



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

01672

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

3
207

EFFECTO DE UN INHIBIDOR DE AROMATASA 1,4,6 -androstatriene-3,17-diona SOBRE LA DETERMINACION SEXUAL EN EMBRIONES DE POLLO

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A D A P O R :

HUGO ARTURO MEZA TORRES

DIRECTORES: MVZ. MC. Ph.D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ. EPA. JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ
MVZ. MC. ERNESTO AVILA GONZALEZ
MVZ. EPA. EZEQUIEL SANCHEZ RAMIREZ
DR. ENRIQUE PEDERNEA ASTEGIANO



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON



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 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.

**EFFECTO DE UN INHIBIDOR DE AROMATASA 1,4,6
-androstatriene-3,17-diona SOBRE LA DETERMINACION SEXUAL
EN EMBRIONES DE POLLO**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

por

Hugo Arturo Nieza Torres

**Directores: MVZ. MC. Ph.D. Guillermo Téllez Isaías
MVZ. EPA. José Antonio Quintana López
MVZ. MC. Ernesto Avila González
MVZ. EPA. Ezequiel Sánchez Ramírez
Dr. Enrique Pedemera Astegiano**

DEDICATORIA

A mis padres:

Marcos Meza Hernández e Imelda Torres García.

Por su amor, su apoyo, y el gran esfuerzo para darme una educación.

A mis hermanos:

Juan Antonio, Magaly, Gonzalo y Odilia

Por sus consejos y comprensión.

A mis amigos:

***Ezequiel Sánchez, Eduardo Mendoza, Marco Antonio Santillán,
Cuauhtémoc Bautista, Ramón Gallegos.***

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Departamento de Producción Animal: Aves

Al Departamento de Embriología

A la Facultad de Medicina

A mis asesores:

Por compartir sus conocimientos, su tiempo y enriquecer este trabajo

A mis amigos y compañeros de laboratorio:

**Enrique Pedernera, Carmen Méndez, Yolanda Gómez, Ana Figueroa,
Margarita González, Guillermo Téllez, Alfredo, Rodrigo Merino, Juan Merino**

A todos y cada uno de Ustedes, mil gracias

TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.	II
AGRADECIMIENTOS.	III
TABLA DE CONTENIDO.	IV
LISTA DE CUADROS.	VI
LISTA DE FIGURAS.	VII
LISTA DE TABLAS.	IX
RESUMEN.	1
SUMMARY.	2
INTRODUCCION.	3
Crianza por sexos separados.	4
Ventaja de criar machos.	4
Desarrollo embrionario.	5
La diferenciación sexual.	13
El factor determinante de testículos.	14
Formación y colonización de la cresta urogenital.	15
El desarrollo gonadal y su situación anatómica durante el desarrollo embrionario.	16
La esteroidogénesis.	19

Biosíntesis de las hormonas esteroides.	22
Andrógenos, estrógenos y la enzima aromatasa.	25
Inhibidores de aromatasa y antihormonas.	27
Administración exógena de esteroides.	28
Los esteroides como moduladores del sexo gonadal en las aves.	29
JUSTIFICACION.	33
HIPOTESIS.	34
OBJETIVOS GENERALES.	35
OBJETIVOS PARTICULARES.	36
MATERIAL Y METODOS.	38
ENSAYOS PRELIMINARES.	51
RESULTADOS.	52
DISCUSION.	62
CONCLUSIONES.	69
LITERATURA CITADA.	70
ANEXO.	98

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1.....	24
----------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.	8
Figura 2.	9
Figura 3.	10
Figura 4.	10
Figura 5.	11
Figura 6.	20
Figura 7.	21
Figura 8.	48
Figura 9.	49
Figura 10.	87
Figura 11.	88
Figura 12.	89
Figura 13.	90
Figura 14.	91
Figura 15.	92
Figura 16.	93
Figura 17.	94

Figura 18.	95
Figura 19.	96
Figura 20.	97

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.....	78
Tabla 2.....	79
Tabla 3.....	80
Tabla 4.....	81
Tabla 5.....	82
Tabla 6.....	83
Tabla 7.....	84
Tabla 8.....	85
Tabla 9.....	86

RESUMEN

Se evaluó la acción de un inhibidor de aromatasa de naturaleza esteroidea el **1, 4, 6-androstatriene-3,-17-diona (IA)**, sobre la determinación sexual y sobre cambios a nivel de las gónadas femeninas en embriones de pollo. A los 5 días de incubación, se inoculó sobre la membrana corioalantoidea (**MCA**) 20, 200, 1,000 y 2,000 µg de **IA**. Los parámetros evaluados fueron: Peso embrionario; porcentaje de machos y hembras en cada dosis; peso gonadal (seco y húmedo); conteo de poblaciones celulares en el ovario izquierdo; cuantificación en la biosíntesis de estrógenos y andrógenos *in vitro*; morfología gonadal del ovario izquierdo y cuantificación de la mortalidad embrionaria posterior a la inoculación del **IA**. Todo lo anterior se realizó a los 17 días de incubación. Los resultados obtenidos demostraron un aumento significativo ($P < 0.01$) en el peso húmedo del ovario izquierdo al comparar la dosis de 20 µg *versus* el testigo; en el peso seco se obtuvieron diferencias similares, al comparar los mismos grupos ($P < 0.05$). En lo que se refiere a la relación machos - hembras los resultados demuestran una diferencia significativa ($P < 0.05$) al ser comparados el grupo testigo vs 20 µg, obteniendo un mayor porcentaje de hembras en el grupo tratado. La morfología gonadal no presentó diferencia entre el grupo testigo *versus* el grupo tratado, ambos demuestran el arreglo celular de un ovario de embrión de pollo al estadio correspondiente, sin encontrar presencia de *ovotestis*.

En la cuantificación hormonal, no se encontraron diferencias significativas en la biosíntesis de estrógenos y andrógenos. Hubo una respuesta estadísticamente significativa ($P < 0.05$), en la producción de estrógenos al estímulo con la hormona gonadotropina coriónica humana tanto en el grupo testigo como en el grupo tratado con 20 µg de **IA**. La mortalidad provocada por la inoculación del **IA** de los grupos tratados *versus* el grupo control, no presentó diferencia significativa, a excepción de las dosis de 1,000 y 2,000 µg que registraron 100% de mortalidad en los embriones. En la dosis de 200 µg no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros anteriores.

SUMMARY

It was evaluated the action of an inhibitor of steroid aromatase **1,4,6-androstatriene-3,-17-dione (IA)**, on sexual determination and the female gonads changes produced in chick embryos. At the fifth day of incubation, 20, 200, 1,000 and 2,000 μg of **IA** was inoculated on the choriolantoidea membrane. The parameters evaluated were: embryo weight; percentage of males and females, gonads weight (dry and wet); count of cellular populations in the left ovary; *in vitro* quantification of androgens and oestrogens; morphology of the left ovary and quantification of embryo mortality. The evaluation were made at the 17th day of incubation. The results show a significative increase ($P < 0.01$) in the wet weight of the left ovary comparing the dosage of 20 μg *versus* control group; in the dry weight there was a similar difference when the same groups were compared ($P < 0.05$). In the male-female relationship the results showed a significative difference ($P < 0.05$) when the control group was compared vs. 20 μg , obtaining a biggest percentage of females in the treated group. There was no difference in the gonads morphology between the control group *versus* the treated group, both showed the cellular arrangement of an ovary of chick embryo in the corresponding stage, without presence of *ovotestis*. In the hormonal quantification there was no significative differences in the biosynthesis of androgens and oestrogens. There was a significative difference ($P > 0.05$) in the production of oestrogens after the application of human corionic gonadotropin, both in the control group and in the group treated with 20 μg of **IA**. There was no significative differences in the mortality produced after the inoculation of **IA** in the treated groups vs. control group, except in the dosage of 1,000 and 2,000 μg where it was 100% of mortality of chick embryos. There was no significative difference in the dosage of 200 μg in none of the anterior parameters.

INTRODUCCION

Durante los últimos dos siglos se han desarrollado más de 300 variedades y razas puras de pollos. Sin embargo, son pocas las que han sobrevivido comercialmente en la industria avícola para ser utilizadas por criadores en la actualidad **(51)**.

En los primeros días de la industria avícola comercial, la mayoría de los pollitos que se vendían representaban razas puras o variedades de las mismas. Sin embargo, gradualmente se fueron cruzando dos o más razas para mejorar la productividad, de manera especial en el caso de las aves criadas para producción de carne, se han desarrollado nuevas razas híbridas **(51)**.

En los últimos años la avicultura ha constituido un ejemplo de eficiencia productiva y cooperación en los niveles de alimentación de la población del país.

En el caso del pollo de engorda, la avicultura a evolucionado notablemente, así, tenemos que en el año de 1950 se lograba en 12 semanas obtener un producto terminado con una conversión alimenticia de 3.2 : 1, en la actualidad la avicultura ha experimentado un notable desarrollo en la producción de carne y huevo. El incremento en la producción de ambos se debe principalmente a los avances que han ocurrido en materia de genética, nutrición y sanidad, así como la creación de nuevos sistemas de manejo en la crianza y producción de aves. **(4,10,58)**.

Actualmente los sistemas de crianza de pollo de uno y otro sexo en el mismo lugar durante ocho semanas hace que el promedio de peso vivo de la parvada sea de 2.5 Kg, sin embargo el peso del macho es de aproximadamente 2.8 Kg y el de la hembra de 2.2 Kg. Razón por lo cual, se obtienen mejores ganancias con la crianza de machos. **(58)**.

Crianza por sexos separados

Para la formulación de alimento se debe tener un promedio de peso de machos y hembras, por lo cual la dieta para la hembra es demasiada e insuficiente para el macho. Según este concepto, constituye un beneficio potencial reducir el costo de alimentación, de manera que se proporcionen raciones alimenticias a machos y hembras que sean más reales a sus requerimientos nutricionales. Criar a las aves por sexos separados muestra menor variación de pesos, por lo cual resulta conveniente cuando la demanda de aves las exige del mismo tamaño **(51,58)**.

Ventajas de criar machos

El peso de los machos para mercado será de 0.5% más que las hembras, por cada día adicional que se mantengan con alimento. Los machos convierten el alimento a carne más eficazmente que las hembras; éste requiere 1.937 g de alimento para producir un kilogramo de peso vivo, mientras que las hembras requieren 2.150 g de alimento para producir el mismo peso. Esto indica una conversión alimenticia de 1.94 y 2.15 respectivamente. A las cuatro semanas de edad, los machos tienen 113% del peso de las hembras, y a las ocho semanas tienen 127%, éstos aprovechan con más eficacia las xantofilas del alimento que las hembras y crecen más rápido. Para producir 2.0 Kg requieren 49 días aproximadamente, mientras que las hembras requieren de 56 días, lo cual hace una diferencia de siete días. Las necesidades de energía para un crecimiento óptimo son mayores en machos que en hembras. Si se complementa energía a los machos, terminarán con más de 100 g que las hembras, pues éstas no responden igual al estímulo de energía; para un crecimiento óptimo, los machos requieren mayor porcentaje de proteína y aminoácidos **(51,58)**.

DESARROLLO EMBRIONARIO

Los huevos producidos por las aves poseen una gran cantidad de yema, generalmente presente en grandes gránulos llamados plaquetas de la yema. La yema se concentra hacia el polo inferior o vegetal del huevo, mientras que el citoplasma se concentra hacia el polo superior o animal. Estos huevos se les denomina **telolécitos** (yema terminal) **(83)**.

El desarrollo de un nuevo individuo comienza con la formación de óvulos y espermatozoides en miembros de la generación anterior. Durante la gametogénesis, la meiosis reduce el número de cromosomas del estadio diploide al estadio haploide, y hay una selección al azar de los genes específicos que se unirán en el nuevo individuo y guiarán su desarrollo **(7,83)**. Después de la ovulación y la fertilización que ocurre en el infundíbulo del oviducto, existe una rápida división celular (mitótica, denominada segmentación), esto ocurre aproximadamente tres horas después de haber sido fertilizado el huevo por el espermatozoide. Así, la división celular inicia en: 2, 4, 8, 16, 32. (Figura 1) **(7,33,83)**. La segmentación continua y da pronto origen a un proceso de desarrollo embrionario llamado mórula (del latín mora, por su aspecto esférico y segmentado), blástula (Figura 2) y gástrula, en ésta fase del desarrollo, el blastodermo o embrioblasto, como se llama a la membrana formada por la segmentación, es más delgado y más transparente en su parte central, denominada área pelúcida, y más grueso en sus bordes, que forman el área opaca, y es visible a simple vista cuando se abre un huevo fértil, (con un tamaño aproximado de 3.5 mm) (Figura 3) (estadio 3) **(7,29,33,58)**.

En los huevos **telolécitos**, al principio todos los planos de segmentación celular son verticales y todos los blastómeros se encuentran en un solo plano, los surcos de segmentación separan los blastómeros entre sí, pero no los separan de la

yema. Al continuar la segmentación se desprenden más células y se unen a las del centro, pero los nuevos blastómeros continúan también con la yema subyacente no segmentada. Los blastómeros centrales llegan a separarse de la yema subyacente por divisiones celulares con planos de segmentación horizontales. Así este tipo de segmentaciones (horizontales) separan un blastómero superior que es una célula con una membrana plasmática completa, separada de sus vecinas y de la yema, y un blastómero inferior que permanece conectado a la yema. Los blastómeros situados en el margen del disco y las células inferiores en contacto con la yema pierden finalmente las hendiduras que los separaban y se fusionan en un sincitio continuo con muchos núcleos, llamado **periblasto**, que no participa en la formación del embrión pero que se cree que divide la yema y pone su contenido nutritivo a disposición del embrión en crecimiento (83).

Los blastómeros libres con membranas plasmáticas completas están rodeados de dos capas, un **epiblasto** superior, y debajo de él una delgada capa de células epiteliales planas, el **hipoblasto**. Este está separado del epiblasto por una cavidad, el blastocele, y de la yema subyacente por otra cavidad, el espacio subgerminal, este espacio sólo aparece debajo de la porción central del blastodermo, (Figura 1) (83).

La gastrulación en las aves se efectúa por una forma de migración celular, las células del epiblasto se mueven hacia abajo aisladamente. Al principio, una banda de epiblasto que se extiende hacia delante en la línea media del embrión, desde el borde posterior del área pelúcida, se engrosa como la **línea primitiva**, con un surco estrecho, **el surco primitivo**, en su centro. en el extremo anterior de la línea primitiva hay un nudo engrosado de células, el **nudo de Hensen**. El engrosamiento del epiblasto en la faja primitiva es provocado por la migración de células procedentes de la parte lateral del epiblasto. Las células de éste se

invaginan en la línea primitiva, se desplazan al espacio situado entre el epiblasto y el hipoblasto y llegan a este último formando una masa de células móviles. Las células continúan emigrando, moviéndose hacia los lados y adelante desde la línea primitiva. Esta es una estructura dinámica y persiste aunque las células comprendidas en ella están cambiando constantemente al llegar procedentes del epiblasto, se hunden en la línea primitiva, luego se desplazan lateral y anteriormente en el interior. El *mesodermo* presuntivo crece lateralmente y anteriormente desde la línea primitiva, entre el epiblasto que se convierte en *ectodermo*, y el hipoblasto. Las células del hipoblasto original más otras células que emigran hacia la capa inferior desde la línea primitiva forman el *endodermo* (estadio 5) (Figura 2,3,4 y 5) **(7,29,33,83)**

Figura: 1

Etapas sucesivas de la segmentación de un huevo de gallina.

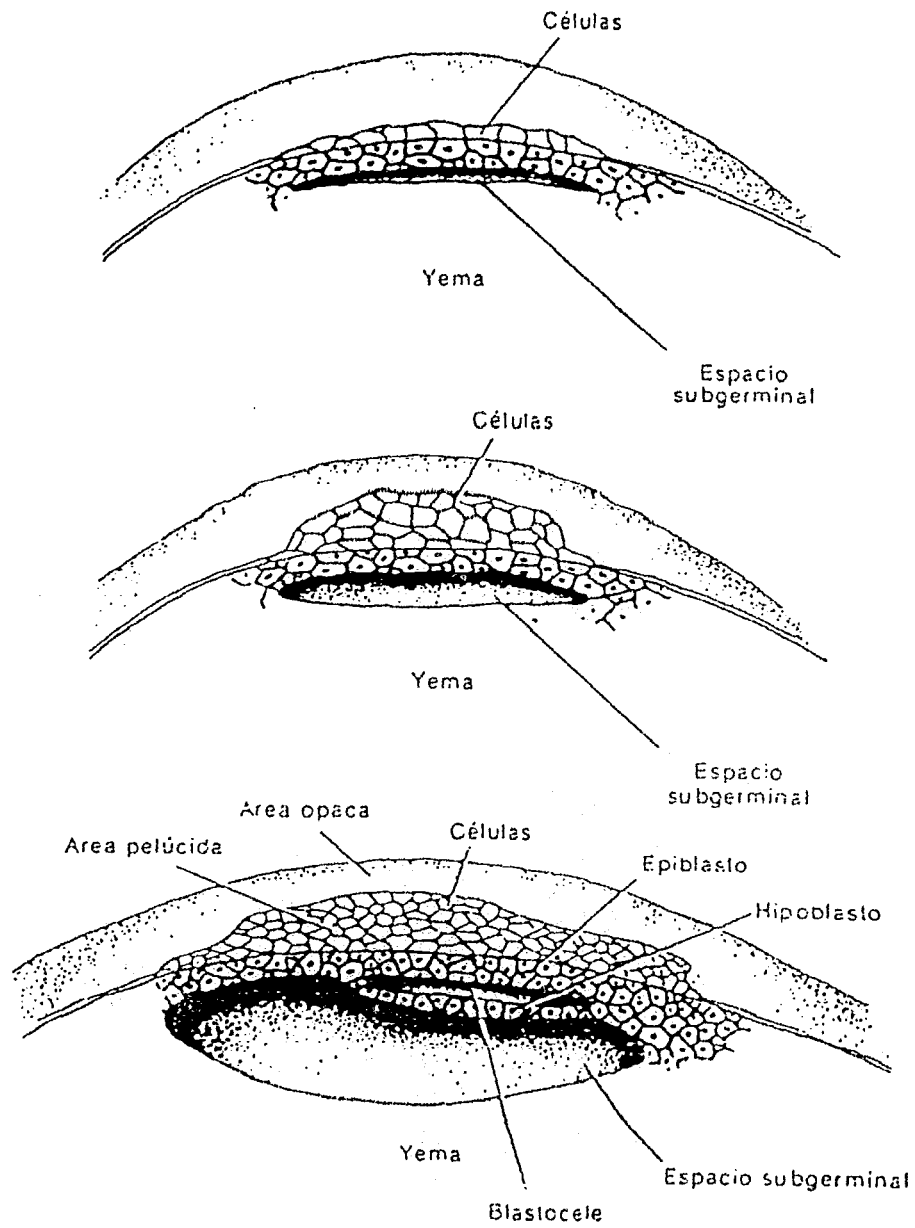
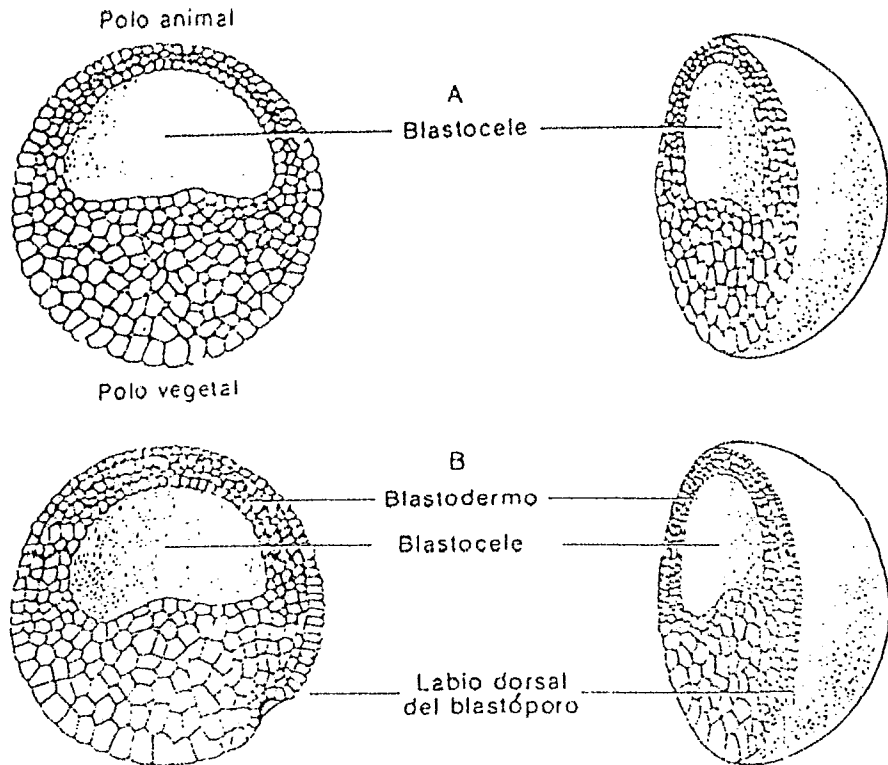


Figura: 2

Blastulación y gastrulación de un huevo de gallina.

