

2 y 22



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL 17β-ESTRADIOL SOBRE EL DESARROLLO DEL OVIDUCTO DE POLLOS RECIEN NACIDOS TRATADOS EN LA ETAPA PRENATAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
OLGA MARIA BALLINAS SANTIAGO

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

Resumen .....	1
Antecedentes .....	3
I. Morfología del aparato urogenital en aves .....	3
A) Desarrollo del ovario y conducto mulleriano .....	3
II. Fisiología ovárica .....	6
III. Morfofisiología del oviducto .....	6
A) Infundíbulo .....	8
B) Magnum .....	9
C) Istmo .....	11
D) Utero .....	12
E) Vagina .....	13
IV. Morfogénesis del magnum .....	14
V. Respuesta morfogénética a estrógenos en aves .....	15
A) Inmaduros .....	15
B) Embriones .....	16
VI. Los receptores a estradiol .....	17
A) Citoplásmicos .....	18
B) Nucleares .....	19
C) El complejo estradiol-receptor .....	20
D) Estradiol y células blanco en oviducto .....	21
VII. Cambios en cromatina, ADN, ARN y peso durante el desarrollo del conducto mulleriano .....	22
VIII. Efecto de estrógenos sobre peso, ADN, ARN y proteínas del oviducto .....	23

IX. Relaciones sinérgicas y antagónicas .....	28
Objetivo de Trabajo .....	30
Materiales y Métodos .....	31
I. Estudio Morfológico .....	32
A) Morfometría o Estereología .....	34
B) Análisis Histológico .....	36
II. Estudios Bioquímicos .....	36
A) Técnica para determinación de ADN .....	36
B) Determinación de proteínas .....	38
Resultados .....	39
Discusión .....	57
Conclusiones .....	64
Bibliografía .....	65

## R E S U M E N

El magnum es la porción más larga del oviducto de la gallina y sintetiza la mayoría de compuestos de la clara del huevo; en el animal sexualmente maduro su mucosa está altamente desarrollada. En embriones y animales inmaduros, las dosis hiperfisiológicas de estrógenos inducen un incremento en la síntesis de proteínas, ADN y ARN, aumento de peso húmedo, edema estromático y citodiferenciación de la mucosa. Las células blancas de estradiol se localizan en el estroma del conducto mulleriano en el día 15 de desarrollo; sin embargo, se han encontrado receptores citoplásmicos y nucleares desde el día 8.

En el presente trabajo se determinaron los cambios morfológicos y bioquímicos en el oviducto de pollos recién nacidos al ser tratados "in vivo" con diferentes dosis de  $17\beta$ -estradiol (0.2, 1, 2 y 4  $\mu\text{g}/\text{embrión}$ ), los días 15 y 17 de incubación. El lote testigo fue tratado con suero fisiológico estéril. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la eclosión. El oviducto izquierdo fue disecado, se registró su peso húmedo y se cuantificó el contenido de ADN y proteínas totales. Para el estudio morfológico se extrajo la porción del magnum y se obtuvieron cortes transversales semiseriados.

Por el análisis histológico se identificaron 4 niveles a lo largo del magnum, tanto en testigos como en tratados, establecidos principalmente por diferencias en la mucosa. En todos los grupos se observa un aumento caudal en la altura del epitelio de la mucosa, la cual no se modifica con las dosis hormonales.

La morfometría revela que en el nivel cefálico (denominado I) la dosis de 0.2  $\mu\text{g}$  provoca un incremento en las áreas total y de la pared del magnum, debido principalmente a un aumento en la porción no epitelial. Histológicamente se observa una mayor densidad celular estromática y epitelial, con una tendencia en el epitelio a la pseudoestratificación. En los 3 niveles restantes, al igual que con dosis altas de la hormona, las modificaciones son menos marcadas. La cantidad de ADN, proteínas totales y peso húmedo no se alteran con 0.2  $\mu\text{g}$  de estradiol.



## A N T E C E D E N T E S

### I. MORFOLOGIA DEL APARATO UROGENITAL EN AVES

En el embrión de pollo están presentes dos ovarios y dos oviductos, pero sólo el ovario y el oviducto izquierdos alcanzan la madurez y se convierten en los órganos funcionales de la gallina adulta, mientras que los órganos derechos permanecen de manera vestigial (Bradley, 1960; Gilbert, 1971a; Tankred, 1973).

La asimetría de las gónadas es sexo-dependiente en aves y es un punto crítico en el que se establece el patrón definitivo de la diferenciación sexual y se hace perceptible en embriones de pollo de 7 días (Gasc, 1978). En otras especies aviarias se reporta que ambos ovarios persisten durante toda la vida (Tankred, 1973). En la gallina se han reportado algunos casos de persistencia y funcionalidad del ovario y oviducto derechos (Gilbert, 1971a), principalmente en estirpes consanguíneas.

#### A. DESARROLLO DE OVARIO Y CONDUCTO MULLERIANO

El ovario es un órgano de color amarillento, oval y aplanado, formado esencialmente por una corteza y una médula altamente vascularizada (Bradley, 1960; Hodges, 1974), separadas por una capa de tejido conectivo denso: la túnica albugínea.

El ovario izquierdo comienza a desarrollarse al tercer día de incubación, cuando las células germinales primordiales (Gilbert, 1971a) y las células mesenquimatosas se incorporan al epitelio germinal. Su crecimiento continúa después del nacimiento. El ovario derecho crece en los primeros es-

tadios de desarrollo y hacia los días 9 a 11 sufre regresión (Teng y Teng, 1977). Gasc (1978) indica que la regresión no se inicia antes del día 11, ya que el crecimiento (medido por ADN y proteínas) es todavía significativo en este estadio. La secreción estrogénica temprana por el ovario izquierdo probablemente impide el desarrollo del ovario derecho (Gilbert, 1971a).

Durante la diferenciación gonadal, el epitelio germinal en el ovario derecho no forma la corteza y cordones sexuales secundarios en los días 8 a 11 en que aparecen en el otro ovario. La diferenciación del ovario izquierdo se manifiesta por una proliferación celular de la corteza, estimulada por estrógeno. La falta de diferenciación cortical en la gónada derecha puede explicarse por la ausencia de células blanco a estrógeno en su epitelio germinal (Gasc, 1980).

El conducto mülleriano derecho inicia su involución alrededor del día 9 de desarrollo embrionario (Hamilton, 1961; Teng y Teng, 1978), al día 12 sufre una involución antero-posterior lenta y al nacimiento aparece como un vestigio cloacal diminuto (Teng, 1980).

La destrucción experimental de las gónadas provoca la retención de los dos conductos müllerianos, tanto en hembras como en machos (Hamilton, 1961), por lo que se piensa que las hormonas gonadales intervienen en la diferenciación de los conductos. En embriones, el tratamiento con dosis de 0.1 mg de estradiol provoca la retención y diferenciación de oviductos en machos intersexuales (Rahil y Narbaitz, 1972).

De igual forma, se ha pensado que la secreción ovárica de esteroides es la responsable del crecimiento y regresión de los conductos de Müller izquierdo y derecho, respectivamente (Teng y Teng, 1977); aunque se ha encontrado que los

tratamientos con dosis de 10  $\mu$ g a 1 mg de estradiol no alteran la diferenciación normal ni previenen la involución del conducto derecho (Hamilton, 1961).

Por otra parte, se ha detectado en los ovarios derecho e izquierdo la presencia de una sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS) de naturaleza glicoproteica, sintetizada probablemente por células de los cordones medulares dispersos en la corteza; su función sería análoga a la de las células de Sertoli. La diferencia en la respuesta de los conductos a la MIS puede estar dada por: a) diferencia en la susceptibilidad de cada conducto, b) antagonismo entre MIS-esteroide (Hutson et al, 1981).

El conducto mülleriano izquierdo exhibe dos fases de crecimiento: a) una fase lenta, los días 8 a 12 de incubación, en la que el peso, longitud, contenido de ADN y proteínas citoplásmicas se incrementan ligeramente y los receptores citoplásmicos a estradiol aumentan en número y b) una fase de crecimiento rápido, los días 14 a 18, en la cual el número de receptores citoplásmicos se mantiene constante mientras que los otros parámetros aumentan rápidamente (Teng y Teng, 1975b). Existe correspondencia entre este crecimiento bifásico y la síntesis de estradiol por el ovario izquierdo que es constante los días 6.5 a 12.5 y aumenta los días 13.5 a 18.5 (Woods y Erton, 1978).

Después del nacimiento, el oviducto atraviesa por un estado de maduración de 100 días para finalmente desarrollarse en un órgano activo, secretor de las proteínas de la clara y cáscara del huevo (Wrenn, 1971; Teng, 1980; Kiell et al, 1982).

## II. FISILOGIA OVARICA

El ovario produce los ovocitos y secreta hormonas que afectan la actividad reproductiva: progestágenos, andrógenos y estrógenos (Gilbert, 1971c).

La esteroidogénesis comienza tempranamente en las gónadas embrionarias. Las células esteroidogénicas se localizan en los cordones medulares desde el día 8 a 9 de incubación (Narbaitz y Adler, 1966; Jordanov et al, 1978). Se ha descrito la presencia de  $17\beta$ -estradiol y estrona desde el día 3.5 de desarrollo (Woods y Erton, 1978).

En estadios embrionarios tempranos el desarrollo del ovario es independiente de la acción hipofisiaria (Teng y Teng, 1977) y efectúa síntesis estrogénica autónoma (Woods y Erton, 1978). La estrona, el  $17\beta$ -estradiol y el  $17\alpha$ -estradiol están presentes como sus conjugados en el líquido alantoideo desde el día 8 de incubación. El  $17\beta$ -estradiol aumenta del día 14 al nacimiento (Gill et al, 1983), este aumento coincide con la aparición de células gonadotrópicas en la hipófisis (Gilbert, 1971c) y con la influencia hipofisiaria, cuando el eje hipotálamo-hipófisis-ovario se conecta (Woods y Weeks, 1969).

En cultivo de órganos el tratamiento exógeno con gonadotropina coriónica, provoca el aumento de secreción de testosterona por ambos ovarios, su porcentaje de secreción es más alto que el de estrógenos y, además, la gonadotropina comienza a ejercer su influencia a partir del día 13 de desarrollo embrionario (Teng y Teng, 1977).

## III. MORFOFISIOLOGIA DEL OVIDUCTO

El oviducto de la gallina es un conducto muscular altamente circunvolucionado que en su estado activo alcanza una

longitud igual a dos veces la del cuerpo: 60 a 80 cm (Bradley, 1960; Aitken, 1971; Tankred, 1973) y presenta un incremento correspondiente en diámetro como resultado de hiperplasia e hipertrofia (Yu y Marquardt, 1974). En aves sexualmente inactivas se observa como un tubo estrecho de 14 a 19 cm de longitud (Aitken, 1971).

El oviducto yace en el lado izquierdo de la cavidad abdominal y está suspendido entre dos capas de un pliegue de peritoneo que forma los ligamentos membranosos dorsal y ventral (Bradley, 1960; Aitken, 1971; Hodges, 1974), Fig. (1). Sus funciones se relacionan con: a) transporte del ovocito desde el ovario, b) fecundación del ovocito y c) síntesis del albumen, membranas y cáscara del huevo (Hodges, 1974).

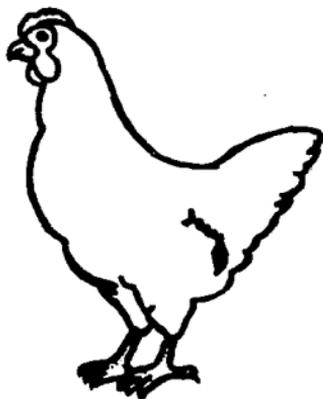


Fig. 1 Esquema que muestra la localización del oviducto en la gallina adulta.

Morfológica y funcionalmente se distinguen 5 regiones: infundíbulo, magnum o región secretora de albumen, istmo, ú-

tero o glándula de la cáscara y vagina (Bradley, 1960; Aitken 1971; Hodges, 1974). Los límites entre estas regiones están determinados principalmente por cambios en la estructura de las glándulas tubulares (Richardson, 1935).

Otros autores reportan 6 regiones, ya que dividen al istmo en dos porciones: istmo granular y región roja (Dra-per et al, 1972) o glándula tubular de la cáscara (Solomon et al, 1975). Con excepción de la vagina, todas las regiones están involucradas con el proceso de la formación del huevo, que al momento de la puesta, tiene aproximadamente 24 horas de fecundado y está en etapa de gástrula avanzada (Schneider y Norton, 1979).

La pared del oviducto está formada por 7 capas: 1) serosa de epitelio peritoneal, 2) muscular externa longitudinal, 3) tejido conectivo externo (vascularizada), 4) muscular interna circular, 5) tejido conectivo interno, 6) lámina propia y 7) epitelial interna (Bradley, 1960; Aitken, 1971; Hodges, 1974; Solomon, 1983). La mucosa está formada por las dos capas más internas, está sumamente plegada y posee gran complejidad histológica (Hodges, 1974).

Las capas musculares aumentan en grosor céfalo-caudalmente, en especial en la unión útero-vaginal (Aitken, 1971; Solomon, 1983).

#### A) INFUNDIBULO

El infundíbulo es el segmento inicial del oviducto, consiste de un embudo aplanado en dirección dorso-ventral (Hodges, 1974) o "ampolla" (Aitken, 1971) y un cuello estrecho de 2 a 3 cm de longitud (Bradley, 1960), ambas de paredes delgadas (Aitken, 1971).

Sus funciones son capturar el ovocito liberado por el ovario y ser el sitio de fecundación (Solomon, 1983).

En la región del embudo los pliegues mucosos son poco pronunciados (Bradley, 1960) y están recubiertos por células ciliadas columnares no secretoras (Hodges, 1974; Solomon, 1983). Conforme el embudo se estrecha, los pliegues se vuelven más altos y delgados con otros pliegues secundarios y terciarios cuyo epitelio es columnar simple y no ciliado. En las porciones media y caudal el epitelio es pseudoestratificado con células ciliadas columnares y células caliciformes secretoras de moco ácido (Aitken, 1971; Solomon, 1983). La altura epitelial varía de 25 a 30  $\mu\text{m}$  (Wyburn et al., 1970; Aitken, 1971; Hodges, 1974).

Al avanzar por el cuello infundibular se observa el desarrollo de glándulas tubulares (Richardson, 1935; Aitken, 1971) llenas de gránulos secretorios electrodensos (Solomon, 1983).

## B) MAGNUM

El magnum o región secretora de albumen es la porción más larga del oviducto. Su longitud varía en las diferentes razas de gallinas desde unos 33 cm (Richardson, 1935) a 40 cm (Bradley, 1960).

Durante el desarrollo crece a una velocidad proporcionalmente mayor respecto a las otras regiones del oviducto, principalmente como resultado de una continua hiperplasia del tejido glandular lleno de productos secretorios (Yu y Marquardt, 1973).

Los pliegues de la mucosa son más numerosos, altos y anchos que en otras regiones del oviducto; su epitelio es pseu

doestratificado en el que alternan células columnares ciliadas y células caliciformes secretoras (Bradley, 1960; Aitken, 1971; Solomon, 1983), llamadas también células granulares (Wyburn et al, 1970; Hodges, 1974) y que de acuerdo con la fase de formación del huevo predomina uno u otro tipo celular (Bradley, 1960). Se indica que las células ciliadas y caliciformes pueden interconvertirse (Richardson, 1935).

