con el microscopio óptico por la presencia de abundantes vacuolas y gotas de aspecto lipídico en las células foliculares. Además de estas alteraciones morfológicas también se modifica el patrón normal de afinidad tintorial, a los distintos colorantes empleados (Fig. 5).

Discusión

El análisis estructural del ovario de *V. chilensis* e *H. melanurus* en fase de recrudescencia gonadal, permite distinguir dos procesos complementarios uno de desarrollo y diferenciación folicular y el otro de atresia folicular que lleva a la involución de una gran cantidad de folículos ováricos, siendo muy escasos aquellos seleccionados para el crecimiento, madurez y ovulación.

La atresia folicular es más frecuente en el ovario de las aves que en el de los reptiles y según Gupta y Maití, (1986) interviene en la regulación de la cantidad de folículos maduros en cada ciclo para mantener, de ese modo, el patrón normal de postura de cada especie.

Notables cambios estructurales se detectan en las envolturas foliculares y en el ovoplasma de los folículos atrésicos de *V. chilensis* e *H. melanurus* al inicio del proceso regresivo. Un importante papel es el desempeñado por las células foliculares las cuales fagocitan los diversos componentes ovoplásmicos, mientras que, las células tecales realizarían una función menos relevante en la remoción del vitelo. De acuerdo a la modalidad involutiva se diferencian dos tipos de regresión: una es la atresia no *bursting*, cuyo vitelo se digiere en el interior del folículo y la otra es la atresia *bursting* o por ruptura, así denominada, porque a través de una abertura el vitelo es liberado a la cavidad abdominal donde será digerido posteriormente.

La atresia lipoglandular de los folículos previtelogénicos y folículos vitelogénicos blancos pequeños de estas especies avia-rias se denomina lipoglandular por el aspecto morfohistológico de las células vacuolizadas de las envolturas foliculares. Estas características concuerdan con las descripciones de los folículos ováricos de otras aves silvestres y domésticas realizadas por diferentes autores (Halse 1985; Gupta et al. 1988; Guraya 1989; Bulfon y Bee de Speroni 2001, 2003; Bulfon 2008). Asimismo este tipo de involución fue descrito en el ovario de reptiles como lagartos (Varma 1970) y colúbridos (Betz 1973).

Con respecto a los folículos vitelogénicos amarillos de mayor tamaño de *V. chilensis* e *H. melanurus*, atresian por ruptura de las paredes foliculares o *bursting*; de esta manera, liberando al exterior del ovario la gran cantidad de vitelo contenido en los folículos grandes se facilita la rápida involución de los mismos.

En la literatura consultada sólo Hugues y Goroscope (1991) y Tilly et al. (1991), mencionan el proceso de la muerte celular en el ovario de las aves. Por el contrario, ha sido extensamente

tratado en diferentes especies de mamíferos por Gavrieli et al. (1992); Palumbo and Yeh (1994); Jolly et al. (1997), los que identifican numerosas células necrosadas y apoptóticas en el epitelio folicular de los folículos atrésicos.

Mientras que la apoptosis se detectó sólo en los primeros estadios de involución no *bursting* (lipoglandular) en el ovario de *Vanellus chilensis* e *Himantopus melanurus*, en los últimos estadios de involución de los folículos atrésicos (no *bursting* y *bursting*) de estas aves, se reveló además, abundantes células necrosadas. A diferencia de la apoptosis, la necrosis no es un proceso fisiológico, está causado por diferentes injurias y también exhibe una degradación en el ADN, no obstante, las observaciones estructurales realizadas en este estudio y corroboradas con la utilización de un método de alta sensibilidad para la fragmentación de ADN, validan la marcación de las células apoptóticas en estas especies de aves.

Los cambios morfológicos e inmunohistoquímicos de las células apoptóticas de *V. chilensis* e *H. melanurus* coinciden con aquellos observados en el ovario de diferentes especies de mamíferos (Murdoch 1995; Jolly et al. 1997).

En conclusión el análisis comparado de la atresia folicular del ovario de *V. chilensis* e *H. melanurus* muestra similitudes a nivel estructural e inmunohistoquímico en estas especies avia-rias.

Así, la involución folicular constituye un proceso dinámico en el ciclo reproductivo contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis del ovario de estas aves. En este mecanismo regresivo interviene activamente la necrosis y la apoptosis, promoviendo la remoción de los folículos supernumerarios y la jerarquía de los folículos dominantes.

