

03062
5
20/

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“EXPRESIÓN DEL ARNm Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA
AROMATASA P-450 EN LAS GÓNADAS INDIFERENCIADAS DEL
EMBRIÓN DE POLLO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE SÁNCHEZ BRINGAS

MÉXICO, D.F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275559



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.

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Irma Villalpando por brindarme la oportunidad de participar como su estudiante de maestría en uno de los proyectos que se desarrollan en su laboratorio.

Al comité tutorial formado por el Dr. Horacio Merchant, el Dr. Enrique Pedernera y la Dra. Irma Villalpando quienes evaluaron esta investigación.

Al Dr. Enrique Pedernera por facilitarme todos los recursos en su laboratorio para realizar los experimentos de cromatografía en capa fina.

Al Biólogo Horacio Villafán por su apoyo en la purificación de la sonda pUGD1201 dirigida contra el cromosoma "W".

A la Bióloga Dolores Aguayo por su ayuda en la técnica de hibridación puntual.

A la D.G.A.P.A. por otorgarme la beca para realizar estudios de maestría.

Al CONACYT por financiar parcialmente esta investigación con fondos obtenidos del proyecto 25287N otorgado a la Dra. Irma Villalpando.

A mis compañeros del laboratorio por el apoyo que me brindaron tanto en el desarrollo de este trabajo como por su amistad incondicional.

A Luis Manuel por su amor,

A Jimena por ser.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
2.0 Dimorfismo sexual cromosomal en la Clase Aves.....	2
2.1 Aspectos morfológicos de la diferenciación sexual en las aves.....	2
a) Formación de la cresta genital.....	3
b) Etapa de gónada indiferenciada.....	4
c) Diferenciación sexual gonadal.....	4
2.2 Genes involucrados en la diferenciación sexual de las aves.....	5
a) Papel del Sry.....	5
b) Función de los genes SOX.....	6
c) Hormona inhibidora de los conductos de Müller.....	8
d) Aromatasa P-450.....	9
2.3 Modulación epigenética de la diferenciación sexual gonadal en los vertebrados.....	10

a) Transplantes.....	11
i) Membrana corioalantoidea.....	11
ii) Cavity celómica.....	11
b) Experimentos de castración.....	12
2.4 Estructura y clasificación de los esteroides sexuales.....	12
a) Clasificación química	12
b) Clasificación biológica.....	13
i) Progestinas.....	13
ii) Andrógenos.....	13
iii) Estrógenos.....	15
2.5 Aspectos relevantes de la función de la aromatasa.....	16
a) Organización molecular del gen.....	16
b) Función del complejo enzimático.....	18
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS.....	21

V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
5.0 Material biológico.....	22
5.1 Técnica de ovoscopía.....	22
5.2 Obtención del tejido embrionario.....	22
5.3 Determinación del sexo genético por hibridación puntual.....	23
a) Marcaje de la sonda del cromosoma "W" con radionucleótidos.....	23
b) Preparación del tejido.....	24
c) Prehibridación e hibridación de las muestras.....	24
d) Autorradiografía.....	25
5.4 Extracción de ARN total gonadal.....	25
5.5 Amplificación en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.....	27
a) Obtención del ADN complementario.....	27
b) Oligonucleótidos sintéticos.....	27
c) Amplificación del ARN mensajero de la aromatasa P-450.....	28

d) Electroforesis del gen amplificado.....	29
5.6 Biosíntesis de estrona.....	29
a) Determinación de la pureza de la hormona radioactiva.....	30
b) Purificación de la androstendiona tritiada.....	31
c) Incubación del tejido con androstendiona tritiada.....	32
d) Extracción total de esteroides.....	32
e) Cromatografía en capa fina de la estrona.....	33
f) Actividad específica constante de la estrona a partir de cristalizaciones.....	34
VI. RESULTADOS.....	35
6.0 Determinación del sexo cromosómico.....	35
6.1 Ontogenia de la expresión del ARNm de la aromatasa P-450.....	36
a) Etapa de gónada indiferenciada.....	36
b) Diferenciación sexual temprana.....	36

6.2 Metabolismo de la androstendiona.....	39
a) Actividad enzimática de la aromatasa P-450 en el período crítico de la diferenciación sexual gonadal en el embrión de pollo.....	39
VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	53
IX. REFERENCIAS.....	54
X. APÉNDICE I.....	60
XI. APÉNDICE II.....	63
XII. ABREVIATURAS.....	64