La altura del epitelio aumenta en dirección caudal; durante la secreción activa es de 10  $\mu\text{m}$  en la parte anterior (Richardson, 1935; Wyburn et al, 1970) y de 25  $\mu\text{m}$  (Richardson, 1935; Solomon, 1983) a 30  $\mu\text{m}$  en el magnum posterior (Wyburn et al, 1970). Sandoz et al (1971) consideran que la altura epitelial varía de 13 a 30  $\mu\text{m}$  y está en relación directa con la fase del ciclo secretor.

Los últimos 3 a 4 cm del magnum posterior forman la "región mucosa" debido a la presencia de un gran número de células secretoras (Richardson, 1935). El moco secretado por el epitelio a todo lo largo del magnum, incluyendo la región mucosa, consiste de un mucopolisacárido ácido (Aitken, 1971).

Las células ciliadas son delgadas con una altura de 20 a 30  $\mu\text{m}$  poco antes de la ovulación, después que el huevo ha pasado su altura es de 13 a 18  $\mu\text{m}$ , producen gránulos electrodenso de glucoproteína (Sandoz et al, 1971) y están relacionadas con la propulsión del material a través del oviducto (Kohler et al, 1969).

Las células caliciformes predominan en el epitelio antes del paso de un huevo (Bradley, 1960); los materiales secretados son la avidina (Kohler et al, 1969; O'Malley et al, 1969) y la ovomucina (Wyburn et al, 1970; Sandoz et al, 1971).

Las glándulas tubulares son muy largas, tortuosas y frecuentemente ramificadas (Bradley, 1960; Hodges, 1974); sus

conductos están revestidos por epitelio glandular, el cual emerge sobre la superficie con el epitelio de revestimiento (Wyburn et al, 1970). Sus células tienen forma piramidal con una altura de 10 a 15  $\mu\text{m}$  (Hodges, 1974) y secretan lisosima y ovalbúmina (Kohler et al, 1969; Oka y Schimke, 1969a,b), la cual comprende alrededor del 54% del total proteínico de la clara del huevo (Gilbert, 1971b).

En la morfología de las células de las glándulas tubulares se distinguen tres fases durante el ciclo de formación del huevo: a) fase secretora, que empieza antes que la yema entre al magnum, b) fase de regeneración, cuando el huevo sale del magnum y en la que se reorganizan los gránulos secretorios residuales y c) fase de descanso, en la que el citoplasma está lleno de gránulos de secreción (Richardson, 1935).

Wyburn et al (1970) han descrito tres tipos celulares dentro de las glándulas tubulares: A, B y C, vistos en todos los niveles del magnum. Las células tipo A parecen ser las productoras de ovalbúmina en una fase pre-secretora; las tipo C corresponden a las células A en fase de recuperación; las células B se consideran la fuente de lisosima bactericida.

Las glándulas de una misma área no están en la misma fase del ciclo secretor (Richardson, 1935), lo que implica descarga asincrónica de la secreciones en grupos de glándulas adyacentes (Aitken, 1971). Durante un período intersecretorio, el magnum tiene proteína suficiente para formar dos huevos (Oades y Brown, 1965).

### C) ISTMO

El istmo produce la membrana de la cáscara. Es más delgado que el magnum y sus pliegues son menos voluminosos y al-

tos (Bradley, 1960; Solomon, 1983), la altura de su epitelio es de 25  $\mu\text{m}$  (Hodges, 1974).

Su límite anterior está definido por una zona estrecha translúcida aglandular revestida por células ciliadas y no ciliadas (Aitken, 1971; Hodges, 1974) que es factible que contribuyan a la producción del albumen viscoso (Solomon, 1983).

Su límite posterior es tema de controversia debido al tipo de células glandulares en la lámina propia, por lo que algunos autores dividen al istmo en dos porciones: a) istmo granular proximal, que posee células glandulares llenas de gránulos electrodensos y b) región roja distal, con células glandulares que contienen pocos gránulos (Draper et al, 1972) e implicada en la transferencia de calcio y llamada por lo mismo glándula tubular de la cáscara (Solomon et al, 1975); sus células glandulares se distinguen de las del istmo granular por su contenido de glucógeno (Solomon, 1983).

#### D) UTERO

Tiene la forma de un saco expandido, secreta algo de albumen y en él se forma la cáscara del huevo. Su parte inicial (unión istmo-uterina) es corta y tiene forma tubular (Richardson, 1935). Su extremo posterior está delimitado por un esfínter muscular bien desarrollado (Hodges, 1974).

Sus paredes son delgadas y expandibles. La musculatura y en particular, la longitudinal externa, está bien desarrollada (Hodges, 1974). La mucosa está formada de numerosos pliegues planos, discontinuos y en forma de hoja.

El epitelio tiene una altura de 30  $\mu\text{m}$  y consiste en una capa simple de células columnares que, de acuerdo con la posición de sus núcleos, han sido denominadas "apicales" cilia-

das y "basales" no ciliadas (Richardson, 1935; Hodges, 1974).

Las células epiteliales en conjunto contribuyen a la formación de la porción proteica de la matriz de la cáscara (Hodges, 1974), de la cutícula (Aitken, 1971), al transporte de calcio (Solomon et al, 1975), al transporte activo de iones fosfato y liberación del pigmento de la cáscara: ovoporfirina (Solomon, 1983).

Las células de las glándulas tubulares están implicadas en la elaboración del fluido acuoso rico en calcio que origina la parte inorgánica de la cáscara (Richardson, 1935; Hodges, 1974; Solomon, 1983).

#### E) VAGINA

Es un conducto muscular corto y estrecho que se extiende desde el esfínter uterino hasta la pared cloacal. Tiene forma de "S", cuyas flexiones están unidas unas con otras y al útero por capas externas de tejido conectivo bien desarrolladas (Hodges, 1974). La capa muscular interna está bien desarrollada y es más gruesa que en cualquier otra parte del oviducto (Bradley, 1960).

Sus pliegues mucosos son largos, delgados y presentan pliegues secundarios muy regulares (Bradley, 1960; Aitken, 1971; Hodges, 1974). Su epitelio consta de células ciliadas con núcleo apical, alternadas con células glandulares no ciliadas secretoras de mucopolisacáridos ácidos (Hodges, 1974) y alcanza una altura de 35  $\mu\text{m}$  (Richardson, 1935).

La mucosa no presenta glándulas tubulares excepto cerca de la unión útero-vaginal y almacenan esperma para inseminaciones posteriores (Hodges, 1974). Están revestidas por células epiteliales columnares (Bradley, 1960) de unos 25  $\mu\text{m}$

de altura (Hodges, 1974), que contienen lípidos, glucógeno y fosfatasa ácida (Solomon, 1983).

#### IV. MORFOGENESIS DEL MAGNUM

El desarrollo natural del magnum ha sido objeto de muy escasos estudios, tales como el de Pageaux et al (1986) realizado en codornices de 7 a 35 días. Ellos lo dividen bioquímica y morfológicamente en tres fases:

##### FASE I

a) Proliferación celular epitelial, precedida por una disminución brusca en la concentración plasmática de progesterona, se observan algunas mitosis en el estroma;

b) formación de glándulas tubulares inactivas y diferenciación de células ciliadas en el epitelio, las mitosis aumentan en las glándulas y disminuyen en el epitelio;

c) diferenciación de algunas células caliciformes epiteliales que contienen pocos gránulos mucosos. Aumento significativo en la concentración de receptores citoplásmicos a progesterona, mientras que los niveles plasmáticos de esta hormona son bajos y los de estradiol aumentan regularmente.

##### FASE II

a) Aumento de niveles plasmáticos de estradiol y progesterona. Esta última aumenta más rápidamente;

b) maduración de glándulas tubulares, que empiezan a sintetizar y acumular proteínas de la clara;

c) aumento en número de células mucosas en epitelio y

d) disminución de la proliferación celular.

##### FASE III

Involucra sólo acumulación de productos secretorios, está asociada con niveles plasmáticos constantes de estradiol (100 pg/ml) y aumento de progesterona (más de 3,000 pg/ml).

## V. RESPUESTA MORFOGENETICA A ESTROGENOS EN AVES

Experimentalmente se ha logrado inducir diferenciación morfológica tanto en el oviducto del animal inmaduro como en el conducto del embrión.

### A) INMADUROS

En los de 4 días, el tratamiento con 1 mg/día de 17 $\beta$ -estradiol provoca aumento en el tamaño del magnum y de las capas muscular externa y epitelial interna. La diferencia más relevante es en la porción glandular, ocupada casi enteramente por numerosos acúmulos de células que contienen gránulos eosinófilos. Aparecen también células caliciformes y ciliadas (Oka y Schimke, 1969a). En animales de 7 a 12 días se produce la aparición de filamentos de 35 a 50 Å de diámetro en las células epiteliales, que proliferan para formar glándulas tubulares. El tratamiento con citocalasina B inhibe la formación de estos filamentos (Wrenn, 1971).

Si el tratamiento con estradiol es suspendido las glándulas tubulares se atrofian, se reduce su citoplasma y los gránulos de secreción son escasos. Al restituir el tratamiento, las glándulas aumentan de tamaño, están compuestas de células columnares altamente desarrolladas, presentan abundantes gránulos de secreción y se observa la organización de polisomas (Palmiter et al, 1970).

En codornices ovariectomizadas de 3 semanas, las inyecciones de estradiol de 10 a 20 µg/día provocan la ciliogénesis en las células indiferenciadas del magnum y es posible controlar la diferenciación epitelial en células mucosas o en ciliadas y también provocar la transformación de células mucosas en ciliadas (Sandoz et al, 1976). En cultivo de tejidos se ha observado también la interconversión de células epiteliales (Seaver et al, 1984a)

Si el estradiol se administra simultáneamente con progesterona se aumenta la diferenciación de las células epiteliales (Oka y Schimke, 1969a; Sandoz et al, 1976); pero se impide la formación de las glándulas tubulares (Oka y Schimke, 1969a).

El tratamiento con dietilestilbestrol (DES), estrógeno no esteroide, también se induce respuesta morfogénica en el magnum. Las dosis de 5 mg/día dan como primera respuesta un edema del estroma subepitelial cuyas células pierden su borde poligonal y se alargan. Se observan 3 fases de desarrollo: 1) preparación estromática, 2) proliferación glandular rápida, 3) maduración glandular. Las mitosis se observan primero en el epitelio, donde se desarrollan células cilindricas y caliciformes; se evidencian 4 etapas: a) alargamiento nuclear, b) hipertrofia nucleolar, c) aumento de zonas ribosomales y d) formación de polirribosomas. Posteriormente, las mitosis son más frecuentes en las glándulas tubulares (Kohler et al, 1969).

En cultivo de tejidos se promueve el crecimiento relativamente mayor de las células de las glándulas tubulares con respecto a otros tipos celulares (Seaver et al, 1984a).

## B) EMBRIONES

En el magnum de hembras y machos intersexuales, tratados con testosterona y posteriormente con estradiol (0.1 mg) en las etapas embrionaria y postnatal inmediata, se observan glándulas secretoras de albumen con gránulos iguales a los de los animales maduros, lo que podría indicar la presencia de ciclos secretorios activos (Rahil y Narbaitz, 1972).

Se reporta que la capacidad para diferenciar células de

Las glándulas tubulares en respuesta al estrógeno, se desarrolla antes del día 13 en el conducto Mülleriano. Después de 5 días de exposición al DES (10 mg/huevo), las células de las glándulas tubulares inducidas representan alrededor del 10% de la población celular del magnum (día 10 de incubación) y alcanzan un valor máximo del 50% al día 16. La mayor respuesta por parte de las células glandulares pudiera indicar que las células epiteliales adquieren competencia estrogénica más temprano que las estromáticas (Teng, 1980).

La administración de dosis altas de DES (5 y 10 mg/ml) a embriones de 5 a 8 días inhibe la diferenciación de las glándulas tubulares a pesar de la reestimulación en los animales inmaduros con inyecciones diarias de  $17\beta$ -estradiol (500  $\mu\text{g}$ /pollo/5 ó 15 días), en cambio en los embriones de 15 días se produce una menor inhibición (Teng y Teng, 1985).

En el magnum de embriones de pollo de 13 y 16 días mantenidos en cultivo de órganos por 12 días, la altura del epitelio es de 11.25  $\mu\text{m}$  aproximadamente y el mesénquima es laxo. La combinación estradiol + hidrocortisona (3 + 0.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) induce desarrollo morfológico completo, dado por un engrosamiento del epitelio que se pliega en criptas y muestra desarrollo de células ciliadas y caliciformes, el número de estas últimas aumenta con dosis mayores de estradiol; hay, además, formación de glándulas tubulares y gran desarrollo de estroma que muestra mucho material fibroso. El tratamiento con estradiol solo provoca una respuesta incompleta. Con 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estradiol el estroma se observa edematoso y con fibras aparentemente de colágena (Kiell et al., 1982):

## VI. LOS RECEPTORES A ESTRADIOL

Las hormonas esteroides (estrógenos, andrógenos, progestinas y corticosteroides) penetran a la células por difusión

y se acoplan a receptores proteicos citoplásmicos (O'Malley y Schrader, 1976), se forma un complejo hormona-receptor que sufre translocación termodependiente al núcleo (Jensen y DeSombre, 1973; O'Malley y Means, 1974; Notides, 1978) donde existen sitios aceptores cromatínicos.

#### A) CITOPLASMICOS

Se señala que el receptor citoplásmico a estrógeno es un dímero 8S que consta de 2 subunidades 4S (Jensen y DeSombre, 1973; O'Malley y Means, 1974; O'Malley y Schrader, 1976; Notides, 1978).

Por otra parte, se ha indicado que en las células del conducto Mülleriano los receptores citoplásmicos a estradiol son 2 macromoléculas con coeficiente de sedimentación 8S (pl 5.8) y 4.5S (pl 6.9) ambas de alta afinidad por la hormona y baja capacidad de unión (Teng y Teng, 1975a). Se han identificado receptores similares en el citosol de células de oviductos de ponedoras, animales inmaduros y con tratamiento hormonal suspendido (Teng, 1980).

En el día 8 de desarrollo embrionario existen aproximadamente 800 sitios citoplásmicos de unión a estrógeno por célula (0.7 pmol/mg ADN). Su número aumenta linealmente a 3,500 sitios (2.4 pmol/mg ADN) al día 12, después el número es constante. Las características físicas y la afinidad del receptor (constante de disociación  $K_d = 3$  a  $3.2$  nM) no cambian durante el desarrollo (Teng y Teng, 1975b).

La concentración de receptores en un tejido no es fija: puede alterarse por la edad, cambios en el estado fisiológico y por la presencia de otras hormonas (O'Malley y Schrader, 1976).

En células uterinas la captación inicial de la hormona no es saturable, incluso con dosis considerablemente hiperfisiológicas (Jensen y DeSombre, 1973). En el conducto Müllleriano la unión específica del receptor citoplásmico a estradiol se satura "in vitro" a una concentración de 10 nM (Teng y Teng, 1975b).

## B) NUCLEARES

El complejo nuclear receptor-estradiol sedimenta en la región 4.5 a 6S (pI 6.8) en embriones de 15 días (Teng y Teng, 1975a, 1976). Su concentración es de 0.06 pmol/mg de ADN en el día 8 y aumenta a 0.45 pmol/mg de ADN al día 15 de incubación. La  $K_d$  en todas las edades es de 3 a 3.1 nM (Teng y Teng, 1976). Del día 15 al nacimiento, el número de sitios de unión permanece constante (Teng y Teng, 1978).

