

151
Reg.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ONTOGENIA DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm A
AROMATASA P-450 EN LAS GÓNADAS
EMBRIONARIAS DEL POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARÍA GUADALUPE SÁNCHEZ BRINGAS



MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 1995

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN DE BIBLIOTECA

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Ontogenia de la Expresión del ARNm a Aromatasa P-450 en las Gónadas
Embrionarias del Pollo"

realizado por María Guadalupe Sánchez Bringas

con número de cuenta 7924459-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Director de Tesis | |
| Propietario | Dra. María Irma Villalpando Fierro |
| Propietario | Dr. Enrique Pedernera Astegiano |
| Propietario | M. en C. Carmen Méndez Herrera |
| Suplente | Dra. Maricela Villagrán Santacruz |
| Suplente | Biol. Miguel Ángel Palomino Caribay |

Quinto
Alfonso
de la Cruz
Maricela Villagrán

Consejo Departamental de Biología
[Firma]
COORDINACIÓN GENERAL
DE BILOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer un especial agradecimiento a la Dra. Irma Villalpando, directora de esta tesis, por haberme brindado su apoyo incondicional en lo académico, lo cual se vió reflejado en el tiempo dedicado a mi formación y en el deseo de transmitir sus conocimientos y experiencias como investigadora; y en lo personal, por su amistad y confianza.

Agradezco al Dr. Enrique Pedernera, investigador del Depto. de Embriología de la Fac. de Medicina quien desde el inicio de este trabajo me ha apoyado con sus valiosos comentarios y con la infraestructura de su laboratorio.

A la Biol. Carmen Méndez investigadora del Depto. de Embriología de la Fac. de Medicina, por su invaluable ayuda en las técnicas empleadas en este trabajo, sus comentarios y amistad.

Al jurado que participó con gran interés en la evaluación de esta investigación.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández, Jefe de Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el apoyo y facilidades proporcionadas en el análisis de resultados.

A la Dra. Imelda López Villaseñor quien con su amplia experiencia en la técnica de PCR facilitó el análisis de resultados.

Al M. en C. Santiago Martínez Calvillo por su amable ayuda en el análisis e interpretación de los resultados.

A los compañeros de laboratorio Gloria, Floria, Horacio, David, Omar y Daniel por su incondicional apoyo en todos los sentidos.

Al fotógrafo Jorge Hernández Juárez por las reproducciones fotográficas.

Al dibujante Rafael Maturano Ávila por su apoyo con los esquemas.

Al Sr. José Guadalupe Baltazar por su excelente colaboración en la histología.

Al Programa de Becas para realizar Tesis de Licenciatura de la UNAM por la beca otorgada para realizar esta tesis.

A la Facultad de Ciencias a mis profesores, en particular a Miguel Angel Palomino quien es responsable en gran medida de mi interés por esta área de investigación; a mis compañeros y amigos, Mercedes, Pepita, Enrique y un especial agradecimiento a Horacio por su amor, su apoyo y su entrega en estos últimos siete años, ¡Gracias!.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POR HABER GENERADO TANTAS ALTERNATIVAS PARA
MI CRECIMIENTO COMO INDIVIDUO Y COMO
PROFESIONISTA,

A MIS PADRES ALICIA Y RICARDO POR SU AMOR
APOYO Y CONFIANZA,

A MIS HERMANOS Y
AMIGOS, POR TODO Y
MÁS.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Embriología Molecular del Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Irma Villalpando Fierro.

ÍNDICE

| | |
|---|-------|
| I. RESUMEN..... | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2.0 Dimorfismo cromosómico en la clase aves..... | 2 |
| 2.1 El factor determinante del testículo en aves, similitudes y diferencias con los mamíferos..... | 2 - 4 |
| 2.2 Diferenciación gonadal en aves..... | 4 |
| a) Formación de la cresta urogenital y colonización por las células germinales primordiales..... | 4 - 5 |
| b) Gónada indiferenciada..... | 5 - 6 |
| c) Diferenciación sexual..... | 6 - 7 |
| 2.3 Modelos de diferenciación gonadal..... | 7 |
| a) Antagonismo cortico-medular..... | 7 - 8 |
| b) Dimorfismo gonadal en función de la velocidad de mitosis..... | 8 |
| 2.4 Papel del los esteroides en la diferenciación gonadal de los vertebrados..... | 8 - 9 |
| a) Transplantes..... | 9 |
| i) Membrana corioalantoidea..... | 9 |
| ii) Cavidad celómica..... | 10 |
| b) Parabiósis..... | 10-11 |
| c) Administración exógena de esteroides..... | 11-12 |

| | |
|---|-------|
| d) Los esteroides como moduladores del sexo gonadal en las aves..... | 12 |
| 2.5 Hormonas esteroides gonadales..... | 12-13 |
| a) Estructura química y nomenclatura..... | 13 |
| b) Clasificación química..... | 13-14 |
| c) Clasificación biológica..... | 14-17 |
| d) Aromatasa P-450..... | 17-19 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS..... | 20-21 |
| IV. OBJETIVOS..... | 22 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 23 |
| 5.0 Material biológico..... | 23 |
| 5.1 Técnica de ovoscopia..... | 23 |
| 5.2 Disección y almacenamiento del tejido embrionario..... | 24 |
| 5.3 Determinación del sexo genético..... | 24-25 |
| 5.4 Aislamiento de ARN..... | 25-26 |
| 5.5 R T-Polimerase chain reaction..... | 26-27 |
| a) Obtención del ADNc..... | 28 |
| b) Amplificación del ARNm de la aromatasa P-450..... | 28 |
| c) Electroforesis de los productos amplificados..... | 29 |
| 5.6 Microscopía óptica..... | 29-30 |
| Esquemas..... | 31-33 |

| | |
|---|--------------|
| VI. RESULTADOS..... | 34 |
| 6.0 Identificación del sexo cromosómico..... | 34-35 |
| 6.1 Morfología Gonadal..... | 36 |
| a) Gónada indiferenciada..... | 36 |
| b) Testículo..... | 37 |
| c) Ovario... .. | 38 |
| 6.2 Detección del ARNm a aromatasa P-450..... | 39 |
| a) Gónada indiferenciada..... | 39 |
| b) Ovario..... | 39 |
| c) Testículo..... | 40 |
| Esquemas..... | 40-42 |
| VII. DISCUSIÓN..... | 43-50 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 51 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA..... | 52-58 |
| X. APÉNDICE..... | 59-60 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| AMH | Antimüllerian hormone |
| Ampli Taq ADN Polim | Ampli Taq ADN polimerasa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| d.i. | Días de incubación |
| d(NTP's) | Desoxinucleótidos trifosfatos |
| dATP | Desoxiadenosin trifosfato |
| dCTP | Desoxicitocin trifosfato |
| dGTP | Desoxiguanosin trifosfato |
| dTTP | Desoxitirosin trifosfato |
| EDTA | Etilenediaminetetra-acetic acid |
| HMG-1 | High mobility group protein - 1 |
| HMG-2 | High mobility group protein - 2 |
| H ₂ O-DEPC | Agua tratada con DEPC |
| Inh. RNAsa | Inhibidor de RNAsa |
| MgCl ₂ | Cloruro de magnesio |
| PCR | Polimerase chain reaction |

| | |
|------|---|
| R-T | Reverse Transcriptase |
| SRY | Sex-determining region in Y chromosome (en humanos) |
| Sry | Sex-determining region in Y chromosome (en vertebrados no humanos) |
| TBE | Tris-ácido bórico-EDTA |
| U.V. | Ultravioleta |

UNIDADES

| | |
|--------|-------------------------|
| ° C | Grados centígrados |
| Kb | Kilobases |
| Kd | Kilodaltons |
| M | Molar |
| ml | Mililitros |
| pH | Potencial de hidrógenos |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| u.d. | Unidades de densidad |
| μl | Microlitros |
| μm | Micrometros |
| 1X | Una vez concentrado |
| 5X | Cinco veces concentrado |

I. RESUMEN

La diferenciación sexual ocurre en la etapa embrionaria, sin embargo, hasta el presente se desconocen el o los mecanismo(s) a través de los cuales se lleva a cabo este proceso. Se ha planteado que las hormonas esteroides juegan un papel fundamental en la diferenciación gonadal aunque aún queda por determinar, si éstas son las responsables directas de este proceso fundamental, o si solo son una consecuencia del mismo.

En la presente investigación se estudio la expresión del ARNm para la aromatasa P-450 en los ovarios de pollo de 6 d.i. (etapa de gónada indiferenciada), a los 14 d.i. (establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada) y en las etapas de diferenciación gonadal tardía. Asimismo, se relacionó la expresión del ARNm con el desarrollo de la gónada. Se determinó que la gónada de 5 d.i. está constituida de dos a tres capas de células. También se observó que los ovarios de 17 d.i. están formados por una corteza y una médula bien diferenciadas y los testículos de la misma edad están compuestos por cordones seminíferos bien organizados. En las etapas evaluadas se determinó que el ARNm de la aromatasa P-450 está ausente en las gónadas de embriones masculinos, en tanto que en las hembras fue detectado a partir de los 14 d.i. El análisis del mensajero indica que su expresión responde a un patrón dinámico durante el desarrollo embrionario y que las células esteroideogénicas tanto del ovario izquierdo como del derecho mantienen su capacidad de procesar el ARNm de la aromatasa P-450. Con base en los resultados obtenidos se propone que esta enzima podría jugar un papel importante en la diferenciación del ovario del embrión de pollo.

II. INTRODUCCIÓN

2. Dimorfismo cromosómico en la clase aves

La determinación sexual de la gónada de los vertebrados es una cascada de eventos concatenados en el tiempo y el espacio que da como resultado el establecimiento del fenotipo de los organismos. Este proceso inicia con la fecundación del óvulo por el espermatozoide, involucrando el intercambio del material genético.

En los mamíferos, el sexo homogamético (XX) se asocia a la diferenciación ovárica, y da lugar al fenotipo femenino; el sexo heterogamético (XY) se relaciona con la diferenciación testicular y por consiguiente, a la formación del fenotipo masculino.

En las aves se encuentra el caso opuesto, las hembras desarrollan ovarios, sin embargo, sus cromosomas sexuales son heterogaméticos (ZW), mientras que los machos desarrollan testículos y son homogaméticos (ZZ) (Mittwoch, 1989).

2.1 El factor determinante del testículo en aves, similitudes y diferencias con mamíferos

Se ha demostrado ampliamente que la diferenciación testicular de los

mamíferos es determinada por la presencia del cromosoma "Y", situación que llevó a considerar la existencia de un factor que estuviera dirigiendo la diferenciación de este órgano, al cual se le llamó TDF, siglas que en español significan Factor Determinante del Testículo (Ford et al., 1959; Jacobs y Strong, 1959). En los últimos diez años se han realizado numerosas investigaciones que han propuesto diferentes genes como posibles candidatos para el TDF (Goldberg, 1988; Chandra, 1985 y Page, 1987). En la actualidad se sabe que este factor se localiza en el brazo corto del cromosoma "Y" en una región de 34 kb y que corresponde a un gen con alta homología a los genes que codifican para el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG1 y HMG2), las cuales a su vez, son factores de transcripción en mamíferos y en algunas levaduras. El gen se denominó SRY en humanos y Sry en el resto de los vertebrados (Sinclair et al., 1990 y Tiersch et al., 1991).

Por otro lado, se ha demostrado que el Sry se expresa en las células somáticas y en la cresta urogenital de embriones masculinos de ratón, antes de que se lleve a cabo la diferenciación gonadal (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1990 y Berta et al., 1990), lo que ha hecho posible considerarlo como el candidato idóneo para ser el TDF en mamíferos.

En los vertebrados el Sry presenta una alta conservación filogenética, sin embargo, en las aves, este gen se expresa en machos y hembras, situación que impide elucidar su función en este grupo, e inclusive permite cuestionar el

hecho de que se encuentre relacionado en la diferenciación gonadal de las aves (Tiersch et al., 1991).