a) Blastulación



b) Gastrulación

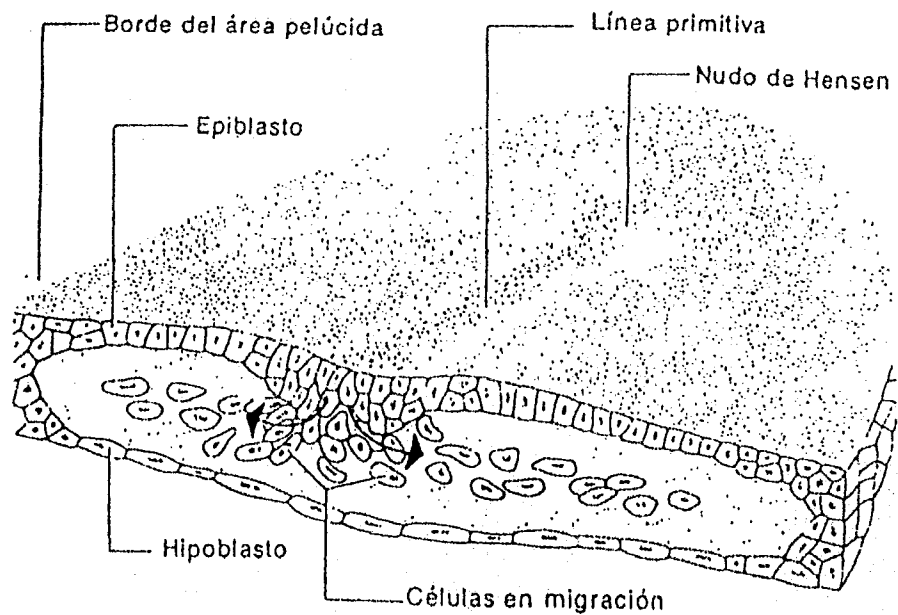


Figura: 3

Embrioblasto visto dorsalmente

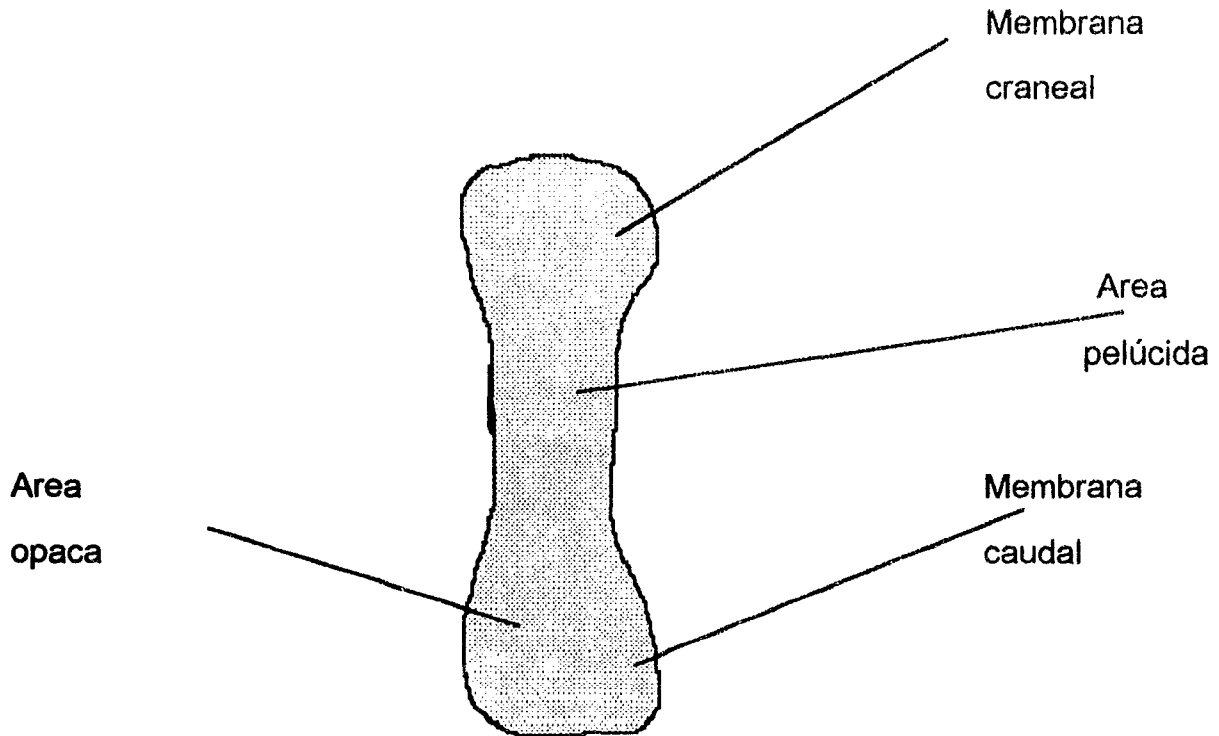


Figura: 4

Embrioblasto visto lateralmente

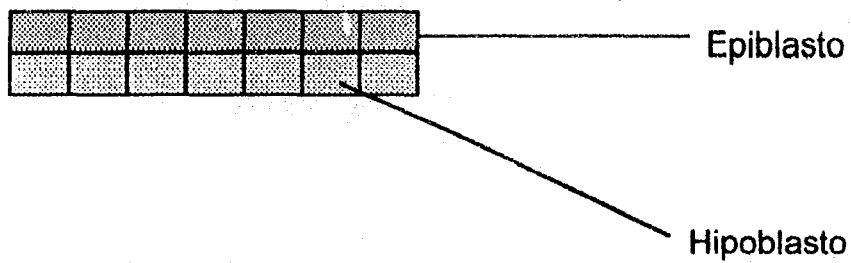
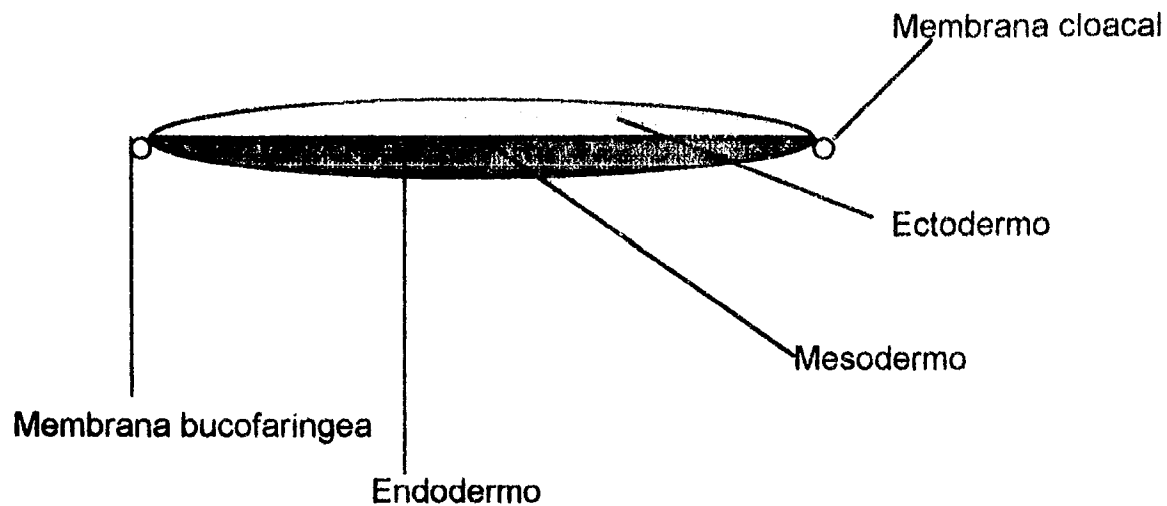


Figura: 5

Embrioblasto visto lateralmente y con un corte longitudinal



Posteriormente las tres capas germinativas básicas pueden comenzar a formar nuevos tejidos y la diferenciación de órganos. De esta manera, el *ectodermo* formará la piel, plumas y el sistema nervioso; el *endodermo*, originará el revestimiento del intestino y las glándulas del aparato digestivo y el aparato respiratorio; el *mesodermo*, dará origen a los músculos, el sistema vascular, los órganos reproductores y el sistema óseo (estadio 7) (7,29,33).

Siguiendo el desarrollo embrionario, con constantes óptimas en lo que se refiere al proceso de incubación (temperatura, humedad, ventilación y volteo), se inicia la organogénesis aproximadamente entre 26 a 29 horas de vida embrionaria (estadio 8) (29), iniciando con el desarrollo del neuroporo anterior como una abertura del tubo neural, que se ha formado por el cierre de los pliegues ectodérmicos. La parte anterior del cerebro a empezado a formarse en el extremo capital del tubo neural. El corazón aparece al segundo día, con una velocidad en el latido de 220/minuto. Al final del segundo día (estadio 12) (29), se forman ciertos pliegues hacia arriba del embrión que se aproximan gradualmente unos a

otros para formar un techo sobre dicho embrión. Cuando estos pliegues se unen, las dos capas internas se fusionan y las dos capas externas lo hacen también, de modo que la cubierta tiene una doble pared. La pared interna que rodea directamente a la cavidad que encierra al embrión se llama amnios, la pared externa se denomina corion. Durante el tercer día de incubación, el embrión descansa sobre su lado izquierdo. Al llegar este momento, se ha formado la alantoides como un desarrollo externo de la parte posterior del intestino (estadio 18) **(5,7,29,33)**.

A medida que el embrión aumenta de tamaño, la alantoides se extiende hasta que su superficie externa se pone en íntimo contacto con la superficie interna del corion. Según va reduciéndose la cantidad de clara del huevo, la alantoides se adapta estrechamente a la superficie interna del corion, que a su vez se apoya contra la membrana interna del cascarón (estadio 22) **(29)**. De este modo, la alantoides sirve de órgano respiratorio y excretor por medio del cual se recibe el oxígeno y se elimina el anhídrido carbónico y recibe las excreciones de los riñones del embrión. La alantoides absorbe los principios nutritivos de la clara y el calcio de la cáscara para la nutrición del embrión **(7,29,33)**.

Hacia el quinto día, en el embrión, se pueden observar varias características externas. La curvatura del embrión es tal que la cabeza y la cola se aproximan (estadio 25) **(29)**. El cerebro consta de tres partes, los ojos y el corazón son claramente visibles. Ciertas protuberancias correspondientes a las patas y a las alas indican los primordios de unas y otras. En esta época, el embrión del pollo es muy similar al embrión de cualquier mamífero **(7,33)**.

LA DIFERENCIACION SEXUAL

Los mecanismos por los cuales se determina el sexo de un individuo ha sido una de las grandes preguntas por los estudiosos de la embriología desde la antigüedad. Aristóteles, quien colectaba y disecaba embriones comentaba: "*Entre mayor sea la pasión al momento de la cópula, mayor será la probabilidad de obtener un macho*", además recomendaba tratar de copular en la primavera y así obtener al heredero.

Sus hipótesis acerca de la determinación sexual eran tres:

- 1.- La mujer fue un hombre en un estadio muy temprano de su desarrollo embrionario, pero se detuvo su evolución.
- 2.- La mujer es un hombre mutilado al que se detuvo su desarrollo, por que la frialdad del útero supero la calidez del semen del hombre.
- 3.- La mujer fue enfriada pasivamente, y los órganos sexuales femeninos no maduraron hasta el punto en que no son observables.

Galeno alrededor del año 200 escribió: El género humano es el más perfecto de todos los animales, sin embargo el hombre es más perfecto que la mujer, y la razón de esta perfección es su excesiva "pasión", esta condición es el instrumento primario natural... La mujer es menos perfecta que el hombre, respecto a sus partes generativas. Estas partes fueron formadas en ella cuando era un feto, pero no pudieron emerger hacia el exterior por falta de calor (63).

Sin embargo hoy en día se conoce que la diferenciación sexual de las gónadas es un proceso secuencial, ordenado que tiene diferentes niveles (13,27,53,63). El sexo de un embrión es determinado en el momento de la fecundación por el mecanismo genético **XX o XY** en los mamíferos, y **ZZ o ZW** en las aves. 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) (22,34,35). Entonces el genotipo del cigoto, determina la naturaleza de las gónadas, las cuales a su vez determinarán el fenotipo macho o hembra. Aunque el sexo genotípico es fijado al momento de la fertilización, el sexo fenotípico del embrión no se manifiesta hasta pasado un tiempo (13,22,53).

El factor determinante de testículos

Estudios hechos en humanos demostraron que el cromosoma "Y" existe un gen denominado **SRY** (siglas de Sex determining Region of the Y chromosome o región determinante del sexo en el cromosoma Y), (en los demás mamíferos el gen se le ha denominado **Sry**), éste se localiza en el brazo corto del cromosoma Y en una región de 15 Kb, el cual al transcribirse produce el **FDT "factor determinante de testículos"** (11,13,22,24,27,30,65,71,77). El **FDT**, juega un papel importante y se le ha considerado como el "switch" para otros genes involucrados en la determinación sexual (13).

Un principio general en el desarrollo del fenotipo macho requiere la acción de sustancias producidas por los testículos, en la ausencia específica de estas sustancias o la falta de capacidad de responder a éstas el fenotipo resultante será el de hembra (22,30,82).

Se ha mencionado que en las aves posiblemente existen genes remanentes con homología al **FDT** (13). Es posible que el **FDT** estimule algunos genes activando

con ello la síntesis de la **hormona anti mulleriana (HAM)** y de algunas enzimas (aromatasa P450 Arom), que intervienen en la síntesis de esteroides gonadales. Actuando sinérgicamente con el **FDT**, para la determinación sexual de machos, la **HAM** causa regresión de los conductos mullerianos en el embrión y puede actuar como agente para la formación de testículos. Entre otras acciones puede también regular los niveles gonadales de hormonas esteroides a través de inhibir al complejo enzimático aromatasa **(13,22,23,27,30,60,63,75,82,89)**.

Varios genes son los encargados de la determinación sexual, la presencia de una porción de el cromosoma Y, y otros genes son esenciales para iniciar el desarrollo de cordones sexuales en el tejido conectivo de las gónadas indiferenciadas, que se unirán y formarán la rete testis en el testículo ya diferenciado **(22,60,63,)**.

La parte codificadora de la información genética para el **FDT** aparece por separado del área del cromosoma que codifica para el antígeno H - Y, este es un antígeno menor de histocompatibilidad, y que solamente se ha determinado en los machos **(46,53,70,78,80)**.

Formación y colonización de la cresta urogenital

En las aves (*Gallus gallus*), a los 2.5 días de incubación (estadios 16 - 17) **(29)**, el epitelio dorsal, formado de 2 a 3 capas de células, da lugar a la cresta urogenital, esta región es colonizada posteriormente por las células germinales primordiales, las cuales se ubican inicialmente en el endodermo del saco vitelino.

En los embriones las células germinales primordiales se localizan en la pared del saco vitelino cerca del alantoides (en los capilares, en la región posterior de la arteria onfalomesentérica). Durante las primeras 23 a 29 horas de incubación (estadio 7 - 8) **(29)**, las células germinales primordiales, se separan del

endodermo y son acarreadas a través de los vasos sanguíneos, en este trayecto se dice que realizan movimiento pasivos, más tarde aproximadamente a las 60 horas de incubación (estadios 15 - 18) (29), las células germinales primordiales salen de los vasos sanguíneos en el mesodermo esplácnico posterior de la arteria onfalomesentérica. Hacia los 3 y 4.5 días de incubación (estadio 20 - 24) (29), las células germinales primordiales, migran rumbo a la cresta urogenital llevando a cabo movimientos ameboides; a esta forma de desplazamiento se le da el nombre de movimiento activo.

Se ha propuesto que éstas células son llevadas a su destino a través de los vasos sanguíneos, y que posiblemente responden a un factor quimiotáctico emitido por la gónada indiferenciada. Aunque todavía no se han elucidado los mecanismos que dirigen el trayecto de las células germinales primordiales, se ha observado que la fibronectina, que es una glicoproteína de 220 Kilodaltons la cual forma parte de la matriz extracelular, está presente en las rutas migratorias de las células germinales primordiales hacia la gónada indiferenciada y dependiendo del lugar que colonicen (corteza = ovario o médula = testículo), la gónada indiferenciada, desarrollará la morfología previamente implícita (1,17,18,42,43,92).

El desarrollo gonadal y su situación anatómica durante el desarrollo embrionario

En las aves (*Gallus gallus*), las gónadas indiferenciadas son un par de eminencias longitudinales llamadas crestas o pliegues gonadales situadas a ambos lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal.

El desarrollo del sistema genital, es una fase que ocurre en la diferenciación de todos los individuos. El desarrollo de las gónadas es una situación única en el

desarrollo embrionario. Todos los demás órganos rudimentarios normalmente se diferencian al órgano del cual ya existe uno determinado embriológicamente. Un pulmón rudimentario o en desarrollo solamente podrá convertirse en el órgano definitivo pulmón, y un hígado rudimentario únicamente se transformará en un hígado funcional, sin embargo las gónadas rudimentarias se podrán diferenciar teniendo 2 opciones. Cuando este órgano se diferencie puede hacerlo hacia ovario o hacia testículo. Antes de que se determine la decisión se puede hablar de que las gónadas aún no han sido diferenciadas, durante este tiempo no existen características femeninas ni masculinas **(63)**.

En el desarrollo embrionario de las aves la formación de gónadas indiferenciadas ocurre aproximadamente entre las 84 y 96 horas (estadios 22-23), y permanece en su estado indiferenciado hasta el día 5 ó finales de éste (estadios 25-27) **(29,33)**. Durante este estado indiferenciado, una vez que las células germinales primordiales han llegado a la cresta urogenital, se establecen distintos grupos celulares (gonocitos y células mesenquimatosas) de manera irregular, y son rodeadas por células mesenquimatosas. Posteriormente hay una invasión de vasos sanguíneos que, junto con las células del mesénquima separan la gónada del tejido mesonéfrico. A continuación se forma una lámina basal que rodea al epitelio genital.

En el embrión macho la diferenciación gonadal se caracteriza por la separación que ocurre entre el tejido medular y el epitelio celómico. Las células germinales primordiales 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. Los cordones sexuales se extienden dentro del tejido conectivo (médula), estos cordones se fusionan unos con otros para formar dentro de la médula la *rete testis* y los tubulos seminíferos Durante el desarrollo fetal las células mesenquimales

intersticiales de los testículos se diferenciarán a células de Leydig, que son las encargadas de producir testosterona. Las células de los cordones testiculares procedentes del epitelio celómico se diferenciarán a células de Sertoli, las cuales nutrirán el espermatozoide y son las encargadas de secretar la hormona antimülleriana **(22,26,30,63,68,82)**. Existen investigaciones que han demostrado que en el cromosoma Y existen genes que determinan la presencia de la línea celular de Sertoli, que es el primer tipo celular en diferenciarse **(22,30,37)**.

En las hembras, las células germinales se instalan cerca de la superficie de la gónada indiferenciada (corteza), los cordones sexuales machos empiezan a degenerar, sin embargo el epitelio, inicia un nuevo tipo de cordones sexuales, los cuales no penetran dentro del tejido mesenquimal, sino que permanecen cerca de la superficie (corteza) de la gónada, estos cordones se empiezan a ramificar formando esferas, las células germinales se convierten en ovos que son rodeados por el epitelio de los cordones sexuales, que se diferenciarán en células de la granulosa. Las células mesenquimales del ovario se diferenciarán en células de la teca, juntas las células de la teca y las células de la granulosa formarán los folículos, que envuelven a las células germinales y secretarán hormonas esteroideas. Cada folículo contiene una célula germinal.

Una de las características particulares de la clase aves presente en la mayoría de las especies, es la asimetría ovárica (que inicia a partir del séptimo día). 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 conducto de Müller izquierdo queda intacto y serán diferenciados en oviducto, (infundíbulo, magnum, istmo, útero y cloaca), mientras que los conductos de Wolff, empiezan a degenerarse **(5,41,63,71)**.

La esteroidogénesis

La biosíntesis de hormonas esteroides aparece únicamente en el phylum de los vertebrados incluyendo los mamíferos, aves, reptiles, anfibios, teleosteos, peces, elasmobranquios, y miembros del género *Agnatha* (lampreas). También ha sido descrito en algunos protocordados como el *Amphioxus*.

Los esteroides son un grupo de compuestos que exhiben un amplio espectro de efectos biológicos, entre los que destacan la homeostásis hidroelectrolítica, el dimorfismo sexual y la función reproductiva. Son lípidos no saponificables, poco solubles en agua y que tienen en común el poseer como núcleo químico básico el ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 6), este hidrocarburo cíclico está constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono. La introducción de un grupo metilo en el C-13 del ciclopentanoperhidrofenantreno constituye un hidrocarburo de 18 átomos de carbono denominado *estrano* (figura 7), que es la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad estrogénica. La introducción de un grupo metilo en el C-10 del estrano constituye un hidrocarburo de 19 átomos de carbono denominado *androstano* (figura 7), que es la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad androgénica. La adición de 2 átomos de carbono en el C-17 del androstano constituye un hidrocarburo de 21 átomos de carbono denominado *pregnano* (Figura 7), que es la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad progestacional. Finalmente, la adición de una cadena lateral alifática de 6 átomos de carbono en el C-20 del pregnano, constituye un hidrocarburo de 27 átomos de carbono denominado *colestano* (Figura 7), que es la estructura básica del precursor común de todas las hormonas esteroides, el colesterol.

La mayor parte de estas hormonas sintetizan en las glándulas de secreción interna (suprarrenal, ovario y testículo)

(5,13,20,23,35,39,50,57,67,71,72,73,74,83).