En animales adultos e inmaduros, tanto "in vivo" como "in vitro", la unión del complejo hormona-receptor a los sitios aceptores (proteínas nucleocácidas) tiene alta afinidad ( $K_d = 1.8 \times 10^{-10} M$ ), baja capacidad (saturable a 3,000 a 5,000 sitios/núcleo) y especificidad tisular (Kon y Spelberg, 1982; Ruh y Spelberg, 1983). A diferencia de los receptores citoplásmicos, en el núcleo la retención es saturable a dosis fisiológicas de la hormona (Jensen y DeSombre, 1973), "in vitro" hay unión lineal (no saturable) del complejo estradiol-receptor con el ADN puro (Ruh y Spelberg, 1983).

En animales inmaduros se han encontrado dos picos de unión a estradiol en cromatina: el 7 a 8S y el 13 a 14S que se correlaciona con la inducción de la síntesis de conalbúmina (Lebeau et al., 1982).

Mientras que Jensen y DeSombre (1973) manifiestan que la captación nuclear del complejo hormona-receptor puede lle

vase a cabo tanto a 0°C como a 25 °C, Teng y Teng, (1976) indican que la unión específica de estradiol a sitios de unión nucleares es termodependiente (37 a 41°C).

### C) EL COMPLEJO ESTRADIOL-RECEPTOR

Cuando la hormona se une al receptor citoplásmico se modifican la actividad intrínseca de éste y sus características de sedimentación, ya que pasa de la forma 8S a la forma 5S que se transloca al núcleo (Jensen y DeSombre, 1973; O'Malley y Schrader, 1976; Notides, 1978).

El complejo hormona-receptor "activado" interactúa con componentes "aceptores" nucleares, definidos como proteínas no-histonas, para activar genes (O'Malley y Schrader, 1976; Kon y Spelberg, 1982; Ruh y Spelberg, 1983).

Después de la administración de estrógeno, los receptores citoplásmicos desaparecen temporalmente, mientras que el receptor nuclear aparece cuando se localiza el estradiol en el núcleo (Jensen y DeSombre, 1973; O'Malley y Means, 1974); posteriormente hay reabastecimiento de receptores citoplásmicos (Teng y Teng, 1976) que, al parecer, requiere nueva síntesis de proteína receptora (Jensen y DeSombre, 1973).

El porcentaje de receptores translocados al núcleo depende de la dosis de estradiol administrada (Teng y Teng, 1976; Clark et al., 1978). En las células del conducto Mülleriano la translocación ocurre a partir del día 10 (Teng, 1980) y la máxima se obtuvo en embriones de 15 días (Teng y Teng, 1976).

Se propone que los receptores a esteroides representan un tipo estructural de proteína reguladora cuya función es abrir regiones específicas de cromatina (Bloom y Anderson, 1982).

Por otra parte, el estradiol produce un aumento en el número de receptores citoplásmicos a testosterona (Tokarz et al, 1979) y progesterona (Palmiter, 1972; Pageaux et al, 1986) por contacto directo con las células blanco (Laugier et al, 1983). En el oviducto de pollos, a los que se les ha suspendido el tratamiento estrogénico, el número de receptores nucleares a estrógeno disminuye (Thomas et al, 1981).

#### D) ESTRADIOL Y CELULAS BLANCO EN OVIDUCTO

En las células del conducto Mülleriano se detecta la presencia de receptores citoplásmicos y nucleares a estradiol desde el día 8 de incubación (Teng y Teng, 1975b). La autorradiografía indica presencia de receptores nucleares en las células estromáticas sólo hasta el día 15, mientras que en el epitelio no se observa concentración nuclear de estradiol en ningún estadio (Gasc y Stumpf, 1981).

A diferencia de lo ocurrido en aves, en animales que presentan ciclo estral, como la rata, las concentraciones más bajas de receptores a estradiol se detectan el día del estro y son máximas en el diestro tardío (Robertson et al, 1971). La sensibilidad del órgano al estradiol exógeno disminuye en estro y proestro y aumenta durante metaestro y diestro (Skafar y Seaver, 1985).

En la especie humana la concentración de receptores en células uterinas varía a través del ciclo sexual, se hace máxima a mitad del ciclo y mínima al inicio y final del mismo; además, la concentración de receptores a estradiol en células de endometrio y miometrio disminuye a través de la longitud del órgano, desde el fondo hasta el cérvix, donde ya no se detectan (Robertson et al, 1971).

## VII. CAMBIOS EN CROMATINA, ADN, ARN Y PESO DURANTE EL DESARROLLO DEL CONDUCTO MULLERIANO

Durante el desarrollo de los órganos embrionarios, la composición y estructura de la cromatina están sujetas a cambio, marcado por un aumento gradual en la cantidad y diversidad de proteínas no-histonas, que es máximo al día 15 y se mantiene constante hasta el nacimiento, contrastado con una pequeña variación en las histonas (Teng y Teng, 1978).

Se postula que durante la diferenciación, ciertas proteínas no-histonas estadio-específicas, probablemente en conjunción con histonas, pueden restringir la transcripción del genoma a un estado que sólo puede ser reactivado por factores específicos como las hormonas (Teng, 1980).

En el estadio de 10 a 12 días la capacidad transcripcional de la cromatina es alta y la administración de estrógeno al embrión (DES 10 mg/huevo) la aumenta sólo en un 6%; sin embargo, en los estadios tardíos, cuando la capacidad transcripcional es reprimida gradualmente, se aumenta en un 130, 144 y 150% en los días 15 y 18 de desarrollo embrionario y a los 9 de post-nacimiento, respectivamente (Teng, 1980).

El número de sitios de iniciación de la cadena de ARN sigue el mismo patrón temporal (Teng y Teng, 1978) y es mayormente estimulado por estrógeno en estadios tardíos que en los tempranos. El contenido de ARN/célula es más alto en estadios embrionarios tempranos que en los tardíos (Teng, 1980).

Durante la fase lenta de crecimiento (días 8 a 12) longitud, peso húmedo, contenido de proteínas citoplásmicas y ADN/oviducto se incrementan ligeramente; mientras que en la fase de crecimiento rápido (días 14 a 18) se incrementan

grandemente (Teng y Teng, 1975b).

Se ha observado que la diferenciación del oviducto durante la embriogénesis no origina amplificación o delección génica importante y que el 30% del genoma en pollos de 3 a 20 días consta de secuencias repetidas (Rosen et al, 1973).

#### VIII. EFECTO DE ESTROGENOS SOBRE PESO, ADN, ARN Y PROTEINAS DEL OVIDUCTO

En pollos inmaduros el tratamiento estrogénico induce un profundo crecimiento del oviducto principalmente por hiperplasia e hipertrofia celular (Kohler et al, 1969; Yu et al, 1971; Clark et al, 1978).

El aumento en la cantidad de ADN por oviducto es indicador de hiperplasia celular, mientras que la concentración incrementada de componentes celulares diferentes al ADN (ARN, proteínas, lípidos y carbohidratos), es indicadora de hipertrofia (Yu et al, 1971). El aumento de peso húmedo es indicador de ambos fenómenos (Laugier et al, 1983).

En animales inmaduros el tratamiento tanto con estradiol como con DES, con dosis que van desde 0.1 a 5 mg, provoca un incremento en el peso húmedo (Oades y Brown, 1965; Oka y Schimke, 1969a; Yu et al, 1971; Palmiter, 1972) que es más marcado al aumentar la cantidad de hormona administrada (Kohler et al, 1969; Seaver et al, 1984a; Skafar y Seaver, 1985) y se da tanto por efecto directo como indirecto del estradiol (Laugier et al, 1983).

Inicialmente el aumento de peso húmedo se da por una captación de agua por el oviducto, ya que el peso seco se mantiene constante (Oka y Schimke, 1969a).

El contenido de ADN/oviducto se incrementa notablemente al administrar dosis de 1 a 5 mg/día de estradiol (Kohler et al., 1969; Yu et al., 1971; Palmiter, 1972). La cantidad de ADN/mg de tejido decrece después de 3 días de tratamiento debido a la captación de agua dentro del tejido provocada por el estradiol, aunque el ADN total sigue aumentando (Oka y Schimke, 1969a).

La diferenciación inducida por estrógeno no se acompaña de amplificación o delección génica importante ya que no se afecta la cinética de renaturalización del ADN (Rosen et al., 1973).

Mientras que en el útero de ratas se requiere la presencia sostenida de estrógeno en el núcleo, para provocar síntesis máxima de ADN (Stormshak et al., 1978), en el oviducto de aves, el efecto del estradiol parece ser indirecto sin requerir concentración alta de receptores nucleares, se propone al hígado como órgano intermediario en la respuesta proliferativa (Laugier et al., 1984a).

La adición de estradiol (1 a 100 nM) al suero de ponedoras y de pollos a los que se les ha suspendido el tratamiento no causa proliferación rápida del oviducto cultivado, se sugiere que los estrógenos administrados "in vivo" causan la síntesis de factores de crecimiento en un órgano aún no identificado y llegan por corriente sanguínea al oviducto para estimular su proliferación rápida. Al parecer, estos factores no son sólo esteroides (Seaver et al., 1984b).

Los estrógenos y, en general, las hormonas esteroides conducen a un aumento en la síntesis de ARN (Oka y Schimke, 1969b; Gilbert, 1971b; Yu et al., 1971; O'Malley y Means, 1974; Clark et al., 1978), demostrado por modificación en la cromatina donde aumenta el número de sitios de iniciación

(Clark et al, 1978) y la actividad de ARN polimerasa (Kon y Spelberg, 1982).

Se reporta inducción en la síntesis de ARN<sub>r</sub> (Palmiter et al, 1970; Clark et al, 1978), ARN<sub>t</sub> y formación de nuevas especies de ARN<sub>m</sub> (Gilbert, 1971b; O'Malley y Means, 1974) que se detectan dos días después de la administración estrogénica (Kohler et al, 1969), se han reconocido para ovalbúmina, conalbúmina, ovomucina y lisosima, todas ellas proteínas de la clara (Palmiter, 1972).

En las glándulas tubulares la concentración de ARN<sub>m</sub> para ovalbúmina puede ser inducida a 50,000 moléculas/célula (Teng, 1980), el núcleo contiene unas 3,000 de las cuales aproximadamente 200 están en los complejos ribonucleoproteicos (RNP) (Thomas et al, 1981).

En cultivo de órganos, además del estrógeno, se requieren otros factores para promover el aumento de ARN<sub>m</sub> de ovalbúmina (Seaver et al, 1984a).

Por otra parte, el estradiol aumenta la captación de aminoácidos por el oviducto (Oka y Schimke, 1969a); la síntesis proteica se hace evidente después de 2 días e incrementa al día 5 de tratamiento (Kohler et al, 1969), el magnum contribuye con la mayor parte de proteínas hidrosolubles sintetizadas (Oades y Brown, 1965).

Al tercer día de tratamiento se detecta la lisosima (Oka y Schimke, 1969a) y las glándulas tubulares tienen gránulos secretorios de ovalbúmina (Kohler et al, 1969). Oades y Brown (1965) no detectan lisosima en las proteínas hidrosolubles del magnum y si gran cantidad de post-albúmina comparada con niveles bajos de ovalbúmina.

Se indica que hay una inducción coordinada en la síntesis

sís de proteínas de la clara, cuando la cantidad de estrógeno administrada es suficiente para saturar todos los sitios de unión, tanto en estimulación primaria como secundaria (Palmiter, 1972); aunque otros estudios reportan que la ovalbúmina no es inducible por estimulación primaria y que la inducción de la síntesis general proteica requiere contacto directo del estradiol con las células blanco y niveles más altos de la hormona que para la proliferación (Laugier et al, 1983).

Se reportan incrementos en lípidos, glucógeno, glucosa (Yu et al, 1971) y en la actividad de enzimas que intervienen en el metabolismo de carbohidratos (Campbell et al, 1971).

En cultivo de tejidos también se estimula la síntesis de proteínas de la clara (Seaver et al, 1984b); la expresión del gene de ovalbúmina está bajo influencia estrogénica directa, aunque su velocidad de síntesis es menor que "in vivo" (Seaver et al, 1984a).

El oviducto puede volverse insensible al aumentar la dosis o al cambiar el tipo de estrógeno administrado, la insensibilización puede ser regulada a diferentes niveles de la expresión génica. En el primer caso, es a nivel de la traducción, ya que la actividad de los ARN<sub>m</sub> de ovalbúmina y conalbúmina permanece elevada y en el segundo, disminuye paralelamente con la síntesis de las dos proteínas, que caen a niveles prácticamente indetectables, aunque con diferentes patrones (Skafar y Seaver, 1985). Esto apoya la idea de la regulación proteica independiente propuesta por Palmiter (1972).

Al suspender el tratamiento estrogénico hay una reducción en la concentración y síntesis de proteínas (Palmiter et al, 1970) así como en el peso húmedo, ADN y ARN en un 76, 24 y 82%, respectivamente, después de 12 días. Tal disminu-

ción puede prevenirse si al suspender la administración de estradiol se continúa con progesterona, con la que se obtiene una mayor cantidad de proteínas que si se continúa con estradiol (Oka y Schimke, 1969b). El ARN<sub>m</sub> de ovalbúmina disminuye primero en las RNP y tres horas después se registra su pérdida en el citoplasma (Thomas et al, 1981).

La estimulación secundaria con estradiol o progesterona restablece en 12 a 24 horas la síntesis de ARN y se asocia con organización de polisomas dentro de las células glandulares. Por efecto estrogénico, hay inducción de la síntesis de ARN<sub>r</sub> con el concomitante aumento en la concentración de ribosomas (Palmiter et al, 1970). Los ARN<sub>m</sub> de ovalbúmina y conalbúmina reaparecen en las RNP con cinéticas diferentes y en el citoplasma (Thomas et al, 1981).

Se sugiere que la función principal del estrógeno y progesterona en el magnum, es regular las concentraciones de ARN<sub>m</sub> específicos, de acuerdo a sus velocidades de degradación y síntesis-activación, que para cada uno de ellos parece ser regulada independientemente (Palmiter, 1972).

El estradiol o la progesterona, en estimulación secundaria, llevan a una restitución de la síntesis de lisosima (Oka y Schimke, 1969b) y a un incremento de varios cientos de veces en la de ovalbúmina por las glándulas tubulares, con aumento de 5 veces en la síntesis general proteica después de 7 días (Palmiter et al, 1970), sin necesidad de proliferación celular (Oka y Schimke, 1969b; Palmiter et al, 1970).

La cromatina de ovalbúmina se reorganiza en una conformación transcripcionalmente activa y el gene expresado son nucleosomas no plegados (Bloom y Anderson, 1982). La síntesis de esta proteína se ha detectado sobre polisomas unidos a membrana (Seaver et al, 1984a)

Se propone que existen múltiples sitios blanco para los receptores, dado que el estrógeno estimula la proliferación y función celulares y la progesterona sólo la función (Oka y Schimke, 1969b; Palmiter, 1972; Pageaux et al, 1986), la cual parece tener regulación multihormonal (Pageaux et al, 1986).