De este modo, este trabajo es un aporte original al estudio de la biología reproductiva de las aves y constituye una contribución al conocimiento de la atresia folicular en el ovario de estas especies silvestres.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. María Helena Samar por las sugerencias y lectura crítica del manuscrito y a la SECYT –UNC, la financiación de este trabajo, Resol. N° 162/06. Una mención especial al Profesor Jorge Dongiovani por la inestimable colaboración en los trabajos a campo.

Literatura citada

- Betz T. 1973. The ovarian histology of the diamond-backed water snake, *Natrix rhombifera*, during the reproductive cycle. *J. Morphol.* 113:245–260.
- Bucher E., E. Gómez, I. Di Tada, et al. 1977. Ecología de la reproducción de la paloma *Zenaida auriculata*. Variaciones estacionales en peso corporal, gonadas, reservas de lípidos y muda. *Ecosur* 4 (7):47–67.
- Bulfon M. & N. Bee de Speroni. 2001. Efecto de la administración exógena de gonadotropinas (FSH y LH) sobre el ovario de *Myiopsitta monachus* (Aves: Psittacidae). *Facena* 17: 67–77.
- Bulfon M. & N. Bee de Speroni. 2003. Atresia folicular de *Spheniscus magellanicus* Forster 1871 (Aves: Spheniscidae). *Ararajuba* 11(2):189–194.
- Bulfon M. 2008. Características estructurales, histoquímicas e inmunohistoquímicas de la atresia folicular de *Myiopsitta monachus* y *Zenaida auriculata* (Aves: Psittacidae y Columbidae). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. FCEF y N. –UNC.

- Etches R. 1990. The ovulatory cycle of the hen. In: CRC Press, Inc., edits. *Critical Reviews in Poultry Biology*, Vol.2, Issue 4. Pp. 293-318.
- Forgó V., G. Afanasiev & 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.
- Gavrieli Y., Y. Sherman & S. Ben-Sasson. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119 (3): 493–501.
- Gilbert A., M. Perry, D. Waddington, et al. 1983. Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen *Gallus domesticus*. *J. Reprod. Fertil.*, 69:221–228.
- Gupta S. & B. Maiti. 1986. Study of atresia in the ovary during the annual reproductive cycle of the pied myna. *J. Morph.* 190 (3):285-296.
- Gupta S., A. Gilbert & A. Walker. 1988. Histological study of follicular atresia in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J.Reprod.Fert.* 82:219-225.
- 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.
- Jolly P., P. Smith, D. Heath, et al. 1997. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biology of Reproduction* 56: 837–846.
- Halse S. 1985. Gonadal cycles and levels of luteinizing hormone in Wild Spur-winged geese, *Plectropterus gambensis*. *J. Zool. Lond. (A)* 205: 335 - 355.
- Hugues F. & W. Goroscope. 1991. Biochemical identification of apoptosis (Programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129: 2415 -2422.
- 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.
- Murdoch W. 1995. Programmed cell death in preovulatory ovine follicle. *Biol. Reprod.* 53: 8–12.
- Palumbo A & J. Yeh. 1994. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biology of Reproduction* 51:888-895.
- Pearse A. 1960. *Histochemistry: theoretical and applied*. Ed. L.W. Browder, Plenum Press., J & A. Churchill Ltd., London, 599 P.
- Pergolani de Costa M. 1961. La ornitología y los problemas agronómicos. *Physis* 22 (63):235-240.
- Romeis, B. 1928. La coloración. En: Editorial Labor S.A. *Guía Formulario de Técnicas Histológicas*. Barcelona - Madrid-Buenos Aires. p. 39-184
- Steller, H. 1995. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445–1449.
- Thompson, C. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Tilly, J., K. Kowalski, A. Johnson y A. Hsueh. 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799-2801.
- Varma, S. 1970. Morphology of ovarian changes in the garden lizard, *Calotes versicolor*. *J. Morphol* 131:195–210.
- Wight, H.M. 1959. A field technique for bursal inspection or mourning doves. *J.Wildl.Mgmt.* 20 (1):94–95.
- Wyllie, A. J. Kerr & R. Currie. 1980. Cell Death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol* 68:251–306.