2.2 Diferenciación gonadal en aves

Este proceso involucra una serie de eventos morfogenéticos en los cuales participan las células germinales primordiales (CGP's), las células somáticas (precursoras de células de la granulosa y células de la teca en el ovario) y vasos sanguíneos.

a) Formación de la cresta urogenital y colonización por las células germinales primordiales

A los 2.5 d.i. el epitelio dorsal, formado de dos a tres capas de células, da lugar a la cresta urogenital. Esta región es colonizada posteriormente por las CGP's, las cuales se ubican inicialmente en el endodermo del saco vitelino.

Para llegar a la cresta urogenital, realizan dos tipos de movimientos: en las primeras 23 a 29 horas de incubación (Hamburger y Hamilton, 1951) se separan del endodermo y son acarreadas a través de los vasos sanguíneos, (Fujimoto et al., 1976). Se ha planteado que las CGP's responden a algún factor quimiotáctico emitido por la cresta urogenital, que podría estar atrayéndolas (Kuwana et al., 1986). En este trayecto se dice que realizan movimientos pasivos. Más tarde, entre los 2 y 3 d.i., las CGP's salen de

los vasos sanguíneos en el mesodermo esplácnico posterior de la arteria onfalomesentérica del embrión (Ando y Fujimoto, 1983). Hacia los 3 y 4.5 d.i., migran rumbo a la cresta urogenital llevando a cabo movimientos ameboides; a esta forma de desplazamiento se le da el nombre de movimiento activo (Kuwana y Fujimoto, 1984). Aunque todavía no se han elucidado los mecanismos que dirigen el trayecto de las CGP's hacia la cresta urogenital, se ha observado que la fibronectina, glicoproteína de 220 kd la cual forma parte de la matriz extracelular, está presente en las rutas migratorias de las CGP's. Se ha propuesto que esta proteína podría funcionar como sustrato en la migración de las CGP's hacia la cresta urogenital (Fujimoto et al., 1985; Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986).

b) Gónada indiferenciada

Una vez que las CGP's han llegado a la cresta urogenital se establecen en grupos distribuidos de manera irregular y son rodeadas por células mesenquimatosas. Posteriormente hay una invasión de vasos sanguíneos que, junto con las células del mesenquima aíslan a la gónada del tejido mesonéfrico. A continuación se forma una lámina basal que rodea al epitelio genital (Merchant-Larios, 1984b). En el cuarto día de incubación, la cresta urogenital está completamente diferenciada de la cavidad celómica. La ausencia de lámina

basal en la región de proliferación permite el contacto directo entre las células del mesénquima y el epitelio celómico (Merchant-Larios, 1978).

c) Diferenciación sexual

La diferenciación gonadal de los machos genéticos se caracteriza por la separación que ocurre entre el tejido medular y el epitelio celómico: las CGP's migran hacia la zona medular. El mesénquima y los vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica invaden la gónada, separan el área medular del epitelio celómico y se establece la túnica albúginea. Continúa la invasión del mesénquima entre los cordones sexuales y la lámina basal se deposita tanto en la superficie del tejido medular como en el epitelio celómico (Merchant-Larios, 1984a).

Una de las características particulares de la clase aves presente en la mayoría de las especies, es la asimetría ovárica. En las hembras normales, el epitelio de la gónada derecha pierde su arreglo y se convierte en una capa de células planas que se separan de los cordones epiteliales internos. El ducto mülleriano derecho también involuciona hasta quedar en un estado rudimentario (Merchant-Larios, 1984b).

A los siete días de incubación comienza a observarse la asimetría ovárica. En la gónada izquierda se lleva a cabo la proliferación del mesénquima; las CGP's realizan múltiples divisiones mitóticas que generan la formación de ovogonias,

las cuales se organizan en grupos. La zona cortical queda separada de la médula por el establecimiento de la lámina basal. La corteza de la gónada izquierda continúa su crecimiento y las células somáticas rodean los conglomerados de ovogonias y dan lugar a los cordones sexuales secundarios o corticales.

Durante las divisiones mitóticas se observa que las citocinesis son incompletas, lo que da lugar a la formación de puentes celulares que permiten la comunicación citoplasmática y dan una conformación sincinal a los grupos de ovogonias (Hoffman, 1991).

2.3 Modelos de diferenciación gonadal

El estudio de los mecanismos por los cuales se diferencia el sexo en los vertebrados se ha abordado desde diferentes perspectivas.

a) Antagonismo cortico-medular

Uno de los primeros modelos propuestos para explicar la diferenciación gonadal fue planteado por Witschi (1929-1934), quien trabajó con anfibios. En su hipótesis propone que la gónada indiferenciada se encuentra formada por dos áreas topográficas: la corteza y la médula. Ambas zonas secretan sustancias antagónicas, que inducirían la diferenciación gonadal. Así, la corteza produciría la cortexina, y la médula la medularina. Este modelo postula que ambas sustancias no son hormonas sexuales ya que el antagonismo entre los

dos componentes desaparece conforme avanza el desarrollo gonadal, antes de que las hormonas esteroides comiencen a producirse en grandes cantidades (Witschi, 1937).

b) Dimorfismo gonadal en función de la velocidad de mitosis

En 1971 Mittwoch propuso que el destino sexual de la gónada indiferenciada y bipotencial, dependía de la velocidad de crecimiento de ésta. Observó que si el cromosoma "Y" y el "W" se encontraban presentes en mamíferos y aves respectivamente, la velocidad de crecimiento aumentaba dando lugar a la diferenciación de testículos en mamíferos y ovarios en aves. Sin embargo en la actualidad no se ha encontrado un modelo que explique completamente el fenómeno de la diferenciación sexual gonadal.

2.4 Papel de los esteroides en la diferenciación gonadal de los vertebrados

Los trabajos de Lillie (1916,1917) son los primeros en atribuir a los esteroides secretados por las gónadas el destino sexual de los organismos. Sus observaciones se llevaron a cabo en fetos de diferente sexo, de bovinos y ovinos, en los cuales se presentaba un fenómeno conocido como "Freemartinismo". Este se define como una anastomosis a nivel del córion, el

cual permite el paso de hormonas esteroides masculinas del feto macho hacia la hembra, causando la masculinización de ésta.

Con el estudio del "Freemartinismo" (Lillie, 1916,1917) se establece la teoría esteroidogénica, la cual propone a las hormonas esteroides gonadales como los moduladores principales durante la diferenciación sexual de los vertebrados.

Las diferentes técnicas experimentales sugieren que los esteroides sexuales intervienen en la diferenciación gonadal, sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado esclarecer en que momento las hormonas actúan en la diferenciación sexual de los vertebrados.

a) Transplantes

i) Membrana corioalantoidea

Para entender y explicar el "Freemartinismo", Minoura (1921) realizó implantes de tejido gonadal de pollo adulto en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. Este autor observó la vascularización del implante y algunas modificaciones en las estructuras sexuales internas del hospedero. Sin embargo, sus trabajos fueron cuestionados ya que carecían de un control riguroso de factores como temperatura y humedad, que podrían estar influyendo en el desarrollo de los embriones.

ii) Cavity celómica

Bradley (1941) implantó el primordio gonadal del embrión de pollo dentro de la cavidad celómica del hospedero de menor edad, de la misma especie y de diferente sexo. Aunque observó modificaciones en el aparato reproductor del hospedero sus resultados fueron inconsistentes debido a que no encontró una relación cuantificable entre el grado de modificación de estructuras y la ubicación del implante.

Posteriormente Wolff (1946) colocó gónadas de 6 a 11 d.i. dentro de la cavidad celómica de embriones de aproximadamente 2 d.i. Bajo estas condiciones observó cambios drásticos en la diferenciación gonadal del hospedero: los ovarios implantados dentro de la cavidad celómica de embriones machos inducían la diferenciación de la corteza en el testículo izquierdo. El testículo derecho, que en general se encontraba más lejos del implante, aunque con menos modificaciones, quedaba inhibido en su crecimiento. Al implantar testículos, las principales modificaciones ocurrían en los ductos müllerianos, cuyo crecimiento era fuertemente inhibido, lo que indicaba que el implante secretaba alguna hormona.

b) Parabiósis

Con la parabiósis, técnica que en la etapa de neurula la fusión de dos larvas de anfibio genera una anastomosis circulatoria, se logró una mayor similitud con

el "Freemartinismo". Burns (1925) observó el efecto de las hormonas sexuales en el desarrollo de los embriones parabióticos. Los resultados obtenidos variaban de acuerdo a las especies que se trabajaban y a las condiciones en que se realizaran los experimentos.

c) Administración exógena de esteroides

Esta técnica fue utilizada en diferentes especies de anfibios, mediante la inyección hormonal en la cavidad corporal de las larvas o al sumergirlas en una solución hormonal acuosa. Los resultados logrados variaban de acuerdo con la especie del animal, con el tipo de esteroide y la dosis aplicada. Así, por ejemplo, al administrar la testosterona, se obtuvo la total reversión sexual sobre las hembras de las especies *Rana temporaria*, (Gallien, 1944) y *Rana sylvatica* (Mintz, 1948). El efecto del estradiol fue radical sobre la especie *Rana temporaria* al ser aplicado en dosis altas (Gallien, 1941), mientras que en la *Rana esculenta* se requería de dosis bajas para lograr el efecto feminizante (Padoa, 1942).

Uno de los trabajos más relevantes con mamíferos es el que se realizó en marsupiales. Debido a que en este orden la diferenciación gonadal se lleva a cabo después del nacimiento, Burns (1950) aplicó dipropionato de estradiol a embriones machos de la especie *Didelphis virginiana* y observó la diferenciación

gonadal hacia ovotestis u ovarios, dependiendo de la dosis de la hormona administrada.

d) Los esteroides como moduladores del sexo gonadal en aves

Aunados a los trabajos de Minoura (1921), Bradley (1941) y Wolff (1946), se encuentran otros experimentos en los cuales se observó el papel fundamental de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal de las aves.

Wolff y Gingler (1935) administraron 17β -estradiol a embriones de pollo y observaron la feminización de las gónadas y estructuras sexuales accesorias.

Wolff (1951) al castrar embriones de pato, vió que éstos desarrollaban un fenotipo masculino independientemente del sexo genético. Posteriormente, Maraud y Vergnaud (1986) administraron tamoxifén, cuya actividad antiestrogénica revirtió el sexo de embriones que eran genéticamente hembras.

Asímismo, Elbrecht y Smith (1992), aplicaron inhibidores de la aromatasa P-450, enzima que transforma los andrógenos en estrógenos, a embriones de pollo y obtuvieron una población del 100% masculina.

2.5 Hormonas esteroides gonadales

En el curso del tiempo tanto los organismos unicelulares como los pluricelulares han adquirido estructuras y funciones especializadas. La producción de sustancias tales como las hormonas es coordinada por moléculas

que en conjunto actúan como llaves en los múltiples pasos que conducen a la obtención del producto.

Dentro de las funciones que realizan las gónadas de los vertebrados se encuentra la producción de hormonas esteroides.

Se ha sugerido que los esteroides gonadales están involucrados en la diferenciación gonadal. Se sabe que estos mantienen las características sexuales en la etapa postnatal y generan el ambiente fisiológico y conductual adecuado para que en la etapa adulta se lleve a cabo la reproducción.

a) Estructura química y nomenclatura

Las hormonas esteroides son moléculas lipídicas cuya estructura básica consiste de un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclopentanoperhidrofenantreno, debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano). Los primeros tres anillos son denominados A, B y C, y el último D (Gorbman, 1962).

b) Clasificación química

El colesterol es la molécula precursora de todos los esteroides y está constituida por el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, grupos metilos unidos a los carbonos 10 y 13 y una cadena lateral formada de ocho carbonos unida al

carbono 17.

La separación de los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral da lugar a los pregnanos con 21 átomos de carbono, esta serie incluye a las progestinas.

La segmentación de los carbonos 17 y 20 de la cadena lateral origina la serie de androstanos o esteroides C19, en los cuales se ubican los andrógenos.