En embriones de 10 a 16 días, la velocidad en los incrementos de peso húmedo, ADN y ARN<sub>m</sub> de ovalbúmina inducidos por DES es mayor que en animales de 16 días de incubación a una semana de post-nacimiento. En embriones sin tratamiento no existen cantidades detectables de ARN<sub>m</sub> para ovalbúmina (Teng, 1980).

La exposición prenatal a dosis altas de DES, 5 y 10 mg/ml disminuyen el contenido de ADN en un 29 y 32%, y la expresión del gene de ovalbúmina en un 75 y 78%, respectivamente; con dosis de 2.5 mg/ml no se afecta el contenido de ADN pero se suprime la expresión del gene de ovalbúmina en un 47 a 53%. El mayor efecto inhibitorio se da en embriones de 5 a 8 días y es menor cuando el órgano se ha diferenciado (15 días), debido a que se ha originado estabilidad en el genoma (Teng y Teng, 1985).

## IX. RELACIONES SINERGICAS Y ANTAGONICAS

En la cromatina los sitios aceptores para estradiol, progesterona y testosterona son diferentes.

La progesterona administrada junto con estrógeno tiene efecto antagónico en la formación de las glándulas tubulares (Oka y Schimke, 1969b) y en general sobre el crecimiento hiperplásico del oviducto (Oades y Brown, 1965; Yu et al, 1971; Palmiter, 1972). pero es sinérgica en la síntesis proteica (Oades y Brown, 1965; Oka y Schimke, 1969b; Palmiter, 1972); aunque cada hormona promueve la síntesis de diferentes pro-

teínas (Yu et al, 1971). Hay también sinergismo en la actividad de las enzimas fosfofructocinasa, fructosa 1,6-difosfata y aldolasa (Campbell et al, 1971).

Si la dosis de progesterona se aumenta no induce la síntesis de ovalbúmina, pero muestra mayor sinergismo en la concentración de glucosa y glucógeno (Yu et al, 1971). A dosis altas existe un marcado antagonismo entre estradiol y progesterona que parece ocurrir durante un evento muy temprano de la transcripción (Kon y Spelberg, 1982).

El estrógeno necesita la adición de progesterona o testosterona para confinar la ovalbúmina en gránulos de secreción (Seaver et al, 1984a).

La testosterona actúa sinérgicamente con el estradiol sobre el crecimiento hiperplásico e hipertrófico del magnum, así como en la inducción de ovomucina y conalbúmina; el sinergismo se observa sólo si los niveles de receptores a testosterona están elevados (Tokarz et al, 1979).

## O B J E T I V O D E T R A B A J O

En el presente trabajo se estudiaron los cambios morfológicos y bioquímicos en el oviducto de pollos recién nacidos al ser tratados "in vivo" con diferentes dosis de  $17\beta$ -estradiol (0.2, 1, 2 y 4  $\mu\text{g}$ /embrión los días 15 y 17 de incubación.

Este estudio permite tener información acerca del efecto de la hormona sobre el oviducto en los últimos estadios embrionarios, previo al desarrollo de las estructuras glandulares de la mucosa y funcionalidad del órgano.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización del presente trabajo se utilizan huevos fértiles de gallinas White Leghorn, obtenidos de la granja avícola Tulyehualco de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, los cuales son incubados a 37.8°C y con 60 a 65% de humedad en una incubadora de circulación de aire.

Al día 13 de incubación, los huevos viables son limpiados con alcohol al 70% y, en condiciones de esterilidad, se procede a hacerles una abertura para permitir el tratamiento hormonal, de la siguiente manera:

- a) En el extremo correspondiente a la cámara de aire se perfora el cascarón con una aguja de disección,
- b) sobre el plano ecuatorial del huevo se hace un pequeño triángulo de aproximadamente 0.5 cm por lado con una segua comercial. Se retira el cascarón y se deja al descubierto la membrana externa del huevo,
- c) se vierte una gota de suero fisiológico estéril para promover la separación de las membranas externa y corioalantoidea y se presionan con unas pinzas de punta roma,
- d) con un bulbo de látex se succiona en el orificio practicado en la cámara de aire, para obligar el descenso de la membrana corioalantoidea,
- e) con unas pinzas de punta delgada se retira la membrana externa. Los dos orificios practicados se sellan con cinta adhesiva transparente.

Los embriones se vuelven a incubar. En los días 15 y 17 de desarrollo, los huevos son limpiados con alcohol al 70% y nuevamente en condiciones de esterilidad, se inyectan las dosis hormonales sobre la membrana corioalantoidea. El grupo

control es tratado con 100  $\mu$ l de suero fisiológico estéril por inyección.

Para el análisis morfológico se utilizan cuatro grupos experimentales tratados con dosis de 0.2, 1, 2 y 4  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol por inyección.

Para los estudios bioquímicos (cuantificación de ADN y proteínas), el grupo experimental es tratado con 0.2  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol por inyección. Las dosis hormonales se administran siempre en un volumen de 100  $\mu$ l.

La preparación de la hormona es de la siguiente manera: 10 mg de 17 $\beta$ -estradiol son disueltos en 10 ml de alcohol etílico al 95% y se aforan a 100 ml con agua bidestilada estéril. De esta solución madre (0.1 mg/ml) se toman 0.2, 1, 2 y 4 ml que se aforan a 10 ml con agua (2, 10, 20 y 40  $\mu$ g/ml). De cada una se toman 100  $\mu$ l, por lo que se administran, según el caso, 0.2, 1, 2 y 4  $\mu$ g/inyección.

La eclosión ocurre el día 21 de desarrollo y, 24 horas después de su nacimiento, los animales son sacrificados por decapitación. Al momento de la disección se determina el sexo de los animales. Se disecan los oviductos izquierdos, se secan en papel filtro y se introducen en cápsulas plásticas herméticas para obtener su peso húmedo.

Para los estudios bioquímicos, los oviductos se mantienen en las cápsulas y se congelan a -70°C durante 24 horas como mínimo.

## 1. ESTUDIO MORFOLOGICO

Después de obtener el peso húmedo, cada oviducto se extiende en una gota de fijador Bouin para ser fraccionado y ex

traer la porción del magnum (Fig. 2). El material así obtenido se procesa de la siguiente manera:

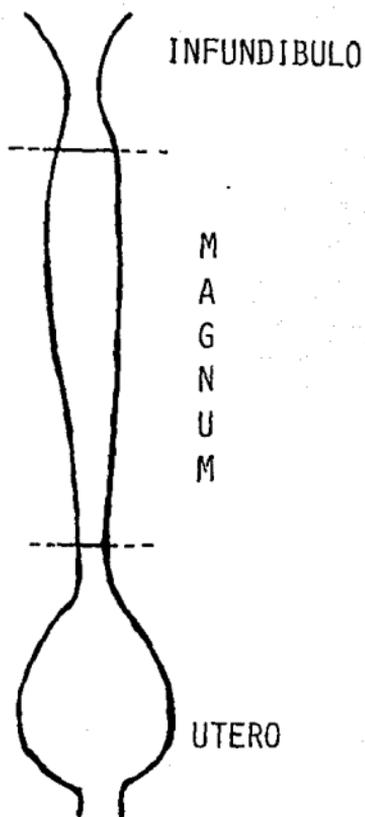


Fig. 2 Esquema del oviducto de pollo.  
Longitud real 16 a 20 mm.

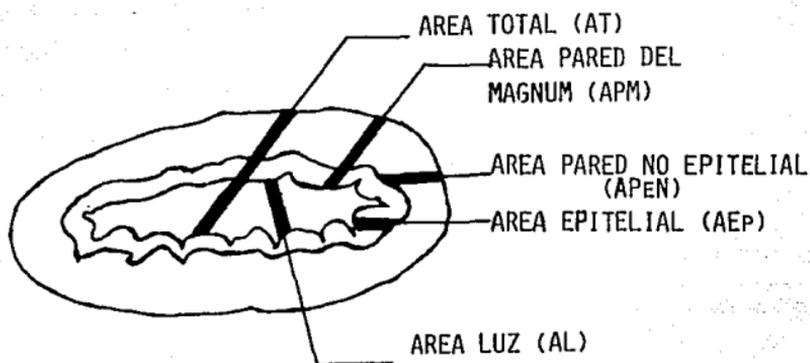
- 1.- Fijación en líquido de Bouin por 2 horas.
- 2.- Lavar en alcohol al 70%. Realizar 4 lavados más durante 24 horas.
- 3.- Continuar la deshidratación en alcoholes graduales (80, 96% y absoluto). 10 minutos en cada alcohol.
- 4.- Transferir a una mezcla 1:1 de alcohol absoluto/tolueno, 15 minutos.
- 5.- Aclarar en tolueno, 20 minutos (2 cambios).
- 6.- Preincluir en una mezcla 1:1 de parafina (56 a 58°C)/paraplast (56 a 57°C), durante 24 horas a 57°C.
- 7.- Incluir en parafina/paraplast, proporción 1:1.

Se realizan cortes transversales semiseriados de 5  $\mu$ m de espesor. Para la elaboración de las laminillas se toma una muestra de 5 a 7 cortes por cada 100 cortes obtenidos en el micrótomo. La tinción se efectúa por medio de la técnica de Hematoxilina-Eosina (Bancroft, 1967) y se montan con bálsamo de Canadá.

Las laminillas se observan al microscopio óptico, se hace un muestreo y se seleccionan de acuerdo a características morfológicas muy evidentes. El estudio morfológico cubre dos aspectos: morfometría o estereología y análisis histológico, los cuales se describen a continuación.

#### A) MORFOMETRIA O ESTEREOLOGIA

Este estudio consiste en la cuantificación de las diferentes zonas que componen cada corte transversal del magnum (Fig. 3); así, en cada corte se advierten cinco zonas bien definidas, susceptibles de medición: área total del tejido (AT); pared del magnum (APM) compuesta de dos porciones, pared no epitelial (APen) y epitelio (AEp) y, finalmente, la luz del magnum (AL).



Para la cuantificación, los cortes son dibujados a escala mediante la adición de una cámara lúcida al microscopio fotónico; el valor real de los dibujos se obtiene por medio de una reglilla micrométrica. Los dibujos son llevados a un equipo consistente en un digitalizador, computadora y unidad de disco y se trabaja con un programa de cálculo de áreas que utiliza un algoritmo de triángulos infinitesimalmente pequeños (Burden y Faires, 1985). Las áreas se reportan en  $\mu\text{m}^2$ .

Se mide también la altura del epitelio de la mucosa mediante el uso de un ocular micrométrico, se toma una medida cada  $75.5 \mu\text{m}$ , hasta muestrear en su totalidad el área epitelial de cada corte.

Los resultados obtenidos para cada parámetro cuantificado son sometidos a las pruebas estadísticas de análisis de varianza, Scheffé y "t" de Student (Scheffé, 1953; Zar, 1984).

## B) ANALISIS HISTOLOGICO

Para este análisis se describen las características histológicas del grupo control en cuanto a densidad, forma, distribución y tamaño relativo de las células no epiteliales, así como forma, tamaño y pseudoestratificación de los núcleos epiteliales para, posteriormente, ser comparadas con los grupos experimentales pertenecientes a la curva dosis-respuesta de  $17\beta$ -estradiol.

## II. ESTUDIOS BIOQUIMICOS

Los estudios bioquímicos consisten en la cuantificación paralela de ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas, con contenidos total y corregido por peso húmedo en cada uno de los oviductos.

La extracción y cuantificación de ADN se basan en los reportes de Burton (1956), Marmur (1961), Giles y Myers (1965) y Rickwood (1980); pero fueron modificados hasta diseñar una técnica más conveniente de acuerdo a las características de peso, tamaño, edad y consistencia del tejido trabajado. Para la obtención de proteínas se utiliza la técnica de Lowry et al (1951).

### A. TECNICA PARA DETERMINACION DE ADN

Cada oviducto es procesado de la siguiente manera:

- 1- Homogenizar el tejido en 1 ml de buffer: 150 mM NaCl, 100 mM EDTA disódico, 20 mM NaOH; pH = 8.0
- 2- Tomar una alícuota de 800  $\mu$ l.
- 3- Incubar a 80°C por 3 minutos en baño María.

- 4- Dejar que los tubos tomen temperatura ambiente.
- 5- Añadir un volumen igual (800  $\mu$ l) de ácido tricloroacético al 10% frío. Agitar en vórtex.
- 6- Precipitar proteínas y ADN durante 2 horas en frío (4°C).
- 7- Centrifugar a 3,500 rpm durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante.
- 8- Agregar 1 ml de ácido perclórico 0.5 N y resuspender en vórtex.
- 9- Incubar a 70°C por 20 minutos en baño María.
- 10- Añadir 2 ml de reactivo de Burton: 50 ml de difenilamina al 3% en ácido acético glacial, 0.75 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 ml de acetaldehído acuoso al 2%.
- 11- Permitir la reacción colorimétrica a 30°C durante 16 a 20 horas en baño de incubación y con los tubos tapados.
- 12- Centrifugar a 3,500 rpm por 15 minutos. Recuperar el sobrenadante.
- 13- Determinar la diferencia de densidad óptica entre 595 y 700 nm leída contra un blanco, de tal forma que:  
 $D.O._{595 \text{ nm}} - D.O._{700 \text{ nm}} = D.O._{\text{real}}$  (Giles y Myers, 1965).

Se utiliza un espectrofotómetro UV-visible, hibridizado con un monocromador (Beckman, mod. DU).

La curva patrón se elabora con concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 70  $\mu$ g de ADN (Sigma, Tipo I altamente polimerizado), obtenidas a partir de una solución madre preparada al momento del estudio con volúmenes iguales de HClO<sub>4</sub> 0.5 N y una solución de 0.2 mg de ADN/ml de NaOH 5 mM (Patterson, 1979).

Los resultados se reportan en  $\mu$ g de ADN/oviducto,  $\mu$ g de ADN/mg de tejido y proporción ADN/proteína y son sometidos a la prueba estadística "t" de Student.

## B, DETERMINACION DE PROTEINAS

Para cada oviducto se realiza el siguiente procedimiento:

- 1- Homogenizar el tejido congelado en 1 ml de buffer.
- 2- Tomar una alícuota de 50  $\mu$ l.
- 3- Agregar 150  $\mu$ l de agua destilada.
- 4- Añadir 1 ml de reactivo A: 50 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 N, 0.5 ml de tartrato de Na y K al 2% en agua, 0.5 ml de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) al 1%. Agitar inmediatamente en vórtex.
- 5- Dejar en reposo 10 minutos.
- 6- Agregar 100  $\mu$ l de solución de Folin-Ciocalteus (1:1 en agua). Agitar inmediatamente (vórtex).
- 7- Dejar reposar 24 horas con los tubos tapados y en la oscuridad.
- 8- Determinar la densidad óptica a 750 nm, leída contra un blanco.

La curva patrón se elabora a partir de una solución madre (1 mg/ml) de albúmina sérica de bovino (Sigma); las concentraciones usadas son de 10, 20, 30, 50 y 70  $\mu$ g de albúmina.

Todos los datos son registrados para su posterior conversión. Los datos se reportan en  $\mu$ g de proteína/oviducto,  $\mu$ g de proteína/mg de tejido y son sometidos a la prueba estadística "t" de Student.

