

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Estudio histomorfométrico de folículos ováricos en fetos de lobo marino fino sudamericano (*Arctocephalus australis*) subpoblación Perú / norte de Chile”

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Fernando Javier Vilchez Delgado
Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Lima-Perú
2021

A mi familia por el apoyo,
Al Programa Punta San Juan por la confianza,

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres por el apoyo brindado en estos años, gracias a lo cual he podido completar este trabajo y realizar diversas actividades que de otro modo no hubiera sido posible.
- Al Programa Punta San Juan y su directora Susana Cárdenas-Alayza por la confianza puesta en mí, estaré eternamente agradecido con todos los que me permitieron concretar este trabajo, me guiaron e hicieron creer en la conservación y la ciencia en el Perú.
- A Chicago Zoological Society y Laboratorios Aranda (Interpharma, Perú) por el financiamiento.
- A Laura Leticia Escobar por los brillantes aportes que dio durante todo este proyecto y la compañía en los arduos trabajos de campo. Además, al Blgo. Marco Cardeña Mormontoy y al Mg. Paulo Colchao Claux por todo el apoyo brindado durante los trabajos de campo.
- A mi asesora la Dra. Luisa Echevarría Cureé por la orientación, las largas conversaciones y sobre todo la paciencia que tuvo conmigo durante todo este camino.
- Al laboratorio y a Roy Andrade por sus orientaciones en el procesamiento de muestras y utilización de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.
- A la Dra. Helena Katz por su consejos y experiencia en el trabajo histológico de muestras de lobos marinos.
- A los evaluadores que me brindaron sus correcciones y sugerencias, gracias a las cuales se pudo concretar una mejor versión de este estudio.
- A la Unidad de Virología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt por el respaldo recibido para poder culminar con éxito esta tesis.
- Al Dr. Javier Mamani, Joaquin Unda, Karime Mateo, Roberto Shen, Allison Rojas, Bianca Esparza y todos aquellos amigos y voluntarios que hicieron posible la realización y culminación de esta investigación.

ABSTRACT

The aim of the study was to perform a histomorphometric evaluation of fetal ovaries of South American Fur Seals (*Arctocephalus australis*) of the Peruvian / northern Chile subpopulation. In this sense, samples of fetal ovaries (n = 08) were collected from four individuals recovered from enzootic abortion events at Punta San Juan Protected Natural Area (15°22'S, 75°12'W) between 2016 and 2017. Ovaries collected corresponded to fetuses around the second-trimester of gestational development and were processed following conventional histological methods with H&E staining. The measurement of follicular sizes and the evaluation of ovarian reserve was performed considering standardized procedures previously reported in the literature. An average of $84,002 \pm 2\,097$ pre-antral follicles per fetal ovary was estimated. Of the total number of pre-antral follicles evaluated, 89.13% corresponded to primordial follicles, 10.35% to transitional follicles, 0.43% to primary follicles and 0.10% to secondary follicles. The size of each type of follicle was measured and significant differences ($P < 0.0001$) were determined between each of them, with the exception of transitional and primary follicles that did not present significant differences. Furthermore, it was observed that 8.1% of the follicles evaluated showed signs of degeneration. It is expected that with the information generated from this study, subsequent evaluations can be developed focusing on follicular dynamics, maintenance of the ovarian reserve, and the impact on the reproduction of females of the *A. australis* species.

Key words: pinnipeds, ovary, *Arctocephalus australis*, reproduction, follicles

RESUMEN

El objetivo del estudio fue realizar una evaluación histomorfométrica de ovarios fetales de Lobo Marino Fino Sudamericano (*Arctocephalus australis*) de la subpoblación de Perú/ norte de Chile. Para ello se utilizaron muestras de ovarios fetales (n= 08) de cuatro individuos colectados a partir de eventos enzoóticos de abortos en el Área Natural Protegida Punta San Juan (15°22'S, 75°12'O) en los años 2016 y 2017. Las muestras colectadas corresponden a ovarios de fetos del segundo tercio de desarrollo gestacional aproximadamente y fueron procesadas siguiendo métodos histológicos convencionales con tinción H&E. La medición de los tamaños foliculares y la evaluación de reserva ovárica se llevó a cabo considerando procedimientos previamente reportados en la literatura. Se estimó un promedio de $84\,002 \pm 2\,097$ folículos pre antrales por ovario fetal evaluado. Del total de folículos pre antrales evaluados, el 89,13% correspondió a folículos primordiales, el 10,35% a folículos de transición, el 0,43% a folículos primarios y el 0,10% a folículos secundarios. Se realizó la medición del tamaño de cada tipo de folículo y se determinó diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre cada una de ellas con excepción de los folículos de transición y primarios entre los cuales no hubo diferencias significativas. Además, se observó que 8,1% de los folículos evaluados presentó signos de degeneración. Se espera que con la información generada en este estudio se pueda llevar a cabo posteriores evaluaciones sobre la dinámica folicular, el mantenimiento de la reserva ovárica y el impacto en la reproducción de hembras de la especie *A. australis*.

Palabras claves: pinnípedos, ovario, *Arctocephalus australis*, reproducción, folículos

INTRODUCCIÓN

“Ex Ovo Omnia – Todo procede de un huevo”.

William Harvey, 1651.

El ovario es el órgano reproductivo femenino que contiene una amplia cantidad de gametos rodeados por estructuras celulares que juntas conforman una unidad básica reproductiva conocida como folículo (Hyttel et al., 2010). Cada folículo es generado a partir de un proceso complejo que se produce durante el periodo fetal (Sawyer et al., 2002; Tingen et al., 2009 ; Smith et al., 2014). Este proceso conocido como oogénesis representa una de las bases biológicas en la reproducción de las especies, ya que genera las células con las que contarán las hembras para su reproducción (Grive & Freiman, 2015).

Durante años, la formación, así como también la composición, de los tipos de folículos en diferentes especies animales ha sido materia de estudio (Gosden & Telfer, 1987; Pepling & Spradling, 2001; Silva-Santos et al., 2011; Monniaux et al., 2014). En general, el total de folículos pre-antrales que son generados en la etapa fetal para ser usados durante la vida sexual adulta de una hembra lleva el nombre genérico de reserva ovárica (Findlay et al., 2015b; Monniaux et al., 2014). Esta denominación hace referencia a una cantidad de reserva de gametos competentes que permitirá la fertilidad y el adecuado proceso reproductivo de las hembras (Findlay et al., 2015a).

Durante la evaluación de la reserva ovárica en diferentes especies silvestres se ha hecho hincapié en la necesidad por conocer más acerca de las diferencias inter-especie que rigen el correcto establecimiento folicular (Gosden et al., 1987; Walker et al., 2009; Stansfield et al., 2011). En ese sentido, es importante conocer la reserva ovárica para el desarrollo de técnicas de reproducción asistida y estudios *in-vitro* e *in-vivo* que permitirán generar estrategias de conservación de animales en medio silvestre y cautiverio (Domingues et al., 2004; Lopes et al., 2006c; Lopes et al., 2017b; Santos et al., 2018).

El lobo marino fino o de dos pelos de Perú (*Arctocephalus australis*) es una especie de pinnípedo clasificada en peligro de extinción que habita las costas de nuestro país ; De Oliveira & Brownell, 2014; SERFOR & WCS, 2018). Las poblaciones de esta especie se

encuentran divididas entre aquellas distribuidas en Perú/ norte de Chile y aquellas que se extienden por el litoral sur del continente sudamericano. La subpoblación distribuida en Perú / norte de Chile se encuentra principalmente en el sur de Perú teniendo a Isla Mazorca (11°20'S) como límite norte y a Rocas Abtao (23° 05'S) en Chile como límite sur de distribución (Cárdenas-Alayza & De Oliveira, 2016). En los últimos 40 años, exhaustivos estudios se han desarrollado para evaluar la ecología e historia natural de colonias residentes de esta especie en el Área Natural Protegida Punta San Juan (PSJ) perteneciente a la Reserva Nacional Sistema de Islas, Islotes y Puntas Guaneras (Majluf, 1987; Cárdenas-Alayza, 2007). Gracias a las bases de datos generadas por el Programa Punta San Juan (PPSJ) se conoce a detalle las dinámicas poblacionales de esta colonia y su vulnerabilidad ante eventos extremos como El Niño Oscilación Sur (ENSO) (Cárdenas-Alayza, 2012; De Oliveira, 2011).

En el ENSO de 1997/1998 se observó una disminución del 72% en las poblaciones de *A. australis* peruanas a consecuencia de la inanición producida por el cambio en la distribución de las presas habituales debido a cambios en la productividad primaria por efecto de las altas temperaturas superficiales del mar (Arias-Schreiber & Rivas, 1998; De Oliveira et al., 2009). Posterior a este fenómeno, las poblaciones se recuperaron gradualmente en el tiempo con el apoyo de políticas nacionales y programas de conservación impulsados por entidades nacionales y extranjeras (DS N° 024 -2009-MINAM, 2009; DS N° 004- 2014-MINAGRI, 2014; Gregory, 2015; CITES, 2020; CMS, 2020). No obstante, el riesgo de nuevos eventos ENSO más frecuentes y duraderos son una amenaza real para la supervivencia de esta subespecie (Timmermann et al., 1999; De Oliveira et al., 2006). En ese sentido, el estudio de la capacidad reproductiva es de especial interés para los programas de conservación y futuros estudios (Katz, 2011; Katz et al., 2013).

La evaluación de órganos reproductivos y la histomorfología ovárica ha sido escasamente evaluada en esta especie y poco se conoce acerca de su reserva ovárica (Katz, 2011; Katz & Johansson, 2017). Algunos estudios sobre la histomorfometría ovárica de esta especie han sido realizados con muestras de cachorras de cero a diecisiete meses de edad de poblaciones uruguayas de *A. australis* (Katz & Johansson, 2013). En adición a ello, Katz y colaboradores realizaron una

revisión de las estructuras foliculares de cachorras y hembras pre-púberes (0 – 18 meses de edad), donde reconocieron la presencia de diferentes estructuras típicas de otáridos (Katz et al., 2009; Katz & Johansson, 2013). En ese sentido, se detalló la presencia de un sistema de criptas subcapsulares, las cuales son proyecciones invaginantes del epitelio germinal que atraviesan la túnica albugínea y abarcan grandes regiones de la corteza ovárica (*zona parenchymatosa*) (Katz et al., 2009).

La función de las criptas subcapsulares es aún poco conocida, algunos autores apuntan que estas cumplen un rol fundamental en la esteroidogénesis y la producción de células intersticiales (Mülling et al., 1998). Además, se reportó una amplia cantidad de células intersticiales (*endocrinocytus interstitialis*) distribuidas en la corteza ovárica, representando el hallazgo histológico más característico para la especie *A. australis* (Katz et al., 2009). Otras características importantes como la presencia de folículos primordiales debajo de la túnica albugínea y en estrecha asociación con las criptas subcapsulares también fue reportado (Katz et al., 2009). Además, se observaron diferencias importantes en los tamaños foliculares entre los diferentes tipos establecidos en el estudio (Katz & Johansson, 2013). En adición, se reportó una tendencia en la disposición de los folículos más desarrollados hacia la zona de la médula ovárica (*zona vasculosa*) (Katz & Johansson, 2013).

En Perú, hasta el momento se cuenta con una única descripción histológica de ovarios y tracto reproductivo de una hembra adulta de la especie *A. australis* (Vilchez et al., 2017). En ese trabajo se corroboró la presencia del sistema de criptas subcapsulares y la asociación con folículos primordiales. Sin embargo, se observó una disminución aparente en la cantidad de folículos primordiales a comparación de los trabajos reportados con cachorras en Uruguay. Además, se detalló la presencia de zonas altamente vascularizadas en la médula ovárica y presencia de cuerpos albicans (Vilchez et al., 2017). Es relevante señalar que en ninguno de estos trabajos se realizó la cuantificación del número estimado de folículos ováricos.

Algunas metodologías se han diseñado con esa finalidad, Gougeon y Chainy (1987) reportaron la adición de un factor de corrección para estimar un total aproximado del número de folículos presentes en un ovario mediante técnicas histológicas convencionales. Este método

considera factores como tamaño de núcleo de los oocitos, cantidad de láminas evaluadas y la intercalación empleada en el montaje de las mismas para optimizar la aproximación de los conteos. Diversos estudios han utilizado esta metodología para realizar estimaciones de poblaciones de folículos pre-antrales o reserva ovárica en diferentes especies de animales domésticos y silvestres (Almeida et al., 2012; Carrijo et al., 2010; Silva-Santos et al., 2011; Lunardon et al., 2015; Lopes et al., 2017b; Santos et al., 2018). Debido a ello, la comparación entre las distintas especies es posible y resulta fundamental para estudios de desarrollo embrionario y fertilidad (Guillette & Moore, 2006; Geber et al., 2012).

Uno de los problemas que afronta la especie *A. australis* en el Perú es la incidencia de abortos durante los meses de julio y agosto de cada año (Vilchez et al., 2016). Un estudio realizado por el PPSJ demostró tasas de aborto de hasta un 25% en playas reproductivas (Vilchez et al., 2018). Hasta el momento no ha sido identificada la causa de estos abortos; sin embargo, entre 2016 y 2017 se consiguió la documentación y colecta de muestras fetales para realizar estudios al respecto. En el presente estudio se trabajó con muestras de ovarios fetales recolectadas durante ese periodo que correspondieron al segundo tercio del desarrollo gestacional, periodo en el cual ya ha ocurrido el rompimiento de cuerdas oovígeras y ha sido establecida la reserva ovárica en, al menos, otras especies (Monniaux et al., 2014; Hummitzsch et al., 2019). Debido a ello, en el presente estudio se busca describir las características histomorfométricas y determinar la reserva de folículos ováricos de fetos obtenidos de eventos enzoóticos de abortos en PSJ. Para ello, se hizo la evaluación, clasificación y cuantificación de folículos ováricos pre antrales presentes en cada muestra. Se espera que este estudio pueda brindar mayor información sobre aspectos reproductivos de la especie *A. australis* y pueda servir de base comparativa para el estudio con ovarios en otros grupos etarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de Estudio

La colecta de muestras se llevó a cabo durante los meses de julio y agosto de 2016 y 2017 dentro del Área Natural Protegida Punta San Juan (PSJ) (15°22'S, 75°12'O), perteneciente a la Reserva Nacional Sistema de Islas, Islotes y Puntas Guanera (RNSIIPG). Para el trabajo de campo se contó con la autorización del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (SERNANP) (RJ-008-2015-SERNANP-RNSIIPG/ RJ-019-2016-SERNANP-RNSIIPG) y la aprobación del protocolo de colecta por parte del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH /DUICT Constancia 05-06-17, Código SIDISI 101189). Las muestras obtenidas fueron posteriormente almacenadas en el Laboratorio de Vida Silvestre y procesadas en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

2. Diseño de Estudio

El estudio correspondió a una investigación descriptiva, con la implementación, adaptación y estandarización de métodos validados por otros autores para el estudio cuantitativo de folículos ováricos (Gougeon & Chainy, 1987). Las muestras fueron obtenidas mediante un estudio de tipo transversal durante semanas pico de episodios enzoóticos de abortos de la especie *A. australis* en PSJ. La colecta fue realizada por conveniencia en condiciones de campo de manera aleatoria en diferentes playas reproductivas de *A. australis* dentro de PSJ. En ese sentido, se desarrolló una metodología de campo para limitar la exposición y el estrés a las colonias reproductivas de *A. australis* (Anexo 1).