Figura: 6

*Representación convencional del ciclopentanoperhidrofenantreno,
núcleo químico básico de los esteroides.*

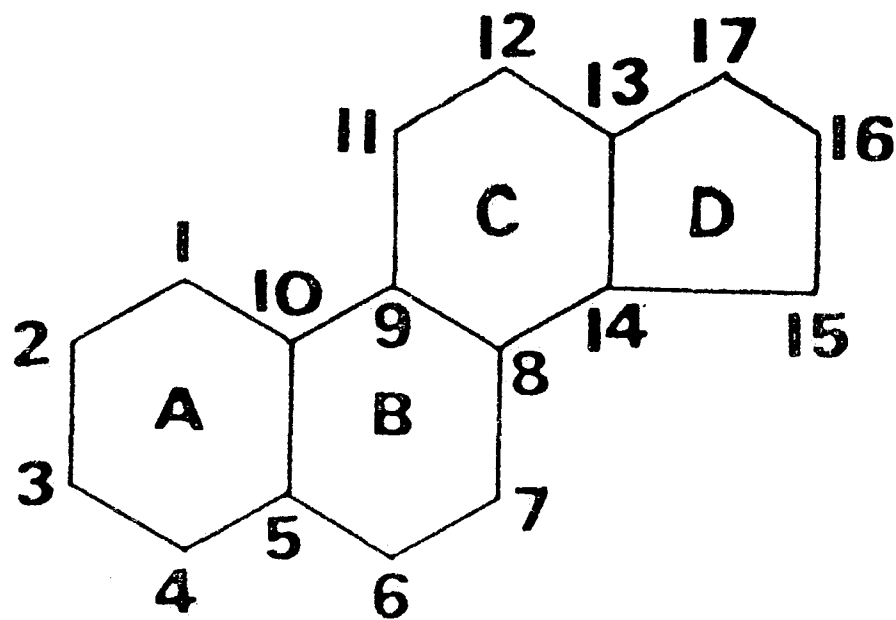
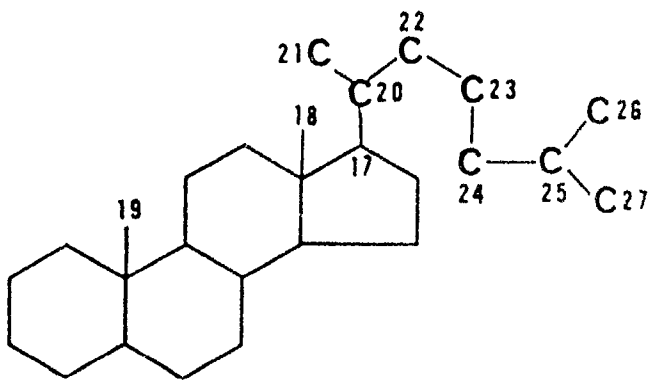
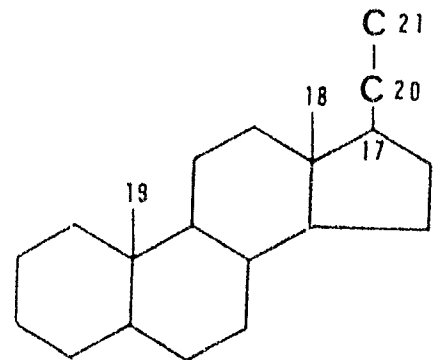


Figura: 7

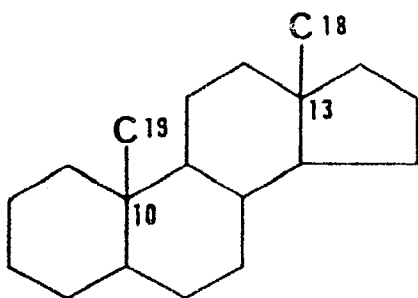
Hidrocarburos básicos de las diferentes hormonas esteroides.



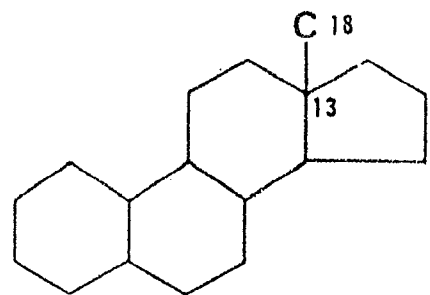
C₂₇-Colestano



C₂₁-Pregnano



C₁₉-Androstano



C₁₃-Estrano

Biosíntesis de las hormonas esteroides

Como todas las hormonas esteroides, para poder iniciar la biosíntesis de estas necesitan de un precursor, que es el colesterol, después mediante catalizadores se biosintetizarán progesteronas, andrógenos y por último estrógenos.

Las hormonas esteroides involucradas en el desarrollo del fenotipo masculino durante la vida embrionaria, de la virilización, espermatogénesis y desarrollo de las estructuras sexuales secundarias masculinas en el adulto, son los andrógenos. Su estructura química básica es la del hidrocarburo androstano, constituido por 19 átomos de carbono, con sustituciones específicas (Figura 7).

El primer paso en la ruta de biosíntesis de los andrógenos lo constituye la conversión a nivel mitocondrial (Cuadro 1), de colesterol a pregnenolona, que tiene como paso limitante la hidroxilación enzimática en C-20.

Los andrógenos inducen en el sistema nervioso central del embrión masculino un fenómeno conocido como virilización hipotalámica, por medio del cual se establece en el macho un patrón de secreción tónica (no cíclica) de gonadotropinas hipofisarias y un patrón de conducta sexual masculina a partir de la pubertad y durante la vida del adulto. **(6,12,24,63,64,67,87).**

Una de las áreas más controvertidas de la determinación sexual secundaria involucra el desarrollo y comportamiento específico de cada sexo: En las aves canoras la testosterona es la hormona involucrada en el crecimiento de racimos de neuronas específicas en el encéfalo. Todos los machos cantan elocuentemente, mientras que las hembras el canto lo desarrollan muy poco. La capacidad de cantar es controlada por seis diferentes racimos de neuronas en el encéfalo aviar, los axones de las neuronas conectan entre sí a cada racimo. En los machos se ha observado que estos núcleos de neuronas son más grandes que en las hembras. Entonces se ha demostrado que la testosterona se ve

involucrada en el canto de las aves, y se ha observado que en adultos machos existe una correlación entre la "cantidad" de canto y la concentración de testosterona sérica **(23,24,63,64,87)**.

Los andrógenos poseen, además, una gran actividad anabólica y por lo tanto su administración es seguida de un incremento significativo en la síntesis proteica.

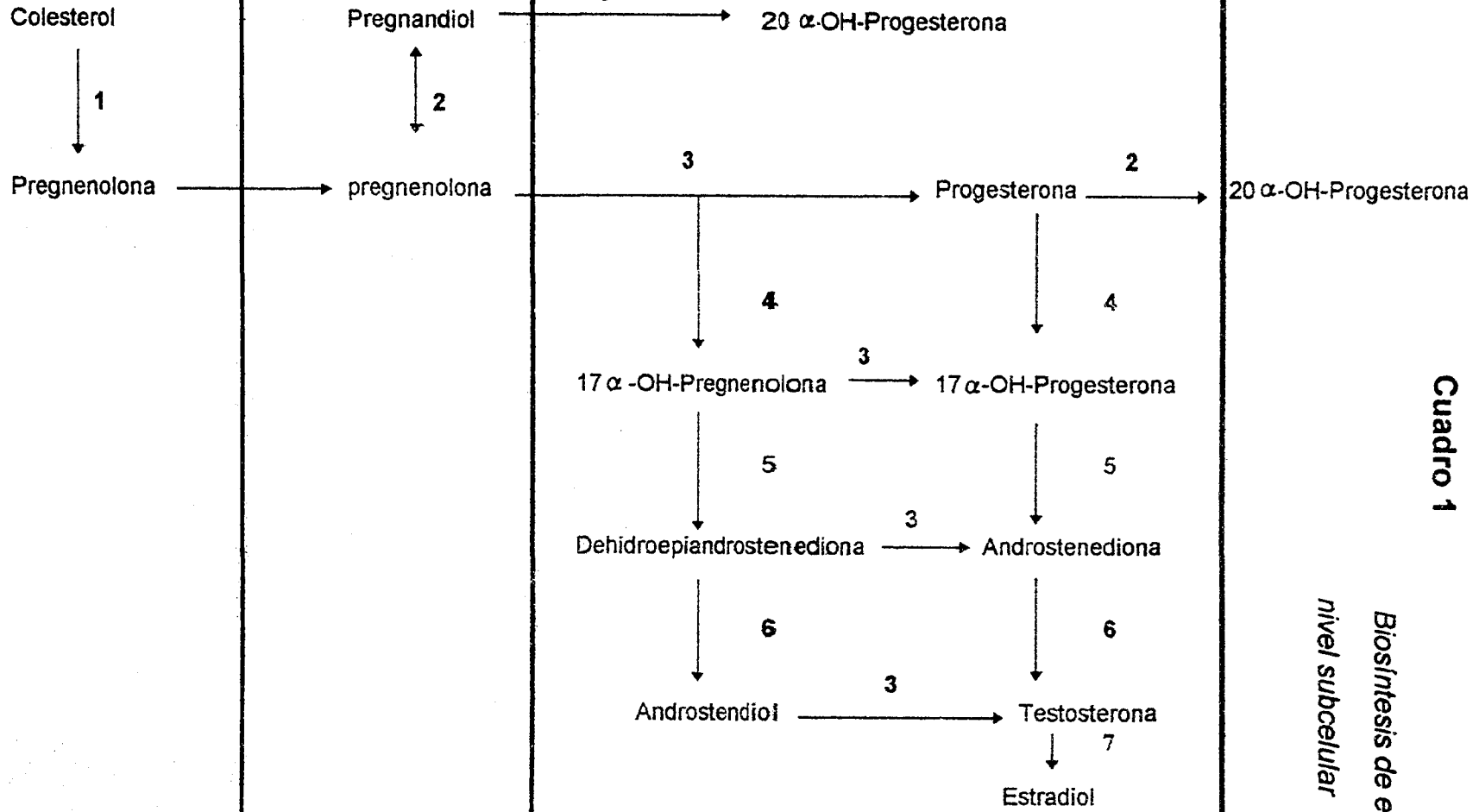
Los andrógenos auto-regulan su síntesis testicular al modular la biosíntesis y liberación de gonadotropinas hipofisiarias **(20,23,63,85,87)**.

Mitocondrias

Citosol

Reticulo endoplasmico

Citosol



- 1) P-450scc
- 2) 20 α HSD
- 3) 3β-HSD
- 4) 17 α Hidroxilasa
- 5) C1720 Liasa
- 6) 17βHSD
- 7) Aromafasa

Cuadro 1

Biosíntesis de esteroides a nivel subcelular

Andrógenos, estrógenos y la enzima *aromatasa*

Como ya se había mencionado, la biosíntesis de esteroides aparece únicamente en el phylum de los vertebrados. Los estrógenos constituyen un grupo de hormonas esteroides responsables de la construcción del fenotipo femenino en la etapa pospuberal, al estimular el desarrollo de las estructuras sexuales secundarias. 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 los péptidos liberados por el hipotálamo y las hormonas hipofisarias, los estrógenos controlan la conducta reproductiva femenina de las aves **(3,9,63,72,87)**.

La estructura química básica de los estrógenos es la del hidrocarburo estrano, constituido por 18 átomos de carbono (Figura 7). La biosíntesis de los estrógenos se realiza a partir de acetato utilizando el colesterol, la androstenediona y la testosterona como intermediarios obligatorios. A partir de los andrógenos, la biosíntesis de estrógenos se efectúa a través de una secuencia de reacciones enzimáticas, genéricamente conocida como proceso de aromatización, indicando la transformación del anillo A neutro de los andrógenos en un anillo aromático. La biotransformación de un andrógeno a un estrógeno (aromatización) requiere tres oxidaciones consecutivas, cada una de las cuales consume una mola de oxígeno y una mola de NADPH. Este proceso que se inicia por la hidroxilación enzimática en el carbono 19, constituye el paso limitante y es catalizado por la 19-esteroide hidroxilasa de localización microsomal, a continuación se introduce un segundo grupo hidroxilo, con la consecuente eliminación estereoespecífica de un átomo de hidrógeno y por la pérdida de una molécula del carbono-19, que se elimina como ácido fórmico. Los complejos enzimáticos que participan en el proceso de aromatización están íntimamente relacionados con el citocromo P-450. En efecto,

la administración experimental *in vivo* o *in vitro* de inhibidores de citocromo P-450 se ha utilizado para bloquear la bioconversión de andrógenos a estrógenos **(13,62,67,79,82)**.

En muchas especies de vertebrados que han sido examinados, la expresión de la aromatasa ocurre únicamente en las gónadas y el encéfalo. La biosíntesis de estrógenos en el encéfalo esta implicada en el comportamiento sexual tales como deseo de copular y la frecuencia de ésta acción, así como un marcado dimorfismo sexual.

La enzima aromatasa en pollos machos "normales", la cantidad es expresada en pequeñas cantidades, mientras que en las hembras esta enzima se encuentra en mayor proporción, y no solamente se encuentra a nivel de las gónadas, sino que también se localiza a nivel de encéfalo, barbillas, cresta, pulmón, bazo, buche glándulas adrenales, corazón, molleja, tejido adiposo, glándula uropigea, riñón, intestino, músculo, hígado, oviducto y piel, determinando así el patrón de emplume propio de las hembras y machos **(64,87)**.

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 (3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona), la androstendiona (4-androsten-3,17-diona) y la testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona). Los andrógenos ováricos no aromatizables incluyen a los 5 α -reducidos como la 5 α -dihidrotestosterona, la 5 α -androstan-3,17-diona, la androsterona y la epiandrosterona, así como el 5 α -androstan-3-17-diol y su epímero β **(12,83)**.

Recientes investigaciones han demostrado que el gen que codifica la síntesis de la enzima aromatasa se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 en la posición 0.16 (76).

Inhibidores de aromatasa y antihormonas

Hoy en día existe una fuerte demanda en terapéutica endocrinológica, de compuestos con actividad antagonista hormonal, lo que estimuló el desarrollo de moléculas sintéticas esteroideas y no esteroideas que impiden los efectos adversos de las hormonas esteroideas naturales en ciertas condiciones patológicas (producción hormonal anormal, neoplasias hormono dependientes) (36,79).

Para su uso clínico, las antihormonas deben de poseer baja toxicidad y muy poca o nula actividad hormonal intrínseca. El mecanismo de acción de estos compuestos antagonistas se ejerce a través de su unión a los sitios activos del receptor, en forma competitiva con la hormona natural impidiendo así su expresión biológica (transcripcional y posttranscripcional). En efecto, el antagonista se une al receptor, y, a nivel nuclear, se acumulan complejos antagonista-receptor. Esta acumulación produce una depleción sostenida de la población citoplasmática de receptores y, además, altera las funciones del receptor en el genoma celular.

En la actualidad no se dispone aún de compuestos con actividad antihormonal ideales, debido esencialmente a que su comportamiento farmacológico puede variar en función de la dosis, vía de administración, modo de empleo y aún de variaciones interespecie. Por ejemplo, el tamoxifen es un potente antiestrógeno en aves y anfibios, mientras que en el humano, según la dosis, tiene efectos antiestrogénicos pero también estrógenicos y, por el contrario, en roedores y en el perro, su actividad es completamente estrogénica (12).

Los inhibidores de aromatasa actúan de 2 formas: Pueden actuar inhibiendo la enzima aromatasa por la unión en el sitio activo, o bien pueden interferir con la reacción de hidroxilación por la unión del citocromo P-450.

La inhibición de la enzima P-450 arom, es la reconstrucción de un extenso sistema de esteroides sintetizados de isómeros 19R.

Algunas características de los inhibidores de aromatasa es que deben de ser muy similares a los esteroides naturales y deben de poseer las características de ser lípidos no saponificables, poco solubles en agua (hidrofóbicos), solubles en solventes orgánicos (49).

Administración exógena de esteroides

Esta técnica ha sido 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 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*, (19), y *Rana Sylvatica* (44). El efecto del estradiol fue radical sobre la especie *Rana temporaria* al ser aplicado en dosis altas (19), mientras que en la *Rana esculeta* se requería de dosis bajas para lograr el efecto feminizante (54).

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, se 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 (8).

Los esteroides exógenos como moduladores del sexo gonadal en las aves

Existen trabajos en los cuales se observa el papel fundamental de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal de las aves.

Wolff y Ginglinger en 1935 (88), administraron 17β - estradiol a embriones de pollo y observaron la feminización de las gónadas y estructuras sexuales accesorias.

Wolff en 1951, al castrar embriones de pato, vio que éstos desarrollaban un fenotipo masculino independiente del sexo genético.

Wolff en 1979 administro estradiol a embriones de pollo machos y obtuvo como resultado la formación de *ovotestis* y una alteración en la secreción de esteroides por las gónadas (88).

Maraud y Vergnaud en 1986, realizaron un experimento en el cual administraron su proyecto experimental en 4 grupos, de embriones de pollo de tres días de incubación: El primer grupo consistió de embriones de pollo fenotípicamente hembras a las que se les realizo un injerto celómico de 2 testículos donados de un embrión de pollo de 13 días de incubación; el segundo grupo experimental fue igual que el primero, además se le administro una dosis de tamoxifen diluido en un medio oleoso; al tercer grupo únicamente se la administro tamoxifen (igualmente diluido en el medio oleoso); y el cuarto y último grupo fue el testigo al que solamente; se le aplico el medio oleoso. Todos los embriones fueron sacrificados antes de terminar el período de incubación. Los resultados fueron los siguientes:

Los embriones del grupo que recibió el injerto de los testículos, presento un alto porcentaje de células intersticiales y sus gónadas fueron fuertemente masculinizadas, en comparación con los embriones hembras a los que unicamente se les aplico el medio oleoso (grupo testigo). Comparando el grupo

testigo y los embriones a los que se les aplicó el tamoxifen únicamente, no presentaron diferencias significativas en lo que se refiere al porcentaje de células intersticiales y el volumen gonadal.

La influencia masculinizante de los testículos injertados fue interpretada como una consecuencia de la inhibición de estrógenos debido a la hormona antimulleriana secretada por los testículos injertados (38).

Koo y col; aplicaron tamoxifén (un antagonista estrógeno) en huevos fértiles, antes de ser incubados, la dosis que utilizaron fue 0.25 a 2.0 mg/huevo, de esta manera los resultados que obtuvieron fue el bloqueo de la regresión de la gónada derecha y su respectivo conducto de Muller, sin alterar la histología interna de la gónada (34).

Scheib y col, (1984), aplicaron tamoxifen en huevos embrionados de codorniz con genotipo hembra a los 15 días de incubación y observó que en el ovario izquierdo hay una marcada inhibición del epitelio germinal de la corteza, mientras que en la médula de ambas gónadas se desarrolla un arreglo cordonal (61).

Vigier y col; trabajando con ovarios fetales de oveja, expuestos a dosis de hormona antimulleriana, observaron que estos secretaron testosterona en lugar de estradiol. De ésta manera provocaron una reversión sexual debido a la supresión de la actividad de la aromatasa. La hormona antimulleriana actúa provocando un descenso de la biosíntesis de la aromatasa, bloqueando de esta manera la actividad de esta enzima. Asimismo la hormona antimulleriana bloquea completamente los efectos del AMPc.

Otras investigaciones de estos mismos autores indican que la actividad esteroidogénica basal de los ovarios fetales de conejo es extremadamente baja, pero esta puede ser incrementada por el AMPc **(82)**.

Estudios hechos por Elbrecht (1992), utilizando un inhibidor de la enzima aromatasa (**(±) 5 - (p-cy-anophenyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazol [1,5]-pyridine hydrochloride**)), producto que impide que se catalice la conversión de testosterona a estradiol (durante los primeros 7 días del desarrollo embrionario); provocó un nacimiento de 100% de machos. Lo que sugiere que la reversión sexual solamente se puede llevar a cabo durante los primeros 7 días de desarrollo embrionario, tiempo durante el cual las gónadas se encuentran en estado indiferenciado y con capacidad bipotencial **(13,63)**.

Entonces se puede resumir que el tratamiento de hormonas, antihormonas e inhibidores de aromatasa inyectadas en la albúmina durante el desarrollo embrionario han demostrado alterar morfológicamente algunos órganos con efectos tales como: La reversión sexual de hembras a machos; virilización del encéfalo, los conductos de Wolff y del hipotálamo; así como atrofia de los conductos de Muller; presencia de espermatogénesis en animales genotípicamente hembras y con bajas concentraciones séricas de estradiol y altos niveles de testosterona, que persisten hasta su estado adulto **(6,11,82,84)**.

Los resultados anteriores soportan la hipótesis que el balance de los esteroides gonadales es necesario en ciertos tiempos del desarrollo, para obtener la diferenciación morfológica adecuada **(53,63)**.

Lo que permiten suponer que el potencial resultante de la manipulación de sustancias endocrinas "*in ovo*", pueden resultar en un alto beneficio económico

para la avicultura, ya que es posible tratar a embriones en estadios tempranos del desarrollo y modificar el fenotipo sexual obteniéndose así mejores parámetros productivos, en menor tiempo y a precios de producción más bajos.