## R E S U L T A D O S

### I. ESTUDIO MORFOLOGICO

En los oviductos destinados al análisis morfológico, tratados con diferentes dosis de  $17\beta$ -estradiol (0.2, 1, 2 y 4  $\mu\text{g}$ ), los resultados obtenidos muestran un incremento en el peso húmedo del oviducto. El análisis de varianza reporta una  $F = 3.014$ ,  $P = 0.030$ ; no obstante, las pruebas de Scheffé y "t" de Student (Tabla I) indican que hay diferencia significativa sólo con la dosis de 1  $\mu\text{g}$  de la hormona (Fig. 4).

La observación de los cortes histológicos en el grupo control, llevó a la identificación de cuatro niveles a lo largo del magnum del oviducto (Fig. 5), los cuales se diferencian a "grosso modo" y en una dirección infundíbulo-uterina, por las siguientes características morfológicas:

- Nivel I - Cuerpo y luz grandes, sin pliegues, epitelio bajo.
- Nivel II - Cuerpo y luz medianos, pocos y bajos pliegues epiteliales, epitelio bajo.
- Nivel III - Cuerpo y luz medianos, numerosos pliegues que involucran al estroma, criptas profundas, el epitelio aumenta en altura.
- Nivel IV - Cuerpo menor y luz pequeña, con esbozo de pliegues sin participación del estroma, epitelio muy alto.

De manera general, la forma de los cortes en el nivel I es elíptica y se hace circular hacia el nivel IV.

Estos cuatro niveles son también identificados en el magnum de los oviductos tratados con las diferentes dosis hormonales.

## A. MORFOMETRIA

La medición de las áreas total (AT), de la pared del magnum (APM) en sus porciones no epitelial (APEn) y epitelial (AEp) y de la luz (AL), a lo largo de la porción del magnum en el lote control, marca diferencias entre los cuatro niveles propuestos.

Como puede verse en la Tabla II, hay una disminución en las áreas total, de la pared del magnum, porción no epitelial y de la luz, conforme se avanza del nivel I al IV. Inversamente, la altura epitelial (hEp) aumenta al seguir la misma dirección de avance (Fig. 6).

Entre los niveles II y III no se observan diferencias cuantitativas en las áreas consideradas. La presencia de numerosos pliegues epiteliales altos establece la diferencia morfológica primaria entre estos niveles (Fig. 5).

El porcentaje de la pared del magnum con respecto al área total se mantiene constante en los tres primeros niveles (85.5%) y se incrementa en el nivel IV donde el área epitelial cobra importancia notable y llega a representar el 26.2% del área total, a diferencia de lo contemplado en los niveles I, II y III, en los que representa sólo el 17.5% en promedio (Tabla II). Contrariamente, el porcentaje de la luz disminuye bruscamente en el nivel IV (7.23%), en tanto que en los niveles precedentes representa, en promedio, el 14.5% del área total.

Un comportamiento análogo en áreas y porcentajes se advierte en los grupos experimentales, aunque con diferentes magnitudes (Tablas III, IV, V y VI).

Al confrontar las áreas consideradas en el grupo control con sus correspondientes en los grupos experimentales por ni-

vel, se observa lo siguiente:

En el nivel I las áreas total, de la pared del magnum, pared no epitelial y de la luz, se encuentran elevadas con los cuatro tratamientos hormonales. La diferencia significativa radica en los grupos control y el tratado con la dosis de 0.2  $\mu$ g de estradiol (Tablas I y III).

En los niveles II y III se registra un aumento del área total con las dosis de 0.2 y 2  $\mu$ g de estradiol (Tablas I, IV y V) por efecto del aumento en el área de la luz en el primer caso. Con el tratamiento de 2  $\mu$ g se incrementan también las áreas de la pared no epitelial y de la pared en conjunto (Tabla I).

Para el nivel IV todas las áreas cuantificadas tienden a incrementarse con la administración hormonal. La prueba de "t" de Student indica que los aumentos son significativos con las dosis de 0.2, 2 y 4  $\mu$ g (Tabla I).

La altura del epitelio no muestra modificaciones significativas con los tratamientos hormonales en ningún nivel.

## B) ANALISIS HISTOLOGICO

El análisis histológico del magnum en el grupo control revela modificaciones estructurales que, en términos generales y al seguir una dirección céfalo-caudal, son: a) variación en el plegamiento y aumento en la pseudoestratificación epitelial con alargamiento nuclear, b) variación en la compactación del estroma (que se muestra aglandular), con aumento de fibras de colágena y c) homogeneidad en los estratos no epiteliales.

Las características de cada nivel se describen a continuación y están ilustradas en las Figuras 5 y 7.

#### NIVEL I

En la pared no epitelial se distinguen tres capas: a) la serosa, constituida por células con núcleos aplanados dispuestos en una sola fila y que no cambia en ningún nivel, b) la muscular, que es una capa circular gruesa de apariencia plexiforme y laxa con núcleos alargados y c) un estroma denso y grueso, con núcleos de formas variables y a diferente nivel, presenta algunas fibras dentro de él y muchas que se proyectan hacia el epitelio.

En la parte media del corte, el epitelio presenta núcleos ovales, grandes y arreglados en una capa. En los extremos laterales, el epitelio presenta pequeños lóbulos donde los núcleos se alargan y tienden a una pseudoestratificación.

#### NIVEL II

La capa muscular se aprecia igualmente laxa y gruesa que en el nivel I. En el estroma los núcleos son irregulares, es más laxo y contiene más fibras que se proyectan hacia el epitelio.

En el epitelio se observan desde pequeñas ondulaciones hasta pliegues bajos, anchos y poco numerosos. Los núcleos son más alargados, sobre todo en los extremos laterales, dando la apariencia de una pseudoestratificación.

### NIVEL III

La capa muscular permanece como la más laxa de la pared. El estroma aparece un poco más compacto, con núcleos ovales y fusiformes. Hay una tendencia a la homogeneidad de estratos no epiteliales, ya que no se distingue con absoluta precisión el límite entre la capa muscular y el estroma.

Los pliegues epiteliales son evidentes, aumentan en número, involucran al estroma y muestran criptas profundas. Hay aumento en la pseudoestratificación, que es más acentuada en los extremos laterales.

### NIVEL IV

En este nivel la pared no epitelial es compacta y homogénea; los límites celulares son difusos y dan al tejido un aspecto poroso. En el estroma se distinguen fibras gruesas y ocasionalmente, eritrocitos.

En el epitelio, los pliegues no involucran al estroma. Hay una marcada pseudoestratificación con núcleos mayormente alargados y se evidencian cilios.

### TRATAMIENTO CON ESTRADIOL

Con dosis de 0.2  $\mu$ g de estradiol se provocan cambios morfométricos y también se observan modificaciones estructurales por efecto de la hormona en el nivel I.

La serosa no muestra variación. La capa muscular es más compacta, gruesa y evidente y, al parecer, es la que contribuye mayormente a la diferencia en el área de la pared no epitelial. El estroma es también más denso y con fibras; sus núcleos son ovales o redondos, más pequeños y con un arreglo radial hacia el epitelio, a diferencia del grupo control (Fig. 8).

Hay formación de pequeños pliegues epiteliales y se observan también lóbulos en los extremos laterales. Los núcleos permanecen ovales y grandes y sólo en los extremos se muestran alargados, con forma cilíndrica y tendencia a la pseudoestratificación. Se observa claramente una separación entre el epitelio y el estroma, formada principalmente de fibras.

En los tres niveles restantes, al igual que con dosis altas de la hormona, las modificaciones histológicas son menos marcadas.

## II. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Los resultados obtenidos en los estudios bioquímicos (Tabla VII), realizados en los grupos control y el tratado con 0.2  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol, confirman que el peso húmedo del oviducto se incrementa ligeramente con el tratamiento hormonal, sin ser estadísticamente significativo.

Un fenómeno similar se visualiza en las cantidades de ADN/oviducto y ADN/mg de tejido, siendo aún más tenues los incrementos observados.

Contrariamente, el contenido proteico/oviducto se ve disminuido con la administración hormonal, sin que el decremento sea significativo; sin embargo, la disminución de proteínas/mg de tejido en el lote experimental es significativa, arrojando un valor de  $t=2.08$ ,  $P < 0.05$ . Debido al aumento en el contenido de ADN y disminución en el de proteínas, la proporción ADN/proteína se ve aumentada en el grupo tratado con estradiol; sin embargo, no hay diferencia significativa entre los grupos.

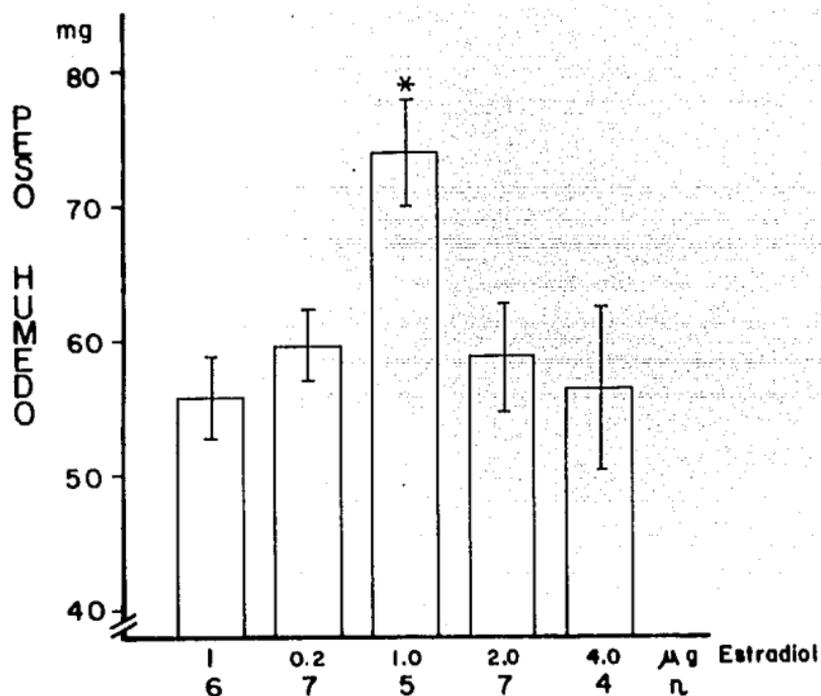


Fig. 4 Peso húmedo del oviducto de pollos recién nacidos tratados con diferentes dosis de  $17\beta$ -estradiol los días 15 y 17 de incubación. Valores expresados como la media  $\pm$  error standard. Testigo (T); número de organismos (n);  $P < 0.05$  (\*).

T A B L A I

Significancia estadística del efecto de las diferentes dosis de 17 $\beta$ -estradiol con respecto al grupo control, sometidas al análisis de varianza (ANOVA), Scheffé (Sch) y "t" de Student (t).

A N A L I S I S P O R D O S I S

	E <sub>0,2</sub> $\mu$ g		E <sub>1</sub> $\mu$ g		E <sub>2</sub> $\mu$ g		E <sub>4</sub> $\mu$ g		
	ANOVA	Sch	t	Sch	t	Sch	t	Sch	t
PESO HUMEDO	+	-	-	+	+	-	-	-	-
AT	+	+	+	-	+	-	+	-	+
	I, II, III, IV	I	I, II, III, IV		I		I, II, III, IV		I, IV
APM	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	I	I	I, IV				III, IV		IV
APEn	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	I	I	I, IV				III, IV		I, IV
AEp	-	-	+	-	-	-	+	-	-
			IV				IV		
AL	+	+	+	-	+	-	-	-	+
	I, II, IV	IV	I, II, III, IV		IV				I, II, IV
hEp	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Area total (AT); área de la pared del magnum (APM); área de la pared no epitelial (APEn); área epitelial (AEp); área de la luz (AL); altura del epitelio (hEp). P < 0.05 (+); P > 0.05 (-) I, II, III y IV (niveles del magnum).

T A B L A   I I

Variación morfométrica en los distintos niveles del magnum de oviductos de pollos recién nacidos, sin tratamiento hormonal. Áreas expresadas en  $10^4 \mu\text{m}^2$ .

NIVEL	AT	APM	APEn	AEp	AL
I	5.78 ± 0.32 % n = 6	4.87 ± 0.28 84.40 ± 2.18	3.85 ± 0.24 66.76 ± 2.73	1.03 ± 0.09 17.64 ± 0.88	0.90 ± 0.15 15.60 ± 2.18
II	4.81 ± 0.26 % n = 7	4.16 ± 0.28 86.28 ± 2.22	3.32 ± 0.22 68.75 ± 1.32	0.84 ± 0.07 17.53 ± 1.08	0.65 ± 0.10 13.72 ± 2.22
III	4.84 ± 0.24 % n = 6	4.15 ± 0.22 85.92 ± 1.94	3.32 ± 0.18 68.65 ± 1.19	0.83 ± 0.06 17.27 ± 0.82	0.68 ± 0.10 14.08 ± 1.94
IV	3.90 ± 0.23 % n = 4	3.62 ± 0.24 92.77 ± 1.18	2.61 ± 0.23 66.60 ± 1.99	1.01 ± 0.02 26.18 ± 1.39	0.28 ± 0.04 7.23 ± 1.18

Valores expresados como la media ± error standard.

Área total (AT); área de la pared del magnum (APM); área de la pared no epitelial (APEn); área epitelial (AEp); área de la luz (AL); porcentaje del área considerada con respecto al área total (%); número de organismos (n).

T A B L A   I I I

Variación de los parámetros morfométricos en el Nivel I del magnum de oviductos de pollos recién nacidos, en respuesta a la administración de las diferentes dosis de 17 $\beta$ -estradiol los días 15 y 17 de incubación. Áreas expresadas en 10<sup>4</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>.

	CONTROL	E <sub>0.2</sub> $\mu$ g	E <sub>1</sub> $\mu$ g	E <sub>2</sub> $\mu$ g	E <sub>4</sub> $\mu$ g
AT	5.78 $\pm$ 0.32 n = 6	8.08 $\pm$ 0.41 n = 6	6.60 $\pm$ 0.08 n = 2	6.75 $\pm$ 0.23 n = 3	7.77 $\pm$ 0.53 n = 2
APM	4.87 $\pm$ 0.28 % 84.40 $\pm$ 2.18	6.33 $\pm$ 0.29 78.69 $\pm$ 2.77	5.33 $\pm$ 0.44 80.68 $\pm$ 5.61	5.33 $\pm$ 0.40 78.75 $\pm$ 3.52	5.75 $\pm$ 0.33 74.08 $\pm$ 0.81
APEn	3.85 $\pm$ 0.24 % 66.76 $\pm$ 2.73	5.14 $\pm$ 0.26 63.95 $\pm$ 3.08	4.16 $\pm$ 0.38 63.04 $\pm$ 5.01	4.33 $\pm$ 0.35 63.97 $\pm$ 3.08	4.81 $\pm$ 0.29 61.87 $\pm$ 0.52
AEp	1.03 $\pm$ 0.09 % 17.64 $\pm$ 0.88	1.19 $\pm$ 0.07 14.74 $\pm$ 0.34	1.16 $\pm$ 0.05 17.65 $\pm$ 0.61	1.00 $\pm$ 0.06 14.78 $\pm$ 0.80	0.95 $\pm$ 0.04 12.21 $\pm$ 0.29
AL	0.90 $\pm$ 0.15 % 15.60 $\pm$ 2.18	1.75 $\pm$ 0.27 21.31 $\pm$ 2.77	1.27 $\pm$ 0.35 19.32 $\pm$ 5.61	1.42 $\pm$ 0.20 21.25 $\pm$ 3.52	2.02 $\pm$ 0.20 25.93 $\pm$ 0.81
hEp	11.55 $\pm$ 0.80	12.51 $\pm$ 0.28	11.71 $\pm$ 0.54	11.76 $\pm$ 0.87	11.00 $\pm$ 1.27

Valores expresados como la media  $\pm$  error standard.