3. Consideraciones Éticas

El uso de las muestras colectadas para el estudio histomorfológico de ovarios fetales fue evaluado y aprobado por el CIEA-UPCH (UPCH /DUICT Constancia 060-07-19, Código SIDISI 104356). Los fetos analizados fueron parte de eventos enzoóticos de abortos y no existió manipulación de animales para esta etapa del estudio.

4. Fases del Estudio

4.1. Colecta y Conservación de Muestras

Los ovarios (n = 08) fueron colectados mediante procedimientos de necropsia realizados en PSJ en fetos frescos (<12 horas desde producido el aborto). Se utilizaron para ello cuatro fetos (dos de 2016 y dos de 2017). Para la determinación del periodo de gestación correspondiente a los fetos se consideró el mes de febrero como el inicio sincrónico de la gestación verdadera después de 3 meses de diapausa (Katz, 2011) y el mes de noviembre como el mes en que ocurren casi todos los partos de la especie *A. australis* en Punta San Juan (Majluf, 1992) (Véase Figura 3). Se extrajeron los ovarios fetales, tanto izquierdo como derecho, y fueron pesados utilizando una balanza digital gramera Valdox® BRD10 de 5 kg (ABACCO, Tokio, Japón). Además, se realizó la medición con ayuda de un vernier-caliper electrónico Dirtygal 150 mm (Phoenix, PL, EE.UU.) y regla de 20 cm. Las muestras fueron colocadas individualmente en frascos de plástico conteniendo formol al 10%. Las muestras de 2016 fueron fijadas por un periodo máximo de 24-48 horas y posteriormente fueron cambiadas a etanol al 70°. Las muestras de 2017 fueron fijadas en formol por un periodo de seis meses y después cambiadas a etanol de 70°. Todas las muestras permanecieron almacenadas a temperatura ambiente hasta enero de 2018, cuando fueron incrustadas en bloques de parafina para su procesamiento.

4.2. Cortes Histológicos y Tinción

Se realizó la incrustación de ovarios fetales completos de manera individual en bloques de parafina siguiendo protocolos convencionales para el procesamiento

histológico de muestras (Anexo 2). Después, se procedió a realizar cortes histológicos seriados en segmentos de 7 µm según recomendaciones de la literatura científica (Silva-Santos et al., 2011; Alves et al., 2015). Las muestras en parafina fueron cortadas utilizando un micrótopo Leica® RM2125-RTS (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) y se montaron en láminas portaobjetos un corte a cada 20 secciones. Se realizó el conteo de las secciones obtenidas por ovario haciendo uso de un contómetro manual (Tamaco Industrial Co., Ltd., Taichung, Taiwan) y se contabilizó desde el primer hasta el último corte visible realizado al ovario en el bloque de parafina. Después de ello, las láminas obtenidas fueron teñidas con coloración de Hematoxilina y Eosina (H&E) mediante protocolos de rutina de tinción histológica (Anexo 2). Todas las secciones obtenidas fueron usadas para la evaluación del número estimado de folículos ováricos, salvo algunas excepciones donde existieron artefactos de tinción y fijación.

4.3. Toma de Fotografías y Elaboración de Imágenes Digitales

Las láminas fueron evaluadas utilizando un microscopio Nikon® Eclipse-e100 (Nikon Corporation, Tokio, Japón) y Leica® DM500 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza). Las láminas fueron enfocadas a un aumento de 100x y 400x realizando la toma de fotografías con el uso de una cámara adaptada al microscopio marca TOUPCAM® (GT Vision Ltd., Sudbury, Reino Unido) y Leica® ICC50 W (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron visualizadas en una computadora con ayuda del software ToupView 2003-2017 (ToupTek Photonics Co., Ltd.®) y LAS EZ v. 3.4.0 (Leica Microsystems, Suiza). Se realizó la toma de fotografías de manera que se abarcara toda el área de extensión de los tejidos por cada lámina. Posteriormente, todas las imágenes de cada lámina fueron unidas y reconstruidas usando el programa PowerPoint (Microsoft®PowerPoint 2019) para generar una imagen panorámica de todo el tejido ovárico. Estas imágenes generadas fueron conservadas digitalmente en carpetas con códigos preestablecidos.

4.4. Clasificación y Conteo de Imágenes Digitales

Para la evaluación y clasificación de folículos ováricos se utilizó el software Image J® (National Institute of Health, EE.UU.). Se realizó una evaluación piloto para comparar los resultados de imágenes siendo visualizadas a 400x y 100x (Anexo 3). Se determinó que no existían diferencias significativas en la cantidad y clasificación de folículos observados por lo que se continuó con la evaluación de imágenes a 100x. La clasificación de los folículos ováricos se realizó siguiendo criterios preestablecidos para esta especie con modificaciones (Katz & Johansson, 2013):

- Folículos primordiales (tipo 1a): presentan un único estrato celular de células planas simples que rodean al ovocito.

- Folículos primarios tempranos o de transición (tipo 1b): presentan un ovocito rodeado por un único estrato celular. Este está compuesto por células planas simples principalmente y al menos dos células cuboidales.

- Folículos primarios verdaderos (tipo 2): al igual que los folículos de tipo 1, presentan un único estrato celular, pero compuesto de células cúbicas simples rodeando al ovocito.

- Folículo secundario (tipo 3 y 4): se caracterizan por presentar más de un estrato de epitelio cúbico. Además, se puede observar la presencia o formación de finas membranas tecales, tanto de la teca interna como de la externa, alrededor del folículo. En algunos casos los folículos pueden presentar un pequeño antro.

- Folículo antral grande, folículo terciario o de Graaf (tipo 5): son aquellos que tiene un espacio antral bien definido y ovocitos de mayor tamaño. Por otra parte, posee igual o más de tres o cuatro capas completas de epitelio cúbico o células de granulosa.

Se añadió como una subclasificación la presencia de folículos apoptóticos o degenerados en cada una de las clasificaciones anteriores. Para ello, se revisó la presencia de características histológicas como ovocitos con vacuolización citoplasmática pronunciada, con núcleos picnóticos, encogimiento celular o formación de cuerpos apoptóticos. Para el conteo solo fueron considerados aquellos folículos que presentaban

un ovocito con núcleo definido, con ello se pretendía seguir las recomendaciones dadas en estudios previos con la finalidad de evitar el doble conteo de folículos.

4.5. Estimación de Reserva Ovárica

La estimación de la reserva ovárica, es decir el total de folículos ováricos pre antrales se llevó a cabo haciendo uso de la metodología y el factor de corrección sugerido por Gougeon & Chainy (1987), la cual ha venido siendo utilizado de forma continua en diferentes trabajos:

$$N_t = \frac{N_o \times S_t \times t_s}{S_o \times d_o}$$

donde N_t representa el estimado total de la población de cada tipo de folículos en el ovario; N_o indica el número total de folículos observados y contados según los criterios establecidos anteriormente para un ovario; S_t señala el número total de cortes realizados sobre el ovario; t_s representa el ancho o grosor de corte realizado con el micrótopo, el cual deberá ser el mismo para todo el tejido procesado; S_o indica el número total de secciones o cortes evaluados en el microscopio; y finalmente d_o representa la media de los diámetros del núcleo de los ovocitos en micras para cada tipo de folículo.

4.6. Mediciones e Histomorfometría

Las mediciones histológicas se realizaron con el software LAS EZ v. 3.4.0 (Leica Microsystems, Suiza) calibrado para realizar medición de distancia en micras (μm). Se determinó el máximo diámetro de folículo, diámetro perpendicular más ancho, máximo diámetro de ovocito, diámetro perpendicular más ancho del ovocito y el diámetro del núcleo (Figura 1). Para estimar la media aritmética de los diámetros evaluados se realizaron mediciones para cada tipo de folículo (primordial $n=150$; transición $n=50$; primario $n=30$; secundario $n=15$). Además, se obtuvo la variable de profundidad (μm) de la ubicación folicular dentro de la corteza para lo que se midió en línea recta desde el centro del núcleo del ovocito hasta la parte externa del epitelio germinal más próximo (Katz & Johansson, 2013) (Figura 1).

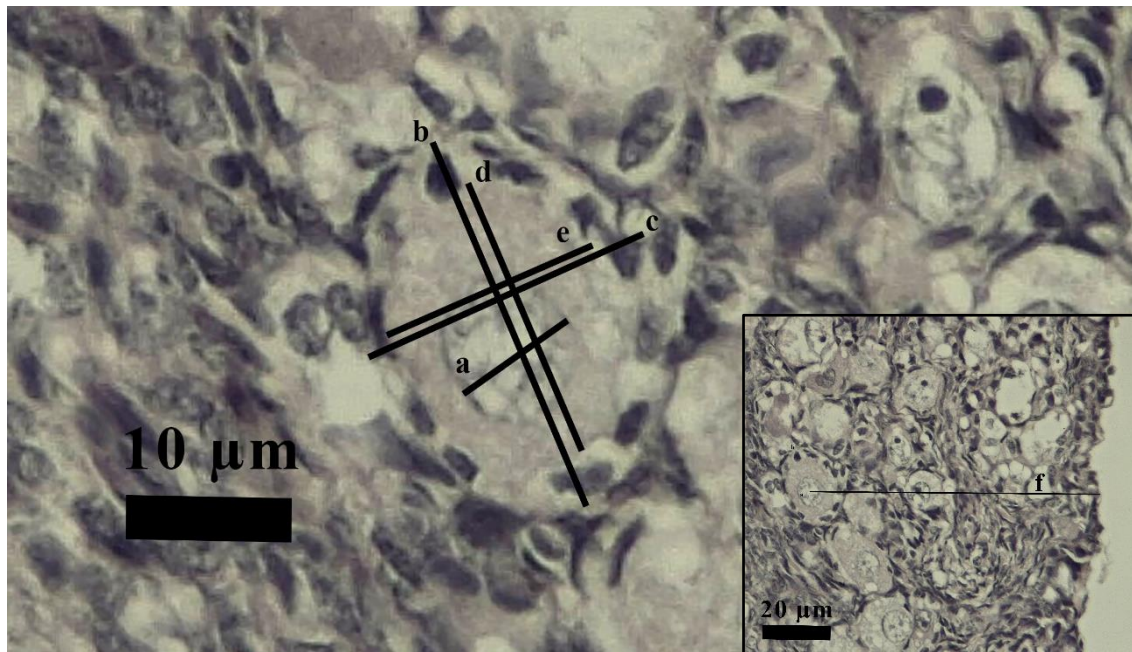


Figura 1. Mediciones realizadas a folículos ováricos. (a) Diámetro de núcleo, (b) máximo diámetro de folículo, (c) diámetro perpendicular más ancho del folículo, (d) máximo diámetro de oocito, (e) diámetro perpendicular más ancho del oocito y (f) profundidad de folículo medido desde el centro del núcleo hasta la superficie ovárica. Aumento de 400X.

4.7. Almacenamiento de Información en Base de Datos

La información obtenida a partir de los conteos y mediciones fue transferida a una base de datos en el programa Microsoft Excel (2016). Los códigos de los ovarios fueron dispuestos de acuerdo a las iniciales de especie, año de colecta y número de feto recolectado (e.g. AA-2016-013).

4.8. Análisis Estadístico de Resultados

Se calcularon las medias y desviaciones estándar de las mediciones morfológicas de los folículos ováricos. Posteriormente, la data fue seleccionada y analizada con la ayuda de los softwares SPSS® Statistics (IBM®) y Graphpad Prism (GraphPad Software). Las variables cuantitativas continuas: máximo diámetro de folículo, diámetro perpendicular más ancho del folículo, diámetro del ovocito, diámetro

perpendicular más ancho del ovocito y diámetro del núcleo fueron evaluadas usando pruebas paramétricas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía asumiendo normalidad de los datos. Después, se realizó la corrección de los datos para múltiples comparaciones de diferencias entre cada par de medias con ajuste apropiado usando la prueba de Tukey.

Para evaluar correlación entre las variables de reserva ovárica (N.º de folículos pre antrales) con peso del feto (g), tamaño del feto (cm), peso del ovario (g) y tamaño del ovario (cm) se utilizó la prueba de correlación de Pearson.

Los gráficos de caja o boxplot para las variables diámetro de folículo y profundidad de ubicación de folículo fueron creados con el software Graphpad Prism. Se utilizó el boxplot de Tukey para graficar la distribución de los datos, el que asume simetría para los bigotes y normalidad para su longitud. La significancia fue establecida por valores con un $P < 0.05$.

RESULTADOS

La evaluación histomorfométrica de folículos ováricos fue realizada con muestras de ovarios de fetales de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*) eventos de aborto del Área Natural Protegida Punta San Juan (AA-2016-015, AA-2016-020, AA-2017-003 y AA-2017-012) (Figura 2). El periodo de desarrollo fetal al momento de producidos los abortos se estima que pertenecen al segundo tercio de gestación (Figura 3). La media de los pesos de los ovarios fue de $84,5 \pm 38$ mg y el tamaño fue aproximadamente de $0,8 \pm 0,2$ cm de diámetro.

Los ovarios presentan forma irregular ovoide con superficie lisa y recubierta completamente por una membrana serosa que corresponde al mesosalpinx (*Bursa ovárica*). La cobertura ovárica presenta una foramen o pequeña abertura hacia medial que conecta con la cavidad peritoneal (*Ostium bursae ovaricae*). Los ovarios evaluados macroscópicamente no presentaron protrusiones por folículos ováricos preovulatorios o cuerpo lúteo. El detalle macroscópico del tracto reproductivo y ovario fetal puede observarse en la Figura 2.

Al microscopio, los ovarios presentaron una delimitación de la corteza (*Cortex ovarii*) y médula ovárica (*Medulla ovarii*) (Anexo 4). La corteza presentó una limitada cantidad de fibras de colágeno, fibrocitos y fibroblastos por debajo del epitelio germinativo que rodea a todo el ovario. Debido a este motivo, no existe una demarcación típica de la túnica albugínea (*Tunica albugínea*). El epitelio germinativo (*Epithelium superficiale*) consiste de una capa de células cúbico-cilíndrico simple. La presencia de criptas subcapsulares, características en ovarios de pinnípedos, no fue observada en los ovarios fetales evaluados y tampoco ninguna invaginación aparente del epitelio germinativo proyectado hacia la zona medular. A diferencia de la corteza, la médula ovárica presentó zonas de alta vascularización y ocupó gran parte del volumen del ovario.