JUSTIFICACION

Debido a la gran explosión demográfica que sufren los países del mundo y alto costo al que se produce un kilogramo de proteína de origen animal, se pretende que esta investigación ofrezca resultados que ayuden a la industria avícola a producir mejores parvadas, con costos más bajos y con mayores índices de productividad, al obtener en su mayoría pollos fenotípicamente machos.

Esto, de igual manera, podría asegurar a la industria avícola nacional un nivel de competitividad internacional, en lo que se refiere al mercado del pollo de carne, satisfaciendo las necesidades internas del país.

HIPOTESIS

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. Además se ha propuesto que existen genes que se activan a partir del **SRY**, capaces de codificar para la expresión de la hormona anti Mulleriana, y ciertas enzimas que intervienen en la síntesis de hormonas esteroides. Investigaciones anteriores han demostrado que los estrógenos son requeridos para que se lleve a cabo la diferenciación sexual del ovario.

De acuerdo a los antecedentes se propone que la enzima aromatasa P-450, catalizadora de estrógenos, podría estar regulando la diferenciación gonadal del ovario.

Razón por lo cual se propone que la administración de un inhibidor de aromatasa **1,4,6-androstatriene-3,17-diona (62)**, a los 5 días de incubación (estadio 26) **(29)**, en huevos fértiles, (vía membrana corioalantoidea) **(15,32,45)**, provocará una reversión sexual hacia el fenotipo macho, obteniéndose un porcentaje mayor al 50%, de embriones con características del sexo masculino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, aplicado vía membrana corioalantoidea en embriones de 5 días de incubación (estadio 26) **(29)**, es capaz de producir reversión sexual en embriones de pollo, obteniendo así un porcentaje mayor al 50% en el fenotipo macho de la población.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Cuantificar la dosis necesaria del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, para poder producir la reversión sexual, de hembras a machos.
- * Determinar posibles cambios de peso en los embriones tratados con el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.
- * Cuantificar la relación embrionaria de hembras - machos, en los grupos testigo y tratados con diferentes dosis del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.
- * Cuantificar el peso gonadal (peso húmedo y peso seco), en los embriones testigo y tratados a diferentes dosis del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.
- * Cuantificar la población celular de las gónadas embrionarias, de los grupos testigo y tratados con diferentes dosis del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(2,40,62,81)**.
- * Observar las características morfológicas de las gónadas de los embriones de los grupos testigo y tratados **(14,16,21,28,47,55)** con el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.

* Cuantificar los niveles de hormonas esteroideas (testosterona y estradiol) de los embriones de los grupos testigo y tratados con el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, por medio de la técnica de radioinmunoanálisis **(25,56)**.

* Cuantificar la mortalidad embrionaria posterior a la inoculación del 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, en cada uno de los grupos (testigo y tratados).

MATERIAL Y METODOS

Para llevar a cabo la presente investigación y obtener resultados confiables se utilizaron 2790 huevos fértiles de gallina de la raza Leghorn, que fueron obtenidos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensionismo en Producción Avícola (C.E.I.E.P.A.), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Posteriormente para poder permitir el desarrollo embrionario, los huevos fueron incubados a 37.7°C, con una humedad relativa de 60%. Al día 5 de incubación (estadio 26) **(29)**, se verificó la viabilidad de los huevos embrionados con la técnica de ovoscopia, desechando los huevos no fértiles o con mortalidad embrionaria. Los huevos del grupo 1, fueron el grupo testigo, a los cuales se les inyectó 100 µl de etanol al 10%.

Los grupos de huevos "tratados", con el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, (el cual fue adquirido de Laboratorios STERALOIDS, INC. Wilton, New Hampshire 03086 U.S.A.), fueron el 2, 3, 4 y 5, los cuales fueron inyectados vía membrana corioalantoidea **(15,32,45)** con dosis de 20, 200, 1,000 y 2,000 µg respectivamente.

Diseño experimental:

El experimento se realizó 10 veces. Cada experimento estuvo formado por 3 grupos de 30 huevos cada uno, y cada grupo experimental fue procesado de la siguiente manera:

Grupos	Dosis del inhibidor de aromatasa	Día de inoculación	Número de huevos
Testigo	100 μ l de etanol al 10%	5°	30
1	2 μ g/100 μ l de etanol al 10%	5°	30
2	20 μ g/100 μ l de etanol al 10%	5°	30
3	200 μ g/100 μ l de etanol al 10%	5°	30
4	1,000 μ g/100 μ l de aceite de cacahuete	5°	30
5	2,000 μ g/100 μ l de aceite de cacahuete	5°	30

Posteriormente al día 17 de incubación (estadío 43) (29) los embriones fueron recolectados de la incubadora para realizar los siguientes estudios:

1) Determinación del peso de los embriones a los 17 días de incubación en los diferentes grupos experimentales

Esta determinación se realizó en todos los embriones de pollo a los 17 días de incubación, (estadio 43) **(29)**, con la finalidad de determinar posibles cambios de peso en el embrión por causa de la acción de las dosis de 2, 20, 200, 1,000 y 2,000 μg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.

Para esto se procedió a abrir la cáscara del huevo, primero se fracturó el cascarón, posteriormente se cortó éste con la utilización de unas tijeras de disección, se localizó el embrión y se tomó del cuello con la ayuda de unas pinzas, posteriormente se cortó los residuos del vitelo y las membranas adheridas. El peso individual de cada embrión se realizó en una báscula granataria (marca Mettler tipo P-120 de origen Suizo).

2) Determinación del sexo fenotípico de los embriones a los 17 días de incubación

La determinación del sexo fenotípico de los embriones a los 17 días de incubación, se realizó por medio de la observación macroscópica de las gónadas "*in situ*".

Una vez que los embriones llegaron al estadio 43 **(29)**, (17 días de incubación), y después de realizar el peso de los embriones, éstos se decapitaron por medio del corte de cuello con la ayuda de unas tijeras de disección, posteriormente se procedió a realizar una laparotomía exploratoria de todos los embriones para poder determinar el sexo fenotípico de cada uno. La determinación del sexo fenotípico se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

3) Peso de las gónadas femeninas (Peso seco y peso húmedo)

Posterior al sexado fenotípico de los embriones se realizó una ovariectomía unilateral izquierda, verificando no maltratar a la gónada. El ovario una vez disecado fue sumergido en una caja de Petri conteniendo solución salina fosfato amortiguada (libre de calcio y magnesio) con un pH de 7.4.

Peso húmedo.

Después de acabar de disecar cada uno de los ovarios fueron depositados en el interior de tubos Eppendorf sellándose así herméticamente, para evitar una posible desecación.

Los tubos Eppendorf fueron pesados antes y después de haber introducido el ovario en su interior.

El pesado de los tubos antes y después se realizó con la ayuda de una balanza analítica (marca Mettler tipo B-5 de origen Suizo). De esta manera el peso exacto de cada ovario fue obtenido por una sustracción.

Peso seco.

La técnica para determinar el peso seco de los ovarios se realizó de la siguiente manera: Después de la ovariectomía unilateral izquierda, y posterior al disecado total del ovario, cada uno de éstos fue colocado sobre un trozo de papel aluminio limpio y previamente pesado en una balanza analítica (marca Sartorius GMBH tipo 7085-011, de fabricación Alemania).

Posteriormente los trozos de papel conteniendo a los ovarios fueron introducidos en una estufa a 110°C (Marca National Appliance Co. modelo 310 USA) durante un tiempo de 24 horas. Al término de las 24 horas los trozos de papel fueron

nuevamente pesados. Así por medio de una sustracción se pudo conocer el peso exacto de cada una de las gónadas deshidratadas.

4) Cuantificación celular de las gónadas femeninas

La técnica de cuantificación celular de los ovarios se realizó en los embriones hembra a los 17 días de incubación, (estadío 43) (29).

Después de la laparotomía exploratoria en todos los embriones se inició la ovariectomía unilateral izquierda; una vez realizada la extracción del ovario izquierdo éste fue totalmente disecado. La disociación enzimática del ovario fue realizada en 1 ml de una solución de tripsina al 0.25%, siendo el solvente una solución salina fosfato amortiguada (libre de calcio y magnesio) con un pH de 7.4, posteriormente el vial conteniendo a los ovarios se colocó en una incubadora con agitación con una temperatura de 37°C y 90 ciclos por minuto durante 10 minutos. Al término de éste tiempo los ovarios fueron disociados con la ayuda de aspiración por medio de pipetas Pasteur durante un lapso de 10 minutos, hasta que el ovario fue totalmente disociado a células.

La acción de la enzima tripsina fue detenida por medio de la adición a la suspensión celular de un inhibidor de tripsina al 0.50% disuelto en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco suplementado con albúmina sérica bovina al 0.1%. Muestras dobles de la suspensión celular fueron contadas con la ayuda de una cámara cuenta glóbulos rojos Newbauer.

Las células fueron clasificadas como:

a) células germinales teniendo un diámetro mayor a 25µm, este tipo de células poseen su núcleo excéntrico

- b) Células somáticas con inclusiones lipídicas con un diámetro de 20 μm o menos, éstas células poseen dentro de su citoplasma 5 ó más vesículas lipídicas, y
- c) Células somáticas con un diámetro menor a 20 μm sin inclusiones lipídicas **(2,40,56,81)**.

5) Estudio morfológico gonadal

Se realizó un estudio morfológico por medio de microscopía óptica, en la cual se trabajo a las gónadas de los embriones de 17 días de incubación (estadío 43) **(29)**. Después de la laparotomía exploratoria en todos los embriones se inició la ovariectomía unilateral izquierda; una vez realizada la extracción del ovario izquierdo éste fue fragmentado con la ayuda de navajas limpias (el tamaño de cada muestra fue de 1 mm aproximadamente), los fragmentos se fijaron con glutaraldehído al 3%, en buffer de cacodilato de sodio 0.15 M (Electron Microscopy Sciences USA) por un lapso de 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente las muestras fueron lavadas 3 ocasiones por un tiempo de 15 minutos cada uno con cacodilato de sodio 0.15 M La deshidratación, se realizó mediante etanol en concentraciones crecientes que van de 10 en 10%, iniciando en 40%, pasando por etanol al 96% hasta llegar al etanol absoluto, los cambios se realizaron cada 15 minutos. La última deshidratación se realizó en óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences USA) durante un tiempo de 15 minutos. La preinclusión se efectuó con mezcla de resina epóxica (poly/bed 812) y óxido de propileno 1:1(Polysciences Inc. Warrington) durante 24 horas y 3:1 de 24 a 48 horas. Antes de realizar la inclusión definitiva, las muestras se cubrieron en resina epóxica fresca durante 2 horas para después incluirlas en moldes planos. La

polimerización de la resina se efectuó a temperatura de 35°C, 45°C y 60°C, con un tiempo de 12 horas en cada temperatura.

Posterior a esto se realizó corte semifinos (0.5 - 1.0 μm) en el ultramicrotomo (marca Reichert Jung tipo 701201 de origen Alemán), los cortes se tiñeron con azul de toluidina, se fijo con calor y se observó al microscopio de luz, para localizar áreas representativas de las muestras **(40,47,55)**.

Además se tomaron fotografías representativas de cada muestra en un microscopio con cámara integrada (marca Reichert Jung tipo 6526-01 de origen Austríaco)

6) Radioinmunoanálisis

Esta técnica se realizó de manera similar a la cuantificación celular de las gónadas, después de la disociación celular, la acción de la tripsina se detuvo lavando las células con inhibidor de tripsina al 0.50% disuelto en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco adicionado con albúmina sérica bovina al 0.1%, y 0.1 mM de metil - isobutil - xantina. La suspensión celular fue filtrada en una malla de nylon, para evitar el paso de partículas mayores a 25 μm . Posteriormente se centrifugó a 1,000 rpm durante 15 minutos, al finalizar, se decantó el sobrenadante y se agregó 5 ml de medio de cultivo modificado por Dulbecco adicionado con albúmina sérica bovina al 0.1%, y 0.1 mM de metil - isobutil - xantina, se resuspendió el botón de células y otra vez se centrifugó a 1,000 rpm durante 15 minutos, después de esto se decantó el sobrenadante y se agregó 400 μl de medio de cultivo modificado por Dulbecco adicionado con albúmina sérica bovina al 0.1% y 0.1 mM de metil - isobutil - xantina con. Para el control de la viabilidad de las células se realizó con la prueba de exclusión de azul tripano. (100

µl de azul tripano, más 90 µl de medio de cultivo modificado por Dulbecco suplementado con albúmina sérica bovina al 0.1% y adicionado con 0.1 mM de metil - isobutil - xantina, y 10 µl de la suspensión celular.

La incubación se realizó en viales (muestras por triplicado de cada grupo experimental, más un vial como blanco con 1,000 µl de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco adicionado con albúmina sérica bovina al 0.1% y con 0.1 mM de metil - isobutil - xantina) a 37.0°C en un baño con agitación continuo a 90 ciclos por minuto, con 5% de CO₂ y 95% de aire, durante 120 minutos. Para estimular la secreción de las hormonas se añadió 1.0 UI/ml de gonadotropina coriónica humana al medio de incubación (25,56).

Al final de la incubación se colectó el medio y se cuantificó el contenido de las hormonas esteroides (estradiol y testosterona) en el medio por radioinmunoanálisis que a continuación se describe:

CURVA ESTANDAR.

1) Pipetear por duplicado 200 µl de muestra titulada de testosterona o estradiol según sea el caso a cada tubo de ensaye. Preparar el tubo control de cuentas totales, el de unión no específica y el de unión en presencia de un estándar.

2) Pipetear por duplicado 200 µl de las muestras problema.

3) Añadir 100 µl del esteroide tritiado a todos los tubos (aproximadamente 4,000 cuentas por minuto).

4) Añadir 200 μ l de antisuero antiesteroide (testosterona o estradiol) (DU PONT, USA) a todos los tubos excepto al tubo de cuentas totales y al de la unión no específica, a estos últimos añadir 200 μ l de buffer RIA.

5) Agitar rápidamente y tapar.

6) Llevarlos al baño maría a 37.0 °C por una hora.

7) Incubarlos otra hora más en el cuarto frío a 4.0 °C, agregar a todos los tubos (menos a los de las cuentas totales), 500 μ l de carbón activado que se prepara al momento de usarse y mantener en suspensión con agitación (25,56).

8) Diez minutos después del último tubo al que se le añadió carbón activado, se centrifuga a 1,500 rpm durante 15 minutos.

9) Vertir el sobrenadante en viales y agregarles 6.4 ml de líquido de centelleo, tapar y agitar 30 segundos en vortex.

10) Limpiar los viales con alcohol y colocarlos en el contador de centelleo (Beckman LS60001C) para ser leídos durante 4 minutos cada uno.

CURVAS DE COEFICIENTE DE VARIACION INTRA E INTERENSAYO.

Se utilizaron las curvas estándar derivados de 4 radioinmunoanálisis para estimar los coeficientes de variación; la figura 8 representa la curva estándar de los radioinmunoanálisis donde se muestra el porcentaje de unión con respecto a la cantidad de testosterona, expresada en picogramos por tubo, detectándose la sensibilidad del mismo.

El radioinmunoanálisis presenta un coeficiente de variación interensayo de 12.9% y un coeficiente de intraensayo de 4.6%

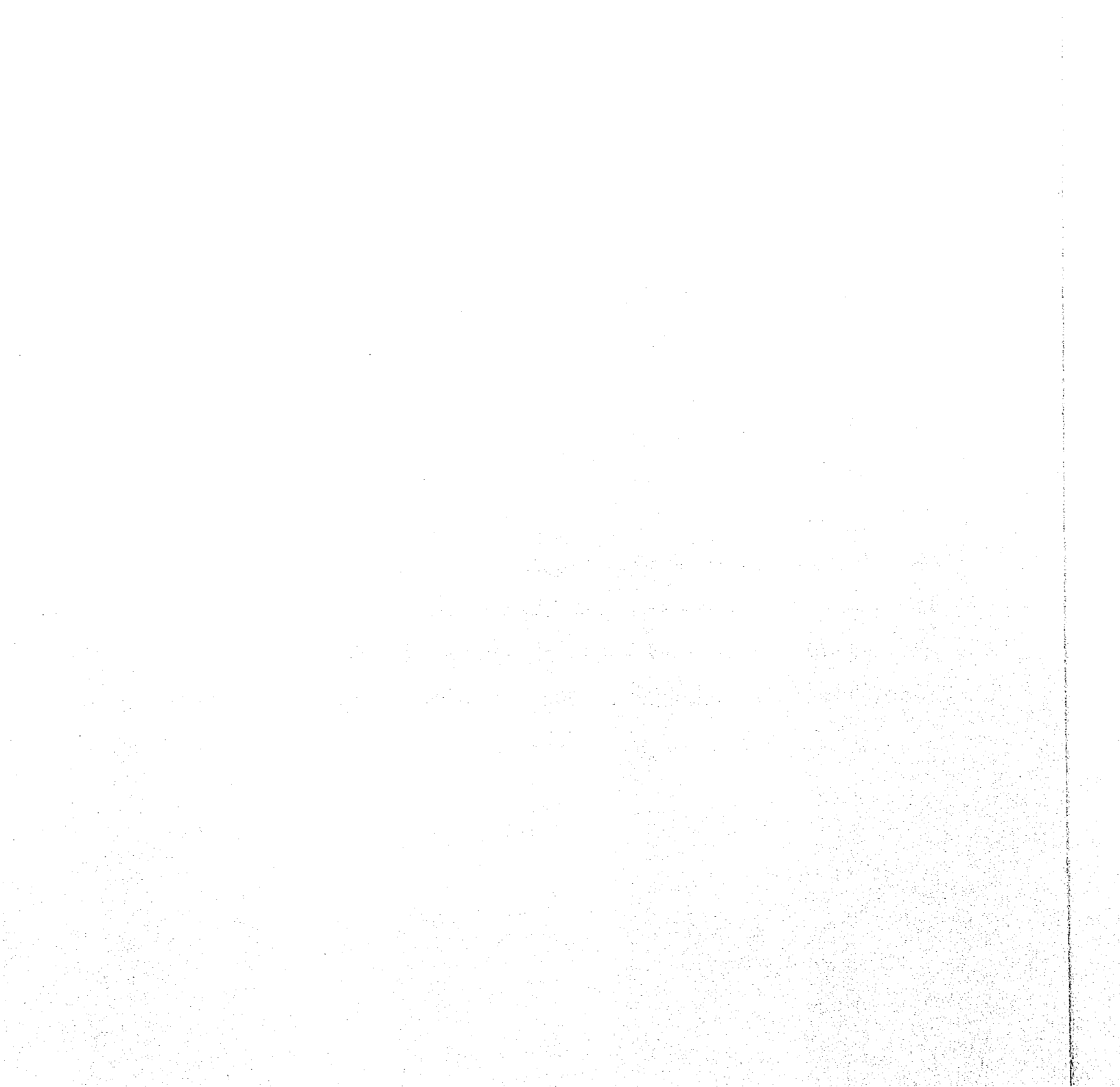
La figura 9 representa la curva estándar de estradiol y su coeficiente de variación interensayo es de 11.035 y el coeficiente de variación intraensayo es de 4.9%, por lo que se consideran modelos confiables y reproducibles.

Figura 8

**Curva estándar de testosterona de los radioinmunoanálisis
donde se muestra el porcentaje de unión**

Figura 9

**Curva estándar de 17 β estradiol de los radioinmunoanálisis
donde se muestra el porcentaje de unión**



7) Cuantificación de la mortalidad embrionaria a los 17 días de incubación (post inoculación del inhibidor de aromatasa)

El criterio utilizado para la cuantificación de la mortalidad embrionaria debida a la inoculación del inhibidor de aromatasa fue el siguiente:

La mortalidad embrionaria antes de los 5 días (estadío 23) **(29)**, no fue tomada en cuenta, de igual manera los huevos no fértiles fueron desechados por medio de la técnica de ovoscopia, de esta manera unicamente se cuantificó la mortalidad embrionaria posterior a la inoculación (hasta el día 17 de incubación, estadío 43) **(29)**, del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.

8) Análisis estadístico

Los resultados obtenidos serán analizados por medio de la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, que permitirá la comparación de los todos los grupos. Para analizar cambios en el porcentaje de machos y hembras se utilizará la prueba de Chi cuadrada **(66,69,93)**.

ENSAYOS PRELIMINARES

Para determinar la dosis necesaria capaz de provocar una reversión sexual en los embriones de pollo, se inocularon dosis crecientes de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (62). Las dosis que se inocularon fueron las siguientes: 2, 20, 200, 1,000 y 2,000 μg de inhibidor de aromatasa / embrión de pollo. Posterior a la inoculación se favoreció el desarrollo de los embriones (por medio de la incubación artificial, con sus constante ya señaladas), al llegar a los 17 días de incubación (estadío 43) (29), se procedió a sacrificar a los embriones de pollos de cada grupo.

Por medio de la inspección morfológica macroscópica de las gónadas se encontró lo siguiente:

A dosis de 2.0 μg , no se identificaron cambios en la morfología (reversión sexual indicada por la presencia de *ovotestis*, o bien cambios de coloración y tamaño) de ovarios o testículos según fue el caso.

A dosis de 20 μg , se encontró aumento del tamaño de los ovarios, otro fenómeno que llamó la atención fue el porcentaje de hembras superior al de machos, y siempre mayor que en los otros grupos (testigo y tratados con 2.0 y 200 μg)

Al inocular 200 μ del inhibidor de aromatasa / embrión, no causó efectos como los mencionados en la dosis antes descrita.