Finalmente, la salida del grupo metilo unido al carbón 10 forma la serie de estranos o esteroides C18, y da origen a los estrógenos, (Gore-Langton y Armstrong, 1988) Figura 1.

c) Clasificación biológica

De acuerdo a su función biológica, los esteroides gonadales se clasifican en tres grupos: progestinas, andrógenos y estrógenos.

Progestinas

La pregnenolona (3β -hidroxi-5-pregnen-20-ona) es considerada la progestina más importante ya que es un intermediario de la producción de andrógenos y estrógenos durante la biosíntesis. El metabolito producido en mayor cantidad es la progesterona que es la responsable de la preparación morfofuncional del endometrio para la implantación del ovocito fecundado, el mantenimiento de la gestación y el desarrollo alveolar de la glándula mamaria de los mamíferos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

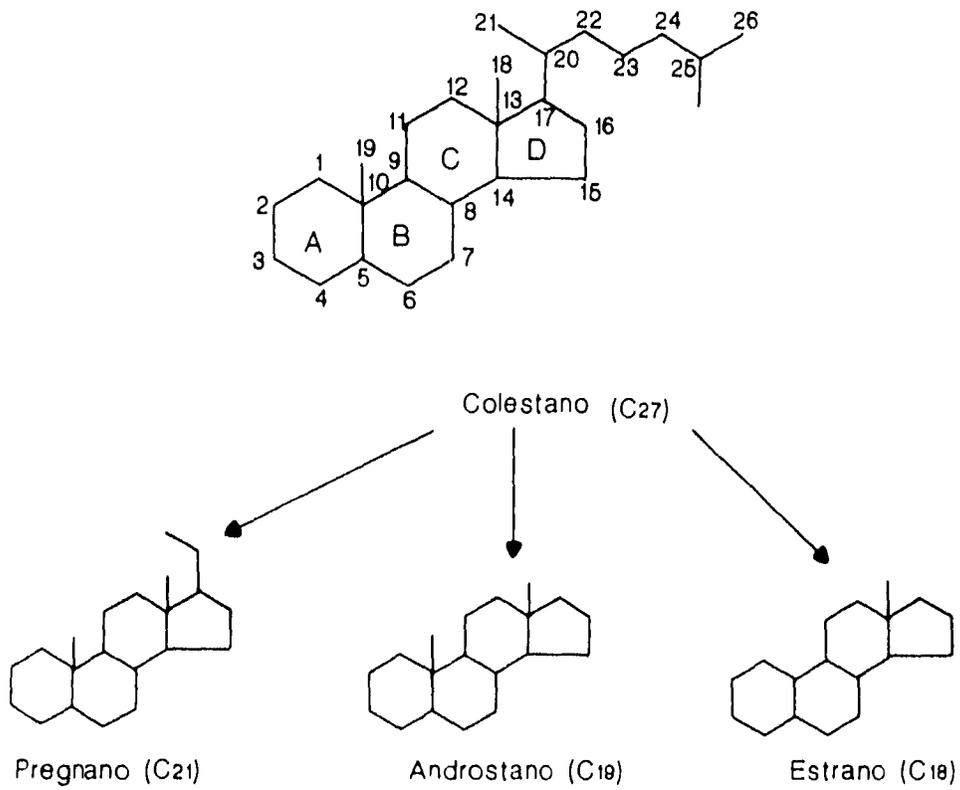


Figura 1. Clasificación química de las hormonas esteroides gonadales.

(Tomada de Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Andrógenos

Este grupo de esteroides es el principal producto del testículo, aunque también se produce en el ovario. Casi todos los andrógenos testiculares son secretados por las células de Leydig, sin embargo, se han encontrado algunas enzimas esteroidogénicas dentro de los túbulos seminíferos (Christensen et al., 1965).

En el ovario los andrógenos son sintetizados principalmente como intermediarios de la síntesis de estrógenos. De ahí que los andrógenos pueden ser divididos en dos grupos, los aromatizables y los no aromatizables. Dentro del primer grupo se encuentran la dehidroepiandrosterona (3β -hidroxi-5-androsten-17-ona), la androstendiona (4-androsten-3,17-diona) y la testosterona (17β -hidroxi-4-androsten-3-ona). El producto de la aromatización de estos esteroides son los estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Los andrógenos ováricos no aromatizables incluyen a los 5α -reducidos como la 5α -dihidrotestosterona, la 5α -androstan-3,17-diona, la androsterona y la epiandrosterona, así como el 5α -androstan- 3α - 17α -diol y su epímero β (Alvarez, 1994).

Estrógenos

La actividad biológica de los estrógenos está relacionada con el establecimiento del aparato reproductor femenino de los vertebrados, así como con el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos secundarios. Junto con

con el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos secundarios. Junto con los péptidos liberados por el hipotálamo y las hormonas hipofisiarias, los estrógenos controlan la conducta reproductiva femenina de las aves (Sutherland et al., 1988). En aves, reptiles y anfibios, los estrógenos estimulan la producción de fosfoproteínas y lipoproteínas por el hígado para la incorporación del vitelo durante el desarrollo del ovocito (Wallace, 1978) y del organismo posteriormente. Apparently los estrógenos son los responsables del paso de la ovoviviparidad hacia la viviparidad (Ryan, 1982).

La estrona y el 17β -estradiol son los estrógenos más importantes. Este último es diez veces más potente que la estrona. Ambos son sintetizados por las células de la granulosa del ovario a partir de la aromatización de andrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Son muchas las funciones que los estrógenos han ido adquiriendo en la historia de los vertebrados, y la llave que da origen a estas moléculas es la aromatasa P-450.

d) Aromatasa P-450

La biosíntesis de estrógenos es el paso final en la vía metabólica de las hormonas esteroides gonadales. La reacción está a cargo del complejo enzimático aromatasa P-450, el cual utiliza a los andrógenos, en particular a la androstenediona y testosterona, como sustrato para la síntesis de estrona y 17β -estradiol, respectivamente (Kellis y Vickery, 1987).

Este complejo está constituido por un citocromo P-450 con función de oxidasa que cataliza una serie de reacciones cuyo destino final es sacar al grupo metilo del carbono 10 en forma de ácido fórmico. La salida de éste genera el rearrreglo del anillo A, el cual adopta una estructura aromatizada. De ahí que el complejo enzimático lleve el nombre de aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Durante la reacción se llevan a cabo tres hidroxilaciones, para lo cual se consumen tres moléculas de oxígeno, y NADPH (Thompson y Siiteri, 1974). El sitio en el cual se llevan a cabo las dos primeras hidroxilaciones es el carbono 19. Con respecto a la tercera se desconoce el lugar exacto, sin embargo, se han sugerido tres posibilidades.

La primera, que además ha sido considerada la más factible, propone que la hidroxilación se lleva a cabo en el carbono 2 β (Fishman y Raju, 1981). La segunda opción plantea que se lleva a cabo una epoxidación de los carbonos 4 y 5. La tercera sugiere la formación de un peróxido a partir de la unión de la enzima al carbono 19 (Gore-Langton y Armstrong, 1988) Figura 2.

En la cepa de pollos White Leghorn, la aromatasa P-450 se localiza en los microsomas del cerebro y gónadas principalmente (Callard et al., 1978). Existe el caso particular de la cepa Sebright la cual presenta un patrón feminizado en características como el plumaje, espolones y cresta, en los machos (Wilson et al., 1987). Se ha visto que en esta cepa, la aromatasa se encuentra activa en órganos como la piel, el pulmón y el riñón (George y Wilson, 1982).

Trabajos recientes han demostrado que el gen que codifica para la aromatasa P-450 en pollos normales, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (Tereba et al., 1991).

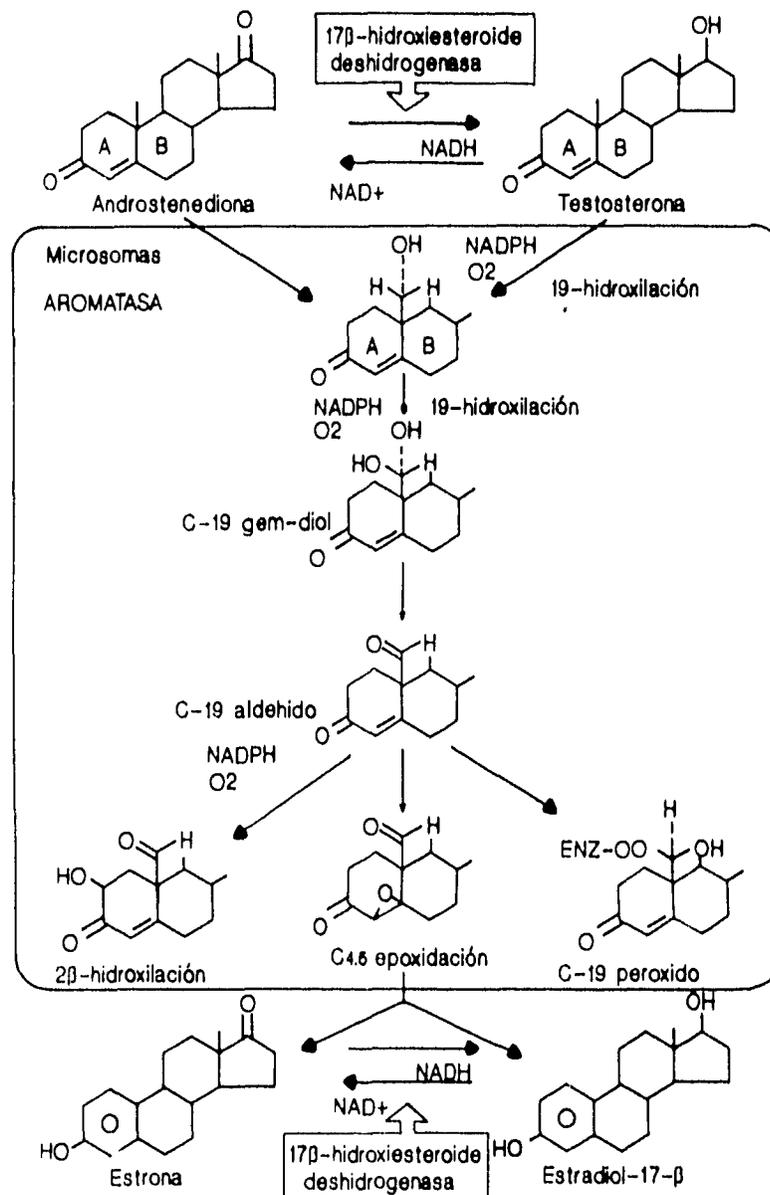


Figura 2. Secuencia de reacciones propuesta para la aromatización de andrógenos (Tomada de Gore-Langton y Armstrong, 1988).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

La diferenciación sexual de los vertebrados es un proceso que involucra una serie de mecanismos los cuales se inician con la determinación genética. Se ha planteado que en los mamíferos, el producto del gen Sry podría actuar como factor de transcripción en la regulación de otros genes en la cascada de eventos que conduce a la diferenciación del testículo. Debido a que en las aves las hembras son heterogaméticas, podría esperarse que el homólogo del Sry en este grupo estuviera presente en el genotipo femenino, y por lo tanto dirigiera la diferenciación sexual del ovario, sin embargo este gen se encuentra presente en ambos sexos.

Se ha propuesto que los genes que se activan a partir del Sry en mamíferos son la AMH, y las hormonas esteroides gonadales. Observaciones hechas con técnicas bioquímicas e inmunocitoquímicas plantean que las gónadas de 3.5 d.i. producen estradiol. Sin embargo, estos resultados son cuestionables debido a que en esta edad la cresta gonadal está formada de una sola capa de células. Otros autores reportan la síntesis de esteroides a partir de gónadas en cultivo, desde los 7 d.i., cuando ya ocurrió la diferenciación gonadal.

Se ha sugerido que la proporción estradiol:testosterona en machos y hembras podría dirigir el destino sexual de la gónada dependiendo de la hormona predominante. A pesar de la cantidad de información sobre la producción

de esteroides sexuales en la etapa embrionaria, hasta el presente no se ha estudiado la expresión del ARNm para la aromatasa, ni se ha relacionado con el desarrollo gonadal. Con base en los antecedentes mencionados, en el presente trabajo se pretende detectar la presencia del mensajero para la aromatasa P-450 en las etapas claves del desarrollo de las gonadas embrionarias del pollo.