La distribución de los folículos ováricos fue variada, ubicándose todos casi exclusivamente en la zona de la corteza. En este trabajo sólo se pudo apreciar la presencia de

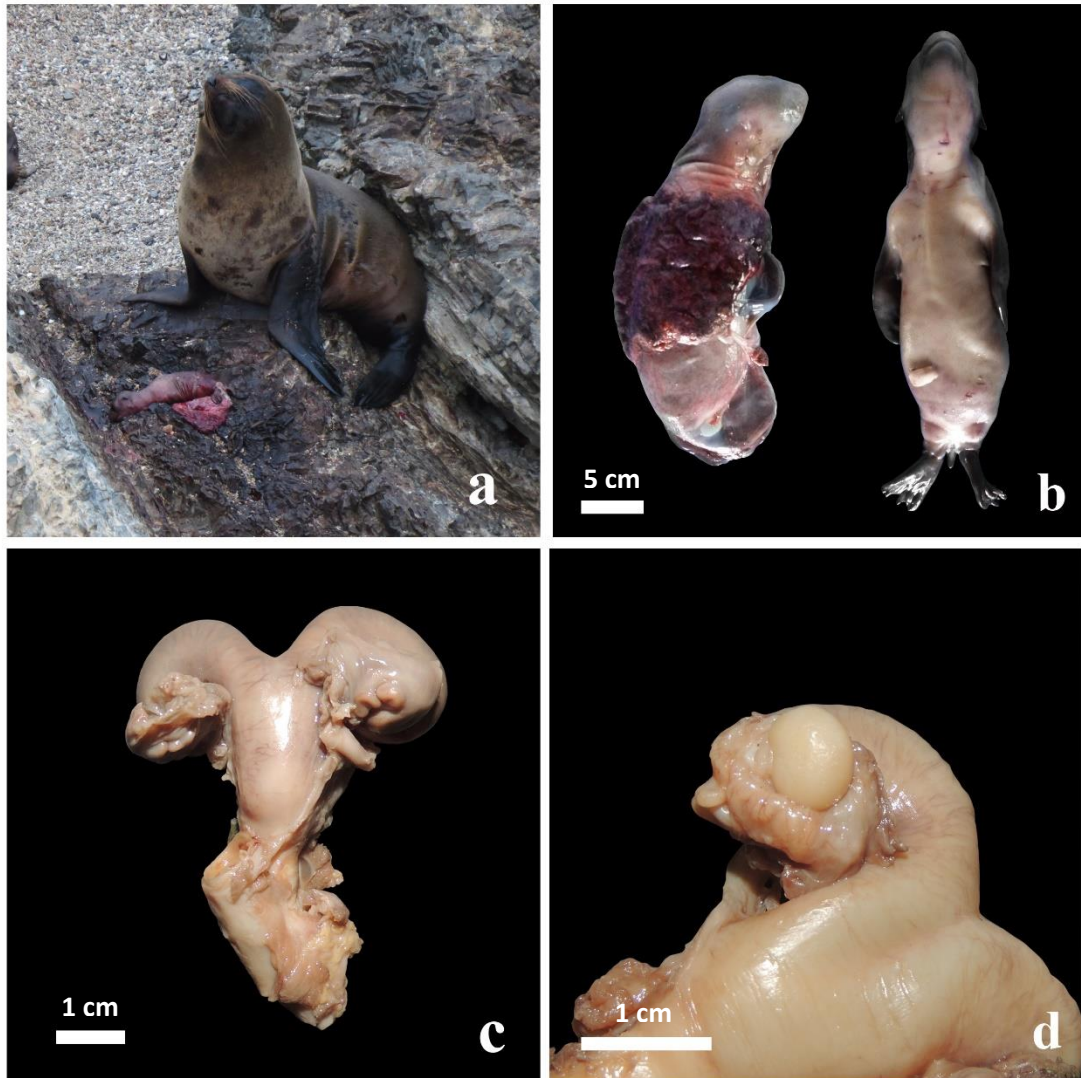


Figura 2. Visualización macroscópica de fetos y tractos reproductivos fetales de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*). (a) Hembra adulta y feto en playa S3 de Punta San Juan, Marcona, cortesía de Escobar L. (b) Feto durante procedimiento de necropsia dentro de placenta de disposición zonaria (izquierda) y posterior a la apertura de la misma (derecha). (c) Detalle macroscópico de tracto reproductivo femenino y (d) ovario derecho.

folículos primordiales, de transición, primarios y secundarios pre-antrales (Figura 4). No se observó la presencia de oogonias y nidos foliculares entre las muestras evaluadas. Todos los folículos presentaron un grado avanzado de diferenciación.

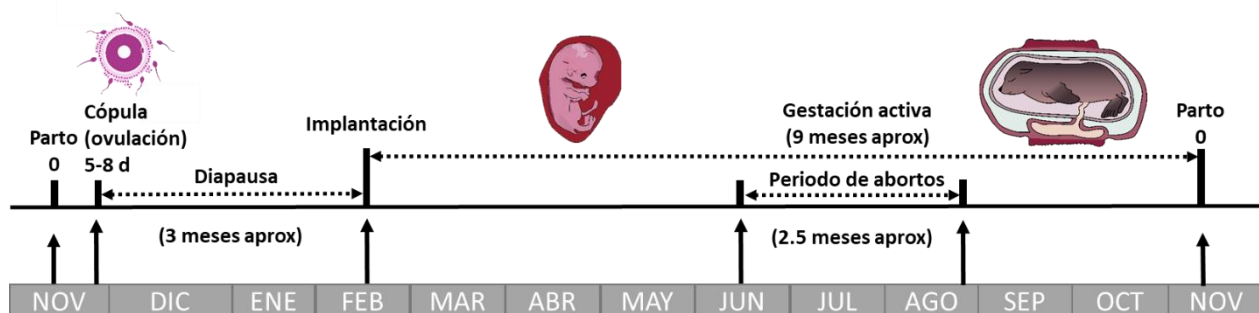


Figura 3. Ciclo reproductivo propuesto de lobo marino fino (*Arctocephalus australis*) en el sur de Perú (Adaptado de Katz, 2011). Nótese el periodo de abortos enzoóticos que ocurre cada año entre los meses de junio y agosto.

Un total de 138 láminas histológicas fueron evaluadas para realizar la estimación de la reserva ovárica siguiendo la metodología descrita por Gougeon & Chainy, 1987. El número de folículos pre antrales estimado varió por cada individuo evaluado (Cuadro 1). La media de folículos pre antrales por ovario fue de $84\,002 \pm 2\,097$, y la reserva ovárica de folículos pre antrales promedio asciende a $168\,005 \pm 2\,966$ por cada animal, sumando ambos ovarios. Datos adicionales sobre poblaciones de folículos pre antrales en los ovarios fetales evaluados puede observarse en la Cuadro 1.

En referencia a la histomorfometría, los folículos primordiales fueron significativamente los más pequeños ($P < 0,0001$) con un diámetro promedio de $30,6 \pm 5,6 \mu\text{m}$ ($19,1 - 47,0 \mu\text{m}$), seguidos por los folículos de transición con $40,2 \pm 9,8 \mu\text{m}$ ($25,7 - 80,6 \mu\text{m}$), folículos primarios con $42,9 \pm 10,6 \mu\text{m}$ ($28,6 - 74,0 \mu\text{m}$) y folículos secundarios con $114,4 \pm 34,3 \mu\text{m}$ ($35,4 - 171,3 \mu\text{m}$) de máximo diámetro folicular. El máximo diámetro de ovocitos de folículos primordiales fue $23,7 \pm 5,2$ ($15,4 - 37,5$), de folículos de transición fue $30,0 \pm 8,4$ ($18,9 - 65,1$), de folículos primarios fue $30,2 \pm 8,3$ ($19,3 - 54,4$) y de folículos secundarios fue de $45,3 \pm 11,5$ ($19,4 - 61,5$). El diámetro del núcleo de ovocitos de folículos primordiales fue de $8,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ($6,2 - 13,6 \mu\text{m}$), de folículos de transición fue de $11,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$ ($7,9 - 16,3 \mu\text{m}$), de folículos primarios fue de $12,3 \pm 2,5 \mu\text{m}$ ($8,9 - 18,6 \mu\text{m}$) y de folículos secundarios fue de $14,0 \pm 2,7 \mu\text{m}$ ($9,0 - 18,6 \mu\text{m}$). Los resultados de otros diámetros se encuentran especificados en la Cuadro 2.

El crecimiento y desarrollo de folículos fue observado hacia la zona medular, encontrándose que los folículos primordiales se observaron en zonas más cercanas a la corteza y epitelio germinativo, mientras que los folículos de transición, primarios y secundarios fueron observados más próximos hacia la médula ovárica (Figura 5). Se encontró diferencias significativas en la profundidad de ubicación de los folículos por debajo de la superficie ovárica ($P < 0,0001$) (Figura 6). En promedio los folículos primordiales se encontraron a $170,7 \pm 65,4 \mu\text{m}$ ($19,3 - 323,1 \mu\text{m}$) de la superficie ovárica, los folículos de transición a $247,6 \pm 121,5 \mu\text{m}$ ($70,7 - 745,2 \mu\text{m}$), los primarios a $410,7 \pm 164,6 \mu\text{m}$ ($191,2 - 900,5 \mu\text{m}$), y los secundarios a $950,7 \pm 353,2 \mu\text{m}$ ($461,2 - 1640,1 \mu\text{m}$).

Los folículos primordiales son el grupo predominante que componen la reserva ovárica de folículos pre antrales con el $89,13 \pm 2,22\%$ ($86,74\% - 92\%$). El segundo grupo más numeroso corresponde a los folículos de transición $10,35 \pm 2,21\%$ ($7,52\% - 12,71\%$), seguido por los folículos primarios $0,43 \pm 0,07\%$ ($0,32\% - 0,46\%$) y secundarios $0,1 \pm 0,06\%$ ($0,02\% - 0,16\%$) (Cuadro 3). Se resalta la presencia de pequeños grupos o “clusters” de folículos primordiales que se distribuyen por toda la corteza ovárica pero que tienden a concentrarse en ciertas zonas. Por su parte los folículos de transición, primarios y secundarios se encuentran distribuidos de forma más homogénea y separada.

Se observó que del total de folículos evaluados en este estudio ($n = 55\,889$), el $8,1\%$ fueron folículos degenerados. Entre los folículos primordiales, $7,89\%$ presentaron signos de degeneración, en folículos de transición fue del $8,86\%$, en folículos primarios fueron el $32,5\%$ y en folículos secundarios fue del $11,11\%$. La distribución de los folículos degenerados fue observada en mayor cantidad en la corteza del ovario adyacente a la superficie ovárica y el epitelio germinativo.

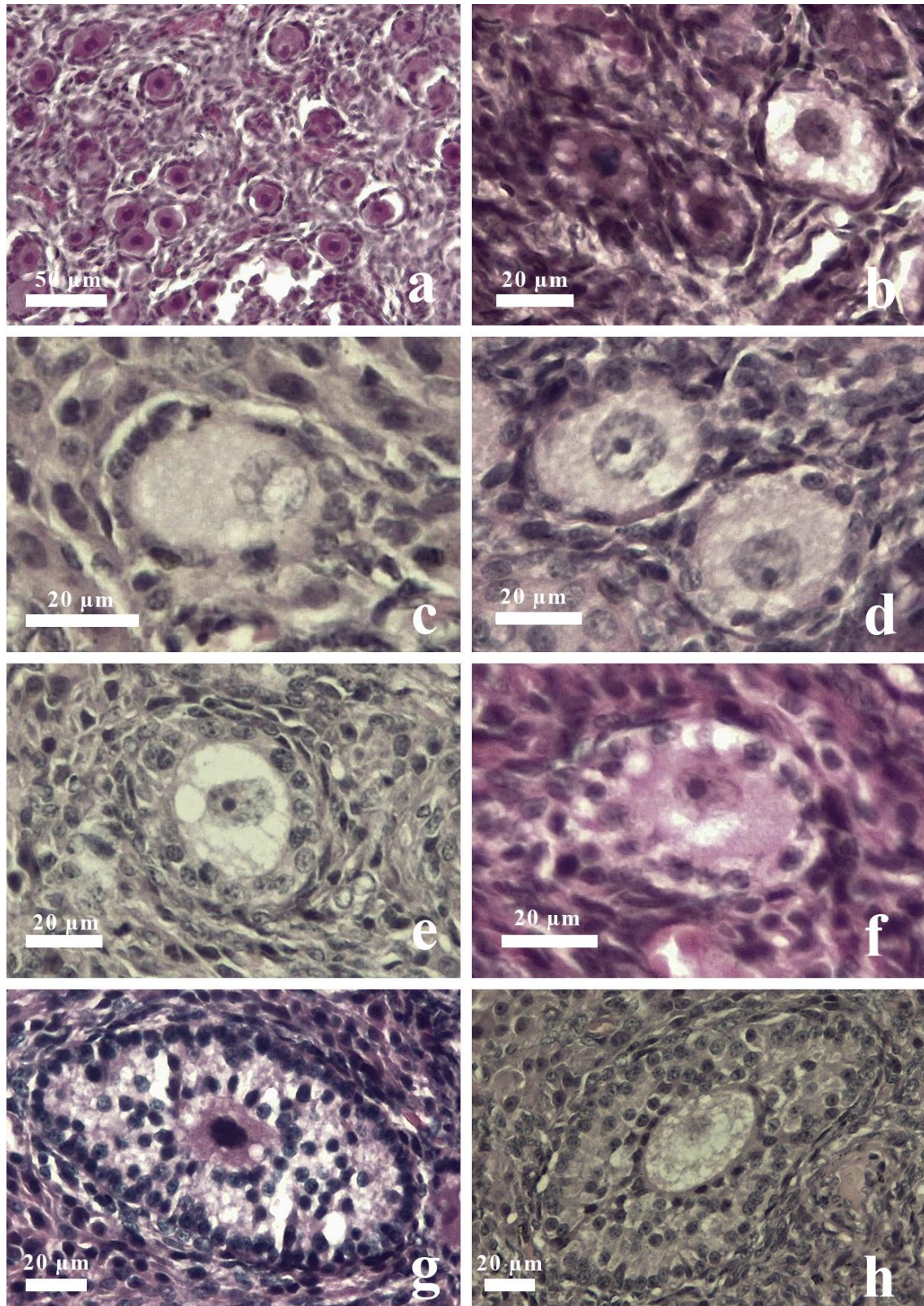


Figura 4. Folículos ováricos de fetos de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*). (a, b) Folículos primordiales, (c, d) de transición, (e, f) primarios y (g, h) secundarios. Aumento de 400X.

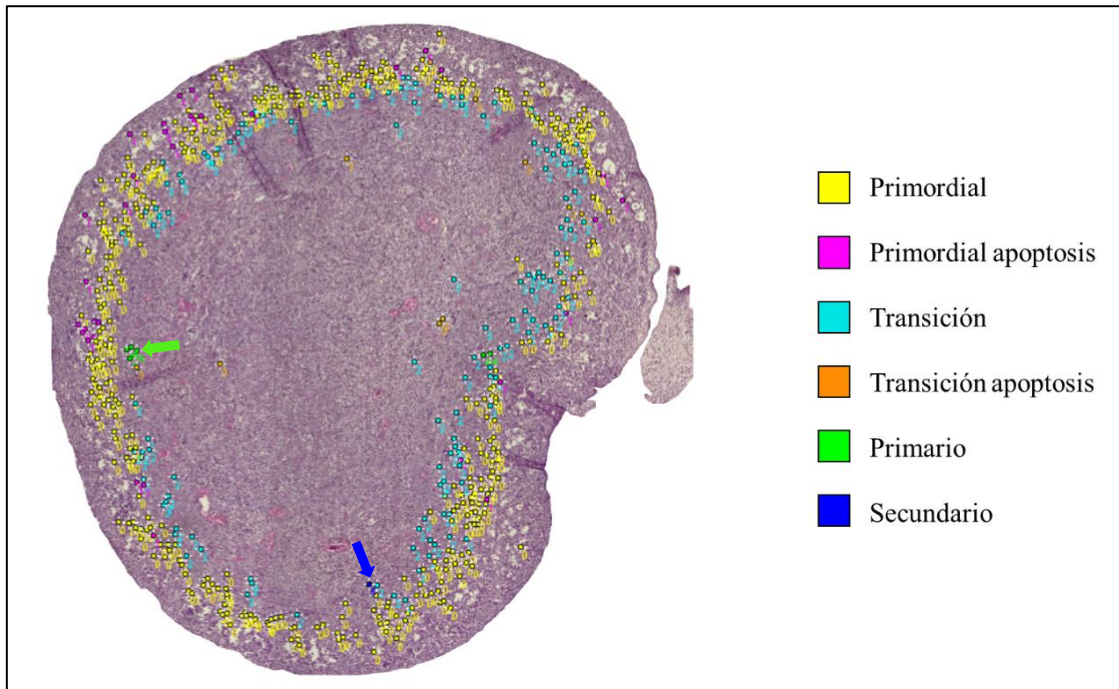


Figura 5. Disposición de folículos ováricos dentro de ovarios fetales de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*). Nótese la tendencia de crecimiento folicular hacia medular. Folículo primordial (amarillo), primordial degenerado (fucsia), transición (celeste), transición degenerado (naranja), primario (verde) y secundario (azul). Figura construida con Image J.