Las dosis de 1,000 y 2,000 μg registraron mortalidad de 100% en los embriones inoculados.

Con base en los resultados obtenidos y la repetibilidad de los fenómenos, decidimos trabajar con los siguientes grupos experimentales:

Grupo testigo, grupo inoculado con 20 μg y grupo tratado con 200 μg de inhibidor de aromatasa.

RESULTADOS

Efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, en el peso de los embriones.

Para determinar posibles cambios de peso en el embrión por causa de la acción de las dosis de 20 µg y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (**62**), con respecto al grupo testigo, se realizó el peso individual de los embriones de pollo.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias numéricas, pero sin valor estadístico entre los tres grupos de embriones (el grupo testigo y los grupos a los que se les administró 20 µg y 200 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (**62**) (Tabla 1; Figura 10).

Grupo testigo

En el grupo testigo el peso promedio de ambos sexos fue: 17.11 gramos, con una desviación estándar de: 3.45 gramos. (La población total de este grupo fue 286 embriones) (Tabla 1 Figura 10).

Los pesos promedio por sexo del grupo testigo fueron:

Machos: 17.18 gramos, con una desviación estándar de: 3.43 gramos.

Hembras: 17.09 gramos, y una desviación estándar de: 3.11 gramos (Tabla 2 Figura 11).

Grupo 20 µg

Al realizar el análisis estadístico, este grupo no mostró diferencia estadística significativa. Los pesos promedio de los embriones en ambos sexos fue de: 17.00 gramos, y una desviación estándar de 3.23 gramos, (el número de embriones en este grupo fue de 303 embriones) (Tabla 1 Figura 10).

Los pesos promedio por sexos de este grupo fueron:

Machos : 17.23 gramos, con una desviación estándar de: 2.87 gramos.

Hembras: 16.56 gramos, y una desviación estándar de: 3.46 gramos (Tabla 2 Figura 11).

Grupo 200 µg

Este grupo no presentó diferencia estadística significativa, siendo el promedio de peso de los embriones en ambos sexos fue: 17.72 gramos, y su desviación estándar fue de: 3.60 gramos (la población total de este grupo fue: 165 embriones) (Tabla 1 Figura 10).

El promedio de peso en cada sexo, de este grupo fueron:

Machos: 17.91 gramos, y su desviación estándar de: 3.59 gramos.

Hembras: 17.52 gramos, y una desviación estándar de: 3.59 gramos (Tabla 2 Figura 11).

Efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, en el sexo fenotipico de los embriones.

Cuando se comparó, el grupo testigo con el grupo tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), en la relación de embriones hembras y machos. Obteniéndose un porcentaje mayor al 50% (56.76%) en la cantidad de hembras en el grupo tratado con 20 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)** (Tabla 3 Figura 12).

Con una dosis 10 veces mayor (200 µg del inhibidor de aromatasa), se obtuvo mayor porcentaje de machos, siendo los resultados similares a los del grupo testigo (Tabla 3 Figura 12).

Es pertinente mencionar que en todos los experimentos hubo siempre una tendencia positiva a encontrar mayor porcentaje de hembras que de machos en el grupo tratado con 20 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**.

Efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, en el peso de las gónadas femeninas (peso seco y peso húmedo).

Peso húmedo

Los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico del peso húmedo de las gónadas femeninas de los embriones a los 17 días de incubación, (estadio 43) (29), de los grupos testigo y tratado con 20 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (62), demostraron una diferencia altamente significativa, registrando el grupo tratado con 20 µg del inhibidor de aromatasa, el mayor peso (4.98 ± 1.40 mg n = 20 vs 3.95 ± 0.96 mg n = 20) ($F = 7.42.$, $P = 0.0097$). (Tabla 4 Figura 13).

Al realizar el estadístico comparativo entre el grupo testigo y los grupos tratados con 20 y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (62), nuevamente el grupo de 20 µg demostró tener el mayor peso con una diferencia significativa ($P < 0.05$) (Tabla 4 Figura 13).

El menor peso húmedo del ovario lo registró el grupo testigo, por el contrario el mayor peso húmedo lo obtuvo el grupo tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa, registrándose una diferencia entre ambos grupos de 1.03 mg indicando que el grupo tratado presentó un peso de 26.07% mayor al grupo testigo (Tabla 4).

El peso húmedo del grupo tratado con 200 µg de inhibidor de aromatasa (62), no mostró diferencia significativa, presentando valores muy similares a los del grupo testigo, con una diferencia de peso de 0.01 mg para el grupo tratado.

Peso seco.

Al realizar el análisis estadístico del peso seco de los ovarios, se observó que al ser comparados el grupo testigo, con el grupo tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa, existe diferencia estadísticamente significativa, registrando un mayor peso el grupo tratado, (0.70 ± 0.16 n = 20 vs 0.60 ± 0.14 n = 20) (F = 5.18., P = 0.0285) (Tabla 5 Figura 14).

El grupo tratado con 200 µg de inhibidor de aromatasa (**62**), presentó un valor de 0.57 mg y un desviación estándar de 0.13 mg, valores muy similares a los del grupo testigo (Tabla 5 Figura 14).

Efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, en la población celular de las gónadas.

Los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico en el conteo de células que componen al ovario izquierdo de los embriones de pollo a los 17 días de incubación, en los diferentes grupos experimentales mostraron diferencias numéricas pero sin significado estadístico (Tabla 6 Figura 15).

Cabe mencionar que el grupo tratado con 20 μg de inhibidor de aromatasa demostró poseer el mayor número de células, pero este incremento no supera el 5% respecto a los valores del grupo testigo (Tabla 6 Figura 15).

Los resultados del conteo celular para el grupo tratado con 200 μg , demostraron que este grupo presento el menor porcentaje de células siendo menor aún que el valor del grupo testigo (1.43%) (Tabla 6 Figura 15).

Efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, sobre la morfología ovárica en los grupos testigo y tratado con 20 µg.

Al realizar la observación (en un microscopio de luz) detallada del montado de los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, se localizaron áreas representativas (panorámica, corteza y médula) de cada una de las muestras tanto del grupo testigo, como del grupo tratado con 20 µg del inhibidor de aromatasa (Figuras 16 y 17).

Los cortes histológicos de ambos grupos demostraron poseer una morfología similar, con células propias de un ovario izquierdo de embrión de pollo en su estadio correspondiente (43) **(21,28,29)**. Las células observadas fueron: Células germinales u ovocitos, células indiferenciadas con inclusiones lipídicas en su citoplasma (células típicamente esteroideogénicas) y células indiferenciadas o mesenquimatosas (sin inclusiones lipídicas) **(56)** (Figuras 16 y 17).

A nivel de corteza se encontraron tanto células epiteliales, como células germinales u ovocitos formando "nidos" de ovocitos, rodeados por un epitelio simple, además de tejido conectivo, más abajo hacia la zona medular se encuentran islotes de células indiferenciadas con inclusiones lipídicas (células típicamente esteroideogénicas productoras de andrógenos) **(21,56)**, que aparecen dispersas entre las células mesenquimatosas sin inclusiones lipídicas, células pregranulosa, además se observan espacios lagunares propios de esta zona (Figuras 16 y 17).

Efecto del inhibidor de aromatas 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, en la producción de hormonas esteroides (testosterona y estradiol), en cultivos celulares *in vitro* con y sin estimulación de la hormona gonadotropina coriónica humana en los grupos testigo y tratados con 20 µg.

Los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico de la producción de estradiol, por los cultivos celulares *in vitro* de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatas 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, demostraron diferencias numéricas, pero sin valor estadístico significativo (Tabla 7 Figura 18).

En lo que respecta al análisis estadístico en la producción de testosterona, por los cultivos celulares *in vitro* en los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatas 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, no fueron analizados estadísticamente ya que sólo 2 valores de 21 analizados presentaron valores por arriba de 5.0 picogramos (siendo el valor límite inferior para ser detectado), estos 2 valores presentaron un valor superior a 5.0 picogramos debido a la estimulación de la hormona gonadotropina coriónica humana (Tabla 8; Figura 19).

Los datos anteriores demuestran que la biosíntesis de andrógenos por los cultivos celulares *in vitro* de ovario de embrión de pollo, de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatas 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, es aproximadamente 10 veces menos a la biosíntesis de estrógenos

Cuando se realizó el análisis estadístico de la producción de estradiol por los cultivos *in vitro* de los ovarios de embrión de pollo de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatas 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)**, con la

estimulación de la hormona gonadotropina coriónica humana *versus*, los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona **(62)** sin estimulación con la hormona gonadotropina coriónica humana, se observó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), detectándose más concentración de estradiol en los grupos testigo y tratados con estimulación de la hormona gonadotropina coriónica humana (Tabla 7 Figura 18).

Efecto del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, sobre la mortalidad embrionaria a la post inoculación

La cuantificación de la mortalidad provocada por el efecto de la inoculación del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (**62**), aunque mostró diferencia numérica, no presento diferencia estadística significativa entre los grupos testigo y tratados con 20 y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (**62**), a excepción de los grupos tratados con 1,000 y 2,000 µg.

La mortalidad para el grupo testigo fue de 26.06 ± 7.33 %; para el grupo tratado con 20 µg presentó una mortalidad de 24.19 ± 3.35 %; y el grupo inoculado con 200 µg tuvo una mortalidad de 22.19 ± 4.30 % (Tabla 9; Figura 20).

DISCUSION

En la presente investigación se evaluó el efecto de la inoculación del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, vía membrana corioalantoidea a los 5 días de desarrollo embrionario (estadio 26), y a los 17 días de incubación (estadio 43) se evaluaron los siguientes parámetros: Peso embrionario; porcentaje de machos y hembras en cada dosis; peso gonadal (seco y húmedo); conteo de poblaciones celulares en el ovario izquierdo; cuantificación en la biosíntesis de estrógenos y andrógenos *in vitro*; morfología gonadal del ovario izquierdo y cuantificación de la mortalidad embrionaria posterior a la inoculación de inhibidor de aromatasa. De estudios previos (88) sabemos que en las aves los estrógenos son la hormona dominante, razón por lo cual surgió la hipótesis de esta investigación, "Al inocular el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona vía membrana corioalantoidea a los 5 días de desarrollo embrionario (estadio 26), se inhibiría la reacción catalizadora necesaria para convertir andrógenos aromatizables a estrógenos, obteniendo un porcentaje mayor al 50% de embriones de pollo fenotípicamente machos".

Para este estudio se eligió el estadio 26 del desarrollo embrionario que corresponde a los 5 días de incubación, edad que corresponde a la etapa de gónada indiferencia. Se presumía que al no haber estrógenos circulantes el embrión de pollo encausaría su diferenciación sexual hacia el fenotipo masculino, sin importar el sexo genotípico ya implícito, sin embargo los resultados fueron contrarios a los esperados, y al analizar el porcentaje del sexo fenotípico de los embriones a los 17 días de incubación, (estadio 43) con la finalidad de determinar posibles cambios en la relación machos - hembras de los embriones por causa de la acción de las dosis de 20 µg y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-

androstatriene-3,17-diona se encontró un aumento en el porcentaje de embriones hembras (56.76%) en el grupo tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa *versus* el grupo testigo (45.10%), al inocular una dosis 10 veces mayor (200 µg), el efecto no se observa presentando resultados similares a los del grupo testigo. Este resultado nos sugiere que el fenómeno descrito se observa a una dosis determinada (20 µg), que es dos ordenes de magnitud menor a lo reportado por otros autores como la dosis que produce reversión sexual (13). En esta investigación no obtuvimos evidencias de este fenómeno, ya que de haberse producido el porcentaje de embriones con características masculinas sería mayor, o bien se hubieran encontrado *ovotestis*.

Una explicación de nuestros resultados podría obtenerse de estudios previos.

North y Bell (51), mencionan algunos de los factores que favorecen la viabilidad y nacimientos de un sexo específico, estos investigadores hablan de la *proporción primaria del sexo* "la proporción de machos y hembras es casi igual en el momento en que se fertilizan los óvulos", pero la desigual mortalidad durante el desarrollo embrionario causa, generalmente, una variación preponderante de machos sobre hembras en el momento del nacimiento (*proporción secundaria de sexo*). Las siguientes son causas de proporción secundaria del sexo:

Letales: Algunos genes letales están relacionados con el sexo y reducen la incubabilidad en un sexo más que en otro.

Factores físicos: Un sexo tiene mayor poder de adaptación a las condiciones ambientales y de incubación.

En consecuencia el tratamiento con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona crea un microambiente que favorece la sobrevivencia de las hembras.

Se demuestra que el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona no produce cambios significativos en el peso de los embriones de los grupos tratados con 20 μg y 200 μg al ser comparados con el grupo testigo. Sin embargo en lo que respecta al peso húmedo del ovario de los grupos testigo y tratado con 20 μg existe una diferencia significativa, registrando el grupo tratado el mayor peso, esta diferencia representó un aumento de peso húmedo de 26.07%.

En lo que respecta al peso seco de los ovarios, el grupo tratado con 20 μg fue superior al ser comparado con el grupo testigo, esta diferencia de peso seco resultó ser de 16.66%. El hecho de que se produzca un fenómeno de aumento en el peso húmedo y seco en las gónadas izquierdas de los embriones permite suponer que la inoculación con 20 μg del inhibidor de aromatasa causa una hipertrofia en el ovario izquierdo. Se puede descartar que el aumento de peso húmedo en el grupo tratado fuera debido a una acumulación de agua en el ovario, ya que el peso seco de la gónada izquierda del mismo grupo presentó de igual manera diferencia significativa.

Cuando se realizó el conteo total de las células del ovario izquierdo de los grupos testigo y tratados con 20 y 200 μg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, no hubo diferencias significativas, sin embargo el grupo tratado con 20 μg presentó un ligero aumento de 4.37% en el número de células totales con respecto al conteo del grupo testigo, contrariamente el grupo tratado con 200 μg presentó 1.43% menos células cuando se comparó con el grupo testigo. Esta pequeña diferencia no explica el aumento en el peso húmedo y seco del ovario. Sin embargo no se puede descartar totalmente que el 1,4,6--androstatriene-3,17-diona a dosis de 20 μg produzca un efecto a nivel celular en la gónada femenina izquierda.

La producción de estradiol en las incubaciones *in vitro* de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, no mostró diferencias significativas; y la biosíntesis de estrógenos y andrógenos por la incubación *in vitro* de los ovarios de embrión de pollo del grupo testigo resultaron similares a lo reportado por Guichard y col (1977), Pedernera y col (1988) y Teng y col (1982) **(25,56,75)**, así estos resultados sirven para demostrar que la producción de andrógenos nunca es mayor que la biosíntesis de estrógenos, de esta manera al no detectarse cantidades altas de testosterona en las incubaciones celulares *in vitro* se vuelve a corroborar que no existe un efecto virilizante en las gónadas tratadas con el inhibidor de aromatasa. Cuando se adicionó hormona gonadotropina coriónica humana al medio de cultivo de los grupos testigo y el grupo tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa, ambos responden al efecto de ésta, fenómeno ya descrito por Guichard y col (1977), Pedernera y col (1988) y Teng y col (1982) **(25,56,75)**. Lo que demuestra que en ambos grupos existen receptores para la hormona gonadotropina coriónica humana y que el 1,4,6-androstatriene-3,17-diona a dosis de 20 µg no afecta los receptores para esta hormona.

El estudio morfológico del ovario izquierdo de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, demostró que las gónadas de ambos grupos presentan la morfología y el arreglo celular propio de un ovario a los 17 días de incubación **(14,21,28)**. Nunca hubo indicios que demostrarán la presencia de cordones seminíferos, fibroblastos y células de Leydig; estructuras que componen la arquitectura histológica de un testículo embrionario **(55,68)**, tal como lo reportan otros investigadores **(13)**.

Después de analizar los efectos por la inoculación del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, se demuestra que a la dosis de 20 µg se desarrolla un microambiente con características favorables para el buen desarrollo de los embriones hembras. Los embriones femeninos se encuentran en mayor proporción y sus respectivas gónadas (izquierdas) a los 17 días de incubación (estadio 43), presentan una hipertrofia.

Aunque no se encuentra una clara explicación a este fenómeno, pueden existir varias explicaciones:

La primera posibilidad es la siguiente:

Sabiendo que el inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona actúa inhibiendo a la enzima P450 arom, por la unión en el sitio activo de ésta **(12,49,67)**, y conociendo la investigación de Sánchez y col (1995) **(59)** en la cual demostraron la expresión del ARNm a P-450 aromatasa en embriones de 14, 16 y 19 días de incubación, ésta no se detectó al día 6 de incubación. Considerando ésto, y que nosotros inoculamos el inhibidor de aromatasa a los 5 días de desarrollo embrionario, es muy probable que el inhibidor de aromatasa permaneció latente hasta la expresión de la enzima, uniéndose al sitio activo de esta proteína catalizadora, impidiendo así la producción de estrógenos. La falta de éstos podría generar una retroalimentación positiva para la biosíntesis de más enzima P450 aromatasa, y así en una etapa posterior, los andrógenos ser aromatizados en forma compesadora.

La segunda causa posible podría ser la siguiente: Hutz y col (1987), observaron que el proceso de aromatización en mamíferos es inducido o activado a través de la FSH **(31)**. En los embriones de pollo aunque se encuentra FSH a los 4 días de incubación **(86,90)**, no se conoce a ciencia cierta a que edad de desarrollo

embrionario se encuentren receptores para esta hormona. Por otra parte se ha visto que los andrógenos pueden estimular la aromatización (31). El ambiente creado por los andrógenos más la aparición de receptores específicos para FSH podrían hacer que el ovario sea estimulado en su capacidad de aromatización, generando una biosíntesis de estrógenos de nueva formación y de esta manera un microambiente estrogénico. La producción de estrógenos, en respuesta a FSH, esta limitada por la cantidad de receptores a FSH. La hormona folículo estimulante junto con los estrógenos, tienen un efecto mitogénico en las células del ovario estimulando su proliferación, por lo que ambos promueven una rápida acumulación de receptores a FSH. Al producirse un efecto mitogénico por la biosíntesis de estradiol, producto de la aromatización de los andrógenos, ayudaría a explicar el efecto de la hipertrofia ovárica, tal como lo describió Méndez y col (1993), los cuales inocularon 200 ng de 17β estradiol en embriones de pollo a los 11, 13 y 15 días de incubación, 24 horas después de nacer los embriones, se realizó la morfometría de las gónadas izquierdas, de esta manera el grupo tratado presentó un incremento en el número de células somáticas, e hipertrofia en las células de la pregranulosa (40).

Sería interesante realizar trabajos posteriores que complementen esta investigación y conocer con exactitud la razón por la cual se ve aumentado el número de embriones hembras a la inoculación de 20 μ g de inhibidor de aromatasa, así como también conocer a que edad embrionaria se sintetiza la enzima aromatasa catalizadora de andrógenos a estrógenos.

Una posible utilidad de esta investigación sería el abrir nuevos senderos del conocimiento en la endocrinología embrionaria con la finalidad de conocer más acerca de esta rama de la medicina.

El obtener más hembras podría ser ensayado en las especies aviares en peligro de extinción bajo la asesoría de científicos interesados en el área.

CONCLUSIONES

El inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona a dosis de 20 µg:

- 1.- No provocó reversión sexual hacia el fenotipo macho.
- 2.- Favoreció el microambiente para el desarrollo de embriones hembras.
- 3.- Provocó una hipertrofia de la gónada funcional en las hembras.
- 4.- En cultivos celulares de ovario izquierdo, no alteró la biosíntesis de estradiol y testosterona.
- 5.- Las células ováricas de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa presentaron respuesta a la hormona gonadotrópica coriónica humana.

LITERATURA CITADA

- 1.- Alvarez-Buylla, A. and Merchant-Larios, H.: Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Experimental Cell Research*, 165: 362-368 (1986).
- 2.- Alvarez-Fernández, G., Juárez-Oropeza, M.A., Velázquez, P., González Del Pliego, M., Méndez-Herrera, M.C. and Pedernera, E.: Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. *General and Comparative Endocrinology*, 97: 31-41 (1995).
- 3.- Armstrong, D.G.: Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology*, 100: 81-86 (1984).
- 4.- Austic, R.E., Neisheim, M.C.: Producción avícola. Décimo tercera edición. *El Manual Moderno*, México, D.F., 1994.
- 5.- Bell, D.J. and Freeman.: Physiology and biochemistry of the domestic fowl. First edition. *Academis Prees Inc.* London, 1971.
- 6.- Beyer, C., Tramonte, R., Hutchinson, R., Sharp, P.J., Barker., Huskinsson, N.S. and Hutchison, J.B.: Aromatase-immunoreactive neurons in the adult female chicken brain detected using a specific antibody, *Brain Research Bulletin*, 33: 583-588 (1994).
- 7.- Bradley, O. C.: The structure of the fowl. Fourth edition. *Oliver and Boyd Ltd.*, U.S.A., 1960.
- 8.- Burns, R. K.: 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. *Journal Morphology*, 65: 497-547 (1939).
- 9.- Callard, G.V., Petro, Z. and Ryan, K.J.: Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology*, 103 (6): 2283-2290 (1978).
- 10.- Cenicerós, R.M. and Téllez, I.G.: Manual de Producción avícola.; Universidad Nacional Autónoma de México, *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Producción Animal: Aves.* México, D.F.: 1995.
- 11.- Coco, C.M., Hargis, B.M. and Hargis, P.S.: Effect of in ovo 17 β estradiol or tamoxifen administration on sexual differentiation of the external genitalia. *Poultry Science*; 71: 1947-1951 (1992).