Área total (AT); área de la pared del magnum (APM); área de la pared no epitelial (APEn); área epitelial (AEp); área de la luz (AL); altura del epitelio (hEp); porcentaje del área considerada con respecto al área total (%); número de organismos (n).

T A B L A I V

Variación de los parámetros morfométricos en el Nivel II del magnum de oviductos de pollos recién nacidos, en respuesta a la administración de las diferentes dosis de 17 $\beta$ -estradiol los días 15 y 17 de incubación. Areas expresadas en 10<sup>4</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>.

	CONTROL	E <sub>0.2</sub> $\mu$ g	E <sub>1</sub> $\mu$ g	E <sub>2</sub> $\mu$ g	E <sub>4</sub> $\mu$ g
AT	4.81 $\pm$ 0.26 n = 7	5.72 $\pm$ 0.26 n = 7	5.22 $\pm$ 0.17 n = 3	6.03 $\pm$ 0.32 n = 3	5.40 $\pm$ 0.11 n = 2
APM	4.16 $\pm$ 0.27 % 86.28 $\pm$ 2.22	4.61 $\pm$ 0.26 80.28 $\pm$ 1.15	4.28 $\pm$ 0.21 82.18 $\pm$ 5.69	4.86 $\pm$ 0.20 80.77 $\pm$ 1.90	4.23 $\pm$ 0.09 78.24 $\pm$ 0.05
APEn	3.32 $\pm$ 0.22 % 68.75 $\pm$ 1.32	3.70 $\pm$ 0.23 64.41 $\pm$ 1.35	3.39 $\pm$ 0.20 65.23 $\pm$ 5.06	3.94 $\pm$ 0.14 65.43 $\pm$ 1.48	3.47 $\pm$ 0.13 64.15 $\pm$ 1.01
AEP	0.84 $\pm$ 0.07 % 17.53 $\pm$ 1.08	0.90 $\pm$ 0.08 15.87 $\pm$ 1.40	0.88 $\pm$ 0.01 16.95 $\pm$ 0.71	0.92 $\pm$ 0.06 15.34 $\pm$ 0.60	0.76 $\pm$ 0.04 14.08 $\pm$ 1.06
AL	0.65 $\pm$ 0.10 % 13.72 $\pm$ 2.22	1.12 $\pm$ 0.05 19.72 $\pm$ 1.15	0.95 $\pm$ 0.33 17.82 $\pm$ 5.69	1.17 $\pm$ 0.16 19.23 $\pm$ 1.90	1.18 $\pm$ 0.03 21.78 $\pm$ 0.05
hEp	12.34 $\pm$ 0.83	13.83 $\pm$ 0.88	12.68 $\pm$ 0.40	11.67 $\pm$ 0.63	11.42 $\pm$ 0.85

Valores expresados como la media  $\pm$  error standard.

Area total (AT); área de la pared del magnum (APM); área de la pared no epitelial (APEn); área epitelial (AEP); área de la luz (AL); altura del epitelio (hEp); porcentaje del área considerada con respecto al área total (%); número de organismos (n).

T A B L A V

Variación de los parámetros morfométricos en el Nivel III del magnum de oviductos de pollos recién nacidos, en respuesta a la administración de las diferentes dosis de 17 $\beta$ -estradiol los días 15 y 17 de incubación. Áreas expresadas en 10<sup>4</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>.

	CONTROL	E <sub>0.2</sub> $\mu$ g	E <sub>1</sub> $\mu$ g	E <sub>2</sub> $\mu$ g	E <sub>4</sub> $\mu$ g
AT	4.84 $\pm$ 0.23 n = 6	5.74 $\pm$ 0.29 n = 8	4.93 $\pm$ 0.15 n = 3	5.95 $\pm$ 0.35 n = 3	4.82 $\pm$ 0.31 n = 3
APM	4.15 $\pm$ 0.22 % 85.92 $\pm$ 1.94	4.63 $\pm$ 0.23 80.68 $\pm$ 1.54	4.17 $\pm$ 0.14 84.77 $\pm$ 2.43	4.90 $\pm$ 0.16 82.64 $\pm$ 3.03	3.93 $\pm$ 0.24 81.45 $\pm$ 1.19
APEn	3.32 $\pm$ 0.18 % 68.65 $\pm$ 1.19	3.63 $\pm$ 0.19 63.43 $\pm$ 1.88	3.22 $\pm$ 0.07 65.58 $\pm$ 2.88	3.94 $\pm$ 0.14 66.40 $\pm$ 1.53	3.18 $\pm$ 0.18 66.08 $\pm$ 1.00
AEP	0.83 $\pm$ 0.06 % 17.27 $\pm$ 0.82	0.99 $\pm$ 0.07 17.25 $\pm$ 0.64	0.95 $\pm$ 0.14 19.19 $\pm$ 2.29	0.96 $\pm$ 0.07 16.24 $\pm$ 1.69	0.74 $\pm$ 0.06 15.37 $\pm$ 0.39
AL	0.68 $\pm$ 0.10 % 14.08 $\pm$ 1.94	1.12 $\pm$ 0.11 19.32 $\pm$ 1.54	0.75 $\pm$ 0.13 15.23 $\pm$ 2.43	1.05 $\pm$ 0.23 17.36 $\pm$ 3.03	0.90 $\pm$ 0.09 18.55 $\pm$ 1.19
hEp	14.89 $\pm$ 1.07	17.37 $\pm$ 1.05	19.48 $\pm$ 3.25	17.20 $\pm$ 1.42	14.59 $\pm$ 0.39

Valores expresados como la media  $\pm$  error standard.

Área total (AT); área de la pared del magnum (APM); área de la pared no epitelial (APEn); área epitelial (AEP); área de la luz (AL); altura del epitelio (hEp); porcentaje del área considerada con respecto al área total (%); número de organismos (n).

T A B L A V I

Variación de los parámetros morfométricos en el Nivel IV del magnum de oviductos de pollos recién nacidos, en respuesta a la administración de las diferentes dosis de 17 $\beta$ -estradiol los días 15 y 17 de incubación. Áreas expresadas en 10<sup>4</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>.

	CONTROL	E <sub>0.2</sub> $\mu$ g	E <sub>1</sub> $\mu$ g	E <sub>2</sub> $\mu$ g	E <sub>4</sub> $\mu$ g
AT	3.90 $\pm$ 0.23 n = 4	5.59 $\pm$ 0.40 n = 8	4.42 $\pm$ 0.54 n = 3	5.72 $\pm$ 0.52 n = 3	5.07 $\pm$ 0.10 n = 3
APM	3.62 $\pm$ 0.24 % 92.77 $\pm$ 1.18	4.86 $\pm$ 0.37 86.91 $\pm$ 1.11	3.89 $\pm$ 0.48 88.12 $\pm$ 0.52	5.09 $\pm$ 0.36 89.16 $\pm$ 1.88	4.37 $\pm$ 0.02 86.13 $\pm$ 1.61
APEn	2.61 $\pm$ 0.23 % 66.60 $\pm$ 1.99	3.53 $\pm$ 0.25 63.42 $\pm$ 1.85	2.97 $\pm$ 0.45 66.81 $\pm$ 1.77	3.74 $\pm$ 0.29 65.55 $\pm$ 1.21	3.29 $\pm$ 0.05 64.85 $\pm$ 0.76
AEp	1.01 $\pm$ 0.02 % 26.18 $\pm$ 1.39	1.33 $\pm$ 0.14 23.49 $\pm$ 1.06	0.92 $\pm$ 0.04 21.31 $\pm$ 1.69	1.34 $\pm$ 0.07 23.60 $\pm$ 0.93	1.08 $\pm$ 0.03 21.28 $\pm$ 1.04
AL	0.28 $\pm$ 0.04 % 7.23 $\pm$ 1.18	0.73 $\pm$ 0.07 13.09 $\pm$ 1.11	0.52 $\pm$ 0.06 11.88 $\pm$ 0.52	0.64 $\pm$ 0.17 10.84 $\pm$ 1.88	0.71 $\pm$ 0.10 13.87 $\pm$ 1.61
hEp	26.58 $\pm$ 2.00	28.15 $\pm$ 1.91	23.45 $\pm$ 1.11	27.84 $\pm$ 1.25	27.03 $\pm$ 1.76

Valores expresados como la media  $\pm$  error standard.

Área total (AT); área de la pared del magnum (APM); área de la pared no epitelial (APEn); área epitelial (AEp); área de la luz (AL); altura del epitelio (hEp); porcentaje del área considerada con respecto al área total (%); número de organismos (n).

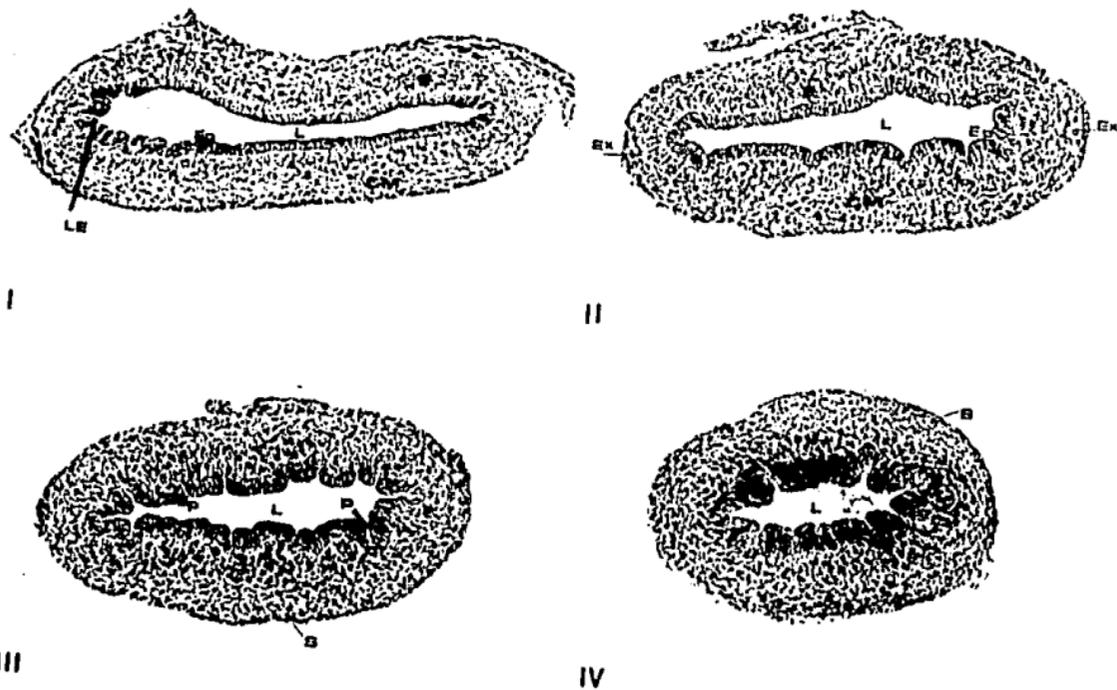


Fig. 5 Niveles morfológicos identificados a lo largo del magnum en el oviducto de pollos recién nacidos, en una dirección céfalo-caudal (256 X). Luz (L), epitelio (Ep), estroma (E), capa muscular (CH), serosa (S), pliegue (P), extremos laterales (EL).

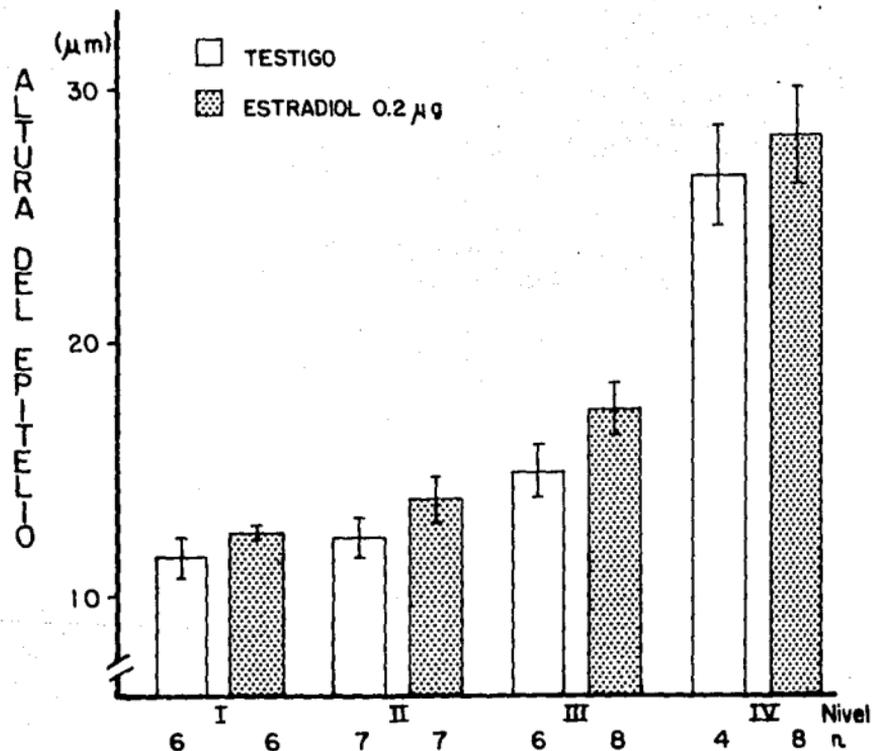


Fig. 6 Altura del epitelio a lo largo del magnum del oviducto de pollos recién nacidos, tratados con 0.2 µg de 17β-estradiol los días 15 y 17 de incubación. Valores expresados como la media ± error standard.

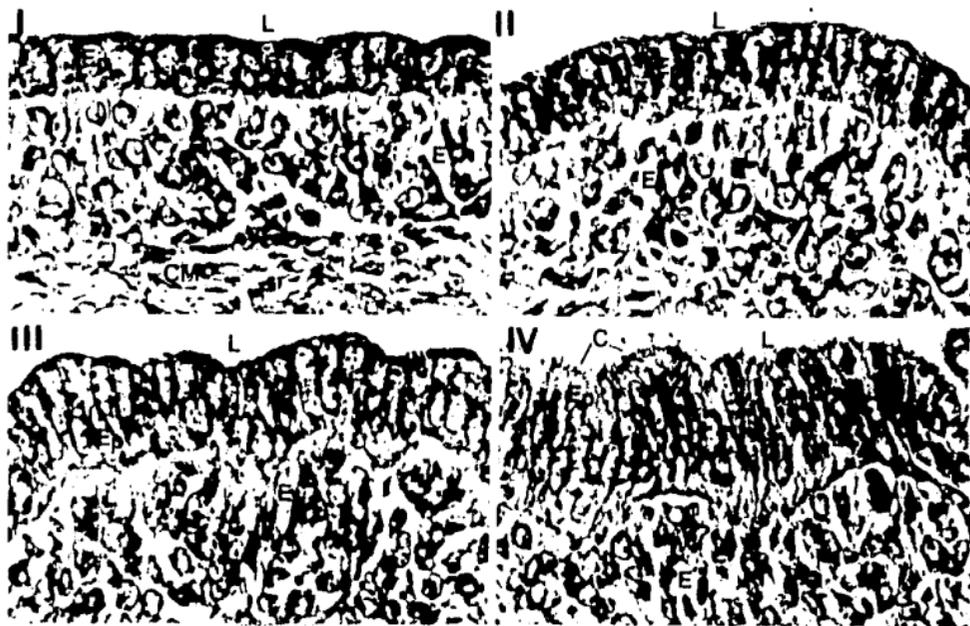


Fig. 7 Cortes histológicos de los diferentes niveles identificados en el magnum del oviducto de pollos recién nacidos, sin tratamiento hormonal (1600 X). Luz (L), epitelio (Ep), estroma (E), capa muscular (CM), cilios (C).