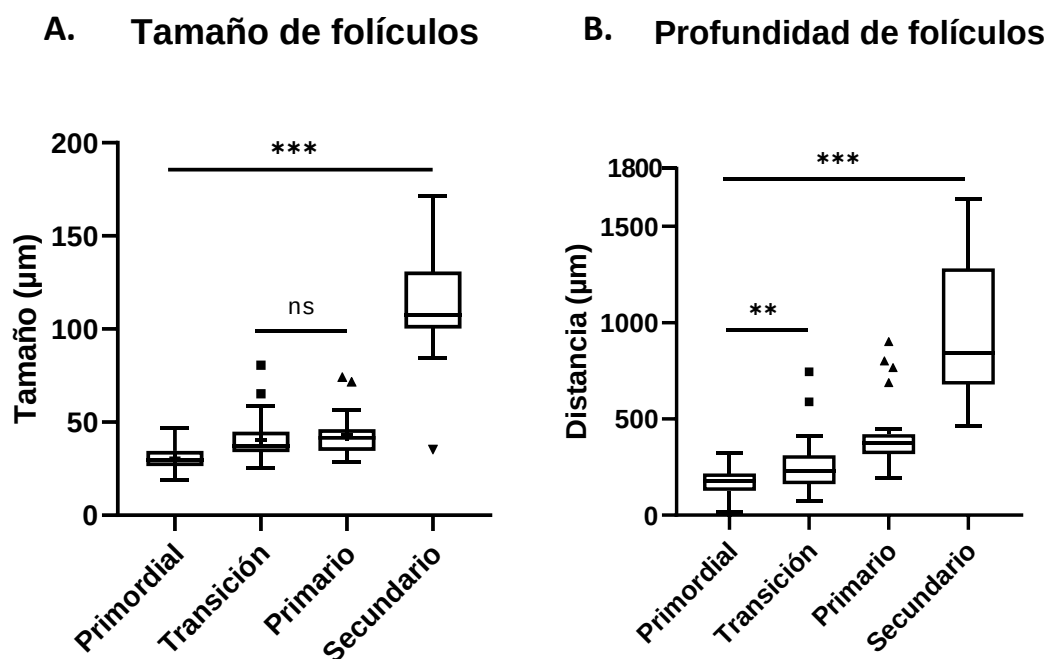


Figura 6. Boxplot de Tukey con medidas de folículos ováricos de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*). Diámetro folicular (μm) (A) y Profundidad de ubicación folicular (μm) (B). Significancia indica diferencias entre las medias estimadas para cada categoría folicular

Cuadro 1. Estimación del total de folículos ováricos en cada ovario evaluado ($X \pm DE$) de fetos de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*)*.

Folículos	Aa.2016.015 Ovario 1	Aa.2016.015 Ovario 2	Aa.2016.020 Ovario 1	Aa.2016.020 Ovario 2	Aa.2017.003 Ovario 1	Aa.2017.003 Ovario 2	Aa.2017.012 Ovario 1	Aa.2017.012 Ovario 2	Promedio
Primordial	93 355 $\pm$ 862	64 089 $\pm$ 1 790	55 073 $\pm$ 2 794	31 497 $\pm$ 2 976	96 644 $\pm$ 1 621	127 655 $\pm$ 2 616	88 912 $\pm$ 1 260	57 554 $\pm$ 1 685	76 847 $\pm$ 2 077
Transición	5 012 $\pm$ 143	5 003 $\pm$ 210	4 062 $\pm$ 297	3 683 $\pm$ 415	10 631 $\pm$ 327	14 847 $\pm$ 436	7 553 $\pm$ 191	3 805 $\pm$ 68	6 825 $\pm$ 288
Primario	250 $\pm$ 24	154 $\pm$ 16	190 $\pm$ 27	55 $\pm$ 8	818 $\pm$ 67	164 $\pm$ 14	405 $\pm$ 24	126 $\pm$ 13	270 $\pm$ 30
Secundario	66 $\pm$ 9	106 $\pm$ 9	9 $\pm$ 3	10 $\pm$ 4	51 $\pm$ 8	100 $\pm$ 9	109 $\pm$ 8	30 $\pm$ 6	60 $\pm$ 7
Total	98 682 $\pm$ 874	69 352 $\pm$ 1802	59 334 $\pm$ 2810	35 245 $\pm$ 3005	108 145 $\pm$ 1655	142 765 $\pm$ 2652	96 980 $\pm$ 1275	61 516 $\pm$ 1686	84 002 $\pm$ 2 097
Suma ambos ovarios	168 034 $\pm$ 2 003		94 579 $\pm$ 4 114		250 910 $\pm$ 3 126		158 495 $\pm$ 2114		168 005 $\pm$ 2 966

* Procedimiento llevado a cabo con la metodología y factor de corrección descritos por Gougeon & Chainy (1987)

Cuadro 2. Diámetro de núcleo de ovocito, máximo diámetro de folículo, diámetro perpendicular más ancho del folículo, máximo diámetro de ovocito, diámetro perpendicular más ancho del ovocito y profundidad de ubicación de folículos ($X \pm DE$) de folículos pre antrales de fetos de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*).

Folículo	Núcleo (μm)	Folículo (μm)	Diámetro perpendicular de folículo (μm)	Ovocito (μm)	Diámetro perpendicular de ovocito (μm)	Profundidad* (μm)
Primordial (n= 150)	8,7 $\pm$ 1,6 ^a	30,6 $\pm$ 5,6 ^a	22,0 $\pm$ 4,4 ^a	23,7 $\pm$ 5,2 ^a	16,2 $\pm$ 3,8 ^a	170,7 $\pm$ 65,4 ^a
Transición (n= 50)	11,0 $\pm$ 2,0 ^b	40,2 $\pm$ 9,8 ^b	28,6 $\pm$ 6,6 ^b	30,0 $\pm$ 8,4 ^b	20,4 $\pm$ 5,2 ^b	247,6 $\pm$ 121,5 ^b
Primario (n= 30)	12,3 $\pm$ 2,5 ^c	42,9 $\pm$ 10,6 ^b	34,2 $\pm$ 7,8 ^c	30,2 $\pm$ 8,3 ^b	22,5 $\pm$ 6,0 ^b	410,7 $\pm$ 164,6 ^c
Secundario (n= 15)	14,0 $\pm$ 2,7 ^d	114,4 $\pm$ 34,3 ^c	72,8 $\pm$ 17,4 ^c	45,3 $\pm$ 11,5 ^c	32,4 $\pm$ 8,7 ^c	950,7 $\pm$ 353,2 ^d

^{a-d} Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de columnas ($P < 0.05$)

*Profundidad de ubicación de folículos

Cuadro 3. Tipo de folículos (%) y folículos degenerados (%) en ovarios fetales de lobo marino fino peruano (*Arctocephalus australis*).

Folículo	Tipo de folículos evaluados (%)^a	Total de folículos evaluados (n) ^a	Folículos normales (%)^b	Folículos degenerados (%)^b
Primordial	89,13	49 813	92,11	7,89
Transición	10,35	5 782	91,14	8,86
Primario	0,43	240	67,5	32,5
Secundario	0,1	54	88,89	11,11
Total	100	55 889	91,9	8,1

a. Media de folículos contabilizada para cada tipo folicular del total de láminas evaluadas (n= 138).

b. Porcentajes estimados a partir del Total de folículos evaluados.

Otras características histológicas de los ovarios evaluados fue la presencia de células intersticiales (*Endocrinocytus interstitialis*) distribuidas por la corteza y médula ovárica. Especialmente en la zona medular se observó la formación de grupos de células delimitadas por delgadas fibras de tejido conectivo de forma poliédrica irregular. Se observó en algunas instancias la presencia de folículos secundarios antrales; sin embargo, esta fue una característica que no se encontró en la mayoría de los ovarios

No se observó correlación significativa entre la reserva ovárica de folículos pre antrales y el tamaño del feto, peso del feto, tamaño de ovario y peso de ovario ($P>0,05$) (Anexo 5). Por otra parte, se encontró una correlación positiva entre el tamaño del folículo y el tamaño del núcleo del folículo ($P<0,0001$).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se reporta la primera evaluación histomorfométrica de ovarios de fetos de lobo marino fino (*Arctocephalus australis*) de la subpoblación peruana/norte de Chile colectados de eventos de abortos enzoóticos en Punta San Juan, Perú. Se describe en detalle los diferentes componentes macroscópicos y microscópicos que constituyen la morfología normal de ovarios y la reserva de gametos durante la etapa gestacional en que ocurrieron los abortos.

En este estudio se utilizaron ovarios fetales de tiempo de gestación desconocido. Sin embargo, las hembras de la especie *A. australis* se caracterizan por tener una reproducción bastante sincrónica; esto quiere decir que los ciclos reproductivos de las hembras en la locaciones y latitudes similares se llevan a cabo en simultáneo (Pavés et al., 2016). Debido a ello, se plantea en este estudio que los fetos de lobos marinos finos peruanos encontrados en los eventos de abortos en Punta San Juan de Marcona se encuentran en periodos similares de gestación. Se estima que la gestación activa de la especie *A. australis* dura aproximadamente 9 meses (Katz, 2011), de esta forma las muestras colectadas en este estudio corresponderían a fetos del segundo tercio de gestación (mes 5 o 6 de gestación aproximadamente) (véase Figura 3).

Los fetos encontrados en las playas de Punta San Juan se caracterizaron por estar considerablemente frescos por ser producto de eventos de abortos recientes (<12 horas aproximadamente). En algunas circunstancias fue posible incluso observar el evento de aborto y coleccionar las muestras de los fetos de forma inmediata. En algunos casos, se observó fetos con reflejos de respiración y latidos cardiacos evidentes. Los fetos del año 2016 fueron colectados el día 29 de julio (AA.2016.015) y 30 de julio (AA.2016.020) (1 día de diferencia). Por su vez, los fetos del año 2017 fueron colectados el día 14 de julio y (AA.2017.003) y 20 de julio (AA.2017.012) (6 días de diferencia). Debido a la proximidad de las fechas de colecta y la sincronía reproductiva de la especie *A. australis* fue posible comparar y establecer que especie. La causa que origina los abortos aún está en investigación, sin embargo, se consideró

como una asunción del estudio que estos eventos no tienen impacto en el establecimiento y cantidad de folículos ováricos observados.

En los ovarios fetales evaluados no se observó la presencia de oogonias ni cuerdas o nidos oovígeras, característica común en ovarios fetales de otras especies en estadios más tempranos del desarrollo embrionario (Pepling et al., 2001; Sawyer et al., 2002). Los diferentes tipos de folículos ováricos se encontraron claramente diferenciados. Esto indicaría que los fetos encontrados se encuentran en una fase avanzada del desarrollo embrionario cuando se compara con otras especies. A excepción de roedores, los cuales nacen con cuerdas oovígeras o foliculares (Findlay et al., 2015a), otras especies evaluadas según literatura establecen el *breakdown* de estas cuerdas y el establecimiento de folículos diferenciados durante el segundo tercio de gestación (Monniaux et al., 2014), lo cual refuerza además la asignación del tiempo de gestación estimada para los fetos de *A. australis* usada en este trabajo.

Cabe mencionar que para comprobar el cálculo apropiado de la reserva ovárica de folículos pre antrales se desarrolló una verificación de los métodos (Anexo 3 y 6). Para ello primero fue realizada una comparación del número de folículos contabilizados en el microscopio, a aumentos de 100X y 400X. La idea inicial consistió en que a mayor resolución existe una mejor visualización y diferenciación de los folículos ováricos. En ese sentido, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de folículos contabilizados a 100X y 400X, motivo por el cual se optó por realizar la evaluación digital de láminas subsecuentes con aumento de 100X (Anexo 3). Asimismo, se buscó validar que la cantidad de folículos estimados con el factor de corrección reportado por Gougeon y Chainy (1987) fuera similar considerando el montaje de láminas evaluadas a cada 10 y 20 cortes. El factor de corrección antes mencionado incorpora como una de sus variables el número de cortes evaluados. Debido a ello, el montaje y evaluación de láminas a cada 10 cortes se planteó que sería igual que a cada 20 cortes. No obstante, el esfuerzo de procesamiento manual y digital para el análisis de láminas a cada 10 cortes resultó más complejo y laborioso que a cada 20 cortes. En ese sentido, no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de folículos pre antrales estimados con montaje y evaluación de láminas a cada 10 y 20 cortes, por lo que se consideró que el factor de corrección ajusta estas

diferencias en la metodología y se optó por continuar con el análisis posterior a cada 20 cortes (Anexo 6).

La población encontrada de $84\,002 \pm 2\,097$ folículos pre antrales por ovario es posiblemente la primera descrita para la especie. Se espera que los ovarios fetales posean una mayor cantidad de folículos comparado con otros grupos etarios debido a que, al igual que en otras especies, es durante el desarrollo embrionario que se lleva a cabo el proceso de foliculogénesis. Este proceso genera una gran cantidad de gametos femeninos después de pasar por procesos regulados por un complejo sistema endo- y paracrino (Grive & Freiman, 2015). La generación de todas estas células reproductivas durante el periodo fetal cumple su función de proveer de una reserva de células reproductivas para la vida adulta de las hembras (Bristol-Gould et al., 2006). Sin embargo, ha sido observado en ovarios fetales de otras especies que la cantidad de folículos disminuye sustancialmente incluso antes del parto (Geber et al., 2012). Debido a ello, la evaluación realizada en este estudio debe ser contrastada con la evaluación de poblaciones de folículos pre antrales en cachorras y hembras adultas para comprender mejor las dinámicas fisiológicas de la reserva ovárica en esta especie. La observación de cortes histológicos de ovarios de hembras adultas de la especie *A. australis* corroboró una disminución aparente en la cantidad de folículos ováricos en comparación con ovarios fetales (Vilchez, comunicación personal, 15 de diciembre de 2020). No obstante, es importante realizar las estimaciones de folículos pre antrales para determinar de forma cuantitativa las diferencias existentes entre los ovarios de cada clase etaria.

Otros estudios han utilizado la misma metodología propuesta por Gougeon & Chainy (1987) para la estimación de folículos ováricos y proporcionan datos comparables con los encontrados en este estudio. De esa forma se ha encontrado que fetos de ganado *Bos taurus* de entre 180 y 240 días de gestación presentan $285\,155 \pm 325\,195$ folículos pre antrales, lo que equivale a más del triple de folículos encontrado en ovarios fetales de lobo marino fino peruano. Por otro lado, fetos de *Bos indicus* presentan $143\,929 \pm 64\,028$ folículos pre antrales (Silva-Santos et al., 2011). En adición a ello, fetos humanos del segundo tercio de gestación (semana 26) presentaron $1\,082\,960$ (Geber et al., 2012) y mujeres adultas (36 – 40 años)

presentaron $21\,450 \pm 2\,650$ folículos pre antrales (Faddy et al., 1992). Por su vez, perras pre púberes (*Canis lupus familiaris*) de tamaño pequeño presentaron un total de $78\,838 \pm 83\,080$ folículos pre antrales, mientras que hembras adultas presentaron $61\,641 \pm 48\,978$ (Lunardon et al., 2015). Otras especies evaluadas como burros silvestres (*Equus assinus*) y monos aulladores (*Alouatta caraya*) presentaron una media de $10\,568 \pm 2\,793$ y $59\,921$ folículos pre antrales por ovario respectivamente (Lopes et al., 2006c; Lopes et al., 2017b). Más detalle sobre reportes de estimaciones foliculares en otras especies se puede encontrar en el Anexo 7.