12.- Díaz-Zagoya, J.C. and Hicks, J.J.: Bioquímica e inmunología., volumen I; Universidad Nacional Autónoma de México, **Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica e Inmunología.** México, D.F. 1988.

13.- Elbrecht, A. and Smith, G.R.: Aromatase enzyme activity and sex determination in chicken. **Science.**, 255: 467-470 (1992).

14.- Fawcett, D. W.: Tratado de histología. Décima edición. **Interamericana Mc Graw Hill.** México. 1990.

15.- Fenner, F.J. and White, D.O.: Medical Virology. Third edition. **Academic Press Inc.** U.S.A. 1986.

16.-Francavilla, S. Cordeschi, G., Properzi, G., Concordia, N., Cappa, F. and Pozzi, V.: Ultraestructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 22: 389-400 (1990).

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

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

19.- Gallien, L.: 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 (1941).

20.- Ganong, W. F.: Fisiología médica. Décimo tercera edición. **El manual moderno.** México. 1992.

21.- Gillian, C. H.: The population of germ cells in the developing female chick. **Journal of the Embryologic Experimental.**, 11: part 3 513-536 (1963).

22.-Goodfellow, P.N. and Lovell-Badge, R.: SRY and sex determination in mammals. **Annu. Rev. Genet.**, 27: 71-92 (1993).

23.- Gonzalez, M.I. and Leret, M.L.: Injection of an aromatase inhibitor after the critical period of sexual differentiation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.**, 47: 183-186 (1994).

- 24.- Guennoun, R. and Gasc, J.M.: Evidence of a functional aromatase system in the pituitary gland of the chick embryo in vitro *Journal of Endocrinology*, 119: 229-232 (1988).
- 25.- Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th.M., Scheib, D. and Haffen, K.: Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex, and side. *General and Comparative Endocrinology*, 32: 255-265 (1977).
- 26.- Gustafson, M.L. and Donahoe, P.K.: Male sex determination: Current concepts of male sexual differentiation. *Annual Review of Medicine*, 45: 505-524 (1994).
- 27.- Hafez, E.S.E.: Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos. Quinta edición. *Interamericana Mc Graw Hill*. México. 1993.
- 28.- Ham, A.W.: Tratado de histología. Séptima edición. *Interamericana*. México. 1975.
- 29.- Hamburger, V. and Hamilton, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88: 49-92 (1951).
- 30.- Harley, V. R. and Goodfellow, P. N.: The biochemical role of SRY in sex determination. *Molecular Reproduction and development*, 39: 184-193 (1994).
- 31.- Hutz, R.J., Krueger, G.S., Meller, P.A., Sholl, S.A. and Dierschke, D.J.: FSH - induced aromatase activity in hamster granulosa cells: effect of estradiol - 17 β in vitro. *Cell and Tissue Research*. 250: 101-104 (1987).
- 32.- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A.: Manual de Microbiología Médica. Séptima edición. *El Manual Moderno*. México. 1977.
- 33.- Jull, M.A.: Avicultura. Segunda edición. *UTEHA*. México. 1953.
- 34.- Koo, G.C., Alleen, H.L., Long, R.A., Serio-Dunn, R., Goggin, B. and Weppelman R.M.: Effect of tamoxifen on H-Y antigen expression and gonadal development in chicken embryos. *Differentiation*, 29: 140-144 (1985).
- 35.- Knobil, E. and Neill, J.D.: The Physiology of Reproduction. Second edition. *Raven Press, Ltd*. U.S.A. 1994.
- 36.- Levin, E. and Schuarzberg, P.: Receptores a antiestrógenos ¿Para que sirven?. *Medicina*, 50: 74-80 (1990).

- 37.- Magre, S. and Jost, A.: Initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscope study. **Arch. Anat. Micr. Morph.**, 69: 297-318.
- 38.- Maraud, R. and Vergnaud, O.: Development of interstitial cells in experimentally sex - reversed gonads of genetically female chick embryos. **General and Comparative Endocrinology**, 63: 464-470 (1986).
- 39.- Marrone, B.L. and Hertelendy, F.: Steroid metabolism by avian ovarian cell during follicular maturation. **Biology of Reproduction**, 29: 953-962 (1983).
- 40.- Méndez-Herrera, C., Hofmann, P. and Pedernera, A.E.: Effect of 17β -estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chick. **General and Comparative Endocrinology**, 89: 182-188 (1993).
- 41.- Merchant-Larios, H.: Ovarian differentiation. In The vertebrate ovary. Jones R.E. **Plenum Publishing Corp.** Ed. Chap. 2 47-81. 1978
- 42.- Merchant-Larios, H.: Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In Ultrastructure of reproduction. Chap. 3 19-30 **Martinus Nijhoff Publ. Boston.** 1984.
- 43.- Merchant-Larios, H., Popova, L. and Reyss-Brion, M.: Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. **Developmental., Growth and Differentiation**, 26 (5): 403-417 (1984).
- 44.- Mintz, B.: Testosterone propionate minimum for induction of male development in anurans; comparative data from other vertebrates. **Proceeding of the Society for Experimental, Biology and Medicine**, 69: 358-361 (1948).
- 45.- Mohanty, S.B. and Dutta, S.R.: Virologia Veterinaria. Primera edición. **Interamericana.** México. 1983.
- 46.- Muller, U., Guichard, A., Reyss-Brion, M. and Scheib, D.: Induction of H-Y antigen in the gonads of male quail embryos by diethylstilbestrol. **Differentiation**, 16: 129-133 (1980).
- 47.- Narbaitz, R. and Adler, R.: Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. **Journal of the Embryologic Experimental**, 16: 41-47 (1966).
- 48.- Narbaitz, R. and De Roberts, E.M.: Steroid-producing cells in chick intersexual gonads. **General and Comparative Endocrinology**, 22: 164-169 (1970).

49.- Nique, F., Van de Velde, P., Brémaud, J., Lucas, D., Hameau, M-C., Philibert, D. and Teutsch, G.: Activity of the pure antiestrogen RU 58668 on models of MCF-7 tumors growing spontaneously in nude mice. **Memories of the International Congress on Hormonal Steroids**, September 24-29 Dallas, Texas, pp 76. 1994.

50.- Norman, W.A. and Litwack, G.: Hormones. First edition. **Academic Press, Inc.** United Kingdom. 1987.

51.- North, M.O. and Bell, D.D.: Manual de producción avícola. Cuarta edición. **El Manual Moderno**. México, D.F. 1994.

52.- Ortega, C.C. and Hernández, P.O.: El papel de los esteroides en el desarrollo folicular del mamífero. **Ginecología y Obstetricia de México**. 63:331-336 (1995).

53.- Ottinger, M.A.: Sexual differentiation of neuroendocrine systems and behavior. **Poultry Science**, 68: 979-989 (1989).

54.- Padoa, E.: Diferenziamento del sesso invertito mediante la somministrazione di ormoni sessuali e corticosteroidi. Ricerche con diidrofollicolina, progesterone e acetato di desossicorticosterone, in Rana esculenta. **Pubbl.Staz. Zool. Napoli**, 19: 185-223 (1942).

55.- Pedernera, E., Aguilar, M.C. and Romano, M.: Ultrastructural differentiation of Leydig cell in the testis of 17 - day - old chick embryo and newly hatched chickens. **Memories of the Eleventh Congress of Anatomy Advances in the Morphology of Cells and Tissues**, New York, pp363-372. 1981

56.- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez, O. M.A. and González, P.M.: Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. **General and Comparative Endocrinology**, 71: 153-162 (1988).

57.- Preslock, J.P.: Steroidogenesis in the mammalian testis. **Endocrinology Review**, 1: 132-139 (1980).

58.- Quintana, L.J.A.: Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes Segunda edición. **Trillas**. México, D.F. 1991.

59.- Sánchez, B M.G.: Ontogenia de la expresión del RNA m a aromatasa P-450 en las gónadas embrionarias del pollo. Tesis de Licenciatura en Biología. **Facultad de Ciencias**. Universidad Nacional Autónoma de México, (1995).

60.- Sayag, N., Snapir, N., Arnon, E., Halawani, E., Grimm, V.E. and Robinzon, B.: Sexual differentiation of copulatory behavior in the male chick requires gonadal steroids. **British Poultry Science**, 32: 607-614 (1991).

61.- Scheib, D., Mignot, T.M.: Effects of early tamoxifen treatment on hormonal content of 15-day quail embryo gonads. **General and Comparative Endocrinology**, 56 (3): 425-432 (1984).

62.- Schwarzel, W.C., Kruggel, W.G. and Brodie, H.J.: Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta. **Endocrinology**, 92: 866-880 (1973).

63.- Scott, F.: Developmental biology. Fourth edition. **Sinauer Associates, Inc. Publishers**. Sunderland, Massachusetts. 1994.

64.- Simpson, R.E., Mahendroo, S.M., Means, D.G., Kilgore, W.M., Hinshelwood, M.M., Lorence-Graham, S., Amarneh, B.Y., Fisher, R.C., Michael, D.M., Mendelson, R.C. and Bulun E.S.: Aromatase cytochrome P-450 the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine Reviews**, (15) 32: 342-355 (1994).

65.- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N.: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, 346: 240-244 (1990).

66.-Snedecor, W.G. and Cochran, W.G.:Statistical methods. Eight edition. **Iowa State University Press/AMES**. U.S.A. 1991.

67.- Solomon S.: The Primate Placenta as an Endocrine Organ. The Physiology of Reproduction. Second edition **Raven Press, Ltd.**, New York. U.S.A. 1994.

68.- Stahl, A. and Carlon,N.: Morphogenèse des cordons sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade chez l'embryon de poulet. **Acta anat.**, 85: 248-274 (1973).

69.- Steel, R.G.C. and Torrie, H.J.: Principles and procedures of statistics a biometrical approach. Second edition. **Mc Graw Hill Book Co**. U.S.A. 1989.

70.- Stites, D.P. and Terr, A.I.: Inmunología básica y clínica. Séptima edición. **El Manual Moderno**. México, D.F. 1993.

71.- Sturkie, P.D.: Fisiología aviar. Segunda edición. **Editorial Acribia Zaragoza**. España.

72.- Sutherland, R. L., Watts, C. K. W. and Clarke, C. L.: Oestrogen actions. In: new comprehensive biochemistry, hormones and their actions. Y. (Cooke, B. A., King, R. J. B. and Van der Molen, H. J. Eds.). First edition. Chap 12 pp. **Elsevier Ed.** 1988.

73.- Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujioka, K., and Doi, O.: Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary, and the adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). **General and Comparative Endocrinology**, 39: 26-33 (1979).

74.- Tanabe, Y., Noboru, S., and Nakamura, T.: Ontogenic steroidogenesis y testes, ovary, and adrenals off embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*).). **General and Comparative Endocrinology**, 63: 456-463 (1986).

75.- Teng, C.T., Teng, C-S., Bousfield,, G.B., Liu, W-K., and Ward, D.N.: Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. **General and Comparative Endocrinology**, 48: 325-332 (1982).

76.- Tereba, A., Nc Phaul, M.J. and Wilson J.D.: The gene for aromatase (P450 arom) in the chicken is located on the long arm of chromosome 1. **The Journal of Heredity**, 82: 80-81 (1991).

77.- Tiersch, T.R., Mitchell, M. J. and Wachtel, S.S Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. **Hum. Gen.**, 87: 571-573 (1991).

78.- Tizard, I.R.: Veterinary immunology. First edition. **W.B. Sanders Company**. U.S.A. 1977.

79.- Van de Velde, P., Nique, F., Bouchoux, F., Brémaud, J., Hameau, M-C., Lucas, D., Moratille, C., Viet, S., Philibert, D. and Teutsch, C.: 58 668, a new pure antiestrogen inducing a regression of human mammary carcinoma implanted in nude mice. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 48: 187-196 (1994).

80- Veerhuis, P.J.M., Hendriksen, A.M., Hengst, L., Kruijt, M. and Tiemann P.B.: The production of anti - H - Y monoclonal antibodies: Their potential use in a sex test for bovine embryos. **Veterinary Immunology and Immuno pathology**, 42: 317-330 (1994).

81.- Velázquez, P., Gómez, Y., González, P.M. and Pedernera, E.: Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. **General and Comparative Endocrinology**, 83: 243-248 (1991).

- 82.- Vigier, B., Forest, M.G., Eychenne, B., Bezard, J., Garrigou, O., Robel, P. and Josso, N.: Anti-mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 3684-3688 (1989).
- 83.- Ville, C.A.: *Biologia Interamericana*. Séptima edición. Interamericana. México. 1986.
- 84.- Wartenberg, H., Lenz, E. and, Schweikert, H. V.: Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. *Andrologia.*, 24 (1) 1-6 (1992)
- 85.- Weniger, J.P.: Sécrétion de stéroïdes par les gonades embryonnaires d'Oiseaux. *Reproduction and Nutrition Dévelopmen.*, 27: (4), 745-753 (1987).
- 86.- Wilson, J.A., Glick, B.: Ontogeny of mating behavior in the chicken. *American Journal of Physiology.*, 218: 951-955 (1970),
- 87.- Wilson, J.D., Leshin, M. and George, F.W.: The sebright bantam chicken and the genetic testigo extraglandular aromatase. *Endocrinology Review.*, 8 (4): 363-376 (1987).
- 88.- Wolff, E.: Old experience and new trends in avian sex differentiation. *29 th Ann. Mtg. tiss. Cult. Assoc.*, Denver, CO., 15(1): 6-9 (1979).
- 89.- Woods, J.E. and Erton, L. H.: The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology.*, 36: 360-370 (1978).
- 90.- Woods, J.E.: Maturation of the hipotalamo - adenohipophyseal - gonadal (HAG) axes in yhe chick embryo. *The Journal of Experimental Zoology Supplement.*, 1: 265-271 (1987).
- 91.- Woods, J.E., Damianides-Keenan. and Thommes, R.C.: FSH- and TSH-binding cells in the ovary of the developing chick embryo. *General and Comparative Endocrinology.*, 82: 487-494 (1991).
- 92.- Yuko, A. and Toyooki, F.: Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood - vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. *Developmental., Growth and Differentiaition.*, 25 (4), 345-352 (1983).
- 93.- Zar, J.: Biostatistical analysis. Second edition. *Prentice Hall Inc. Englood*

Tabla 1

Peso promedio de los embriones de ambos sexos, en los grupos testigo y tratados con 20 µg y 200 µg del Inhibidor de aromatasas 1,4,6-androstatriene-3,17-diona

Grupos	n	Peso promedio y desviación estándar
Testigo	286	17.11 ± 3.45 g
20 µg	303	17.00 ± 3.23 g
200 µg	165	17.72 ± 3.60 g

Tabla 2

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA INSTITUCION

**Peso promedio de los embriones hembras y machos en los grupos
testigo y tratados con 20 μ g y 200 μ g del inhibidor de aromatasa 1,4,6-
androstatriene-3,17-diona**

Grupo	Peso promedio hembras y desviación estándar	Peso promedio machos y desviación estándar
Testigo	17.09 \pm 3.11g	17.18 \pm 3.43g
20 μ g	16.56 \pm 3.46g	17.23 \pm 2.87g
200 μ g	17.52 \pm 3.59g	17.91 \pm 3.59g

Tabla 3

Porcentaje y número de machos y hembras obtenidos en los grupos testigo y tratados con dosis de 20 µg y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona

Tratamiento	Número de embriones	Número de machos	Porcentaje de machos	Número de hembras	Porcentaje de hembras
Testigo	286	157	54.89	129	45.10
20 µg	303	131*	43.23*	172*	56.76*
200 µg	165	85	51.51	80	48.48

El superíndice *, indica diferencia estadística ($P < 0.05$) entre el grupo testigo *versus* el grupo tratado con 20 µg.

Tabla 4

Valores de peso húmedo de los ovarios izquierdos de embriones de los grupos testigo y tratados con dosis de 20 µg y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona

Grupos	n	Peso promedio y desviación estándar
Testigo	20	3.95 ± 0.96 mg
20 µg	20	4.98 ± 1.40 mg *
200 µg	20	3.96 ± 0.79 mg

El superíndice *, indica diferencia estadística (P<0.01) entre el grupo testigo y el grupo tratado con 20 µg.

Tabla 5

Valores de peso seco de los ovarios izquierdos de embriones de los grupos testigo y tratados con dosis de 20 µg y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona

Grupos	n	Peso promedio y desviación estándar
Testigo	20	0.60 ± 0.14 mg
20 µg	20	0.70 ± 0.16 mg *
200 µg	20	0.57 ± 0.13 mg

El superíndice *, indica diferencia estadística (P<0.05) entre el grupo testigo y el grupo tratado con 20 µg.

Tabla 6

Conteo celular de los ovarios izquierdos de embriones de los grupos testigo y tratados con dosis de 20 µg y 200 µg del inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona

Grupo	Células germinales	Células somáticas con inclusiones lipídicas	Células somáticas sin inclusiones lipídicas	Total celular del ovario izquierdo
Testigo <i>n= 24</i>	431,666 ± 128,830	306,666 ± 100,609	5,702,500 ± 931,599	6,440,832
20 µg <i>n= 32</i>	455,000 ± 141,244	310,625 ± 154,407	5,956,875 ± 1,004,267	6,722,500
200 µg <i>n= 14</i>	387,142 ± 130,407	309,514 ± 85,634	5,652,357 ± 1,243,707	6,349,013

Tabla 7

Cuantificación de estrógenos por los cultivos celulares *in vitro* de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, con y sin estimulación por la hormona gonadotropina coriónica humana

Grupo	Promedio y desviación estándar
Testigo basal	1.19 ± 0.30 ng.
Testigo HCG	1.83 ± 0.49 ng.*
Tratado basal	1.02 ± 0.10 ng.
Tratado HCG	1.99 ± 0.77 ng.*

El superíndice *, indica diferencia estadística (P<0.05) entre los grupos basal *versus* tratado

Tabla 8

Cuantificación de andrógenos por los cultivos celulares *in vitro* de los grupos testigo y tratado con 20 µg de inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona, con y sin estimulación por la hormona gonadotropina coriónica humana

Grupo	Promedio y desviación estándar
Testigo basal	0.02 ng.
Testigo HCG	0.23 ng.
Tratado basal	0.08 ± 0.04 ng.
Tratado HCG	0.11 ± 0.08 ng.

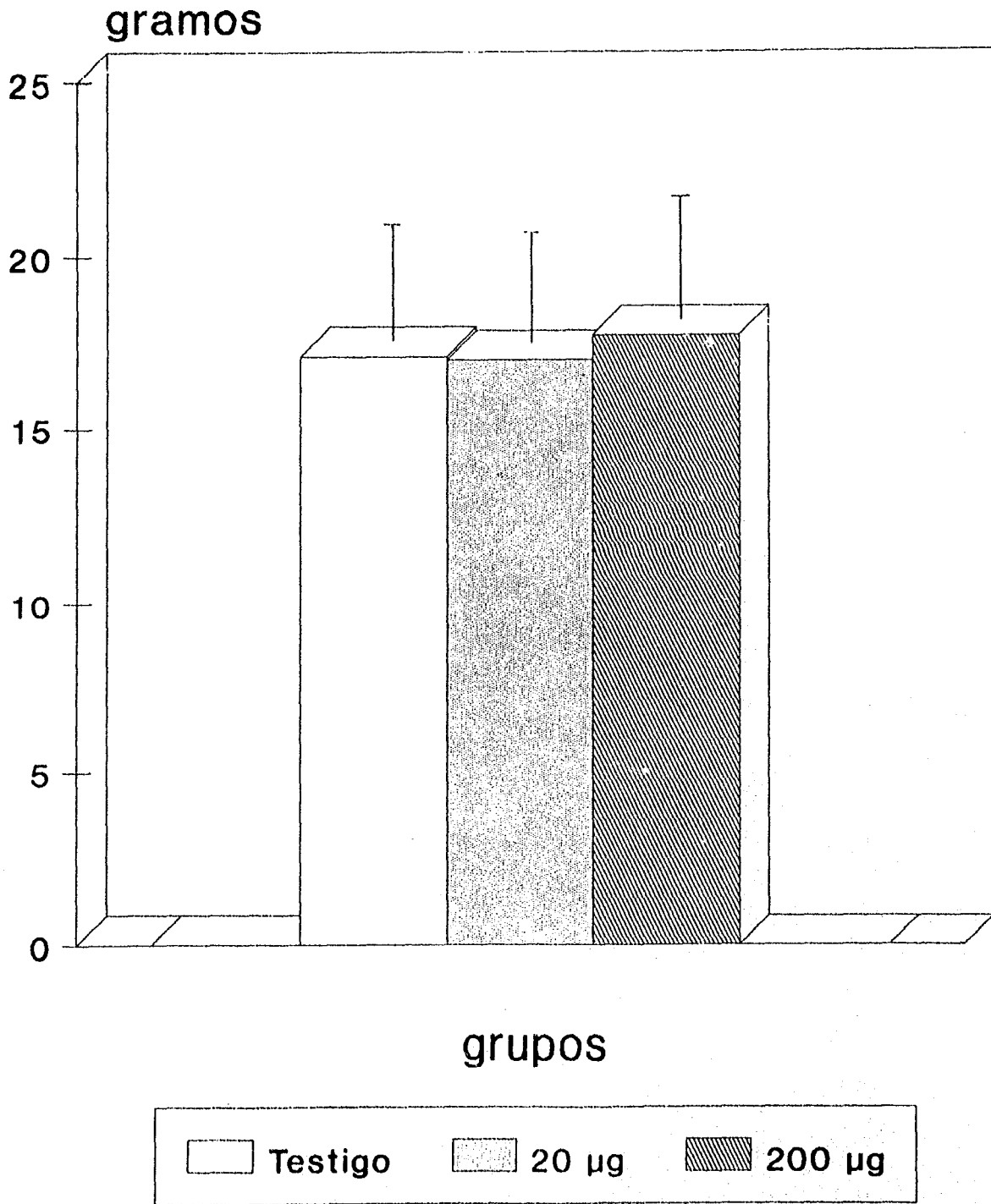
Tabla 9

Porcentaje de mortalidad embrionaria en los grupos testigo y tratados con 20 µg y 200 µg post inoculación al inhibidor de aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona.