HIPÓTESIS

Dado que se han cuantificado esteroides gonadales desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en la aves, antes de que se lleve a cabo la diferenciación sexual gonadal y durante la diferenciación propiamente, y se ha visto que los estrógenos se requieren para que se lleve a cabo la diferenciación sexual del ovario, se propone que la enzima aromatasa P-450, catalizadora de estrógenos, podría estar regulando la diferenciación gonadal del ovario en este grupo.

IV. OBJETIVOS

1. Determinar mediante la amplificación por PCR, si se encuentra presente el ARNm en las gónadas de embriones de pollo en etapa de gónada indiferenciada (6 d.i.), doce horas después de que se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (14 d.i.) y en etapa de gónada diferenciada (14, 16 y 19 d.i.)
2. Evaluar y estandarizar, en embriones de pollo de la cepa White Leghorn, la técnica de sexado por Corpúsculo de Barr.
3. Evaluar y estandarizar, en las gónadas embrionarias del pollo, la técnica de aislamiento de ARN total.
4. Evaluar y estandarizar, en de las gónadas embrionarias del pollo, la técnica de amplificación por PCR.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.0 Material biológico.

Se obtuvieron huevos fértiles de la cepa White Leghorn de la granja avícola A.L.P.E.S. (Aves Libres de Patógenos Específicos), ubicada en Tehuacán, Pue.

Se colocaron en una incubadora marca James MFG CO., a 37.7° C y 80% de humedad.

Se utilizaron grupos de 15 embriones de 6, 14, 16 y 19 d.i., cuyas etapas de desarrollo fueron 26, 40,42 y 45 (Hamburger y Hamilton, 1951), respectivamente.

5.1 Técnica de ovoscopía

Esta técnica se utiliza para realizar un seguimiento confiable del desarrollo de los embriones de pollo y fue practicada antes de obtener el material biológico.

La observación se llevó a cabo colocando cada huevo a contraluz de una lámpara en un cuarto oscuro. En las etapas iniciales del desarrollo, la vida del embrión se detectó básicamente por la presencia de una red de vasos sanguíneos bien establecida. Conforme avanzó el desarrollo, se pudo apreciar al embrión unido firmemente en un punto de confluencia de la red vascular.

5.2 Disección y almacenamiento del tejido embrionario

Los embriones se obtuvieron haciendo un corte circular en la zona de la cámara de aire. Se retiró la membrana papirácea y se sacó al embrión. Las etapas de desarrollo fueron determinadas de acuerdo con la descripción de Hamburger y Hamilton (1951), En los embriones de 6 d.i. el sexo genético se determinó con la técnica de Corpúsculo de Barr, descrita más adelante. A partir de los 11 d.i. se realizó el sexado por observación morfológica gonadal.

Los embriones se sacrificaron por decapitación y se disecó el complejo urogenital, que consiste de las gónadas y el mesonéfrs y se sumergió en medio de cultivo MEM en SSB Hank's pH=7. Las gónadas se disecaron y colocaron en tubos Eppendorf y congeladas en nitrógeno líquido a -70°C.

El tejido se almacenó a esta temperatura en un ultracongelador marca Forma Scientific, modelo 8416 SN 83423612 hasta la extracción del ARN.

5.3 Determinación del sexo genético.

El sexo genético se determinó de acuerdo a la técnica de Burgoyne et al, (1983) con ligeras modificaciones, la cual se basa en la localización de la cromatina sexual condensada también llamada corpúsculo de Barr. En las aves la condensación se observa tanto en hembras como en machos, sin embargo, los embriones de sexo femenino la presentan en una frecuencia del 50% (Ishizaki y Kosin, 1960).

Se aisló el amnios de embriones de 6 d. i. y se fijó en una mezcla de ácido acético:metanol (1:1) a 4°C. Se centrifugó en una centrífuga marca Beckman modelo GS-6R a 5000 r.p.m., 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó la fase acuosa. Se agregaron 40 μ l de ácido acético glacial al 60% y con una pipeta Pasteur, sellada por calor, se disgregó el tejido tres minutos.

Se agregaron 40 μ l de la mezcla de ácido acético:metanol (1:1) y se centrifugó a 5000 r.p.m., 5 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió la muestra con una pipeta Pasteur. Se colocaron 40 μ l de la suspensión sobre un portaobjetos. Se dejó secar y a continuación se agregaron 20 μ l de azul de toluidina al 1%, filtrado.

Finalmente se montó la muestra y se observó al microscópio óptico Nikon a 40X como se observa en la figura 3, al final del capítulo.

5.4 Aislamiento de ARN

Se extrajo el ARN total de gónadas embrionarias de 6 d.i empleando la técnica de Chomczynsky y Sacchi (1987). Para las gónadas de edades más avanzadas se ajustaron las proporciones de los reactivos dependiendo de la cantidad de tejido.

El tejido se homogeneizó con 100 μ l de solución 1 (ver apéndice) con pistilos de punta de teflón marca Weathon en un homogenizador marca Tri-R Instruments, modelo S63C. Se agregaron los siguientes reactivos secuencialmente: 10 μ l/gónada de acetato de sodio 2M, pH=4.0; 100 μ l/gónada de fenol saturado con

agua (ver apéndice) y 20 μ l/gónada de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Las muestras se agitaron 10 segundos y se incubaron a 4°C.

Las muestras se centrifugaron a 14000 r.p.m., 20 minutos a 4°C, en una ultracentrífuga marca Eppendorf, modelo 5402. Se transfirió la fase acuosa a tubos Eppendorf por separado y se agregó 100 μ l/gónada de isopropanol. La muestra se agitó con la mano 10 segundos y precipitó a -20°C, una hora. Las muestras se centrifugaron a 14000 r.p.m., 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 30 μ l/gónada de solución 1. Se agregó un volúmen similar de Isopropanol y se precipitó -20°C, una hora. Las muestras se centrifugaron a 14000 r.p.m., 20 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se lavaron con 100 μ l de etanol al 75%. Se centrifugaron a 14000 r.p.m. a 4°C, diez minutos. La fase de lavados se repitió dos veces. Los tubos se colocaron en un desecador, una hora a temperatura ambiente. Se resuspendió el ARN de cada tubo en 10 μ l de agua tratada con DEPC (ver apéndice) y se almacenó a -70° C, Figura 4.

5.5 R T- Polimerase Chain Reaction

El PCR es un avance importante de la Biología Molecular. Con muy pocas cantidades de tejido, este método permite obtener, mediante la síntesis enzimática "in vitro", millones de copias de una determinada secuencia de ADN O ARN (Erlich et al. ,1991). Si se desea analizar ARNm es necesario realizar la síntesis de ADNc. Esto se lleva a cabo utilizando la enzima transcriptasa-reversa.

Para efectuar el PCR se requiere de una mezcla de la muestra de ADNc con dos oligonucleótidos sintéticos iniciadores, (dNTP's) y la enzima térmica Taq ADN polimerasa.

Durante la amplificación se llevan a cabo tres eventos básicos:

1. La desnaturalización a 94° C.
2. El alineamiento de los oligonucleótidos sintéticos iniciadores en cada una de las hebras por separado en dirección 3'→5', a 55°C.
3. La síntesis del ADN a 72°C. Estos tres pasos conforman un ciclo de la reacción; de cada ciclo se obtiene un cierto número de copias idénticas del ADN unido al oligonucleótido sintético iniciador, las cuales a su vez, funcionan como moldes para nuevas copias de ADN, alcanzando con ésto la acumulación exponencial del fragmento deseado (Erich, 1991).

Los reactivos utilizados en esta técnica fueron comprados a Perkin Elmer Cetus y los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Análisis y Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El diseño de los oligonucleótidos se realizó de acuerdo al ADNc para la aromatasa P-450 (McPhaul et al., 1988). Cada uno consiste de 24 pb, no complementarias que delimitan un fragmento de 546 pb del gen (Innis et al., 1990). Se manejó una muestra experimental y un control negativo por cada edad. Inicialmente se colocaron 2 µl de la muestra de ARN en tubos para PCR y se desnaturalizó a 94°C, 5 minutos.

a) Obtención de ADNc

Para obtener el ADNc se preparó una mezcla maestra agregando 4 μ l de sol. $MgCl_2$, 2 μ l de amortiguador II PCR 10X, 2 μ l de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), 1 μ l del inhibidor de RNAsa y 1 μ l de hexanucleótidos con secuencias al azar. Por separado se agregaron 1 μ l de agua-DEPC en el tubo experimental y 2 μ l en el control, y 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa solo en la muestra experimental. El volúmen final por tubo fue de 20 μ l.

Los tubos se incubaron en el aparato para PCR (thermal cycler) marca Perkin Elmer Cetus modelo 9600, un ciclo de 25°C -10 minutos, 42°C - 60 minutos y 99°C - 10 minutos. Se colocaron 10 minutos en hielo y se agregaron los reactivos arriba mencionados.

b) Amplificación del ARNm de la aromatasa P-450

Para amplificar del segmento deseado se preparó una mezcla con 4 μ l de solución de $MgCl_2$, 8 μ l del amortiguador II PCR 10X, 65.5 μ l de agua tratada con DEPC, y 0.5 μ l de la enzima Ampli Taq ADN Polimerasa y se agregó al ADNc. Por separado se añadió 1 μ l de cada oligonucleótido sintético y se incubó en el thermal cycler a 94°C-2 minutos, 55°C-15 segundos y 72°C-30 segundos, un ciclo; 94°C-15 segundos, 55°C-15 segundos y 72°C-30 segundos, 33 ciclos; 94°C-15 segundos, 55°C-15 segundos y 72°C-10 minutos, un ciclo. El producto del PCR se almacenó a 4°C. Figura 5.

c) Electroforesis de los productos amplificados

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1X, pH=8.0 (ver apéndice). Se utilizó un marcador de peso molecular PBR322 digerido con Hinf-I del cual se tomaron 3 μ l y se mezclaron con 17 μ l de un amortiguador 5X (ver apéndice) y 2 μ l de azul de bromofenol (ver apéndice). De esta mezcla se usaron 12 μ l en cada gel.

De cada producto amplificado se tomaron 20 μ l, se mezclaron individualmente con 3 μ l de amortiguador de carga (ver apéndice) y cada muestra se colocó en un pozo del gel.

Se agregaron a la cámara de electroforesis 300 ml de amortiguador TBE 1X, pH=8 (ver apéndice), y se aplicaron 100 volts durante 2 horas. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.8% en agua destilada, 10 minutos. Se lavó con agua destilada por 10 minutos y se visualizó en un transiluminador de luz U.V. marca Sigma.

Las bandas se analizaron por densitometría con el programa AMBIS CORE software versión 4.0.

5.6 Microscopía óptica.

Se aislaron las gónadas de 5, 16 y 17 d.i. Se colocaron en medio Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965), 24 horas a 4°C. El tejido se lavó con cacodilato de sodio 0.1M, pH=7.3 y se mantuvo en éste 24 horas. Las gónadas se transfirieron a

tetraóxido de osmio en donde se dejaron 24 horas. El tejido se deshidrató con alcoholes graduales de 70% a 100%. Posteriormente se incluyó en epon y se polimerizó a 60°C. En un microtomo marca Leika modelo Reichert Ultracuts se obtuvieron cortes de 1 μm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina al 2%. Se observaron y fotografiaron en un microscópio marca Nikon modelo Opti Phot. de campo claro.