Algunos autores señalan que la variación existente entre las poblaciones de folículos pre antrales de distintas especies tienen un sentido biológico. Así, especies con expectativa de vida más longeva y aquellos que tienen una mayor cantidad de crías presentarían una mayor cantidad de folículos pre antrales. Por el contrario, aquellas especies con menor expectativa de vida y cantidad de crías poseerían una menor cantidad de folículos en función a la utilidad e inversión energética que estas generarían para las hembras (Gosden & Telfer, 1987; Findlay et al., 2015a). No obstante, estos ejemplos no deben ser asumidos como reglas pues múltiples factores pueden influenciar en las dinámicas foliculares entre cada especie e individuos incluso después del parto (Richardson et al., 2014). Los procesos que regulan la fertilidad y empleo de reserva ovárica en hembras adultas van más allá de la simple estimación de poblaciones foliculares (Monniaux et al., 2014). Por otro lado, es sabido que en mujeres adultas la disminución de la población de folículos pre antrales es una de las características más resaltantes que condicionan el ingreso al periodo de menopausia (Te Velde, 2002).

El lobo marino fino peruano es una especie monotoca, lo cual significa que puede gestar hasta 1 cría a la vez (Majluf, 1987). Las hembras pueden comenzar su vida sexual activa tan temprano como a los 3 años y tienen una expectativa de vida menor a 25 años en silvestría (Cárdenas-Alayza, comunicación personal). No se conoce hasta la fecha si las hembras poseen un periodo de menopausia; sin embargo, es posible que no lo tengan debido a que estos son complejos mecanismos evolutivos presentes en especies con vidas más longevas como seres humanos y orcas (Croft et al., 2017). La comparación entre las poblaciones estimadas de folículos pre antrales con fetos de otras especies reflejan aparentemente que los ovarios de los fetos de

lobos marinos finos son propios de una especie donde las hembras presentan una menor cantidad de crías, ciclos reproductivos o años de vida.

En este estudio se advierte sobre las limitaciones de extrapolar los resultados encontrados con la posible cantidad de folículos pre antrales que se esperarían al nacimiento. Además, se pudo evidenciar diferencias entre la cantidad de folículos estimados entre los diferentes fetos evaluados. Se plantea como hipótesis la posibilidad de que estas diferencias observadas en la cantidad de folículos por individuos se pueden mantener en el tiempo y signifique que la cantidad de folículos con los que nacerían los individuos de esta especie sería variada. Estas diferencias encontradas en ovarios evaluados de distintos individuos ha sido también mencionadas para otras especies (Silva-Santos et al., 2011). La alta variación individual podría explicar diferencias en la capacidad reproductiva de ciertas hembras, aunque estudios sugieren la existencia de procesos post nacimiento que regulan una eficiente utilización de folículos pre antrales y no permite un agotamiento temprano de los folículos en aquellas hembras que nacen con una reserva ovárica disminuida (Bristol-Gould et al., 2006; Ruoss et al., 2009). Las razones que explican estas diferencias individuales entre los fetos y el posible impacto que tienen para la reproducción de la especie aún no se conoce.

No se observaron correlaciones entre la reserva de folículos pre antrales y características como el tamaño del feto, el peso del feto, el tamaño del ovario y el peso del ovario ($P > 0,05$). Estos resultados indican una independencia de las variables evaluadas que en otras palabras significa que ninguna de las características antes mencionadas puede explicar las diferencias individuales encontradas en las reservas ováricas de cada feto. No obstante, se recomienda la evaluación de un mayor número de muestras para dar más consistencia o rechazar los planteamientos anteriores. Por el contrario, estudios realizados con ovarios de burras silvestres (*Equus assinus*) encontraron una correlación inversa entre la cantidad de folículos pre antrales y el peso de las hembras. De esta manera, hembras más pesadas presentaron una menor cantidad de folículos pre antrales (Lopes et al., 2017b). Más evidencia sería necesaria para comprobar o rechazar este fenómeno en individuos de la especie *A. australis* debido a lo cual se recomienda para estudios posteriores

complementar siempre la información de los ovarios con la biometría y peso de las hembras de donde fueron colectadas.

Se observaron además diferencias significativas entre las medidas realizadas a los diferentes tipos de folículos. En el caso del tamaño máximo de folículo o tamaño de folículo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre cada tipo de folículo evaluados, excepto entre los folículos de transición y primarios donde no se observaron diferencias significativas en los tamaños. Esto se puede deber a que los folículos de transición presentan características similares a los folículos primarios con la diferencia que no todas las células de la pre granulosa son cúbicas simples. Las mediciones de folículos pre antrales obtenidas en este estudio fueron contrastadas con resultados obtenidos en ovarios de cachorras de la especie *A. australis* de Uruguay. En ese sentido, se encontró al igual que en este trabajo, existieron diferencias significativas en los tamaños de folículos y diámetros de núcleos entre los diferentes tipos de folículos pre antrales evaluados (Katz & Johansson, 2013) (Anexo 8). Los resultados histomorfométricos de folículos obtenidos en cachorras de *A. australis* de Uruguay fueron similares a los encontrados en este estudio.

Con respecto a lo antes mencionado, se han realizado estudios con la misma metodología para obtener medidas de folículos pre antrales en otras especies domésticas y silvestres. Así, el tamaño de folículos primordiales de lobos marinos finos fue similar a los tamaños reportados para monos aulladores (*Alouatta caraya*), burros silvestres (*Equus assinus*), ganado vacuno (*Bos indicus*) y gatas (*Felis silvestris catus*) (Kacinskis et al., 2005; Lopes et al., 2006c; Lopes et al., 2017b; Carrijo et al., 2010); por otra parte, son más grandes que los promedios de folículos primordiales calculados para monos machines (*Sapajus apella*) y frailecitos (*Saimiri macrodon*) (Domingues et al., 2004; Lopes et al., 2017a). El tamaño de los ovocitos de folículos primordiales de *A. australis* fue más pequeño que el de mujeres, pero de similar tamaño que el de vacas (*Bos indicus*) (Kacinskis et al., 2005; Westergaard et al., 2007). El tamaño de núcleos de los folículos primordiales de lobos marinos finos peruanos es similar al de monos frailecitos y agutí brasileño (*Dasyprocta leporina*), pero más pequeño que el de mujeres (Westergaard et al., 2007; Lopes et

al., 2017a; Santos et al., 2018). Más detalle sobre la comparación con folículos de otras especies puede encontrarse en el Anexo 8.

En este trabajo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) en la profundidad que fueron encontrados los diferentes tipos de folículos por debajo de la superficie ovárica. Al respecto, los promedios y diferencias obtenidas fueron consistentes con reportes previos realizados con ovarios de cachorras (Katz & Johansson, 2013). Para fetos, la distribución de los folículos primordiales, primarios y secundarios tuvo rangos de profundidad de 19 a 323, 191 a 900 y 461 a 1640 μm ; estos rangos para cachorras fueron de 13 a 400, 17 a 1062 y 101 a 1295 μm , respectivamente. Estas mediciones pueden verse afectadas dependiendo del tamaño de los ovarios evaluados. Es por ello que para calcular estos promedios fueron utilizados cortes sagitales de la parte central de ovarios con tamaños semejantes. Los resultados indican que existe la activación de folículos durante este periodo del desarrollo embrionario, a través del cual los folículos crecen y maduran orientándose hacia la zona medular central. En otras especies como equinos se sabe que los folículos se encuentran y desarrollan en la zona central del ovario, además de presentar una ovulación interna a través de la fosa de ovárica (Lopes et al., 2017b). La función de este crecimiento de folículos hacia la zona medular durante la etapa fetal y en cachorras de lobo marino aún no se conoce. Se sugiere realizar evaluaciones más exhaustivas para tener una mejor descripción de estos fenómenos en hembras adultas.

El porcentaje de folículos pre-antrales encontrados en este estudio fue de 89,13%, 10,35%, 0,43% y 0,1% para los folículos primordiales, de transición, primarios y secundarios, respectivamente. En otras especies se han reportado porcentajes similares como en agoutí brasileño (86,63% primordiales; 13,02% primarios; 0,35% secundarios) (Santos et al., 2018). En otras especies, sin embargo, se han encontrado porcentajes variados como en alpacas adultas (71,16% primordiales; 22,37% transición; 6,1% primarios; 0,37% secundarios) (Echevarria et al., 2019), monos frailecitos (32% primordiales; 20% transición; 18% primarios; 30% secundarios) (Lopes et al., 2017a), elefantes africanos de sabanas ($< 2\%$ primordiales; 75,8 % transición; 23,8% primarios) (Stansfield et al., 2011), gatas (87% primordiales; 10,4% primarios; 2,3% secundarios)

(Carrijo et al., 2010) y fetos de ganado bovino (*Bos taurus*) (82,26% primordiales; 16,28 % primarios; 1,46% secundarios) (Silva-Santos et al., 2011).

El porcentaje de folículos degenerados reportado en este estudio es del 8,1%. Las células clasificadas en apoptosis o con signos de degeneración han sido determinadas usando características morfológicas como ovocitos con núcleos picnóticos, citoplasma retraídos y células de la pre granulosa desorganizadas y desprendidas de la membrana basal (Echevarria et al., 2019). No obstante, esta metodología puede presentar un margen de error considerable y se recomienda para futuros estudios hacer uso de herramientas como inmunohistoquímica (ensayo TUNEL, Caspasa-3, Ki-67, FAS/FAS-L) para el marcaje de células en apoptosis con mayor sensibilidad (Albamonte et al., 2019; Lombardi et al., 2014). Otros estudios que realizaron la identificación de folículos degenerados basados en características histomorfológicas encontraron diversos porcentajes: agutí brasileño (29,22%) (Santos et al., 2018), mono machín (20,75%) (Domingues et al., 2004), alpaca (13,28%) (Echevarria et al., 2019) y burras silvestres (9,77%) (Lopes et al., 2017b).

La presencia de criptas subcapsulares no fue observada entre las muestras evaluadas. Este sistema de criptas es un conjunto de invaginaciones del epitelio germinativo, el cual se proyecta hacia la túnica albugínea y se considera que tiene una función importante en la formación de cordones celulares y células intersticiales, además de mantener una estrecha relación con folículos ováricos (Mülling et al., 1998). Es importante mencionar que el sistema de criptas subcapsulares es una característica típica de ovarios de carnívoros (Akihara et al., 2007) y especialmente de lobos marinos (Katz et al., 2009; Palma-Cerda et al., 2012), por lo tanto, una posible explicación es que el desarrollo de las criptas subcapsulares ocurre en periodos posteriores del desarrollo fetal o al nacimiento. Evaluaciones adicionales deben realizarse para esclarecer el tiempo de desarrollo de las criptas y la función que cumplen en los ovarios de la especie *A. australis*.

Por otro lado, fue posible observar la ocurrencia anecdótica de folículos poliovulares con una incidencia mínima. La presencia de folículos poliovulares ha sido descrita en otras especies de carnívoros como en perras donde la prevalencia es alta y el 55% de ovarios evaluados en un estudio presentaron folículos con estas características (Lunardon et al., 2015). Se ha sugerido que

la presencia de folículos poliovulares representan la ocurrencia una organogénesis incompleta del ovario (Domingues et al., 2004), no obstante, hasta la fecha no se conoce si tienen alguna implicancia en la reproducción de las hembras y la fisiología ovárica.

Se recomienda para futuros estudios la preservación de muestras ováricas en solución tamponada al 4% de formaldehído o de preferencia en solución de Bouin, debido a que preserva mejor las estructuras celulares de tejidos blandos como los ovarios. Además, se recomienda que los ovarios colectados sean procesados rápidamente y colocados en bloques de parafina lo antes posible, de manera que se preserven mejor los tejidos y sirvan para estudios posteriores de inmunohistoquímica. En adición, se espera que futuros estudios incorporen otras tinciones de diferenciación como la tinción de ácido peryodico de Schiff (PAS) y la tinción tricrómica de Masson.

En este trabajo se realizó una revisión histomorfométrica de los folículos ováricos de lobo marino fino peruano y esto tiene una importancia fundamental para la evaluación de técnicas de reproducción asistida en cautiverio o *in-vitro*. En adición a ello, sirve como base comparativa para futuros estudios que se espera puedan ser realizados con otros grupos etarios de *A. australis* y en otras especies de pinnípedos con las que cohabitan como los lobos marinos chuscos (*Otaria byronia*), los cuales también presentan eventos de abortos de los cuales se podrían obtener muestras de ovarios fetales.

CONCLUSIONES

- En base a lo descrito en este estudio, se estima que la cantidad de folículos ováricos pre antrales en fetos sea superior a la de cachorras y hembras adultas, tal como sucede en otras especies mamíferas.
- Los folículos primordiales representan el principal componente de la reserva ovárica en los ovarios fetales de *A. australis*.
- Durante el periodo de desarrollo fetal que fueron obtenidos las muestras fetales para este estudio no existió un aumento aparente de degeneración de gametocitos.
- Los folículos primordiales representan aquellos de menor tamaño debido a que, a diferencia de otros tipos de folículos, aún no han pasado por un proceso de activación y desarrollo de células de la pre granulosa.
- Para el segundo tercio de gestación de las hembras de *A. australis*, los folículos primordiales han culminado su proceso de formación y el tamaño de los mismos permanecería inmutable a través de las diferentes clases etáreas de la especie.
- En base a la evidencia presentada, es posible inferir que la disposición de los folículos ováricos más desarrollados hacia zonas de mayor profundidad por debajo de la corteza ovárica se deba a una orientación hacia zonas de mayor vascularización como las encontradas en zonas cercanas a la médula ovárica.