Grupos	Porcentaje del promedio de mortalidad embrionaria y desviación estándar
Testigo	26.06 ± 7.33
20 µg	24.19 ± 3.35
200 µg	22.19 ± 4.30

Figura 10

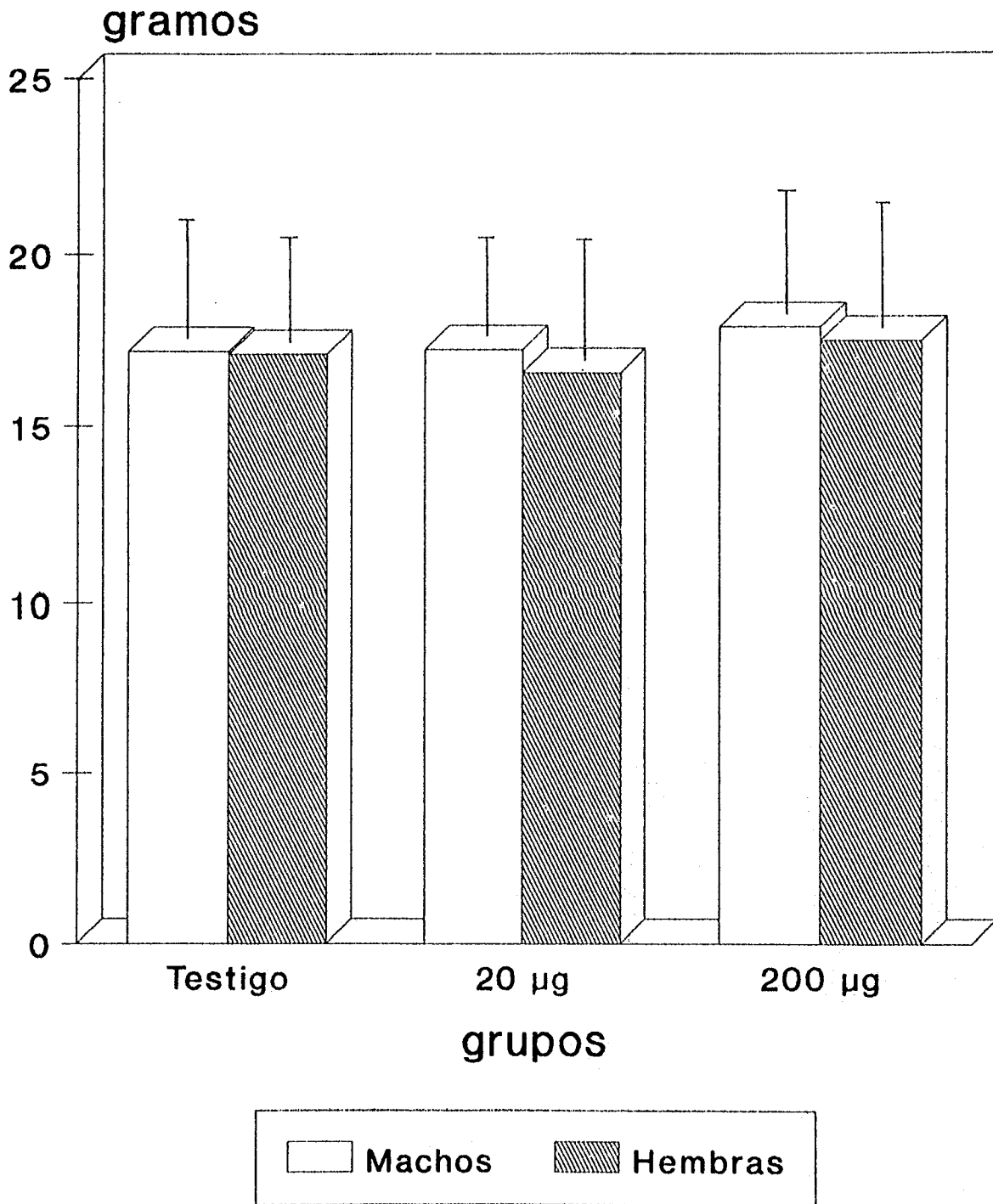
Peso embrionario de ambos sexos a los 17 días de incubación en los grupos Testigo, 20 y 200 μg de inhibidor de aromatasa



(P > 0.05)

Figura 11

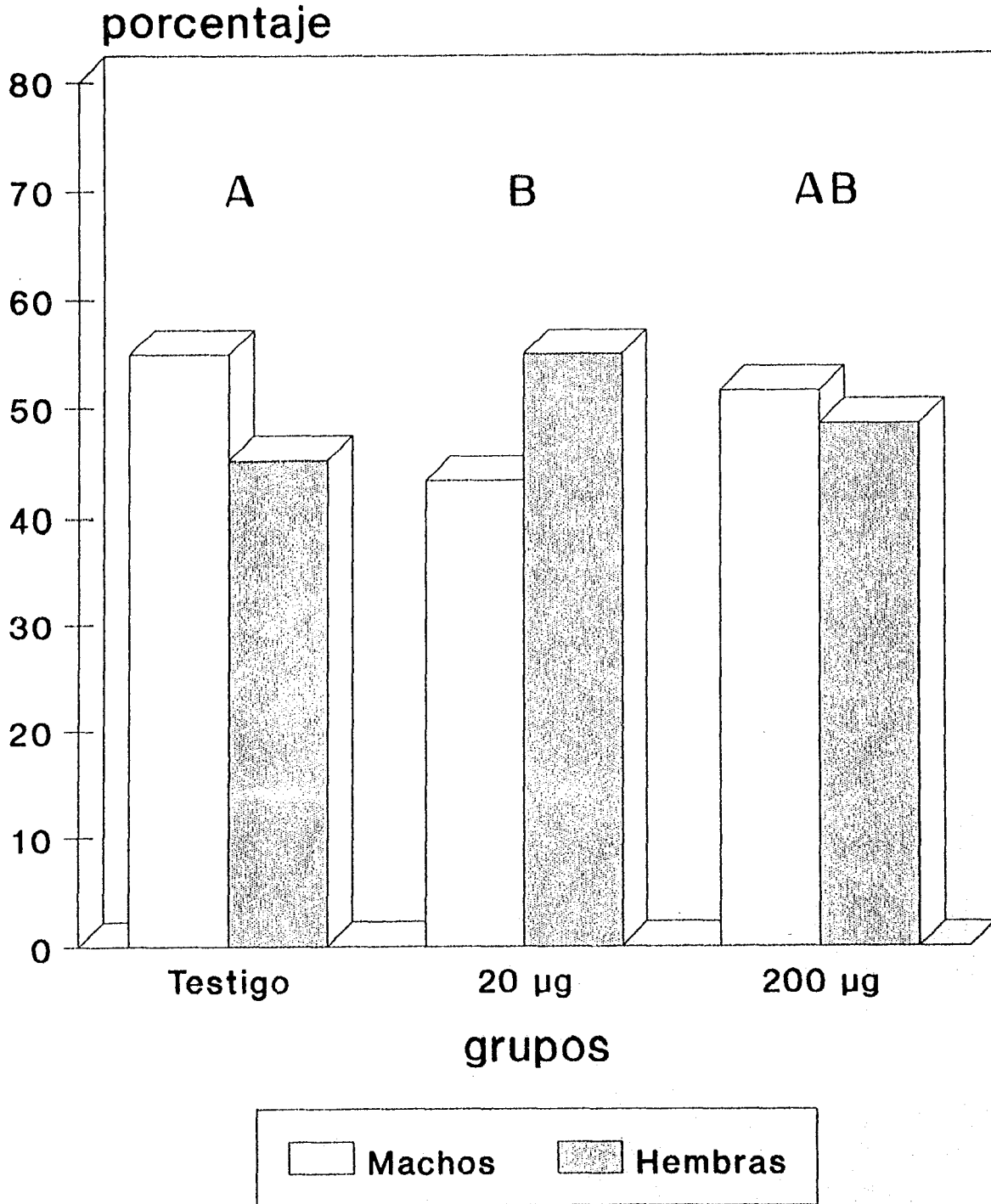
Peso embrionario de machos y hembras a los 17 días de incubación en los grupos Testigo, 20 y 200 μ g de inhibidor de aromatasa



(P > 0.05)

Figura 12

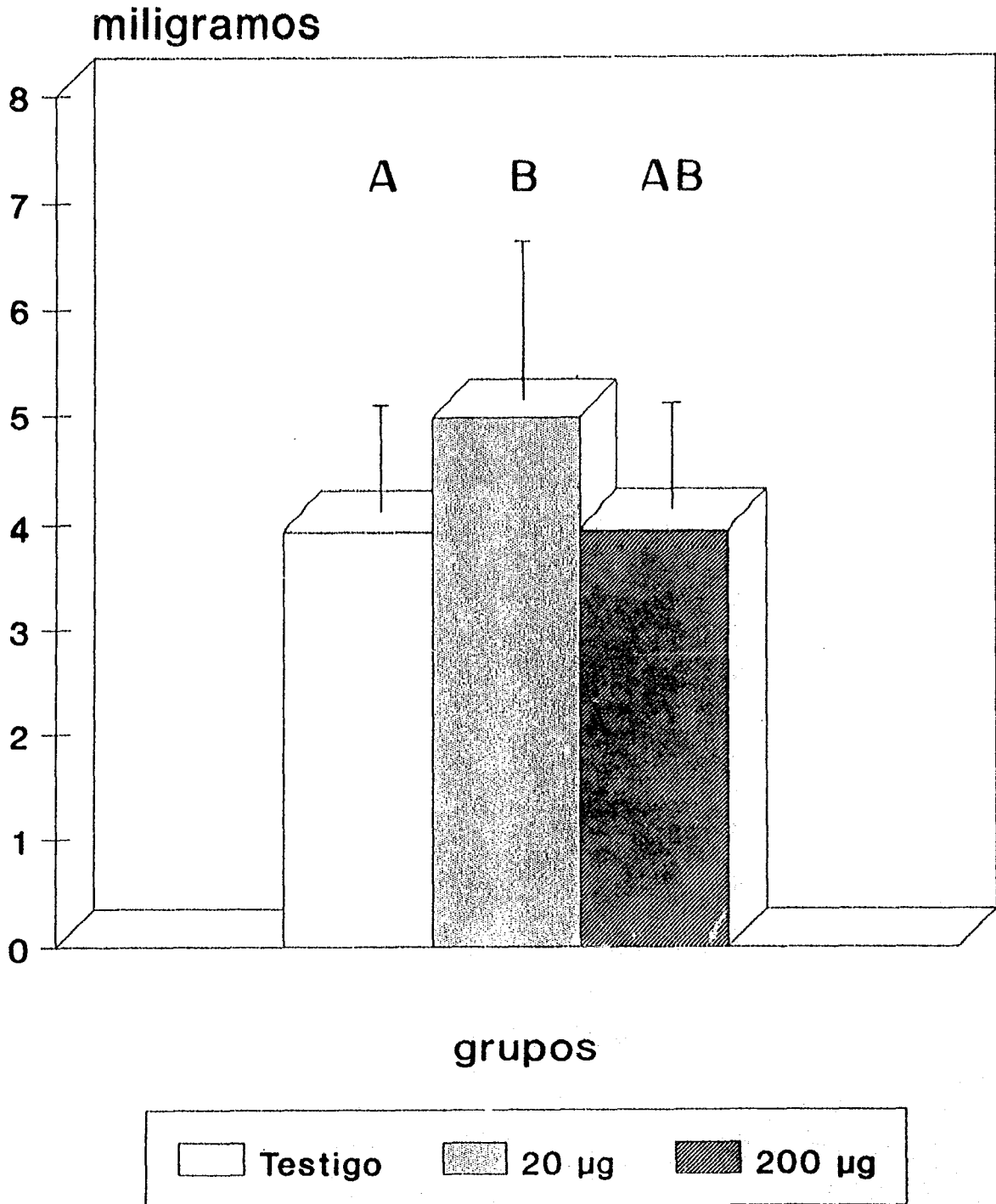
Porcentaje de sexos a los 17 días de incubación en los grupos
Testigo, 20 y 200 µg de Inhibidor de aromatasa



(P < 0.05)

Figura 13

Peso húmedo del ovario izquierdo, a los 17 días de incubación en los grupos Testigo, 20 y 200 μ g de Inhibidor de aromatasa

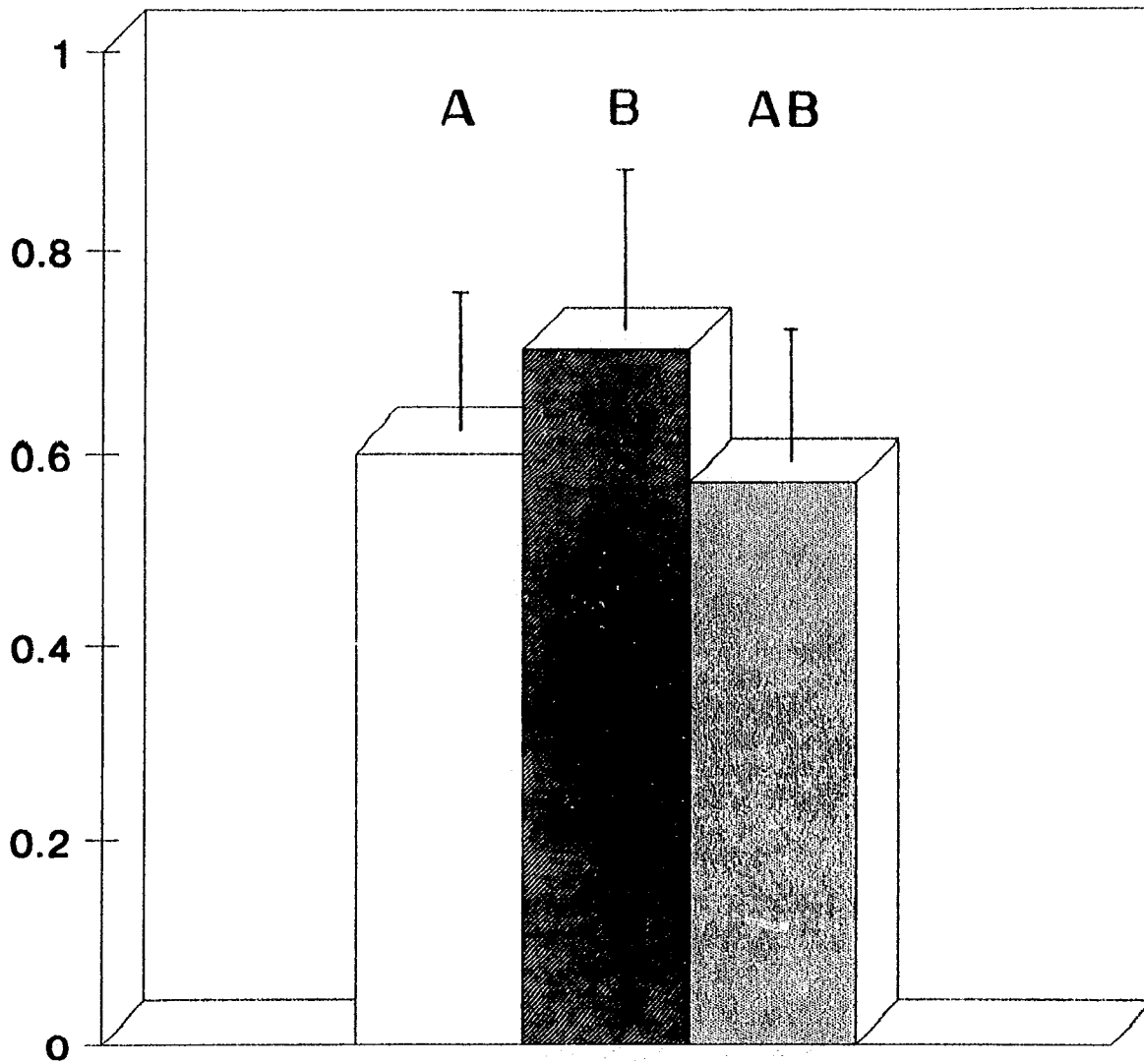


(P < 0.05)

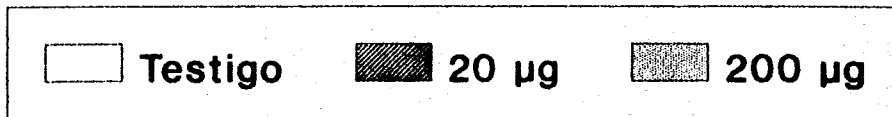
Figura 14

Peso seco del ovario izquierdo, a los 17 días de incubación en los grupos Testigo, 20 y 200 μ g de inhibidor de aromatasa

miligramos



grupos



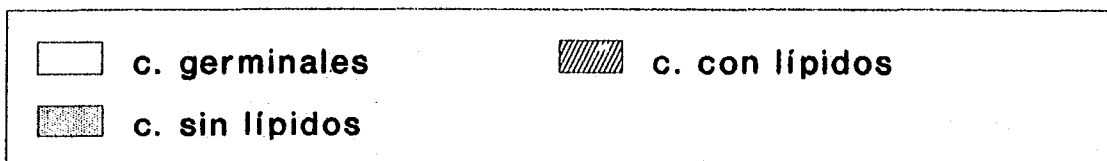
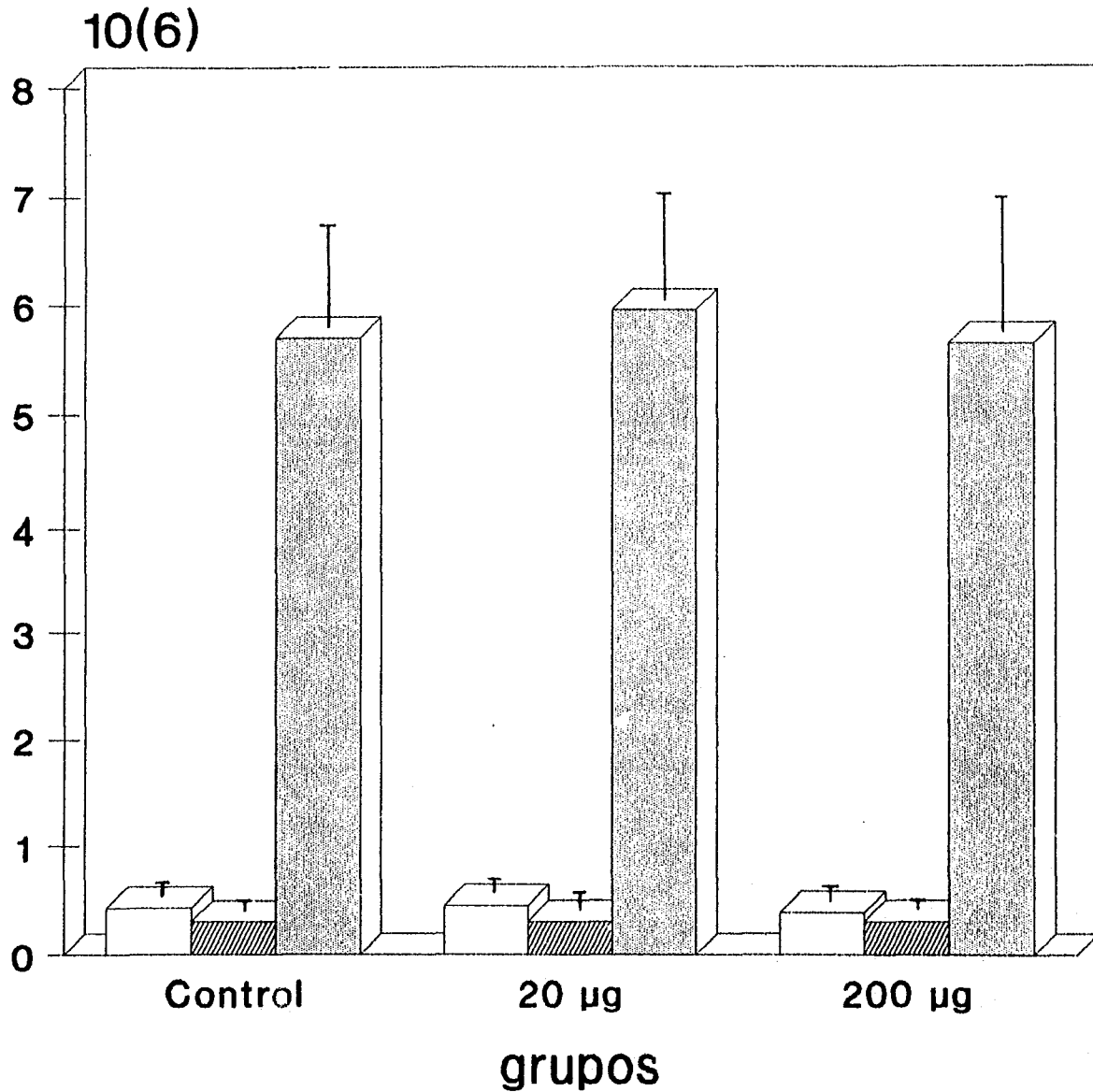
(P < 0.05)