TECNICA DE SEXADO POR CORPUSCULO DE BARR

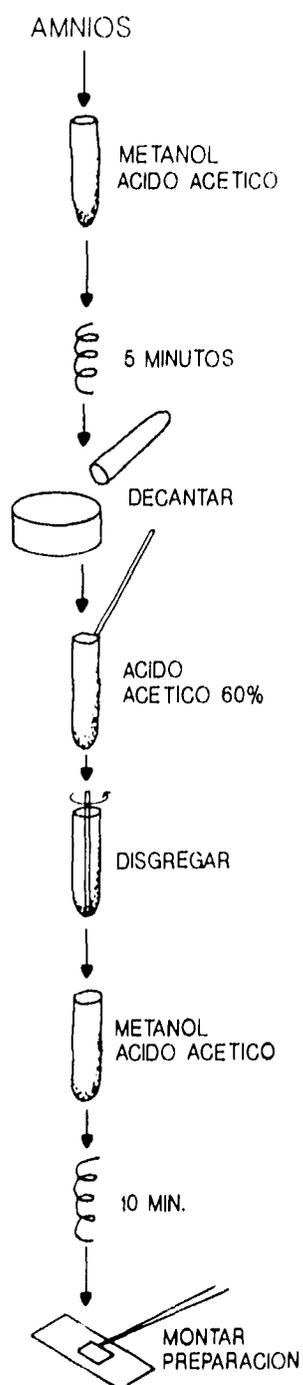


Figura 3. Se ilustra el procedimiento para el sexado de los embriones de 6 d.i. (Burgoyne et al., 1983) con modificaciones.

TECNICA DE AISLAMIENTO DE ARN

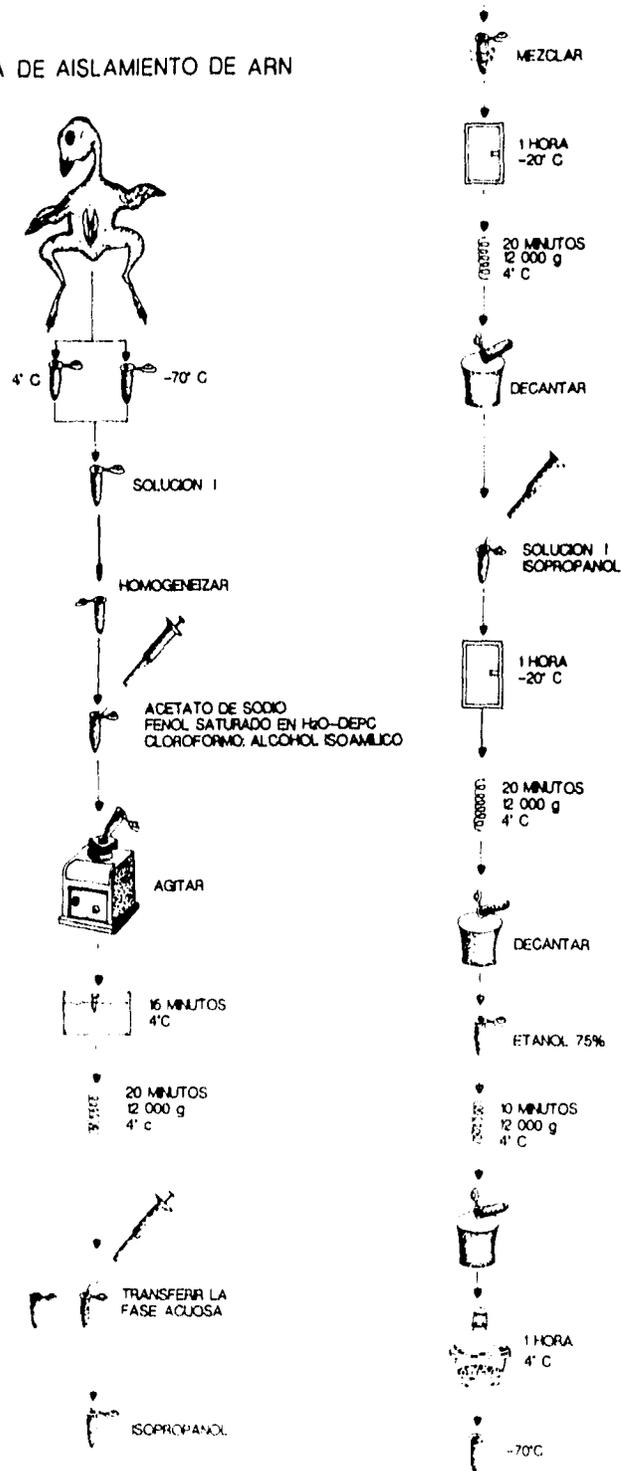


Figura 4. Esquema del proceso de obtención de ARN

REVERSE TRANSCRIPTASE-POLIMERASE CHAIN REACTION

OBTENCION DE ADNc A PARTIR DE ARN

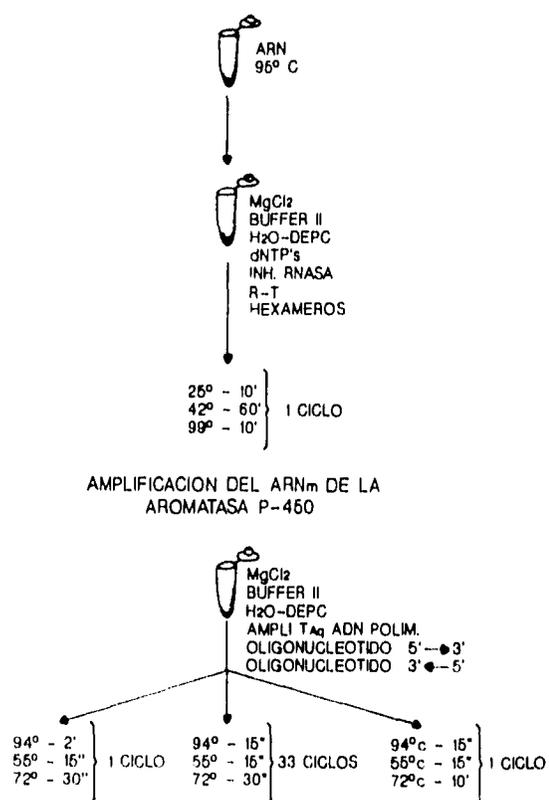


Figura 5. Método empleado en la de amplificación del ARNm de la aromatasa P-450 de la gónadas de embriones de pollo.

VI. RESULTADOS

6.0 Identificación del sexo cromosómico

Para determinar la presencia o ausencia del corpúsculo de Barr, se contó un promedio de 100 núcleos. Los embriones de sexo femenino presentaron el corpúsculo de Barr en una frecuencia del 50% (Ishizaki y Kosin, 1960). La figura 6 muestra un núcleo del amnios en el cual se puede observar la cromatina sexual compactada, localizada en la periferia de la envoltura nuclear, en forma de media luna.

En los embriones de sexo masculino, como era de esperarse, el corpúsculo de Barr estuvo presente un porcentaje menor del 50%. La figura 7 muestra un núcleo del amnios de un macho de 6 d.i.



Figura 6. Se muestra el corpúsculo de Barr (→) en un núcleo del amnios de hembra de 6 d.i., 1000 X.

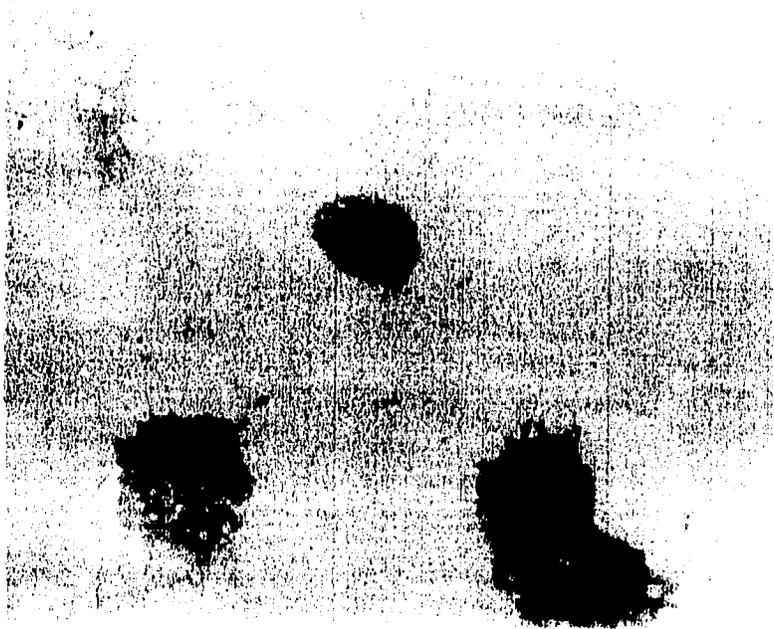


Figura 7. Se observan los núcleos de las células del amnios de un embrión masculino de pollo de 6 d.i., el corpúsculo está ausente, 1000 X.

6.1 Morfología Gonadal

a) Gónada indiferenciada

En las aves el tiempo en el cual se considera que las gónadas son indiferenciadas corresponde desde los 5 hasta los 7 d.i. la figura 8 corresponde a un embrión de 5 días de incubación, de sexo masculino. El sexo se determinó por la técnica de corpúsculo de Barr. Como se puede observar en esta etapa el desarrollo gónadal consiste de la presencia de varias capas de células ubicadas en la cresta urogenital, las cuales, por su disposición y cantidad indican una etapa temprana de la gónada indiferenciada.

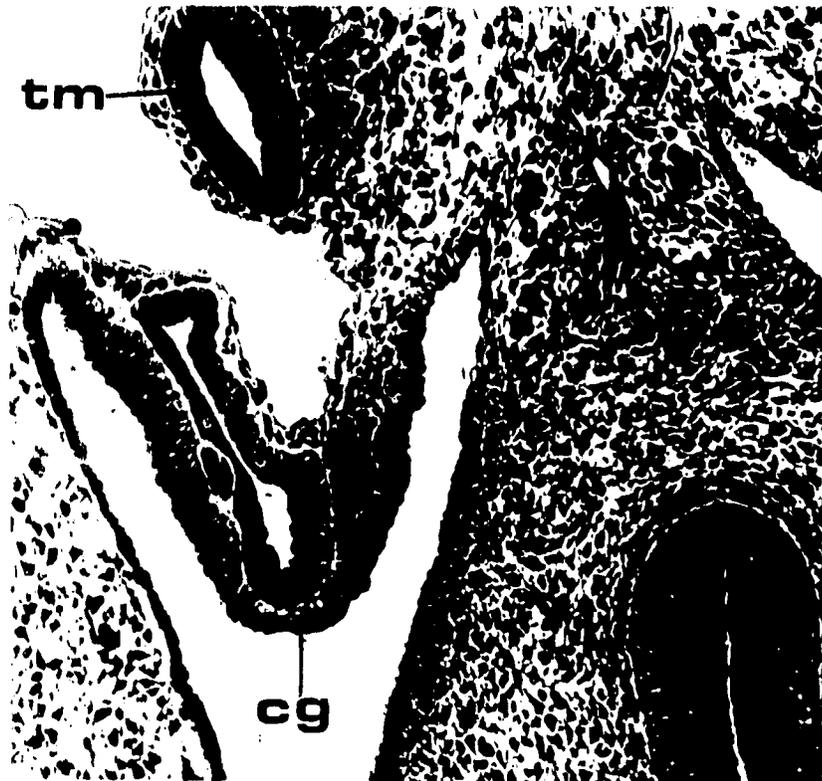


Figura 8. Región urogenital de un embrión en la etapa de gónada indiferenciada (5 días de incubación). Se observa la cresta genital (cg) formada por varias capas de células epiteliales, el intestino (i) y un túbulo mesonéfrico (tm), 400 X.

b) Testículo

El testículo de un embrión de 16 d.i. está formado por cordones seminíferos los cuales se distribuyen a través de la gónada y son separados por mesénquima, Figura 9.



Figura 9. Testículo de embrión de pollo de 16 días de incubación. Se observa el epitelio celómico delgado (ec), los cordones seminíferos (cs) separados por mesénquima (m), 400 X.

c) Ovario

A los 17 d.i. se observa una clara disposición topológica en la cual la corteza engrosada es evidente. Los cordones sexuales, ahora corticales dada su disposición, se encuentran rodeados de mesénquima y en conjunto caracterizan a un ovario bien diferenciado.



Figura 10. Ovario izquierdo de un embrión de pollo de 17 días de incubación. Se muestra la corteza (c) engrosada y el tejido lagunar (tl) que forma la médula (m). En algunas zonas de la corteza se ven algunas conexiones del epitelio celómico con los cordones corticales, 400 X.