BIBLIOGRAFIA

- Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasaki K, Komine M, Hirayama K, Terasawa A, Ohmachi T, Matsuda K, Okamoto M, & Taniyama H. 2007. Histological and immunohistochemical evaluation of canine ovary. *Reprod. Domest. Anim.*, 42(5): 495–501.
- Albamonte MI, Albamonte MS, Bou-Khair RM, Zuccardi L, & Vitullo AD. 2019. The ovarian germinal reserve and apoptosis-related proteins in the infant and adolescent human ovary. *J. Ovarian Res.*, 12(1): 22.
- Almeida D V., Santos RR, Scalercio SR, Leão DL, Haritova A, Oskam IC, & Domingues SFS. 2012. Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Anim. Reprod. Sci.*, 134(3–4): 210–215.
- Alves KA, Alves BG, Rocha CD, Visonná M, Mohallem RFF, Gastal MO, Jacomini JO, Beletti ME, Figueiredo JR, Gambarini ML, & Gastal EL. 2015. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology*, 83(6): 1048–1055.
- Arias-Schreiber M, & Rivas C. 1998. Distribución, tamaño y estructura de las poblaciones de lobos marinos *Arctocephalus australis* y *Otaria byronia* en el litoral Peruano, en Noviembre 1996 y Marzo 1997. *Inf. Prog. Inst. Mar Perú N° 73*, 17–32.
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, & Woodruff TK. 2006. Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. *Dev. Biol.*, 298(1): 132–148.
- Cárdenas-Alayza S. 2007. Preferencia de uso de sitios para pariciones por hembras de *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) en la Reserva Guanera Punta San Juan, Perú. Tesis para optar el título de Licenciado en Ciencias con mención en Biología. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 116 p.
- Cárdenas-Alayza S. 2012. Prey abundance and population dynamics of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) in Peru. Master of science thesis. Vancouver: University of

- British Columbia. 79 p.
- Cárdenas-Alayza S, & De Oliveira LR. 2016. *Arctocephalus australis* (Peruvian/Northern Chilean subpopulation), Peruvian Fur Seal. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T72050476A72050985.en>
- Carrijo OA, Marinho APS, Campos AA, Amorim CA, Bão SN, & Lucci CM. 2010. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, 191(2): 152–160.
- CITES. 2020. Appendices I, II and III. Retrieved from <https://cites.org/eng/app/appendices.php>
- CMS. 2020. Convención sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres. Retrieved January 20, 2021, from <https://www.cms.int/es/legalinstrument/cms>
- Croft DP, Johnstone RA, Ellis S, Natrass S, Franks DW, Brent LNJ, Mazzi S, Balcomb KC, Ford JKB, & Cant MA. 2017. Reproductive Conflict and the Evolution of Menopause in Killer Whales. *Curr. Biol.*, 27(2): 298–304.
- De Oliveira LR. 2011. Vulnerability of South American Pinnipeds Under El Niño Southern Oscillation Events. In *Global Warming Impacts - Case Studies on the Economy, Human Health, and on Urban and Natural Environments* (pp. 237–252).
- De Oliveira LR, Arias-Schreiber M, Meyer D, & Morgante JS. 2006. Effective population size in a bottlenecked fur seal population. *Biol. Conserv.*, 131(4): 505–509.
- De Oliveira LR, & Brownell RL. 2014. Taxonomic status of two subspecies of South American fur seals: *Arctocephalus australis australis* vs. *A. a. gracilis*. *Mar. Mammal Sci.*, 30(3): 1258–1263.
- De Oliveira LR, Meyer D, Hoffman J, Majluf P, & Morgante J. 2009. Evidence of a genetic bottleneck in an El Niño affected population of South American fur seals, *Arctocephalus australis*. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*, 89(8): 1717–1725.
- Domingues SFS, Diniz LV, Furtado SHC, Ohashi OM, Rondina D, & Silva LDM. 2004. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amaz.*, 34(3): 495–501.
- DS N° 024 -2009-MINAM. 2009. Decreto Supremo que aprueba el establecimiento de la

- Reserva Nacional Sistema de Islas, Islotes y Puntas Guaneras. Lima. Retrieved from http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/decreto_supremo_024-2009.pdf
- Echevarria L, Leiva-Revilla J, Andrade R, Smitz J, & Figueiredo JR. 2019. First characterization of preantral follicles in the ovaries of adult alpaca. *Memorias Del Inst. Investig. En Ciencias La Salud*, 17(2): 102–106.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, & Nelson JF. 1992. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. *Hum. Reprod.*, 7(10): 1342–1346.
- Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, & Anderson RA. 2015a. How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established? *Biol. Reprod.*, 93(5): 111, 1–7.
- Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, & Anderson RA. 2015b. What is the “ovarian reserve”? *Fertil. Steril.*, 103(3): 628–630.
- Geber S, Megale R, Vale F, Lanna AMA, & Cabral ACV. 2012. Variation in ovarian follicle density during human fetal development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 29(9): 969–972.
- Gosden RG, & Telfer E. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zool.*, 211(1): 169–175.
- Gougeon A, & Chainy GBN. 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fertil.*, 81(2): 433–442.
- Gregory T. 2015. Brookfield Zoo’s quiet crusade: Saving wildlife on the Peruvian coast. *Chicago Trib.*, p. 1. Disponible en <https://www.chicagotribune.com/news/ct-brookfield-zoo-peru-marine-conservation-20151222-story.html#>
- Grive KJ, & Freiman RN. 2015. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development*, 142(15): 2554–2563.
- Guillette L, & Moore B. 2006. Environmental Contaminants, Fertility, and Multioocytic Follicles: A Lesson from Wildlife? *Semin. Reprod. Med.*, 24(03): 134–141.
- Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Schwartz J, & Rodgers RJ. 2019. Development of the Mammalian Ovary and Follicles. In *The Ovary* (pp. 71–82).
- Hyttel P, Sinowatz F, & Vejlsted M. 2010. Essentials of domestic animals embryology. In

Saunders Elsevier (p. 20).

- Kacinskis MÁ, Lucci CM, Luque MCA, & Bão SN. 2005. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 87(1–2): 45–57.
- Katz H. 2011. Estudio histomorfológico del tracto reproductor de cachorras de lobo fino sudamericano: *Arctocephalus australis*. Tesis de Maestría. Universidad de la República (Uruguay), Facultad de Veterinaria. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=FCT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf&n=002207>
- Katz H, & Johansson O. 2013. Ovarian follicular morphometry of south american fur seal pups (*Arctophoca australis*). *Anat. Rec.*, 296(10): 1658–1663.
- Katz H, & Johansson O. 2017. Reproductive Tract Histology in South American Fur Seal Pups (*Arctophoca australis*). *Anat. Rec.*, 300(3): 600–613.
- Katz H, Pérez W, Bielli A, & Chavez R. 2009. Histomorphology of prepuberal ovaries in the South American fur seal (*Arctocephalus australis* Zimmerman, 1783). *Folia Morphol. (Warsz.)*, 68(4): 277–286.
- Katz H, Pessina P, & Franco-Trecu V. 2013. Serum progesterone concentration in female south american fur seals (*Arctophoca australis*) during the breeding season. *Aquat. Mamm.*, 39(3): 290–295.
- Lombardi LA, Simões RS, Maganhin CC, Baracat MCP, Silva-Sasso GR, Florencio-Silva R, Soares Jr JM, & Baracat EC. 2014. Immunohistochemical evaluation of proliferation, apoptosis and steroidogenic enzymes in the ovary of rats with polycystic ovary. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 60(4): 349–356.
- Lopes GP, Santos RR, Almeida D V., Brito AB, Queiroz HL, & Domingues SFS. 2017. Population estimate and morphometry of ovarian preantral follicles from three recently recognized squirrel monkey species: a comparative study. *Zygote*, 25(3): 279–287.
- Lopes KRF, Lima GL, Bezerra LGP, Barreto-Junior RA, Oliveira MF, & Silva AR. 2017. Characterization of the ovarian preantral follicle populations and its correlation with age and nutritional status in Brazilian Northeastern donkeys (*Equus assinus*). *Anim. Reprod.*

- Sci.*, 187: 193–202.
- Lopes LHR, Lucci CM, Garcia MP, de Azevedo RB, & Bao SN. 2006. Light Microscopical and Ultrastructural Characterization of Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) Ovarian Follicles. *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med. Ser. C*, 35(3): 196–201.
- Lunardon NT, Silva-Santos KC, Justino RC, Dessunti GT, Seneda MM, & Martins MIM. 2015. Population estimate of the preantral follicles and frequency of multioocyte follicles in prepubertal and adult bitches. *Theriogenology*, 83(6): 1015–1020.
- Majluf P. 1987. Reproductive ecology of female South American fur seals in Punta San Juan, Perú. PhD Thesis. England: University of Cambridge.
- Majluf P. 1992. Timing of births and juvenile mortality in the South American fur seal in Peru. *J. Zool.*, 227(3): 367–383.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Decreto Supremo N° 004-2014-MINAGRI (2014). Perú: El Peruano.
- Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, & Monget P. 2014. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biol. Reprod.*, 90(4): 85, 1–11.
- Mülling C, Christian B, & Budras KD. 1998. Subsurface crypts and interstitial cells in the ovary of the seal (*Phoca vitulina vitulina*): light and electron microscopic findings. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 4(1): 167–181.
- Palma-Cerda F, Di Fiore MM, Sepúlveda M, Duran LR, & Raucci F. 2012. Ovarian folliculogenesis in the southern sea lion *Otaria flavescens*. *Acta Zool.*, 93(4): 444–452.
- Pavés HJ, Schlatter RP, Franco-Trecu V, Páez E, Sielfeld W, Araos V, Giesecke R, Batallés LM, & Cappozzo HL. 2016. Breeding season of the South American fur seal (*Arctocephalus australis*, Otariidae: Carnivora): New data for establishing independent evolutionary histories? *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 51(2): 241–253.
- Pepling ME, & Spradling AC. 2001. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Dev. Biol.*, 234(2): 339–351.
- Richardson MC, Guo M, Fauser BCJM, & Macklon NS. 2014. Environmental and

- developmental origins of ovarian reserve. *Hum. Reprod. Update*, 20(3): 353–369.
- Ruoss C, Tadros A, O’Shea T, McFarlane J, & Almahbobi G. 2009. Ovarian follicle development in Booroola sheep exhibiting impaired bone morphogenetic protein signalling pathway. *Reproduction*, 138(4): 689–696.
- Santos EAA, Lima GL, Praxedes ECG, Silva AM, Maia KM, Oliveira MF, Rodrigues APR, & Silva AR. 2018. Estimation, morphometry and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in agouti (*Dasyprocta leporina*). *Pesqui. Veterinária Bras.*, 38(1): 175–182.
- Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, & McNatty KP. 2002. Formation of Ovarian Follicles During Fetal Development in Sheep1. *Biol. Reprod.*, 66(4): 1134–1150.
- SERFOR, & WCS. 2018. Libro Rojo: Fauna Silvestre Amenazada del Perú. *Lima: Depósito legal en la Biblioteca Nacional del Perú*.
- Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, Sturion L, Melo-Sterza FA, & Seneda MM. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76(6): 1051–1057.
- Smith P, Wilhelm D, & Rodgers RJ. 2014. Development of mammalian ovary. *J. Endocrinol.*
- Stansfield FJ, Picton HM, & Nöthling JO. 2011. Early primary-rather than primordial follicles constitute the main follicular reserve in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Anim. Reprod. Sci.*, 123(1–2): 112–118.
- te Velde ER. 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update*, 8(2): 141–154.
- Timmermann A, Oberhuber J, Bacher A, Esch M, Latif M, & Roeckner E. 1999. Increased El Niño frequency in a climate model forced by future greenhouse warming. *Nature*, 398(6729): 694–697.
- Tingen C, Kim A, & Woodruff TK. 2009. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol. Hum. Reprod.*, 15(12): 795–803.
- Vilchez F, Colchao P, & Cárdenas-Alayza S. 2016. Estacionalidad de abortos de lobo marino fino sudamericano (*Arctocephalus australis* sp.) en la playa S3 Punta San Juan, Ica, Perú.

- In *Libro de resúmenes V Congreso de Ciencias del Mar del Perú* (p. 219). Lambayeque.
- Vilchez F, Escobar-Mendoza LL, Adkesson M, Colchao P, & Cárdenas-Alayza S. 2018. Evaluation of enzootic abortion events in the Peruvian population of South American Fur Seals (*Arctocephalus australis*) at Punta San Juan, Peru. In *67th Annual International Wildlife Disease Association Conference* (p. 83). St. Augustine, Florida.
- Vilchez F, Llerena C, Echevarría L, Escobar LL, & Cárdenas-Alayza S. 2017. Histological description of a post estrous adult female reproductive tract in a South American Fur Seal of the Peruvian subpopulation (*Arctocephalus australis*). In *33rd WORLD VETERINARY CONGRESS* (p. 888). Incheon, South Korea.
- Walker ML, Anderson DC, Herndon JG, & Walker LC. 2009. Ovarian aging in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Reproduction*, 138(5): 793–799.
- Westergaard CG, Byskov AG, & Andersen CY. 2007. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Hum. Reprod.*, 22(8): 2225–2231.

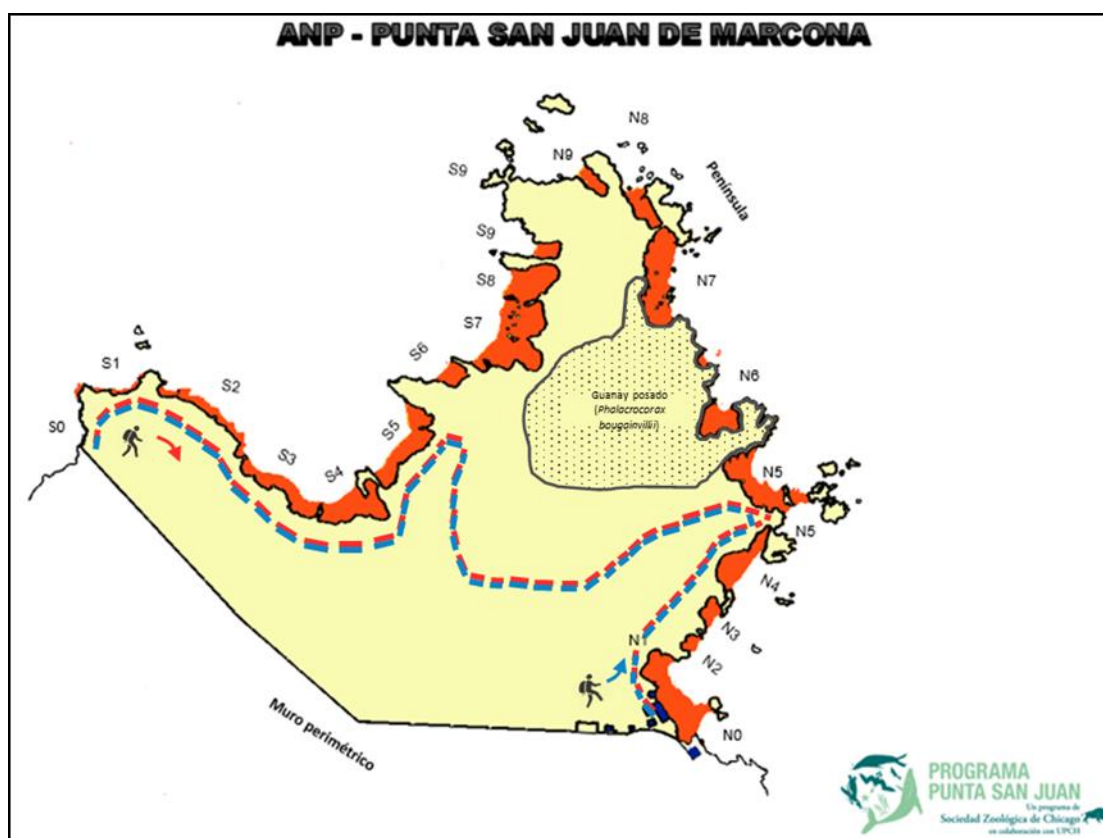
ANEXO 1

METODOLOGÍA DE CAMPO

PARA COLECTA DE MUESTRAS FETALES CON MINIMIZACIÓN DE IMPACTO A COLONIAS REPRODUCTIVAS

Las actividades de campo entre los años 2016-2017 se llevaron a cabo siguiendo la misma metodología. Una persona estuvo encargada del registro en la playa S3 y otra persona encargada de realizar rondas diarias por las distintas playas de la ANP-PSJ. Siempre respetando a la fauna local que imposibilitaba la visualización de ciertas playas. Para graficar mejor la forma en que se realizaron las rondas véase Figura 1.

Figura 1. Recorrido diario hecho en el mes de julio para el registro de abortos en la ANP-PSJ (Edición propia).