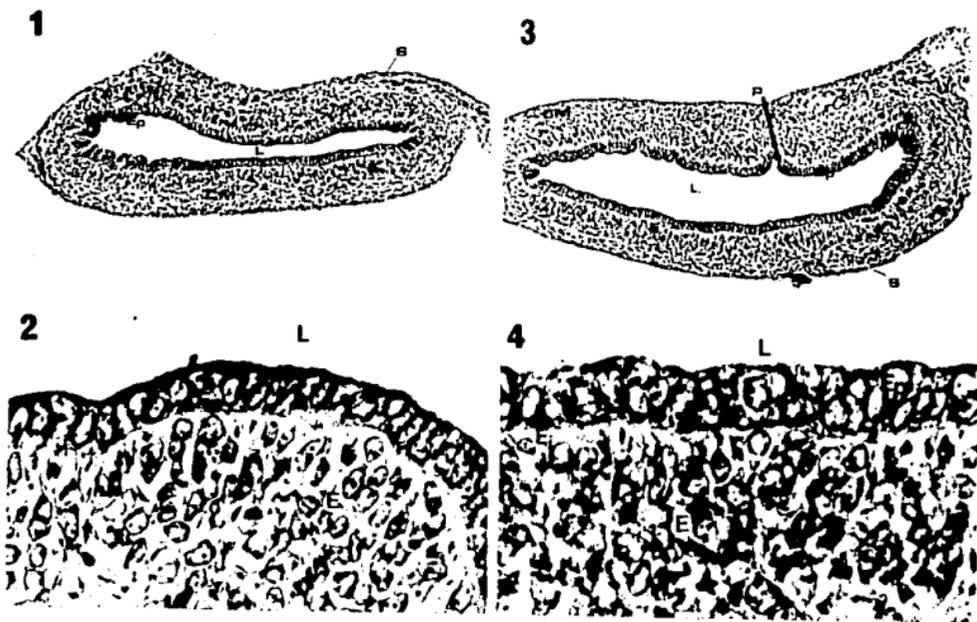


Fig. 8 Modificaciones histológicas en la porción cefálica (Nivel 1) del magnum de oviducto de pollos recién nacidos, tratados con 0.2 µg de 17β-estradiol los días 15 y 17 de incubación (256 y 1600 X). Testigo (1 y 2); Tratado (3 y 4). Luz (L), epitelio (Ep), espacio interepitelial (Ei), estroma (E), pliegue (P), capa muscular (CM), serosa (S).

T A B L A V I I

Cuantificación de peso húmedo, contenido total y corregido por peso de ADN y proteínas, en oviductos de pollos recién nacidos tratados con 0.2 µg de 17β-estradiol los días 15 y 17 de incubación.

	TESTIGO	ESTRADIOL
PESO HUMEDO (mg)	5.96 ± 0.10 n = 41	6.26 ± 0.14 n = 46
ADN (µg/oviducto)	39.40 ± 1.75 n = 39	41.26 ± 1.26 n = 46
ADN (µg/mg oviducto)	6.59 ± 0.26 n = 39	6.70 ± 0.24 n = 46
PROTEINAS (µg/oviducto)	821.60 ± 18.34 n = 41	787.35 ± 21.28 n = 46
PROTEINAS (µg/mg oviducto)	139.13 ± 3.75 n = 41	* 127.74 ± 4.00 n = 46
ADN/PROTEINA	0.049 ± 0.002 n = 39	0.054 ± 0.002 n = 46

Valores expresados como la media ± error standard.

n = número de organismos

\* = P < 0.05

## D I S C U S I O N

La utilización de embriones de aves constituye un buen modelo que permite estudiar el efecto de las hormonas sexuales evitando la intervención de otras variables, como efecto materno y placenta, como en el caso de mamíferos. Los resultados observados se pueden interpretar como producto del estradiol aplicado exógenamente.

Es un hecho confirmado que el oviducto es un efector del  $17\beta$ -estradiol, el cual controla la proliferación celular de este órgano e interviene, al parecer conjuntamente con otras hormonas, en la regulación de sus funciones.

Los diseños elaborados para valorar los efectos de la hormona en el oviducto de aves inmaduras y en estado embrionario han sido diversos, tanto "in vivo" como "in vitro", la mayoría están enfocados a animales inmaduros. En el caso de embriones son pocos los reportes que, en general, son "in vitro" y/o con dosis francamente altas. Es por eso que nuestro interés fue investigar los efectos del  $17\beta$ -estradiol sobre el oviducto de pollos al ser tratados "in vivo" durante la etapa embrionaria.

Para el análisis histológico se administraron diferentes cantidades de la hormona con el fin de obtener aquella que provocara una respuesta del tejido en límites fisiológicos, ya que las dosis farmacológicas han sido utilizadas preferentemente por diversos autores, tanto en embriones como en animales inmaduros.

Encontramos que la administración de  $0.2 \mu\text{g}$  provoca efectos más marcados, por lo que se utilizó para los estudios bioquímicos. Esta dosis equivale a  $1.42 \times 10^{-8}\text{M}$  que se sabe cae dentro de los niveles fisiológicos del embrión:  $10^{-9}$  a  $2 \times 10^{-8}\text{M}$  (Norton y Wira, 1977).

En nuestros resultados se observa una tendencia al aumento en el peso húmedo que puede ser explicada por la mayor captación de agua por el órgano provocada por el estradiol, hecho anteriormente reportado por Oka y Schimke (1969a) y visualizado morfométricamente en el presente estudio con el aumento del área de la luz en todos los casos.

El tratamiento con 0.2 µg de 17β-estradiol, en nuestro caso, no provoca modificaciones en los contenidos de ADN total y corregido por peso, por tanto, no causa crecimiento hiperplásico global del oviducto, a diferencia de lo reportado para otros diseños experimentales (Kohler et al, 1969; Yu et al, 1971; Palmiter, 1972).

Al tomar en cuenta los resultados de Seaver et al (1984 a y b) en los que proponen una inducción estrogénica en la síntesis de factores de crecimiento, probablemente por el hígado, que se cree tiene un papel intermediario en la respuesta proliferativa del oviducto (Laugier et al, 1983), podría pensarse que esta vía no se encuentra funcionalmente activa en esta etapa del desarrollo o bien, necesita de dosis estrogénicas mucho mayores para poder activarse y observar así un crecimiento hiperplásico como el reportado por Teng (1980) en embriones.

Contrariamente a lo esperado, el contenido total proteico tiende a disminuir con el tratamiento; la disminución en su concentración por miligramo de tejido es significativa. Este fenómeno es difícil de explicar, pero podrían tomarse en cuenta:

Por una parte se sabe que tanto en el desarrollo natural del magnum (Pageaux et al, 1986) como en el inducido por estrógenos en estimulación primaria (Oka y Schimke, 1969a; Kohler et al, 1969; Palmiter, 1972) el primer fenómeno que ocurre es la proliferación celular y posteriormente la síntesis incrementada de proteínas, especialmente de aquellas que forman parte

de la clara del huevo. En el presente trabajo se observó que la hormona no induce multiplicación celular significativa del oviducto ni diferenciación glandular por tanto, tampoco síntesis incrementada de proteínas que, además, parece requerir efecto directo del estradiol con las células blanco y niveles más altos de la hormona que para la proliferación (Laugier et al, 1983).

Por otra parte, el contenido total proteico muestra una tendencia a la disminución mientras que el peso húmedo tiende a aumentar, básicamente por mayor retención de agua, sin que ninguno de los dos fenómenos muestre diferencia significativa con el grupo control; sin embargo, la concentración proteica en el oviducto es un resultado indirecto, ya que se obtiene por medio de un cociente (proteínas/mg de tejido) en el que se divide una cantidad de proteínas que tiende a disminuir por un peso que tiende a aumentar, lo que podría explicar la disminución significativa con respecto al lote testigo. Al momento no es posible explicar lo que ocurre específicamente en el magnum, ya que en el análisis bioquímico se utilizó el oviducto en su totalidad.

Debe hacerse hincapié en la etapa del desarrollo estudiada así como en la dosis hormonal probada y su administración. En la totalidad de los reportes revisados, sea en animales inmaduros o en embriones, las dosis estrogénicas utilizadas son hiperfisiológicas, de 2 a 4 órdenes de magnitud mayores a la usada en nuestro estudio, además de ser aplicadas de manera crónica. Esta variación en el tratamiento puede ser la explicación de la diferencia observada en nuestros resultados.

Además, se sabe que la síntesis de estradiol por el ovario se incrementa en los días 13.5 a 18.5 de desarrollo embrionario (Woods y Erton, 1978; Gill et al, 1983), de igual forma su concentración plasmática alcanza valores máximos (González et al,

1987; Tanabe et al., 1986) y coincide con la fase de crecimiento rápido del oviducto, en la que el número de receptores citoplásmicos y nucleares se mantiene en un valor máximo constante (Teng y Teng, 1975b). Es esta etapa justamente la que abarcó nuestro diseño experimental. El oviducto está en plena fase proliferativa y de síntesis proteica, y la cantidad de hormona administrada no parece ser capaz de estimular la síntesis de proteínas receptoras ni del albumen, o bien de alterar la actividad celular por diferentes mecanismos aún no bien explicados.

Por otra parte, si bien no se advierte bioquímicamente una respuesta proliferativa global del oviducto, si hay respuesta zonal por parte del magnum al ser tratado con 0.2  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol.

Lo anterior fue observado histológicamente en las porciones caudal y cefálica de esta región del oviducto. La primera (Nivel IV) responde morfométricamente al estímulo estrogénico en los cinco parámetros medidos (áreas total, de la pared, no epitelial, epitelial y de la luz). Cabe recalcar que es el único nivel en el que se registra incremento del área epitelial por efecto de la hormona. Histológicamente se observa un aumento en la densidad celular epitelial y estromática, aunque de manera menos acentuada que en el nivel 1. En el estroma los núcleos aparecen de mayor tamaño con respecto al grupo control. Al igual que en el testigo, hay homogeneidad de las capas no epiteliales y presencia de células epiteliales ciliadas, por lo que la hormona no parece conducir a una diferenciación celular.

En la porción cefálica (Nivel I) los aumentos morfométricos significativos en las áreas total y de la pared, específicamente en su porción no epitelial, más el aumento en la densidad celular estromática y epitelial son claras premisas de

la inducción de crecimiento hiperplásico.

En el estroma se observa mayor arreglo celular con células de menor tamaño que en el control y hay evidencia de su separación con el epitelio, en el que se observa una tendencia a la pseudoestratificación y a la formación de células columnares ciliadas, lo que indica el inicio de una diferenciación celular.

El fenómeno de ciliogénesis inducido por estradiol se ve apoyado por los hallazgos de Sandoz et al (1976) en codornices inmaduras ovariectomizadas y por los estudios de Pageaux et al (1986), en los que se indica ciliogénesis epitelial posterior a la proliferación celular durante el desarrollo natural del magnum, también en codornices inmaduras.

El aumento de la luz a todo lo largo del magnum puede explicarse por la mayor captación de agua por parte del tejido, fenómeno ya reportado tanto en animales inmaduros (Kohler et al, 1969) como en embriones (Kiell et al, 1982); sin embargo, el estroma no se muestra edematoso como en los casos citados, probablemente porque el tratamiento hormonal se realizó con dosis marcadamente menores y su efecto se registró varios días después de su administración.

Con este estudio no es posible determinar si las mitosis se inician en la porción epitelial o en la estromática. Se ha indicado que en animales inmaduros, tanto en el desarrollo natural del magnum (Pageaux et al, 1986) como en el inducido estrogénicamente (Kohler et al, 1969), la proliferación celular ocurre primeramente en el epitelio.

En embriones se reporta también que las células epiteliales adquieren competencia estrogénica más temprano que las estromáticas (Teng, 1980). Contrariamente, Gasc y Stumpf (1981)

indican que en estado embrionario el mesénquima parece ser el blanco principal del estradiol, es el primer sitio de recepción de la información llevada por éste y de allí pasar al epitelio.

Al momento, el efecto del  $17\beta$ -estradiol puede definirse por una inducción de la multiplicación celular e inicio de citodiferenciación en regiones definidas del magnum. Este hecho podría relacionarse con la presencia de receptores activos también por niveles. Así, es posible sospechar de un mayor número de receptores activos en el nivel I, que es donde se observan mayores respuestas histológicas tanto en epitelio como en estroma.

En el endometrio y miometrio de humanos la concentración de receptores de alta afinidad a estradiol disminuye a través de la longitud del útero, desde el fondo hasta el cérvix, donde ya no se detectan (Robertson et al, 1971). Si bien no es posible hacer extrapolaciones, los resultados del presente estudio podrían indicar un fenómeno parecido en el magnum de aves. Lo más indicado es la realización de autorradiografías a lo largo de todo el magnum y en diferentes etapas de su desarrollo.

Lo que consideramos más relevante de este estudio es la observación de cambios histológicos a lo largo del magnum en el grupo control, los que indican que durante el período embrionario la citodiferenciación no es simultánea en esta región del oviducto. Este es un fenómeno hasta ahora no reportado.

La serosa y las capas musculares y conectivas de la pared típicas del oviducto adulto (Bradley, 1960; Aitken, 1971; Hodges, 1974; Solomon, 1985) están aún indiferenciadas, pero presentan límites visibles; en consecuencia, es en la etapa post natal cuando se concluye el desarrollo y diferenciación de la

pared del magnum. Cabe señalar que los estratos identificados en la porción no epitelial están mejor definidos en los niveles cefálicos que en los caudales, donde se tiende a una homogeneidad tisular. Este es un indicio de una diferenciación zonal del tejido.

En recién nacidos, las dimensiones y el aumento caudal en la altura del epitelio, concuerdan con lo reportado en adultos (Richardson, 1935; Solomon, 1985); aunque no se observa la citodiferenciación típica del estado adulto, definida por un epitelio pseudoestratificado con alternancia de células columnares ciliadas y caliciformes (Aitken, 1971; Hodges, 1974).

En las porciones cefálicas del magnum, donde la forma de los cortes es elíptica, el inicio de la pseudoestratificación y alargamiento nuclear se observa en los extremos laterales. Al avanzar caudalmente, cuando el tubo se estrecha y su forma tiende a ser circular, la pseudoestratificación y el alargamiento nuclear se hacen uniformes en el epitelio. Este hallazgo, más la variación en el plegamiento epitelial a lo largo del magnum, son también indicadores de una diferenciación y desarrollo por niveles.

Por otra parte, en el nivel IV se observan células ciliadas que, por sus características de altura y arreglo, quizás correspondan a la futura "región mucosa" del adulto descrita por Richardson (1935).

Todos estos datos corroboran que la diferenciación de la mucosa se inicia también en etapas postnatales, la cual concluye hacia el cuarto mes, cuando el oviducto se convierte en un órgano funcionalmente activo (Wrenn, 1971; Teng, 1980; Kiell et al, 1982).