6.2 Detección del ARNm a aromatasa P-450

a) Gónada indiferenciada

Como se puede observar en la figura 11 no se detectó la expresión del ARNm de la aromatasa P-450 en la etapa que corresponde al estadio 26 (Hamburger y Hamilton, 1951) que representa a la gónada indiferenciada de un embrión de 6 d.i. sexado por la técnica de corpúsculo de Barr.

b) Ovario

La expresión del ARNm de la aromatasa P-450 se observó a partir de los 14 d.i. La figura 11 muestra la banda que corresponde al ovario izquierdo y que está más concentrada que en el ovario derecho de la misma edad. A los 16 d.i. hay una disminución con respecto a los 14 d.i. en la expresión del ARNm de la aromatasa P-450, pero la intensidad entre los dos ovarios es similar. Finalmente, a los 19 d.i. la expresión del mensajero en el ovario izquierdo se incrementa notablemente, en tanto que el derecho disminuye. Estos resultados fueron analizados en un densitómetro y se pueden observar en la tabla 1.

Las unidades que se usaron en los valores obtenidos fueron designadas arbitrariamente como unidades de densidad. Como se ilustra en la gráfica de la figura 12, la edad en que se encontró una mayor expresión del ARNm de la aromatasa P-450 en el ovario izquierdo fue a los 19 d.i. cuyo valor de intensidad fue de 130.6 u.d.. En tanto que la edad en la que el mensajero se expresó en menor intensidad en el ovario izquierdo fue a los 16 d.i. con 50.6 u.d.. A los 14 d.i. el ARNm de la aromatasa P-450 se encontró presente con una intensidad de 120.1 u.d.

Con respecto al ovario derecho se puede ver que existe una expresión decreciente desde los 14 d.i. en donde la intensidad fue de 92.4 u.d. A los 16

d.i. se observa una expresión de 47.6 u.d., lo cual significa una caída aproximadamente del 50%. Finalmente, a los 19 d.i. el mensajero se expresa con una intensidad de 23.5 u.d., lo cual representa una nueva caída cercana al 50%.

c) Testículo

La expresión del ARNm de la aromatasa P-450 en las gónadas masculinas de 6, 14 16 y 19 d.i. se evaluó por la técnica de PCR y no se detectó en ninguna de las etapas analizadas.

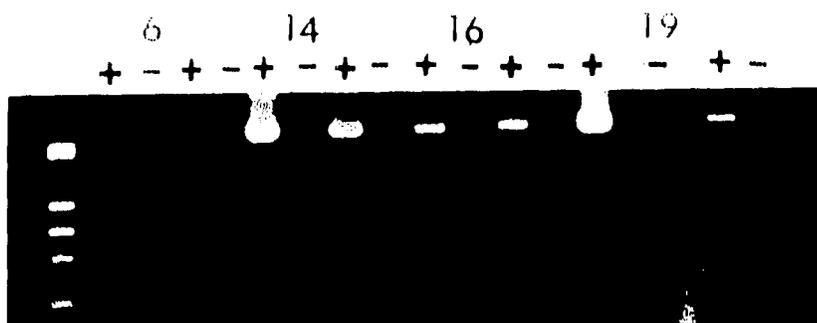


Figura 11. Expresión del ARNm de la aromatasa P-450. Se muestran las bandas del ARNm de la aromatasa P-450 en el ovario izquierdo y derecho de embriones de 6, 14 16 y 19 d.i. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, las muestras experimentales (+) fueron procesados con R-T, mientras que en los controles (-) se omitió el uso de esta enzima.

Quantificación del ARNm de la aromatasa P-450 por densitometría

| | 6 d.i. | 14 d.i. | 16 d.i. | 19 d.i. |
|------|--------|---------|---------|---------|
| o.i. | 0 | 120.1 | 50.6 | 130.6 |
| o.d. | 0 | 92.4 | 47.6 | 23.5 |

Tabla 1. Valores obtenidos (u.d.) para el mensajero de la aromatasa en las diferentes edades evaluadas.

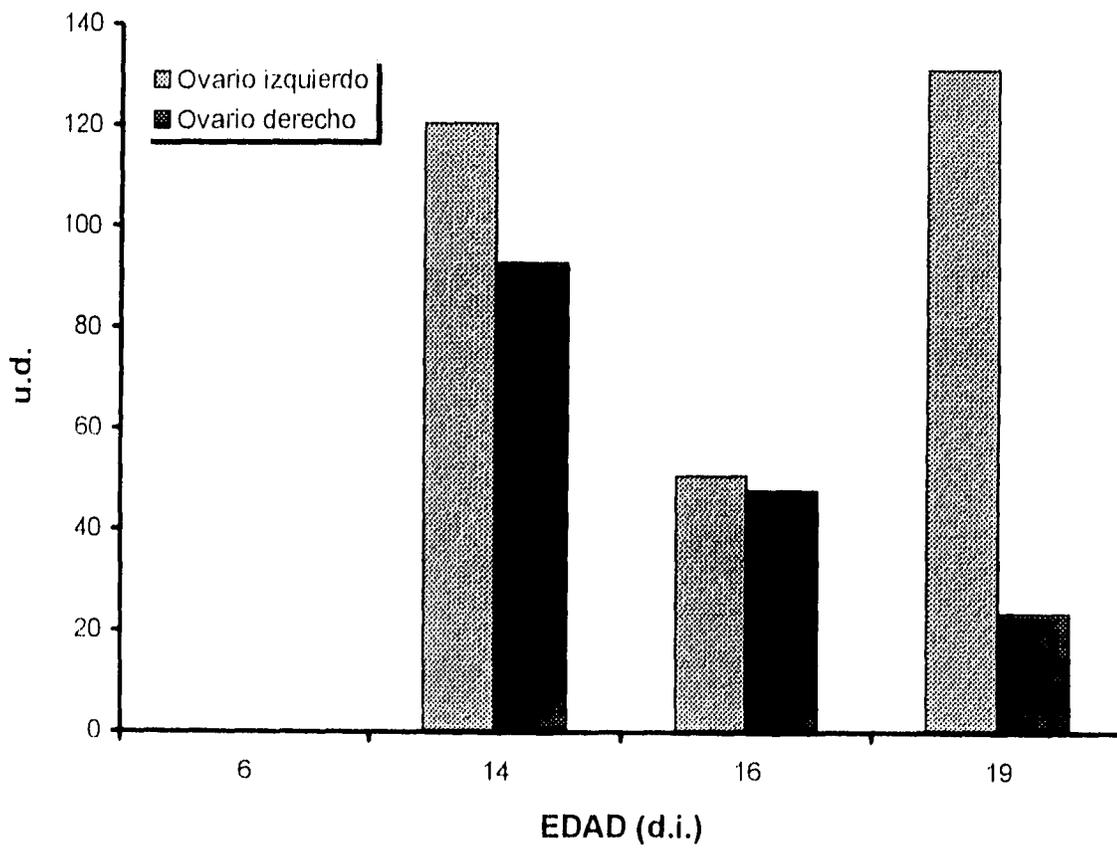


Figura 12. Expresión de la aromatasa P-450 en el ovario embrionario de pollo a diferentes edades.

VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación se estudió la expresión del ARNm a aromatasa P-450. Se determinó que para amplificar el ARNm de esta enzima, el ARN total de las gónadas debe ser aislado fresco y no ser almacenado un período más largo que una semana. Durante la extracción de ARN total se emplean reactivos que inhiben a las RNAsas. El ARN aislado se almacena a -70°C (Chomczynsky y Sacchi, 1987), y puede degradarse por contaminación o por la presencia de RNAsas, aunque estas últimas aparentemente se inactivan a temperaturas bajas.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la técnica empleada para sexar a los embriones en etapa indiferenciada, coinciden con el hecho de que en las aves, la cromatina sexual condensada no corresponde a la del macho, que en este grupo es heterogamético, sino se encuentra en ambos sexos con una mayor frecuencia en las hembras (Kaplan y Kinoshita, 1960).

En el estudio no se detectó la presencia de ARNm para la aromatasa P-450 en embriones masculinos, en ninguna de las etapas analizadas (26, 40, 42 y 45 del desarrollo embrionario.). Considerando que esta enzima transforma los andrógenos a estrógenos, se puede decir que estos resultados coinciden con los que reportaron Galli y Wasserman (1973). Ellos compararon la biosíntesis de esteroides sexuales producidos por las gónadas embrionarias de pollo a partir de precursores radioactivos y observaron que las gónadas masculinas no producían estrógenos. Otros autores proponen que en los machos, los esteroides sexuales son elaborados en cantidades muy pequeñas (Guichard, et al., 1973).

El no haber detectado el ARNm de la aromatasa en ninguna de las etapas evaluadas en embriones masculinos plantea la posibilidad de que en los machos esta enzima se active posteriormente, durante el desarrollo postnatal.

Se ha planteado que la relación testosterona:estrógenos es de vital importancia para la diferenciación sexual gonadal (Elbrecht y Smith, 1992) y que el destino sexual de las gónadas depende de la hormona que predomina. De estudios previos sabemos que en las aves, los estrógenos son la hormona dominante (Wolff y Wolff, 1951). Sin embargo, hasta ahora no se sabe exactamente en que momento comienzan a producirse y si realmente la diferenciación sexual es dependiente de la relación antes planteada o bien si éstas últimas son consecuencia de eventos previos.

En este estudio se eligieron estadios 26, 40, 42 y 45 del desarrollo embrionario, que corresponden a los 6, 14, 16 y 19 d.i. y que consideramos representan momentos importantes de la diferenciación gonadal en esta especie. Se encontró que en las hembras, el ARNm para la aromatasa P-450 no se detectó a los 6 d.i., edad que corresponde a la etapa de gónada indiferenciada; lo cual puede tener varias explicaciones. La primera posibilidad podría consistir en que la cantidad de ARN empleado para la amplificación no haya sido suficiente dado que, en esta etapa, la gónada está formada de dos a tres capas de células precursoras de las células foliculares y de la teca. La segunda causa posible podría ser que el gen que codifica para la aromatasa comience a expresarse después de los 6 d.i.

Existen trabajos que reportan la síntesis de estrógenos en gónadas de 3.5 d.i. (Woods y Erton, 1978), lo que estaría implicando que la aromatasa P-450 se encuentra en actividad desde esa edad. Sin embargo, esos resultados son cuestionables ya que nuestra experiencia con el manejo y cirugía de tejido embrionario de pollo de la cepa White Leghorn permite decir que a los 3.5 d.i., resulta imposible aislar las gónadas embrionarias ya que en esa edad, la cresta genital está empezando de organizarse morfológicamente.

Otros autores cultivaron gónadas con precursores radioactivos y detectaron la síntesis de estrógenos a los 6 d.i. (Weniger y Zeis, 1971), a los 7 y 10 d.i.

(Galli y Wassermann, 1973), a los 7.5, 10 y 18 d.i. (Guichard, et al., 1973) y de los 7.5 a los 18 d.i. (Guichard et al., 1977), lo que indica que existe una clara actividad de la aromatasas P-450 desde esas etapas. Sin embargo, no se puede perder de vista que los resultados arriba mencionados se refieren al producto de la enzima, sintetizado *in vitro* y que hablan de la capacidad de las gónadas de secretar esteroides, lo cual no quiere decir que ocurra al mismo tiempo *in vivo*; en tanto que en esta investigación se estudió el ARNm de la aromatasas presente en las gónadas hasta el momento de la disección.

Como se puede observar en la figura 11, en las edades analizadas posteriores a los 6 d.i. se detectó claramente la presencia del ARNm de la aromatasas P-450. En estas edades (14, 16 y 19 d.i.), las gónadas se encuentran completamente diferenciadas.

Se ha reportado que en las aves el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se establece a los 13.5 d.i. (Woods, et al., 1977; 1981). Este es un evento que marca un cambio importante a nivel hormonal en los organismos. Hasta antes de que se establezca y madure el eje, las gónadas tienen una actividad hormonal autónoma que además es menor a la que se observa después de los 13.5 d.i. (Woods et al., 1977).