Para la recolección de fetos de las playas la comunicación entre los integrantes del equipo fue de vital importancia (Figura 2). Una vez divisado un aborto, el encargado debía dar aviso por radio sobre la ubicación y accesibilidad del mismo en la playa, además del estado e integridad con que se encuentra el feto. Puesto que los carroñeros (*Cathartes aura ruficollis*) se encuentran siempre alertas y a la expectativa de que la madre abandone a su cría. Se ha observado que, el tiempo que transcurre desde el momento en que se produce un aborto hasta que desaparece por completo, sin dejar rastro del mismo que pueda dar indicio de que ocurrió un aborto en el lugar, puede ser tan corto como 4 minutos (Vilchez com. pers.). Esto debido a la ferocidad con la que se abalanzan los carroñeros cuando la madre deja de proteger al feto. Es por eso que fue necesario que en cada ronda, el encargado debía llevar una mochila equipada con todos los materiales de bioseguridad necesarios para el recojo de los fetos (guantes de latex, mascarillas, mamelucos, red para cabello, bolsas ziploc, etc). En el caso de que el encargado que llevaba la

mochila divisaba un aborto, debía comunicar por radio de igual forma para que un compañero se acercara a brindar asistencia. Una vez que los encargados se encontraban listos e implementados, descendían a las playas de manera sigilosa y prudente hasta aproximarse al lugar donde se encontraba el feto y lo colocaban dentro de una bolsa ziploc (Ziploc® y tipo ziploc genérico) con cierre hermético, véase Figura 3. Existía un tiempo límite de 15 minutos desde el momento del descenso hasta la retirada de la playa que debía cumplirse con rigurosidad para evitar un mayor impacto en las colonias de *A. australis*. Todos los fetos recolectados fueron llevados al laboratorio ubicado en la playa N1 y algunos se colocaron en coolers con hielos para evitar su rápida descomposición.

Figura 2. Diagrama de flujo para la toma de muestras (Elaboración propia).

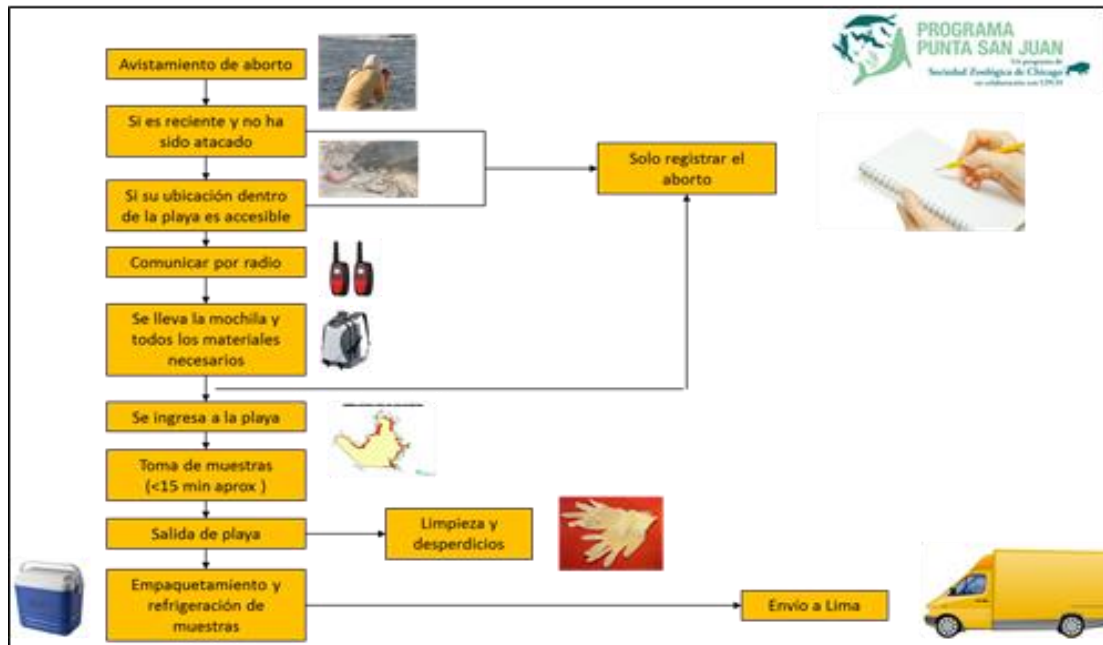


Figura 3. Recolección de fetos realizada con las correctas medidas de bioseguridad y evitando grandes impactos en la colonia reproductiva de *A. australis* de la playa S1 (Foto tomada por: Escobar L., 2016).



ANEXO 2

METODOLOGÍA LABORATORIO

PROTOCOLOS CONVENCIONALES PARA EL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE MUESTRAS – TINCIÓN H&E

Protocolo para el procesamiento de muestras en bloques de parafina

1. Realizar los cortes de tejidos e incluirlos dentro de los cassettes (apenas cortes del tamaño que quepan dentro de los cassettes). Colocar ovarios fetales enteros y por separado.
2. Colocar nombre a los cassettes con los códigos correspondientes (e.g. AA-2016-F02 ovario).
3. Si las muestras que se desean procesar estuvieron conservadas en formol por mucho tiempo (> 1 mes) se debe dejar reposando en Agua Destilada x 12 - 24 horas.
4. Pasado el periodo establecido en el paso 1 (o si las muestras estuvieron conservadas en Alcohol de 70°) se deberá dejar reposando en Alcohol de 70° limpio x 48 horas.
5. Comenzar con el procesamiento de deshidratación de la muestra pasándolo por el Alcohol de 95° I y II x 45 minutos c/u.
6. Pasar las muestras por Alcohol 100° I, II y III x 45 minutos c/u.
7. Pasar las muestras por Xilol (Neo-Clear®) I, II y III x 60 minutos c/u.
8. Sumergir muestras en parafina líquida y dejar en estufa entre 4 – 14 horas (60 °C aproximadamente), puede dejarse *overnight* (i.e. toda la noche) siempre y cuando se procese al día siguiente a las primeras horas de la mañana.
9. Colocar muestra en molde metálico y cubrir con parafina hasta casi el tope, colocar base del cassette en la superficie y dejar enfriar (5 minutos aproximadamente).
10. Dejar en refrigeradora x 15 minutos.
11. Retirar excesos de parafina de bordes del cassette.

Protocolo para tinción H & E

12. Cortar bloque de parafina con tejido usando el micrótopo a 7 µm. (Dejar intervalos de 10 cortes) Ejemplo: corte 1 si, corte 2-10 no, corte 11 si, corte 12-20 no, corte 21 si, etc.
13. Colocar el corte de parafina en agua tibia para extender el tejido y evitar pliegues.
14. Inmediatamente colocar delicadamente el corte en una lámina portaobjetos.
15. Dejar secar, colocar en canastilla y después incubar a 65 °C por 15 minutos mínimo (para mejores resultados dejar hasta 4 horas).
16. Sumergir las canastilla con láminas en Xilol (Neo-Clear®) I, II y III x 5 minutos c/u.
17. Pasar las muestras por Alcohol 100° I y II x 5 minutos c/u.
18. Pasar las muestras por Alcohol 96° I y II x 5 minutos c/u.
19. Pasar las muestras por Alcohol 70° x 5 minutos.
20. Pasar las muestras por Agua destilada x 5 minutos.
21. Sumergir en Hematoxilina x 3 minutos (asegurarse de remover película superficial que se forma en la hematoxilina).
22. Pasar las muestras por Agua destilada x 5 segundos.
23. Pasar las muestras por Alcohol ácido x 5 segundos.
24. Pasar las muestras por Agua destilada x 5-6 minutos.
25. Sumergir en Eosina x 40 segundos.
26. Pasar las muestras por Agua destilada x 5 segundos.
27. Pasar las muestras por Alcohol 70° x 1-2 minutos.
28. Pasar las muestras por Alcohol 96° I y II x 1-2 minutos c/u.
29. Pasar las muestras por Alcohol 100° I y II x 1-2 minutos c/u.
30. Dejar secar brevemente y agregar una gota de resina e inmediatamente colocar la laminilla cubreobjeto.
31. Dejar reposando por 2 horas mínimo.

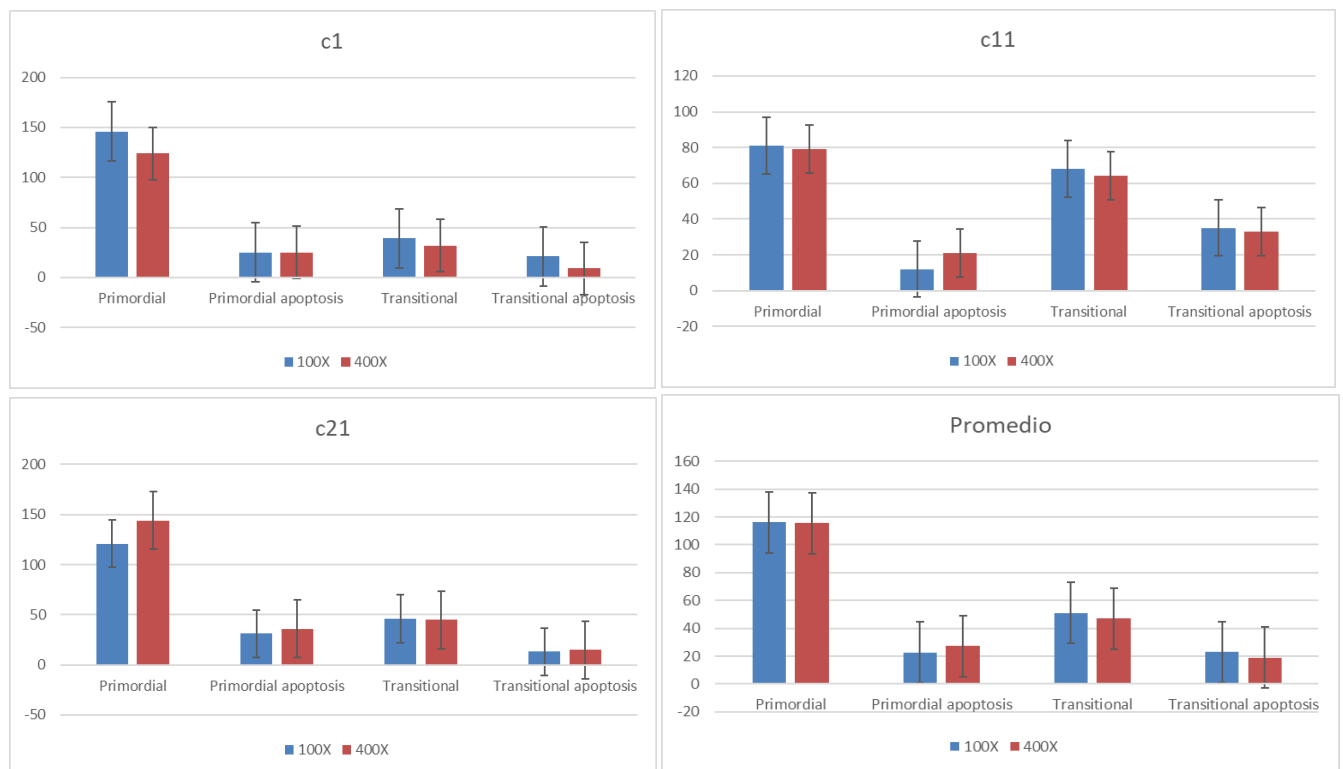
ANEXO 3

COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS

ESTIMACIÓN DE DIFERENCIAS EN CONTEO DE FOLÍCULOS CON IMÁGENES HECHAS A ENFOQUES DE 400X Y 100X

Se realizó la comparación de dos métodos para la estimación de población de folículos pre antrales haciendo uso de imágenes digitales tomadas a enfoques de 400X y 100X. Después del procesamiento y evaluación de tres cortes ováricos se utilizó la prueba de Análisis de Varianza por Rangos de Signado de Wilcoxon para determinar las diferencias con una 95% de confianza.

Resultados: Figuras representan la cantidad contabilizada por cada tipo de folículo.



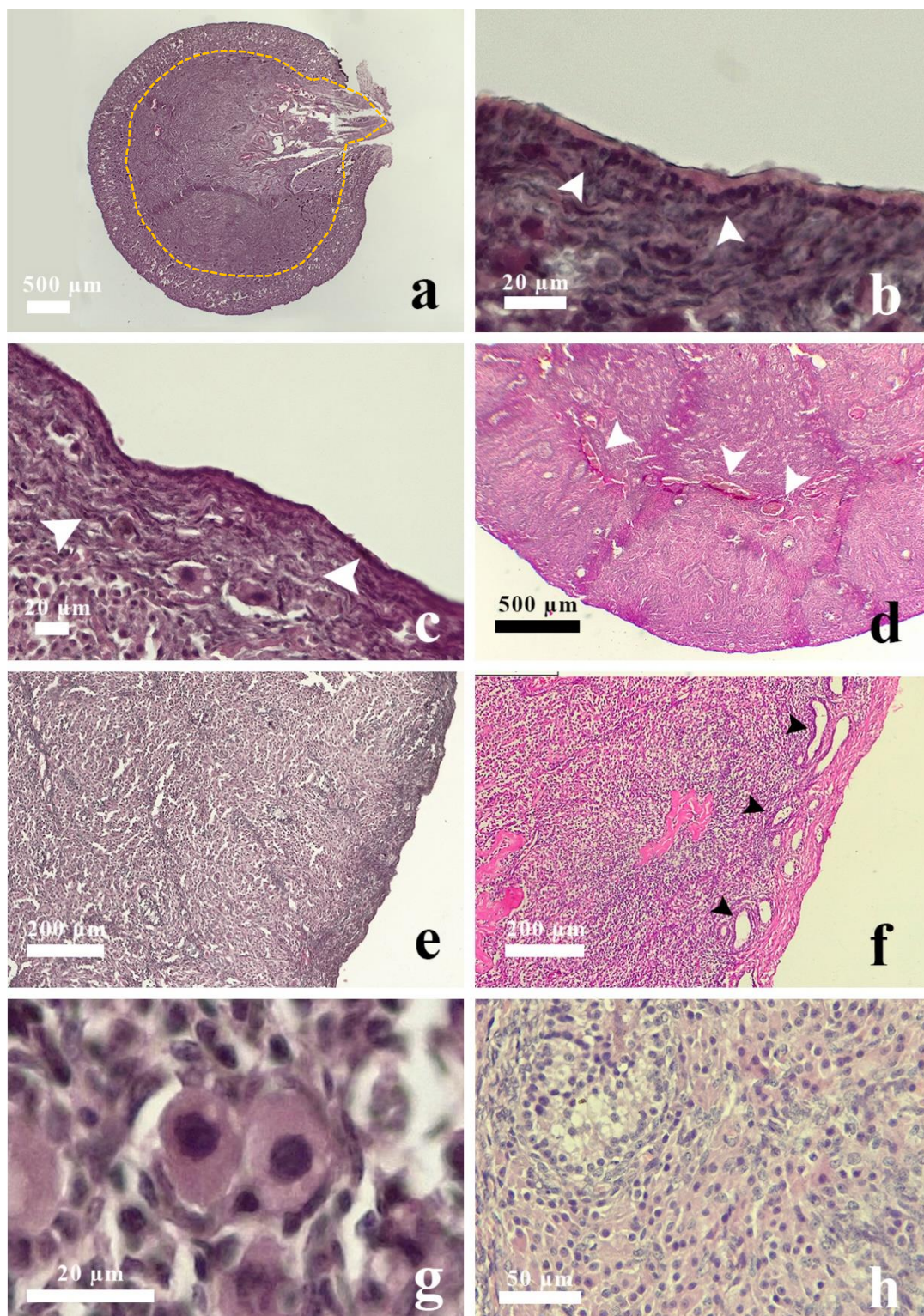
Análisis de Rangos

Primordiales GL	t	u	o	tw+	tw-	Z+	Z-	Respuesta
2	4,3	3	1,87082869	6	0	1,60356745	-1,60356745	Ho
Primordiales deg. GL	t	u	o	tw+	tw-	Z+	Z-	Respuesta
1	12,7	1,5	1,11803399	3	0	1,34164079	-1,34164079	Ho
Transición GL	t	u	o	tw+	tw-	Z+	Z-	Respuesta
2	4,3	3	1,87082869	6	0	1,60356745	-1,60356745	Ho
Grados de libertad	t	u	o	tw+	tw-	Z+	Z-	Respuesta
2	4,3	3	1,87082869	5,5	-2,5	2,93987366	-2,93987366	Ho

Conclusión: No se encontraron diferencias significativas entre la evaluación de folículos pre antrales utilizando los diferentes enfoques.