Al momento, se propone la existencia de una diferenciación

por niveles en el magnum de pollos recién nacidos, cuya importancia en el marco de la estimulación estrogénica reside en su respuesta diferencial al estradiol.

### C O N C L U S I O N E S

- 1- Las dosis fisiológicas de  $17\beta$ -estradiol no provocan incremento en los contenidos de ADN y proteínas del oviducto.
- 2- Existe una diferenciación por niveles en el magnum del oviducto de pollos recién nacidos.
- 3- Las dimensiones y el aumento caudal en la altura del epitelio concuerdan con lo reportado en animales adultos.
- 4- Hay una respuesta diferencial a la hormona en los distintos niveles y tejidos de la pared del magnum.
- 5- La respuesta al estímulo estrogénico, en esta etapa del desarrollo, es evidenciada por un aumento en las áreas total, de la luz y de la pared, ya sea en todos los parámetros o en algunos de ellos según el nivel, el cual puede ser provocado por el aumento en la densidad celular.
- 6- El tratamiento no provoca citodiferenciación epitelial y estromática como la observada en el animal sexualmente maduro.

## B I B L I O G R A F I A

Aitken, R.N.C. The oviduct. Cap. 53. En: Physiology and Biochemistry of the domestic fowl. (Bell, D.J. y B.M. Freeman), Academic Press, London. 3: 1238-1289 (1971).

Bancroft, J.D. An introduction to histochemical technique. London Butterworths. pp 238 (1967).

Bloom, K.S.; Anderson, J.N. Hormonal regulation of the conformation of the ovalbumin gene in chick oviduct chromatin. J. Biol. Chem. 257 (21): 13018-13027' (1982).

Bradley, O.C. The structure of the fowl. 4<sup>a</sup> ed. Oliver y Boyd, Edinburgh. pp 59-71 (1960).

Burden, R.L. y Fayres, J.D. Análisis numérico. Cap. 2-7. Wadsworth Iberoamérica. México, D.F. (1985).

Burton, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315-323 (1956).

Campbell, L.D.; Yu, J.Y.L.; Stothers, S.C.; Marquardt, R.R. Sex hormone control mechanisms. II. Influence of estrogen and progesterone on the activities of key enzymes involved in the carbohydrate metabolism of chicken (Gallus domesticus) oviduct. Can. J. Biochem. 49: 201-206 (1971).

Clark, J.H.; Peck Jr., E.J.; Hardin, J.W.; Erikson, H. The biology and pharmacology of estrogen receptor binding: Relationship to uterine growth. Cap. 1. En: Receptors and hormone action (O'Malley, B.W. y L. Birnbaumer). 2: 1-31 (1978).

Draper, M.H.; Davidson, M.F.; Wyburn, G.M.; Johnston, H.S. The fine structure of the fibrous membrane forming region of the isthmus of the oviduct of Gallus domesticus. Quart. J. Exp. Physiol. 57: 297-310 (1972).

Gasc, J.M. Growth and sexual differentiation in the gonads of chick and duck embryos. J. Embryol. Exp. Morph. 44: 1-13 (1978).

Gasc, J.M. Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. J. Embryol. Exp. Morph. 55: 331-342 (1980).

Gasc, J.M.; Stumpf, W.E. Sexual differentiation of the urogenital tract in the chicken embryo: autoradiographic localization of sex-steroid target cells during development. J. Embryol. Exp. Morph. 63: 207-223 (1981).

Gilbert, A.B. The ovary. Cap. 50. En: Physiology and Biochemistry of the domestic fowl. (Bell, D.J. y B.M. Freeman), Academic Press, London. 3: 1163-1208 (1971a).

Gilbert, A.B. Egg albumen and its formation. Cap. 54. En: Physiology and Biochemistry of the domestic fowl. (Bell, D.J. y B.M. Freeman), Academic Press, London. 3: 1291-1321 (1971b).

Gilbert, A.B. The endocrine ovary in reproduction. Cap. 61. En: Physiology and Biochemistry of the domestic fowl. (Bell, D.J. y B.M. Freeman), Academic Press, London. 3: 1449-1464 (1971c).

Giles, K.W.; Myers, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature (London). 206 (1965): 93 (1965).

Gill, D.V.; Robertson, H.A.; Betz, T.W. In vivo estrogen synthesis by the developing chicken (Gallus gallus) embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 49: 176-186 (1983).

González, C.B.; Charreau, E.H.; Aragonés, A.; Lantos, C.P.; Follet, B.K. The ontogenesis of reproductive hormones in the female embryo of the domestic fowl. Gen. Comp. Endocrinol. 68: 369-374 (1987).

Hamilton, T.H. Studies on the physiology of urogenital differentiation in the chick embryo. I. Hormonal control of sexual differentiation of müllerian ducts. J. Exp. Zool. 146: 265-274 (1961).

Hodges, R.D. The histology of the fowl. Academic Press, London. pp 347-387 (1974).

Hutson, J.; Ikawa, H.; Donahoe, P.K. The ontogeny of müllerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. J. Ped. Surg. 16 (6): 822-827 (1981).

Jensen, E.W.; DeSombre, E.R. Estrogen-receptor interaction. Science. 182: 126-134 (1973).

Jordanov, J.; Angelova, P.; Boyadjieva-Michailova, A.; Bakalska, M. Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 92: 449-464 (1978).

Kiell, C.S.; Cohen, I.T.; Fell, P.E. Development of embryonic chick oviducts in organ culture under the influence of steroid hormones. J. exp. Zool. 220: 387-390 (1982).

Kohler, P.O.; Grimley, P.M.; O'Malley, B.W. Estrogen-induced cytodifferentiation of the ovalbumin-secreting glands of the chick oviduct. *J. Cell Biol.* 40: 8-27 (1969).

Kon, L.; Spelberg, T.C. Nuclear binding of estrogen-receptor complex: receptor-specific nuclear acceptor sites. *Endocrinology*. 111 (6): 1925-1935 (1982).

Laugier, C.; Pageaux, J.F.; Soto, A.M.; Sonnenschein, C. Mechanism of estrogen action: indirect effect of estradiol-17 $\beta$  on proliferation of quail oviduct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 80: 1621-1625 (1983).

Lebeau, M.C.; Massol, N.; Baulieu, E.E. Oestrogen and progesterone receptors in chick oviduct chromatin after administration of oestradiol, progesterone or anti-oestrogen. *Biochem. J.* 204: 653-662 (1982).

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).

Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218 (1961).

Narbaitz, R.; Adler, R. Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16: 41-47 (1966).

Norton, J.M.; Wira, Ch.R. Dose-related effects of the sex hormones and cortisol on the growth of the bursa of Fabricius in chick embryos. *J. Steroid Biochem.* 8: 985-987 (1977).

Notides, A.C. Conformational forms of the estrogen receptor. Cap. 2 In: Receptors and hormone action (O'Malley, B.W. y L. Birnbaumer). 2: 33-61 (1978).

Oades, J.M.; Brown, W.O. A study of the water-soluble oviduct proteins of the laying hen and the female chick treated with gonadal hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* 14: 475-489 (1965).

Oka, T.; Schimke, R.T. Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. I. Antagonistic effect of progesterone on estrogen-induced proliferation and differentiation of tubular gland cells. *J. Cell Biol.* 41: 816-831 (1969a).

Oka, T.; Schimke, R.T. Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. II. Effects of estrogen and progesterone on tubular gland cell function. *J. Cell Biol.* 43: 123-137 (1969b).

O'Malley, B.W.; McGuire, W.L.; Kohler, P.O.; Korenman, S.G. Studies on the mechanisms of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent. Prog. Horm. Res.* 25: 105-160 (1969).

O'Malley, B.W.; Means, A.R. Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science.* 183: 610-620 (1974).

O'Malley, B.W.; Schrader, W.T. The receptors of steroid hormones. *Sci. Am.* 234 (2): 32-43 (1976).

Pageaux, J.F.; Laugier, C.; Pal, D.; D'Almeida, M.A.; Sandoz, D.; Pacheco, H. Magnum morphogenesis during the natural development of the quail oviduct: analysis of egg white proteins and progesterone receptor concentration. *Biol. Reprod.* 35 (3): 657-666 (1986).

Palmiter, R.D.; Christensen, A.K.; Schimke, R.T. Organization of polysome from pre-existing ribosomes in chick oviduct by a secondary administration of either estradiol or progesterone. *J. Biol. Chem.* 245 (4): 833-845 (1970).

Palmiter, R.D. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid and lysozyme induction. *J. Biol. Chem.* 247 (20): 6450-6459 (1972).

Patterson Jr., M.K. Measurement of growth and viability of cells in culture. Cap. 11. En: *Methods in enzymology*. (Jakoby, W.B. y I.H. Pastan), Academic Press, N.Y. 58: 141-152 (1979).

Rahil, K.S.; Narbaitz, R. Differentiation on male chick oviducts under hormonal stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 18: 315-318 (1972).

Richardson, K.C. The secretory phenomena in the oviduct of the fowl, including the process of shell formation examined by the microincineration technique. *Phil. Trans. R. Soc.* B 225: 149-196 (1935).

Rickwood, D. Centrifugation. A practical approach. Information Retrieval Limited. London and Washington, D.C. pp 35-46 (1980).

Robertson, D.M.; Mester, J.; Beilby, J.; Steele, S.J.; Kellie, A.E. The measurement of high-affinity oestradiol receptors in human uterine endometrium and myometrium. *Acta Endocrinol.* 68: 534-542 (1971).

Rosen, J.M.; Liarakos, C.D.; O'Malley, B.W. Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. I. Deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid renaturation studies. *Biochemistry.* 12 (15): 2803-2809 (1973).

Ruh, T.S.; Spelberg, T.C. Acceptor sites for the oestrogen receptor in hen oviduct chromatin. *Biochem. J.* 210: 905-912 (1983).

Sandoz, D.; Boisvieux-Ulrich, E.; Brard, E. Etude des ultrastructures des magnum des oiseaux. I. Evolution au cours du cycle de ponte chez la poule Gallus domesticus. J. Microscopie. 11: 371-400 (1971).

Sandoz, D.; Boisvieux-Ulrich, E.; Laugier, C.; Brard, E. Ciliogénèse dans les cellules à mucus l'oviducte de caille. II. Contrôles hormonal. J. Cell Biol. 71: 460-471 (1976).

Scheffé, H. A method for judging all contrast in the analysis of variance. Biometrika. 40: 87-104 (1953).

Schneider, B.F.; Norton, S. Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. Teratology. 19 (3): 273-278 (1979).

Seaver, S.S.; Baird, S.M.; Skafar, D.F. The chick oviduct in tissue culture. II. Estrogen affects ovalbumin synthesis differently than oviduct cell proliferation. Exp. Cell Res. 155: 252-260 (1984a).

Seaver, S.S.; Bosch van der, J.; Sato, G. The chick oviduct in tissue culture. I. Initial characterization of growing primary oviduct tissue cultures. Exp. Cell Res. 155: 241-251 (1984b).

Skafar, D.F.; Seaver, S.S. Desensitization of the chick oviduct to estrogen: mediation at different levels of gene expression. Endocrinology. 116 (5): 1755-1762 (1985).

Solomon, S.E.; Fryer, J.R.; Baird, T. The ultrastructural localization of calcium in the avian shell gland. J. Microsc. 105: 215-222 (1975).

Solomon, S.E. Oviduct. Cap. 20 In: Physiology and Biochemistry of the domestic fowl. (Freeman, B.M.), Academic Press London. 4: 379-449 (1983).

Stormshak, F.; Harris, J.n.; Gorski, J. Nuclear estrogen receptor and DNA synthesis. Cap. 3 In: Receptors and Hormone Action. (O'Malley, B.W. y L. Birnbaumer), Academic Press. 2: 63-81 (1978).

Tanabe, Y.; Saito, N.; Nakamura, T. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (Gallus domesticus). Gen: Comp. Endocrinol. 63: 456-463 (1986).

Tankred, K. Anatomy of the chicken and domestic birds. (Shold B.H. y L. DeVries). The Iowa State University. Press/Ames., Iowa. pp 96-108 (1973).

Teng, C.S. Ontogeny of the receptor and responsiveness to estrogen in the genital tract of the chick embryo. In: Advances in the Biosciences. The development of responsiveness to steroid hormones. (Kaye, A.M. y M. Kaye). Pergamon Press. 25: 77-94 (1980).

Teng, C.S.; Teng, C.T. Isolation and characterization of an oestrogen receptor form chick müllerian duct. Biochem. J. 150: 183-190 (1975a).

Teng, C.S.; Teng, C.T. Ontogeny of cytoplasmic oestrogen receptor in chick müllerian duct. Biochem. J. 150: 191-194 (1975b).

Teng, C.S.; Teng, C.T. Oestrogen-receptor translocation in the developing chick müllerian duct. Biochem. J. 154: 1-9 (1976).

Teng, C.T.; Teng, C.S. The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. Biochem. J. 162: 123-134 (1977).

Teng, C.S.; Teng, C.T. Changes in chemical composition and oestradiol-binding capacity in chromatin durin the differentiation of chick müllerian ducts. *Biochem. J.* 172: 361-370 (1978).

Teng, C.S.; Teng, C.T. Decreased ovalbumin-gene response to oestrogen in the prenatally diethylstilbestrol-exposed chick oviduct. *Biochem'* 228: 689-695 (1985).

Thomas, P.S.; Shepherd, J.H.; Mulvihill, E.R.; Palmiter, R.D. Isolation of a nuclear ribonucleoprotein fraction from chick oviduct containing ovalbumin messenger RNA sequences. *J. Mol. Biol.* 150 (2): 143-166 (1981).

Tokarz, R.R.; Harrison, R.W.; Seaver, S.S. The mechanism of androgen and estrogen synergism in the chick oviduct. Estrogen-modulated changes in cytoplasmic androgen receptor concentrations. *J. Biol. Chem.* 254 (18): 9178-9184 (1979).

Woods, J.E.; Weeks, R.L. Ontogenesis of the pituitary gonadal axis in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 242-254 (1969).

Woods, J.E.; Erton, L.H. The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 360-370 (1978).

Wreen, J.T. An analysis of tubular gland morphogenesis in chick oviduct. *Develop. Biol.* 26: 400-415 (1971).

Wyburn, G.M.; Johnston, H.S.; Draper, M.H.; Davidson, M.F. The fine structure of the infundibulum and magnum of the oviduct of the Gallus domesticus. *Quart. J. exp. Physiol.* 55: 213-232 (1970).

Yu, J.Y.L.; Campbell, L.D.; Marquardt, R.R. Sex hormone control mechanisms. I. Effect of estrogen and progesterone on major cellular components in chicken (Gallus domesticus) oviducts. Can. J. Biochem. 49: 348-356 (1971).

Yu, J.Y.L.; Marquardt, R.R. Development, cellular growth, and function of the avian oviduct. I. Studies on the magnum portion of the domestic fowl (Gallus domesticus) oviduct during a reproductive cycle. Biol. Reprod. 8: 283-298 (1973).

Yu, J.Y.L.; Marquardt, R.R. Hyperplasia and hypertrophy of the chicken (Gallus domesticus) oviduct during a reproductive cycle. Poult. Sci. 53: 1096-1105 (1974).

Zar, H.J. Bioestatistical Analysis. 2<sup>a</sup> ed. Prentice Hall, N.J. (1984).