Como se puede ver en la figura 11 las bandas que corresponden al ARNm de la aromatasas P-450 a los 14 d.i. aparecen altamente concentradas y se encuentran presentes en ambos ovarios, aunque en el derecho, como era de esperarse dado el proceso de involución por el que atraviesa, se encuentra en menor cantidad.

A los 16 d.i., que es la siguiente etapa evaluada observamos, por un lado, la caída en la concentración de ARNm de aromatasas con respecto a la edad anterior, y por otro lado, vemos que las bandas tanto en el ovario izquierdo como en el derecho se encuentran casi con la misma intensidad. Este resultado coincide con las observaciones hechas en el laboratorio del

Dr. Enrique Pedernera, quien trabaja con la cepa White Leghorn y a visto que la síntesis de 17β -estradiol en el embrión de pollo alcanza un nivel alto entre los 10 y 13 d.i. y posteriormente decae hacia los 15 y 18 d.i., lo que implica que se trata de un proceso dinámico con variaciones a lo largo del desarrollo embrionario (comunicación personal). Interesantemente, a los 19 d.i., como se puede observar en la figura 11, el ARNm de la aromatasa P-450 en el ovario izquierdo se ve altamente incrementado en comparación con las edades anteriores y con el ovario derecho. Este tipo de análisis no se ha demostrado en ninguna cepa de pollos.

Aunque el tipo de PCR utilizado no es cuantificable, una manera de dar objetividad y formalidad a los resultados obtenidos fue midiendo la intensidad de las bandas en un densitómetro. Los resultados de esta medición pueden ser observados en la tabla 1. Los valores correspondientes a cada edad y a cada ovario pueden observarse en la representación gráfica de la figura 11.

Como se puede ver, en el ovario izquierdo a los 14 d.i. el ARNm de la aromatasa P-450 está presente con una intensidad de 120.1 u.d., sin embargo, a los 16 d.i. se reduce a un poco más de la mitad, esto es, a 50.6 u.d. y posteriormente se incrementa a 130.6 u.d., logrando la intensidad más alta de las edades estudiadas.

El ARNm de la aromatasa P-450 en el ovario derecho tiende a perder la intensidad pasando de 92.4 u.d. a los 14 d.i. a 47.6 u.d. a los 16 d.i. y decae a 23.5 u.d. a los 19 d.i. Estos resultados plantean que la velocidad con la que se procesa el ARNm de la aromatasa P-450, varía en función de la etapa de desarrollo que se trate, lo que nos permite confirmar que efectivamente existe un patrón dinámico de síntesis de esteroides sexuales en el ovario del embrión de pollo.

Al relacionar la presencia del ARNm de la aromatasa P-450 con la actividad esteroideogénica de esta enzima se puede decir que los resultados obtenidos

coinciden, al menos en las tres últimas edades evaluadas, con los resultados de Galli y Wassermann (1973) , quienes reportaron la síntesis de testosterona y 17β -estradiol en el ovario derecho, a partir de los 10 d.i.

Es interesante señalar que a pesar de que el ovario derecho pierde su arreglo tisular debido a que la corteza involuciona y se potencia el desarrollo medular característico de un testículo, las células esteroideogénicas, productoras de 17β -estradiol, aunque en forma decreciente, continúan elaborando el ARNm de la aromatasa P-450 al menos hasta los 19 d.i.

En la literatura revisada no se encontraron trabajos en los cuales se lleve a cabo un seguimiento del ARNm de la aromatasa P-450 en embriones de pollo. Sin embargo, en estudios en los cuales se utilizó la cepa White Leghorn como control, se observó la presencia del ARNm de la aromatasa P-450 en el ovario de 7 semanas después de la eclosión (Matsumine et al., 1990).

Otros autores analizaron la actividad de la aromatasa en diferentes tejidos en la cepa de pollo Sebright-Bantam, debido a que en esta cepa los pollos presentan una mutación que feminiza los caracteres sexuales secundarios masculinos. Los resultados de estos trabajos han demostrado que en esta cepa, la aromatasa P-450 está presente en el ovario, piel, pulmón, glándula adrenal, riñón, corazón, mesonéfricos, intestino, testículo, músculo, cerebro e hígado. Sin embargo, en los controles White Leghorn la actividad de la aromatasa P-450 solo se encuentra en el ovario tanto de embriones como de adultos (George y Wilson, 1982; Wilson et al., 1987).

Al estudiar una cepa como la Sebright, se debe tener en cuenta que la mutación no es un evento común en la naturaleza de las especies, por lo tanto los resultados obtenidos explican el problema planteado exclusivamente para la cepa evaluada, lo que impide proponer generalizaciones a nivel de especie.

Se sabe que en mamíferos los principales sitios de aromatización son las gónadas y la placenta, sin embargo, el sistema nervioso central también

sintetiza pequeñas cantidades de estrógenos (Kellis et al., 1987). A nivel cerebral los estrógenos están relacionados con la conducta sexual, la secreción de gonadotropinas y la diferenciación sexual cerebral (Gilbert, 1994).

Se ha propuesto que los sitios en donde se ha detectado la actividad de la aromatasas P-450 en el cerebro (hipotálamo, área preóptica y lóbulos límbicos), indican que la síntesis de estrógenos a este nivel es un carácter primitivo del sistema nervioso central, que se ha conservado en el transcurso de la historia evolutiva de los vertebrados (Callard et al., 1978).

Comparando los mecanismos de diferenciación sexual que ocurren en el cerebro y en las gónadas se ha planteado que el sexo homogamético (XX, ZZ) dirige la organización cerebral; mientras que el sexo heterogamético (XY, ZW) requiere de la presencia de hormonas esteroides gonadales para la diferenciación del sistema nervioso central. Como en los mamíferos, el patrón intrínseco es femenino, es necesaria la presencia de las hormonas esteroides gonadales para que se lleve a cabo la diferenciación cerebral masculina. En las aves, cuyo patrón intrínseco es el masculino, la diferenciación cerebral femenina requiere de la presencia de los esteroides gonadales para llevarse a cabo (MacLusky y Naftolin, 1981).

En los mamíferos el gen Sry dirige la diferenciación del testículo (Berta et al., 1990; Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1990; Sinclair et al., 1990; y Tiersch et al., 1990), aunque se desconocen los eventos que intervienen para que esto ocurra. Sin embargo, en las aves se desconocen por completo los mecanismos que dirigen la diferenciación sexual gonadal.

En las aves se han propuesto a la AMH y a los esteroides gonadales como posibles candidatos para dirigir la diferenciación sexual, una vez que se activa el homólogo del TDF. Por un lado se ha planteado que la AMH podría estar actuando como un inhibidor natural de la aromatasas regulando los niveles de

estrógenos (Elbrecht y Smith, 1992); por otro lado se ha visto que éstos atenúan el efecto de la AMH (Hutson et al., 1981; 1985; Müstenberg y Lovell.Badge, 1991).

Se sabe que en las aves, los dos ovarios producen AMH, y para explicar el desarrollo del ovario y del ducto mülleriano izquierdos y la regresión del ovario y del ducto mülleriano derechos se ha propuesto que existe un antagonismo entre los estrógenos y la AMH o sus receptores que se encuentra regulando estos eventos (Hutson et al., 1981; 1985; MacLaughlin et al., 1983).

Los resultados de esta investigación indican que el ARNm de la aromatasa P-450 se sintetiza en ambos ovarios en las etapas analizadas (26, 40, 42 y 45 del desarrollo embrionario), lo cual junto con otros trabajos que han reportado la presencia de estrógenos en las gónadas embrionarias femeninas y en tiempos que coinciden a los evaluados por nosotros (Weniger y Zeis, 1971; Galli y Wassermann, 1973; Guichard et al., 1973; Guichard et al., 1977). Ésto permite pensar que si la AMH fuera una sustancia antagónica a los estrógenos, sería de esperarse la ausencia de estos últimos en el ovario derecho dado el proceso de regresión que experimenta. Sin embargo, es claro que los estrógenos siguen siendo sintetizados en ambas gónadas hacia los últimos días del desarrollo embrionario, y que a pesar del patrón decreciente que presenta en el ovario derecho, éste sigue teniendo actividad esteroidogénica, es decir, no está siendo completamente inhibido. Ésto plantea la posibilidad de que otro(s) factor(es) además de la AMH esté regulando la actividad de la aromatasa.

Por otro lado, se sabe que en mamíferos el patrón intrínseco sexual es el femenino, como claramente lo demostraron los trabajos de Jost realizados en conejo (Jost, 1970); sin embargo se ha visto que en este grupo de vertebrados la diferenciación del testículo inicia antes que la del ovario y que el primer tipo celular en diferenciarse son las células de Sertoli, que entre otras

funciones sintetizan la AMH (Josso et al., 1977). De ahí que esta sustancia haya sido propuesta como uno de los candidatos más viables para activarse después de que el Sry ha iniciado la cascada de eventos que conducen a la diferenciación sexual de los mamíferos (Luo et al., 1994).

Sin embargo, en las aves el patrón intrínseco sexual es el masculino, es decir que se requiere de la presencia del ovario y de las hormonas ováricas para que el destino sexual sea el femenino (Wolff y Wolff, 1951).

De ahí que en este trabajo se considere que en las aves, el homólogo del Sry podría encontrarse en el ovario y que al encenderse este gen podría estar desencadenando la cascada de eventos que dirigen la diferenciación sexual del ovario, en la cual la aromatasa P-450 podría estar participando desde momentos tempranos en la regulación de este proceso.

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación y en los reportados en la literatura se considera que es necesario llevar a cabo una investigación para analizar la expresión del ARNm de la aromatasa P-450 en etapas previas a la diferenciación gonadal y durante la diferenciación propiamente, con la finalidad de ubicar en el tiempo y el espacio el momento en que este mensajero comienza a ser elaborado.

Dada la importancia reproductiva de los estrógenos, su conservación en el tiempo, su influencia en los cambios evolutivos del tracto reproductor y su estrecha participación en la diferenciación del ovario, se propone que la aromatasa P-450 tiene un papel fundamental en la diferenciación de las aves.

VIII. CONCLUSIONES

1. El ARNm de la aromatasa P-450 no se expresa en las gónadas masculinas de 6, 14, 16 y 19 d.i., en el embrión de pollo.
2. El ARNm de la aromatasa P-450 está presente en los ovarios izquierdo y derecho de embriones de pollo de 14, 16 y 19 d.i. y aparentemente se expresa de manera diferencial en ambas gónadas.
3. El ARNm de la aromatasa P-450 sigue un patrón dinámico de expresión a lo largo del desarrollo gonadal embrionario.
4. A pesar del proceso de involución que experimenta el ovario derecho del embrión de pollo las células esteroidogénicas sintetizan el ARNm de la aromatasa P-450, aunque esta capacidad decrece conforme se acerca el tiempo de eclosión.
5. El ARN de las gónadas de embriones de pollo puede almacenarse durante una semana como tiempo máximo para evitar degradaciones parciales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Buylla A, Merchant-Larios H 1986 Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res* 165:362-368.

Alvarez F 1994 Caracterización de la actividad esteroidogénica en diferentes poblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Ando Y, Fujimoto T 1983 Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. *Dev Growth Differ* 25:345-352.

Berta P, Hawkins J, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M 1990 Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.

Bradley EM 1941 Sex differentiation of chick and duck gonads as studied in homoplastic and heteroplastic host-graft combinations. *Anat Rec* 79:507-529.

Burgoyne PS, Evans EP, Holland K 1983 XO monosomy is associated with reduced birthweight and lowered weight gain in the mouse. *J Reprod Fert* 68:381-385.

Burns RK 1925 The sex of parabiotic twins in amphibians. *Anat Rec* 27:198.

Burns RK 1939 Sex differentiation during the early pouch stages of the opossum *Didelphys virginiana* and a comparison of the anatomical changes induced by male and female sex hormones. *J Morphol* 65:497-547.

Callard GV, Petro Z, Ryan KJ 1978 Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology* 103(6):2283-2290.