FALTA PAGINA

No. 91

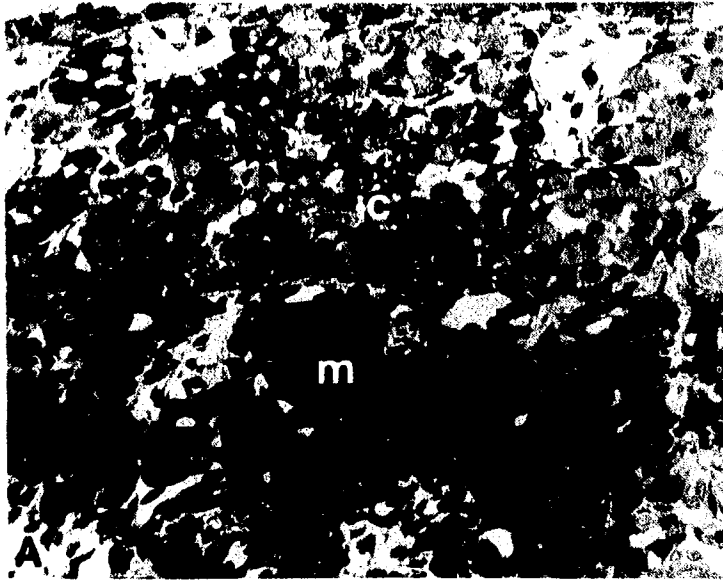
Figura 15

Conteo celular del ovario izquierdo, a los 17 días de incubación en los grupos Testigo, 20 y 200 µg de Inhibidor de aromatasa



(P > 0.05)

Figura 16



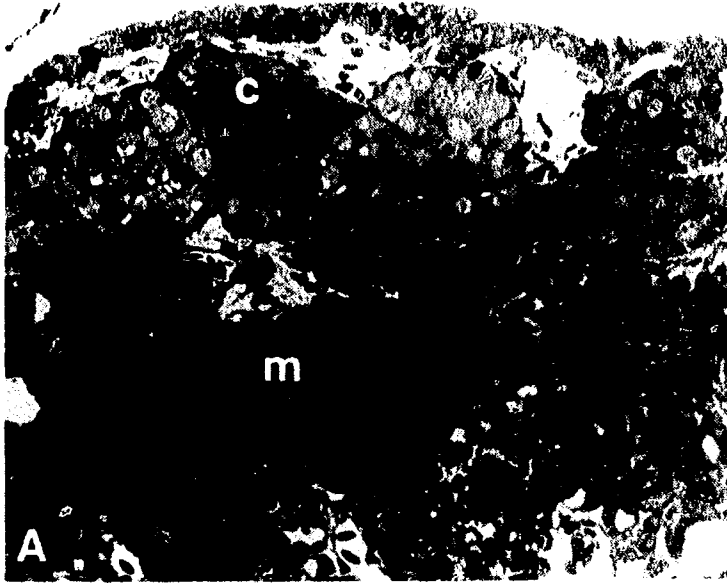
A Fotografía (40 X) panorámica de un ovario de embrión de pollo de 17 días de incubación (grupo testigo), en la que se muestra la corteza (c) y la médula (m)

B Fotografía (100 X) de la corteza de un ovario de embrión de pollo a los 17 días de incubación (grupo testigo), en la que se muestra con las flechas, las células germinales u ovocitos (O), y las células pregranulosa (G)



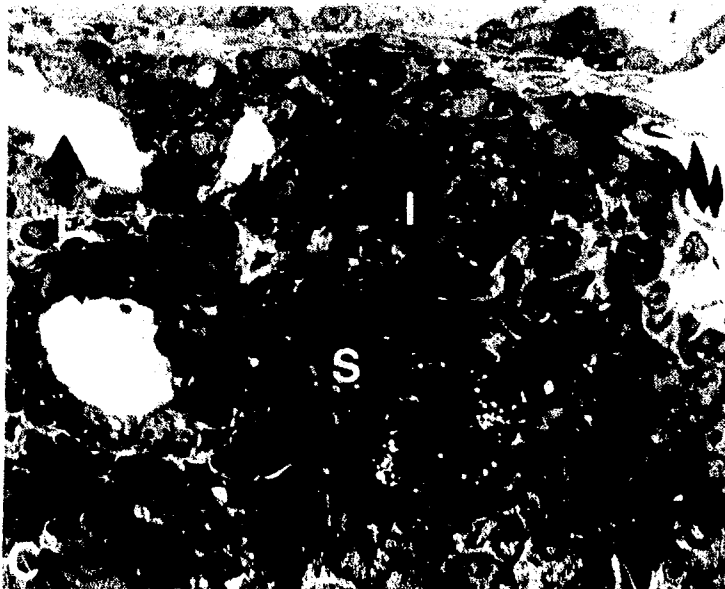
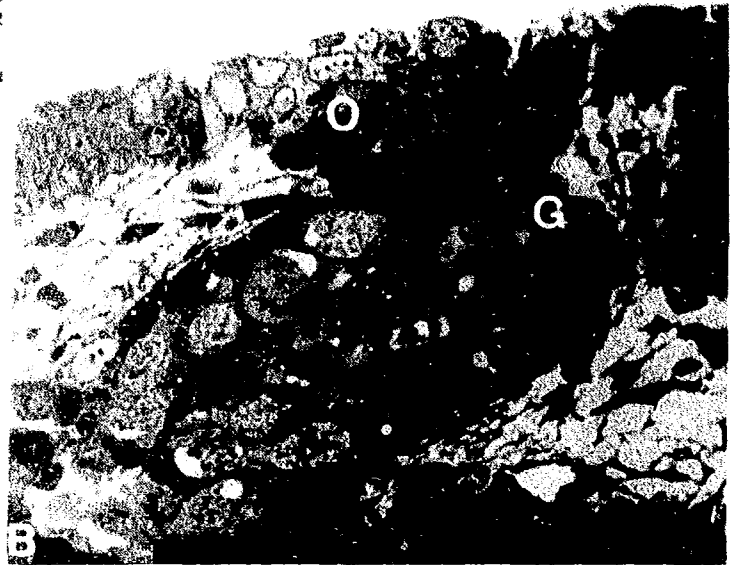
C Fotografía (100 X) de la médula de un ovario de embrión de pollo a los 17 días de incubación (grupo testigo) en que se muestra con las flechas, las células típicamente esteroidogénicas (S), las células indiferenciadas (I) y los espacios lacunares (L)

Figura 17



A Fotografía (40 X) panorámica de un ovario de embrión de pollo de 17 días de incubación (grupo testigo), en la que se muestra la corteza (c) y la médula (m)

B Fotografía (100 X) de la corteza de un ovario de embrión de pollo a los 17 días de incubación (grupo testigo), en la que se muestra con las flechas, las células germinales u ovocitos (O), y las células pregranulosa (G)



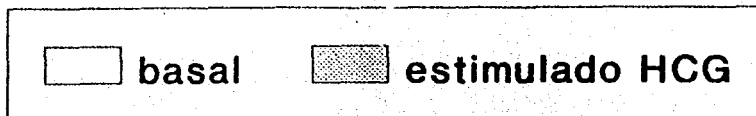
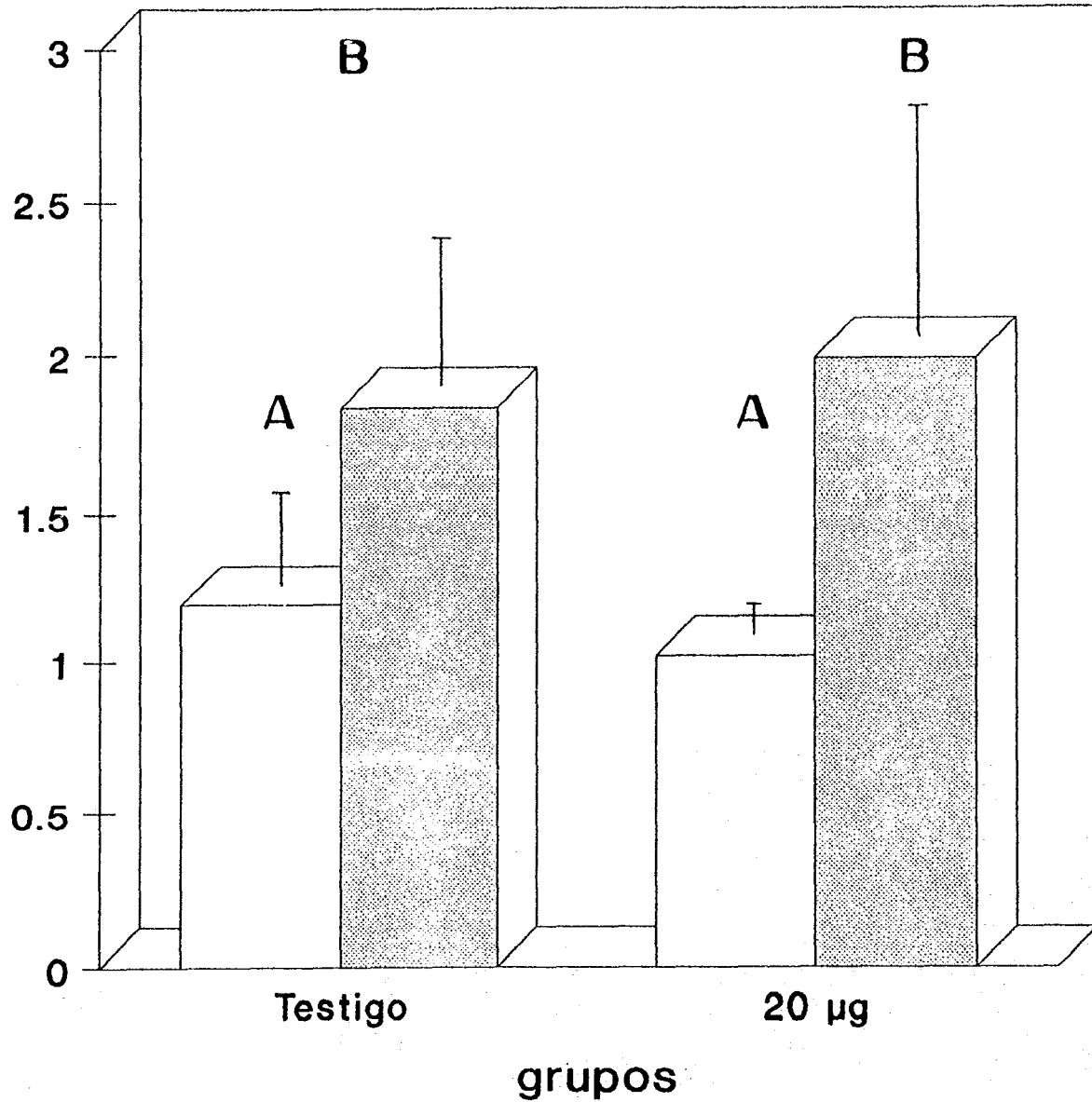
C Fotografía (100 X) de la médula de un ovario de embrión de pollo a los 17 días de incubación (grupo testigo) en que se muestra con las flechas, las células típicamente esteroidogénicas (S), las células indiferenciadas (I) y los espacios lacunares (L)

Figura 18

Biosíntesis de estrógenos en cultivos *in vitro*, grupos

Testigo y 20 µg de inhibidor de aromatasa

nanogramos



(P < 0.05)

Figura 19

Biosíntesis de andrógenos en cultivos *in vitro*, grupos

Testigo y 20 μg de inhibidor de aromatasa

nanogramos

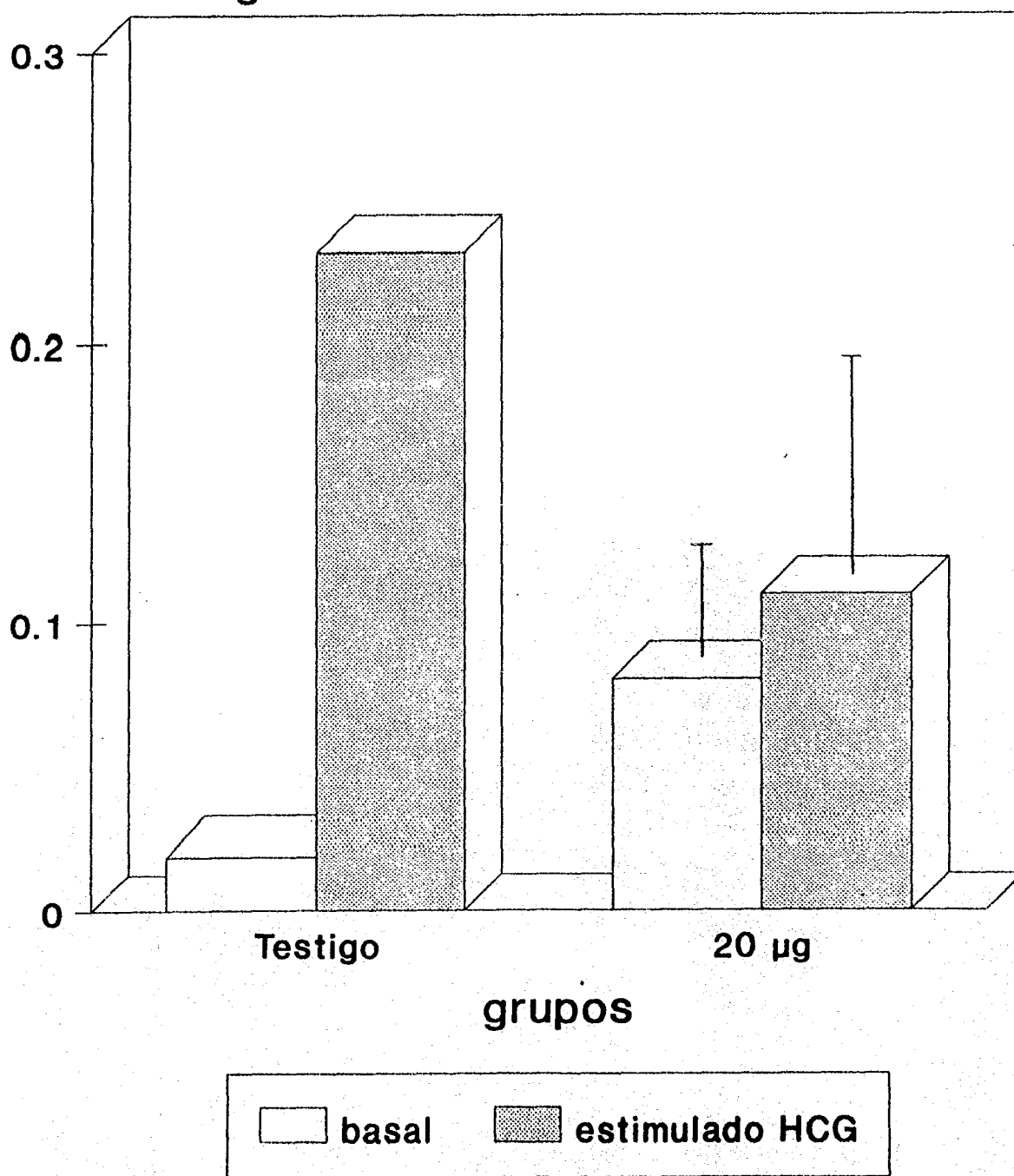
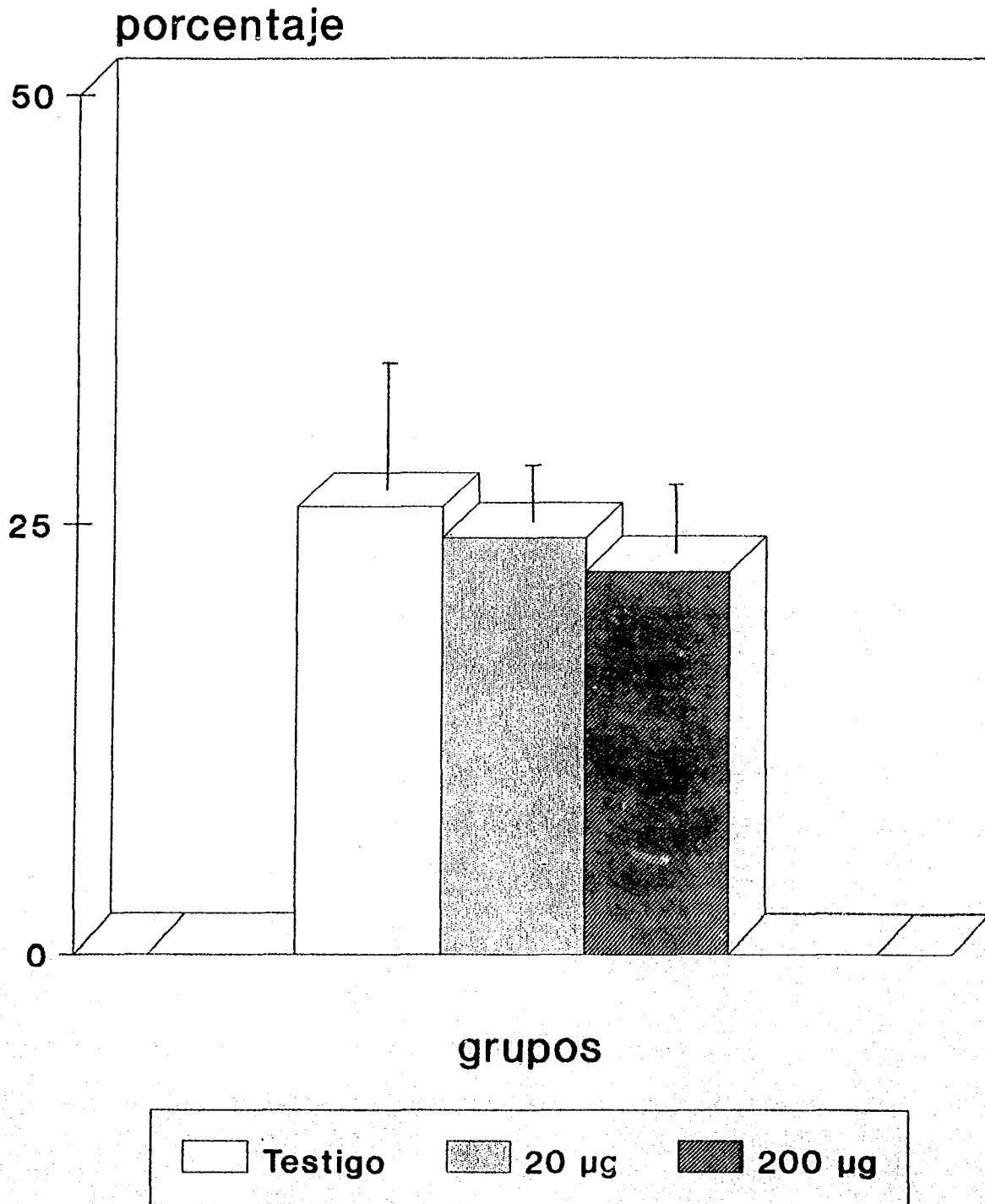


Figura 20

Porcentaje de mortalidad embrionaria post inoculación en los grupos Testigo, 20 y 200 μg de inhibidor de aromatasa



(P > 0.05)

ANEXO

1.- SOLUCIONES Y REACTIVOS

A) Solución amortiguadora de fosfatos libre de calcio y magnesio

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
Agua bidestilada	1,000 ml

B) Medio de cultivo mínimo de Eagle modificado por Dulbeco + albúmina

Medio de cultivo	10.3 g	Sigma Chemical Co, St Louis Mo.
Albúmina bovina	1.0 g	Sigma Chemical Co, St Louis Mo.
Agua ultrapura	1,000 ml	

Se ajusta el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio al 5.0% y se afora a 1,000 ml

C) Tripsina al 25%

Tripsina	0.062 g	Grand Island Biological Co
----------	---------	----------------------------

Disolver en 25 ml de solución amortiguadora de fosfatos libre de calcio y magnesio

D) Inhibidor de tripsina al 50%

Inhibidor de tripsina	0.120 g	Sigma Chemical Co, St Louis Mo.
-----------------------	---------	---------------------------------

Disolver en 25 ml de Medio de cultivo mínimo de Eagle modificado por Dulbeco + albúmina

E) Líquido de centelleo

PPO (2,5-diphenyl-oxazole) 4.0 g

Dimethyl popop

(1,4-bis-[4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl]benzene 0.2 g

Tolueno 667 ml

Tritón X 100 333 ml

F) Solución azul tripano

Azul tripano 400 mg

NaCl 810 mg

KH₂PO₄ 60 mg

Metil p-hidroxibenzoato 50 ml

Agua destilada 90 ml

Calentar a punto de ebullición y enfriar a temperatura ambiente, ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1N y ajustar el volumen a 100 ml