ANEXO 4

FOTOS HISTOLÓGICAS DE OVARIOS DE FETO DE LOBO MARINO FINO



Anexo 4. Evaluación histológica de ovarios fetales de lobo marino fino (*Arctocephalus australis*).

(a) Visualización de corte corteza y médula ovárica separada con línea punteada imaginaria de

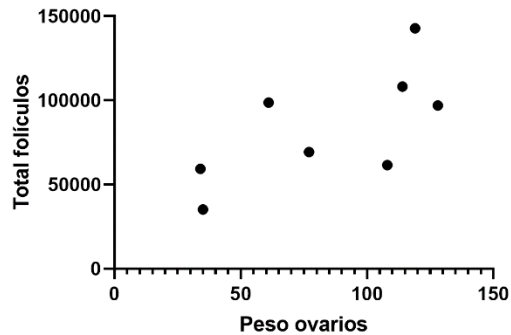
color amarillo. (b) Epitelio germinativo (*Epithelium superficiale*) de ovario (flechas blancas). (c) Fibras de colágeno presentes en corteza del ovario (flechas blancas). (d) Venas y zonas de alta vascularización presentes en la médula del ovario fetal (flechas blancas). (e y f) Ausencia de criptas subcapsulares en ovarios fetales (e) en comparación con un ovario de hembra adulta (criptas subcapsulares señaladas con flechas negras) (f), imagen de ovario de hembra adulta obtenida de Vilchez, 2017. (g) Folículo poliovular encontrado en ovario fetal de lobo marino fino. (h) Células intersticiales presentes en médula ovárica.

ANEXO 5

CORRELACIÓN DE DATOS

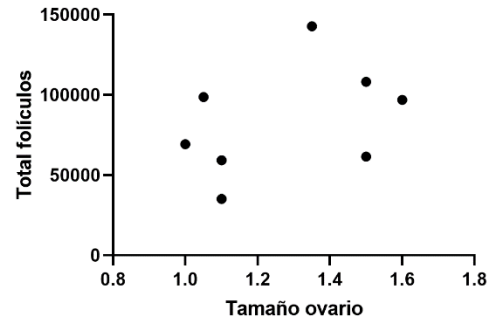
CÁLCULOS REALIZADOS CON VARIABLES DE OVARIOS FETALES DE LA ESPECIE *A. AUSTRALIS*

A. CORRELACIÓN PESO OVARIO X TOTAL DE FOLÍCULOS



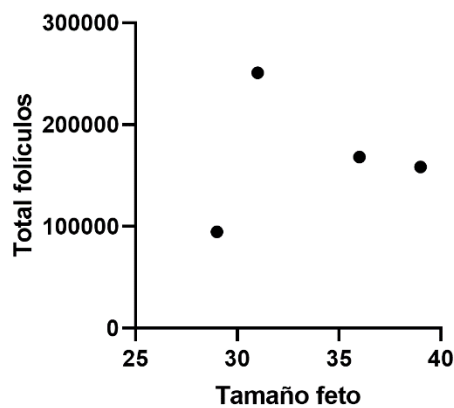
$r = 0,6839$; p (two-tailed) = 0,0614 (N.S)

B. CORRELACIÓN TAMAÑO OVARIO X TOTAL DE FOLÍCULOS



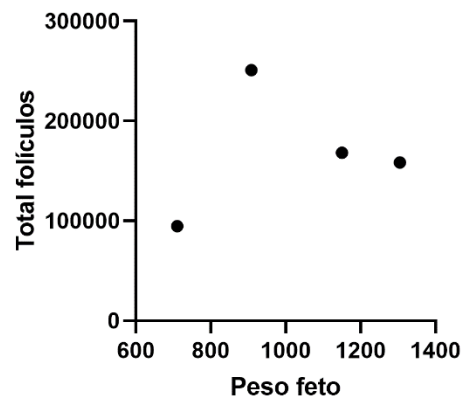
$r = 0,3959$; p (two-tailed) = 0,3316 (N.S)

C. CORRELACIÓN TAMAÑO DE FETO X TOTAL DE FOLÍCULOS



$r = 0,08054$; p (two-tailed) = 0,9195 (N.S)

D. CORRELACIÓN PESO DE FETO X TOTAL DE FOLÍCULOS



$r = 0,2131$; p (two-tailed) = 0,7869 (N.S)

Conclusión: No se encontró correlación entre las variables evaluadas en este estudio.

Peso de ovario con total de folículos (A), tamaño de ovarios con total de folículos (B), tamaño de feto con total de folículos (C) y peso de feto con total de folículos (D).

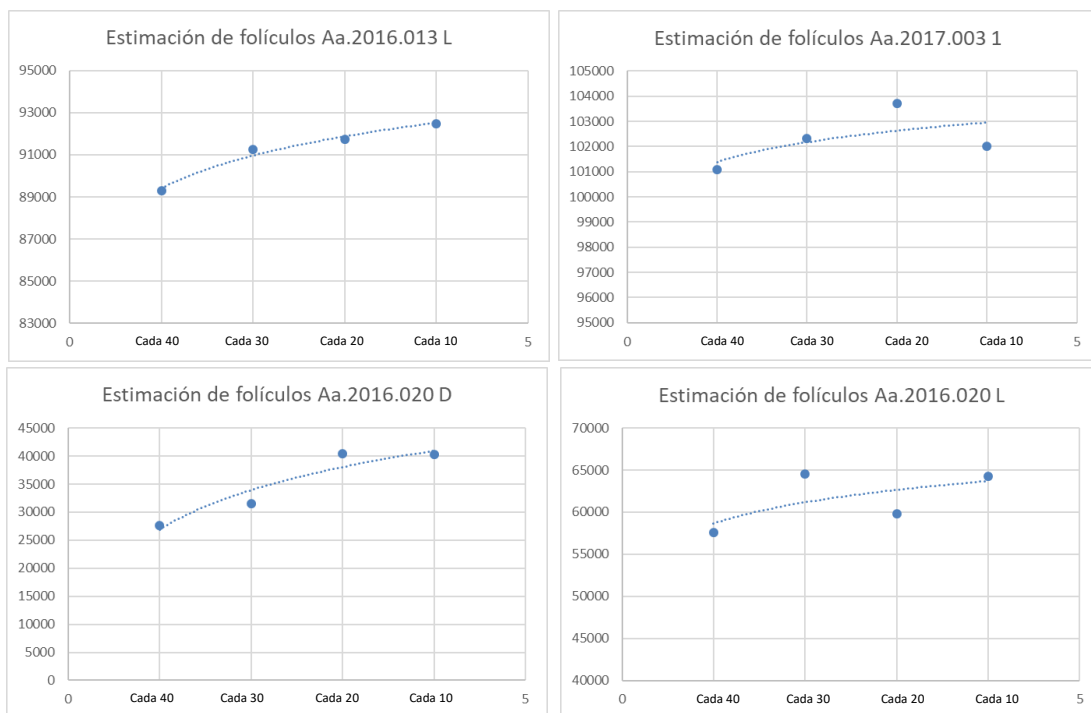
ANEXO 6

COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS

ESTIMACIÓN DE DIFERENCIAS EN CONTEO DE FOLÍCULOS CON MONTAJES DE LÁMINAS A CADA 10, 20, 30 Y 40 CORTES

Se realizó la comparación de la estimación de folículos ováricos realizando el montaje y evaluación de láminas a cada 10, 20, 30 y 40 cortes. Para este análisis se llevó a cabo el procedimiento conteo y comparación de variables relacionadas para lo cual fue utilizada la prueba de Rangos de Friedman y Análisis de Varianza por Rangos de Friedman para determinar las diferencias con una 95% de confianza.

Resultados: La prueba de Rangos de Friedman encontró diferencias entre los diferentes tratamientos ($P= 0,029$). Se aplicó entonces el Análisis de Varianza por Rangos Signado de Wilcoxon. No se encontraron diferencias significativas en el tratamiento Cada 10 vs. Cada 20, Cada 10 vs. Cada 30 y Cada 20 vs. Cada 30. Todas las comparaciones con el tratamiento Cada 40 presentaron diferencias significativas.



Cuadro de significancias por prueba de Rango Signado de Wilcoxon (NS= no significativo).

Tratamiento	Cada 10	Cada 20	Cada 30	Cada 40
Cada 10	-	NS	NS	0,043
Cada 20		-	NS	0,043
Cada 30			-	0,043
Cada 40				-

Conclusión: No se encontraron diferencias significativas en el total de folículos estimados realizando la evaluación de cortes histológicos a cada 10 y 20 cortes.

ANEXO 7

COMPARACIÓN DE ESTUDIOS

ESTIMACIÓN FOLÍCULOS PRE ANTRALES EN OTRAS ESPECIES

Especie (ovarios evaluados)	Edad	Montaje a cada n	Folículos pre antrales/ovario	Referencia
Feto de Lobo Marino Fino Peruano (Arctocephalus australis) (n=08)	5 meses de gestación	1/20	84 002 ± 2 097	Este estudio
Feto de <i>Bos taurus</i> (n=10)	180 – 240 días de gestación	1/120	285 155± 325 195	Silva-Santos, et al., 2011
Fetos <i>Bos indicus</i> (n=10)	180 – 240 días de gestación	1/120	143 929±64 028	Silva-Santos, et al., 2011
Adultos <i>Bos taurus</i> (n=10)	72 – 96 meses	1/120	89 577±86 315	Silva-Santos, et al., 2011
Adultos <i>Bos indicus</i> (n=10)	72 – 96 meses	1/120	39 438±31 017	Silva-Santos, et al., 2011
Feto <i>Homo sapiens</i> (n=01)	Semana 26 de gestación	1/50	1 082 960± N.E.	Geber, et al., 2012
Adulto <i>Homo sapiens</i> (n=14)	36 – 40 años	1/200	21 450± 2 650	Faddy et al., 1992
Pre púberes de <i>Canis lupus familiaris</i> tamaño pequeño (n=20)	4 – 8 meses	1/70	78 838± 83 080	Lunardon et al., 2014
Adultos de <i>Canis lupus familiaris</i> tamaño pequeño (n=20)	1 – 5 años	1/70	61 641±48 978	Lunardon et al., 2014
Subadultos y adultos de <i>Equus assinus</i> (n=20)	1.6 – 10 años	1/120	10 568± 2793	Lopes et al., 2017
Adulto de <i>Alouatta caraya</i> (n=01)	> 3 años	1/120	59 921± N.E.	Lopes et al., 2006

ANEXO 8

COMPARACIÓN DE ESTUDIOS HISTOMORFOMETRÍA DE FOLÍCULOS OVÁRICOS EN OTRAS ESPÉCIES

Medida	Fetos <i>A.australis</i> ^a	Cachorras <i>A.australis</i> ^b	Adultos <i>Sapajus</i> <i>Apella</i> ^c	Adulto <i>Alouatta</i> <i>caraya</i> ^d	Adultos <i>Equus</i> <i>assinus</i> ^e	Adultos <i>Felis s.</i> <i>catus</i> ^f	Adulto <i>Saimiri</i> <i>macrodon</i> ^g	Adulto <i>Dasyprocta</i> <i>leporina</i> ^h	Adulto <i>Vicugna</i> <i>pacos</i> ⁱ	Adulto <i>Bos indicus</i> ^j	Adulto <i>Homo</i> <i>sapiens</i> ^k
<i>Tamaño del núcleo</i>											
Folículo primordial (µm)	8,73 ± 1,59	10,04 ± 2,5	10,6 ± 0,2*	12,5 ± 2,3	16,6 ± 2,2	12,3 ± 3,7	7,9 ± 0,1*	6,10 ± 0,93*	-	-	18,3 ± 2,5
Folículo transición (µm)	10,97 ± 1,99	-	11,0 ± 0,2*	-	-	-	7,9 ± 0,1*	-	-	-	18,5 ± 1,6
Folículo primario (µm)	12,30 ± 2,47	11,12 ± 2,1	11,0 ± 0,2*	13,3 ± 2,2	16,0 ± 4,3	15,6 ± 2,3	8,2 ± 0,1*	6,70 ± 1,24*	-	-	19,8 ± 1,6
Folículo secundario (µm)	14,01 ± 2,70	14,7 ± 7,4	13,7 ± 0,4*	14,4 ± 2,5	26,8 ± 16,5	18,6 ± 4,1	34,2 ± 1,6*	22,3 ± 17,6*	-	-	-
<i>Tamaño del ovocito</i>											
Folículo primordial (µm)	23,72 ± 5,16	22,24 ± 7,8	17,9 ± 0,4*	21,1 ± 4,3	26,9 ± 5,2	23,1 ± 7,2	14,3 ± 0,1*	12,3 ± 2,4*	31,8 ± 4,9	28,1 ± 5,4	35,5 ± 5,0
Folículo transición (µm)	30,03 ± 8,44	-	18,9 ± 0,3*	-	-	-	15,9 ± 0,2*	-	33,1 ± 4,1	-	36,4 ± 4,8
Folículo primario (µm)	30,18 ± 8,30	27,56 ± 11,1	19,3 ± 0,3*	24,9 ± 3,7	28,1 ± 6,6	30,1 ± 4,7	17,2 ± 0,3*	14,2 ± 3,0*	35,4 ± 7,4	31,7 ± 5,7	39,7 ± 6,2
Folículo secundario (µm)	45,34 ± 11,49	48,5 ± 23,2	30,4 ± 1,2*	29,7 ± 5,0	39,4 ± 20,6	40,8 ± 13,4	106,8 ± 4,5*	52,9 ± 17,6*	49,1 ± 1,4	43,8 ± 8,0	-

Tamaño del folículo

Folículo primordial (µm)	30,62 ± 5,58	30,4 ± 16,5	22,1 ± 0,5*	28,5 ± 4,4	30,6 ± 6,0	28,3 ± 9,1	19,8 ± 0,1*	18,6 ± 3,4*	40,5 ± 5,4	36,0 ± 8,0	40,4 ± 5,0
Folículo transición (µm)	40,23 ± 9,75	-	24,2 ± 5,0*	-	-	-	23,3 ± 0,2*	-	43,1 ± 5,0	-	44,1 ± 4,8
Folículo primario (µm)	42,93 ± 10,62	39,3 ± 1,7	27,3 ± 0,5*	35,5 ± 5,3	34,9 ± 8,3	41,0 ± 7,6	26,6 ± 0,3*	23,8 ± 5,7*	49,2 ± 8,4	48,5 ± 11,4	54,4 ± 9,3
Folículo secundario (µm)	114,36 ± 34,30	95,9 ± 16,1	61,2 ± 4,0*	51,0 ± 7,3	70,6 ± 43,4	74,6 ± 20,3	230,7 ± 9,4*	88,6 ± 17,6*	134,7 ± 50	88,4 ± 16,7	-

-
- a. Este trabajo.
 - b. Katz & Johansson et al, 2013.
 - c. Domingues et al, 2004.
 - d. Lopes et al, 2006.
 - e. Lopes et al, 2017.
 - f. Carrijo et al, 2009.
 - g. Lopes et al, 2017.
 - h. Santos et al, 2018.
 - i. Echevarria et al, 2019.
 - j. Kacinskis et al, 2005.
 - k. Grabow et al, 2007.