Chandra HS 1985 Sex determination: a hypothesis based on noncoding DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 1165-1169.

Chomczynsky P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Bioch* 162:156-159.

Christensen AK 1975 Leydig cells. In: Handbook of physiology. Greep RO, Astwood EB (eds) sect. 7. vol. (V) p. 21. American physiology society, Washington.

Compton T 1990 Degenerate primers for DNA amplification. In: PCR protocols a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) pp. 39-45.

Davis LG, Dibner MD, Battey JF 1986 Molecular biology. Elsevier (Ed) p. 368 New York.

Elbrecht A, Smith RG 1992 Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 225:467-470.

Erllich HA, Gelfand D, Sninsky JJ 1991 Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1650.

Fishman J, Raju MS 1981 Mechanism of estrogen biosynthesis. *J Biol Chem* 254:4472-4477.

Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida J, Briggs JH 1959 A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 4. 711-713.

Fujimoto T, Ukeshima A, Kiyofuji R 1976 The origin, migration, and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat Rec* 185:139-154.

Fujimoto T, Yoshinaga K, Kono I 1985 Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat Rec* 211:271-278.

Galli FE, Wassermann GF 1973 Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 21:77-83.

Gallien L 1941 Recherches expérimentales sur l'action amphisexuelle de l'hormone femelle (oestradiol), dans la différenciation du sexe chez *Rana temporaria*. L. *Bull Biol France et Belgique* 75:369-397.

Gallien L 1944 Recherches expérimentales sur l'organogenèse sexuelle chez les batraciens anoures. *Bull Biol France et Belgique*, 78:257-359.

George F, Wilson JD 1982 Developmental pattern of increased aromatase activity in the sebright bantam chicken. *Endocrinology* 111(4):1203-1207.

Gilbert SF 1994 Developmental biology. Sinauer (eds) pp. 759-784. Sunderland, Massachusetts.

Goldberg EH 1988 H-Y antigen and sex determination. *Phil Trans R Soc Lond B* 322:73-81.

Gorbman A, Bern H 1962 Steroid hormones and steroidogenesis. In: A textbook of comparative endocrinology. 9:230-246. Wiley J. and Sons. Inc. New York. USA.

Gore-Langton RE, Armstrong DT 1988 Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of reproduction. Knobil E, Neil JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL Pfaff DW (Eds) Vol. 1. pp. 331-335. Raven Press Ed. New York.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R 1990 A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.

Guichard A, Cedard L, Haffen K 1973 Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). *Gen Comp Endocrinol* 20:16-28.

Guichard A, Cedard L, Mignot ThM, Scheib D, Haffen K 1977 Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex and side. *Gen Comp Endocrinol* 32:255-265.

Hamburger V, Hamilton HL 1951 A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.

Hoffman Salcedo PG 1991 Efecto del 17 β -estradiol sobre las poblaciones celulares del ovario embrionario de *Gallus domesticus*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.

Hutson JM, Ikawa H, Donahoe PK 1981 The ontogeny of müllerian inhibiting substance in the gonads of the chick. *J Pediatr Surg* 16(6): 822-826.

Hutson JM, Donahoe PK, MacLaughlin DT 1985 Steroid modulation of müllerian duct regression in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57:88-102.

- Ishizaki H and Kosin IL 1960 Sex chromatin in early chick embryos. *Exp Cell Res* 21:197-259.
- Jacobs PA, Strong JA 1959 A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303.
- Josso N, Picard JY, Tran D 1977 The antimüllerian hormone. *Recent Prog Horm Res* 33:117-163.
- Jost A 1970 Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Phil Trans Roy Soc London Ser B*, 259:119-131.
- Kaplan DW, Ohno S, Kinoshita R 1960 On the sex chromatin of *Gallus domesticus* *Exp Cell Res* 19:180-183.
- Karnovsky MJ 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde-fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A.
- Kellis JT, Vickery LE 1987 The active site of aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem* 262:8840-8844.
- Koopman P, Müstenberg A, Capel B, Gubbay J, Collignon J, Economou A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R 1990 Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- Kuwana T, Fujimoto T 1984 Locomotion and scanning electron microscopic observations of primordial germ cells from the embryonic chick blood "in vitro". *Anat Rec* 209:337-343.
- Kuwana T, Maeda-Suga H, Fujimoto T 1986 Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage "in vitro". *Anat Res* 215:403-406
- Lillie FR 1916 The theory of freemartin. *Science* 43:611-613.
- Lillie FR 1917 The freemartin: a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle. *J Exp Zool* 23:371-452.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- MacLusky NJ, Naftolyn F 1981 Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211:1294-1303.

- MacPaul MJ, Noble JF, Simpson ER, Mendelson CR, Wilson JD 1988 The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450 arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen. *J Biol Chem* 263(31):16358-16363.
- Matsumine H, Wilson JD, McPhaul J 1990 Sebaceous and pineal glands express aromatase P-450 messenger RNA inappropriately in extraglandular tissues and in skin fibroblasts. *Molec Endocrinol* 4(6):905-911.
- Merchant-Larios H, Villalpando I 1990 Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: an organ culture study. *J Exp Zool* 254:327-331.
- Merchant-Larios H 1978 Ovarian differentiation. In: The vertebrate ovary. Jones RE (Ed) Chap.2 pp.47-81. Plenum Publishing Corp.
- Merchant-Larios H 1984a Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In: Ultrastructure of reproduction. Chap.3 pp. 19-30. Martinus Nijhoff Publ. Boston.
- Merchant-Larios H, Popova L, Reyss-Brion M 1984b Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. *Dev Growth and Differ* 26(5):403-417.
- Minoura T 1921 A study of testis and ovary grafts on the hen's and their effects on the embryos. *J Exp Zool* 33:1-16.
- Mintz B 1948 Testosterone propionate minimum for induction of male development in anurans; comparative data from other vertebrates. *Proc Soc Exper Biol and Med* 69:358-361.
- Maraud R, Vergnaud O 1986 Development of interstitial cells in experimentally sex-reversed gonads of genetically female chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 63:464-470.
- Mittwoch U 1971 Sex determination in birds and mammals. *Nature* 231:432-434.
- Mittwoch U 1989 Sex differentiation in mammals and tempo of growth: possibilities vs. switches. *J Theor Biol* 137:445-455.
- Moore CR 1941 On the role of sex hormones in sex differentiation in the opossum *Didelphis virginiana*. *Physiol Zool* 14:1-45.

Münsterberg A, Lovell-Badge R 1991 Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113:613-624.

Padoa E 1942 Il differenziamento del sesso invertito mediante la somministrazione di ormoni sessuali. e é corticosurrenali. Ricerche con diidrofollicolina, progesterone e acetato di desossicorticosterone in *Rana esculenta*. *Pubbl Staz Zool Napoli*, 19:185-223.

Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, Chapelle A, Brown L 1987 The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104.

Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M 1989 Genetic evidence that the ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342:937-939.

Ryan KJ 1982 Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Can Res (suppl.)* 42:3342s-3344s.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. pp. 615-617. New York.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-badge R, Goodfellow PN 1990 A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.

Sutherland RL, Watts CKW, Clarke CL 1988 Oestrogen actions. In: *New comprehensive biochemistry, hormones and their actions*.I. Cooke BA, King RJB and van der Molen HJ (Eds.)Chap 12 pp.197-215. Elsevier (Ed)

Tereba A, McPhaul MJ, Wilson JD 1991 The gene for aromatase (P450 arom) in the chicken is located on the long arm of chromosome 1. *J Her* 82(1):80-81.

Thompson EA, Siiteri PK 1974 Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem* 249:5364-5372.

Tiersch TR, Mitchell MJ, Wachtel SS 1991 Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum Gen* 87:571-573.

Wallace R A 1978 Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: *Teh vertebrate ovary*. R. E. Jones (Ed) pp. 469-502. New York : Plenum publishing corp.

Weniger JE, Zeis A 1971 Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen Comp Endocrinol* 16:391-397.

Wilson JD, Leshin M, George FW 1987 The sebright bantam chicken and the genetic control extraglandular aromatase. *Endocrinol Rev* 8(4):363-376.

Witschi E 1929 Studies on sex differentiation and sex determination of the gonads of *Rana silvatica*, *J Exp Zool* 52:235-265.

Witschi E 1934 Genes and inductors of sex differentiation in amphibians. *Develop Biol* 9:460-488.

Witschi E 1939 Modification of the development in lower vertebrates and in mammals. In: *Sex and internal secretions* 2nd, ed. Allen, Danforth, Doisy (Eds) Ch.4 Baltimore. The Williams & Wilkins Company.

Wolff E, Ginglinger A 1935 Sur la transformation des poulets males en intersexués par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Arch Anat Hist et Embryol* 20:219-278.

Wolff E 1946 Recherches sur l'intersexualité expérimentale produite par la méthode des greffes de gonades à l'embryon de poulet. *Arch Anat Microscop et Morphol Expér* 36:69-91.

Wolff E, Wolff E 1951 The effects of castration on bird embryos. *J Exp Zool* 116:59-97.

Woods JE, Podczaski ES 1974 Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 24:413-423.

Woods JE, Podczaski ES, Erton LH, Rutherford JE, MacCarter CF 1977 Establishment of the adenohipophyseal-testicular axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 32:390-394.

Woods JE, Mennella JA, Thommes RC 1981 The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 45:66-73.

Woods JE, Erton LH 1978 The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 36:360-370.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

X. APÉNDICE

AGUA TRATADA CON DEPC

Colocar un litro de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 1000 ml. Agitar el contenido con una barra magnética y agregar 1 ml de DEPC. Mantener la solución en agitación hasta que el DEPC esté completamente disuelto en el agua. Cubrir el recipiente con papel aluminio y esterilizar a una presión de 15 libras, 40 minutos, dos veces.

FENOL SATURADO CON AGUA

Los cristales de fenol deben mantenerse almacenados a -20° C. Cuando se utilicen deben estabilizarse a temperatura ambiente. Bajo campana fundir los cristales en baño María. Colocar una barra magnética estéril dentro del frasco de fenol, añadir 100 ml de agua tratada con DEPC y dejar saturar a 4° C, 24 horas. Retirar el agua con una pipeta Pasteur estéril. Añadir 0.1 g de hidroxiquinoleína. Agregar 100 ml. de agua tratada con DEPC. Mantener la solución en agitación, 30 minutos y almacenarla a 4° C, 24 horas. Retirar el agua con una pipeta Pasteur estéril. Añadir 200 μ l de β -mercapto-etanol. Agregar 100 ml de agua tratada con DEPC, agitar 30 minutos y almacenar a 4° C.

SOLUCIÓN DE TIOCIANATO DE GUANIDINA

A 100 g de tiocianato de guanidina agregar 117.2 ml de agua tratada con DEPC, filtrada. Incubar en un agitador el reactivo a 65° C, 15 minutos.

Agregar 7.04 ml de citrato de sodio 0.75 M, pH 7.0. Añadir 10.56 ml de sarkosyl al 10% en agua tratada con DEPC. Agitar suavemente durante 10 minutos. Cubrir el frasco con papel aluminio y almacenar a temperatura ambiente.

Nota: El tiempo de almacenamiento de esta solución es de tres meses.

SOLUCIÓN 1

En un frasco estéril, tratado con DEPC añadir 5 ml de solución de tiocianato de guanidina. Agregar 36 μ l de β -mercapto-etanol. Cubrir el frasco con papel aluminio.

Nota: El tiempo de almacenamiento de esta solución es de un mes.

AMORTIGUADOR TBE 5X

A 500 ml de agua bidestilada en agitación agregar 30.25 g de tris, 15.425 g de ácido bórico y 1.86 g de EDTA- Na_2 . Ajustar a pH=7.2 y almacenar en un frasco color ambar a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE CARGA

Para preparar 10 ml agregar 0.2 ml de amortiguador TBE 5X, 10 μ l de SDS al 20%, 1 g Ficoll 400 al 10%. Por otro lado, preparar una mezcla de azul de bromofenol al 0.05% y verde de xilen-cianol al 0.05%. Agregar 1 ml de la mezcla de colorantes al amortiguador de carga. Almacenar a temperatura ambiente.