I. RESUMEN

La diferenciación sexual de las aves ocurre en etapa embrionaria, sin embargo hasta la fecha no se han esclarecido los mecanismos que intervienen en este proceso. Se ha planteado que el complejo enzimático aromatasa P-450 pudiera estar participando de manera fundamental en el proceso de diferenciación sexual gonadal, pero hasta ahora no existen suficientes evidencias que permitan asegurar esta propuesta. En la presente investigación se estudió la expresión del ARNm de la aromatasa P-450, para lo cual con la técnica de RT-PCR se amplificó el ADN del gen a edades muy tempranas del desarrollo embrionario (96, 108, 120 y 132 horas de incubación) y a diferentes tiempos dentro del período crítico de la diferenciación sexual gonadal (144 a 156 horas de incubación a intervalos de una hora). Asimismo, con la técnica de cromatografía en capa fina se evaluó la biotransformación de la estrona a partir de androstendiona tritiada en las gónadas masculinas y femeninas a las 144, 147, 151, 155, 156, 168 y 192 horas. Nuestros resultados indican que el inicio de la expresión del mensajero de la aromatasa P-450 ocurre a las 147 horas de incubación en los ovarios derecho e izquierdo del embrión de pollo; sin embargo, no se detectaron transcritos en el testículo embrionario. Solo en el ovario izquierdo se observó mayor intensidad de la expresión a las 156 horas. Se demostró que la biosíntesis de la estrona inicia a las 147 horas en las gónadas de machos y hembras, y en el ovario izquierdo se observa un incremento lineal. Con base en nuestros resultados se propone que la aromatasa P-450 cumple una función determinante en los primeros eventos de la diferenciación sexual gonadal de las aves.

II. INTRODUCCIÓN

2.0 Dimorfismo sexual cromosomal en la Clase Aves

La determinación sexual de los vertebrados se inicia con la fecundación del ovocito por el espermatozoide. En ese momento de acuerdo a la combinación de los cromosomas sexuales se establece el sexo genético del individuo y con ello se genera una cascada de eventos morfogenéticos que conducen en diferentes intervalos espacio-temporales al establecimiento del sexo gonadal y fenotípico. En los mamíferos la diferenciación ovárica y por lo tanto femenina, se asocia con el sexo homogamético (XX). Asimismo, el sexo cromosómico heterogamético (XY) da lugar a la diferenciación del testículo y con ello al fenotipo masculino.

En las aves se presenta el caso opuesto, el fenotipo femenino está relacionado con el sexo heterogamético (ZW), mientras que los machos son homogaméticos (ZZ) (Ohno y col., 1959).

2.1 Aspectos morfológicos de la diferenciación sexual en las aves

Los diferentes componentes que participan en este proceso son: a) las células germinales primordiales (cgp's), b) las células del mesénquima c) las células somáticas (precursoras de las células de la granulosa y de las células de la teca en el ovario, así como de las células de Leydig y las células de Sertoli en el testículo) y d) las células endoteliales.

a) Formación de la cresta genital

Dentro de los eventos iniciales que ocurren en la formación de la cresta genital de las aves se lleva a cabo la migración de las cgp's que en las primeras 18 h.i. (Hamburger y Hamilton, 1951), se separan del hipoblasto para ubicarse en el endodermo del saco vitelino. Entre los 1.5 y 1.8 d.i. se localizan dentro de los vasos sanguíneos y comienzan a migrar a través del torrente sanguíneo (Kuwana, 1993). Aproximadamente a los 2 d.i. las cgp's salen de los capilares en el mesenterio esplácnico posterior de la arteria onfalomesentérica del embrión rumbo a la cresta genital (Ando y Fujimoto, 1983) la cual para entonces ha comenzado a diferenciarse como una estructura epitelial mesenquimática (Fargeix y col. 1981). Se ha observado que en el trayecto hacia la cresta genital las cgp's emiten prolongaciones citoplasmáticas que les permiten desplazarse hacia su destino (Hardisty, 1984). Se ha planteado que las cgp's responden a algún factor quimiotáctico liberado por la cresta genital que pudiera estar atrayéndolas (Kuwana, 1993). Asimismo, se ha visto que la fibronectina, una glicoproteína de 220 kDa la cual forma parte de la matriz extracelular, se encuentra presente en las rutas de migración de las cgp's de las aves y se ha propuesto que ésta podría funcionar como sustrato de migración de las cgp's hacia la cresta genital. (Fujimoto y Yoshinaga, 1986).

A los 2.5 d.i. las células mesenquimáticas de la cresta genital comienzan a formar cordones de tipo epitelial. Al comienzo del 3º d.i. y hacia el 4º d.i. prolifera el área basal del epitelio germinal y se observan cgp's localizadas entre las células epiteliales. Junto con la proliferación epitelial, las células

mesenquimáticas más dorsales se agregan y generan un segundo grupo de cordones epiteliales que se incorporan progresivamente dentro de la médula (Fargeix y col, 1981). En el 4° d.i. la cresta genital está completamente estructurada. Junto con la formación de los cordones sexuales, el mesénquima y los vasos sanguíneos aislan a la gónada del tejido mesonéfrico (Carlón y Stahl, 1985 y Zaccanti y col., 1990).

b) Etapa de gónada indiferenciada

A los 5 d.i., los componentes antes mencionados proliferan y constituyen la gónada indiferenciada, la cual presenta dos áreas topográficas bien definidas en las aves: la corteza y la médula. Asimismo, esta estructura se caracteriza por ser bipotencial, ésto es que tiene la capacidad morfo-fisiológica de desarrollarse como un ovario o un testículo de acuerdo al sexo genético del embrión (Carlón y Stahl, 1985) y a factores de tipo epigenético. Paralelo al desarrollo de las gónadas se diferencian los conductos de Wolff, los cuales darán lugar al tracto reproductor masculino y los conductos de Müller que en las hembras genéticas se diferenciarán como el tracto reproductor femenino.

c) Diferenciación sexual gonadal

El evento característico en la diferenciación gonadal de los machos genéticos es la separación que ocurre entre el tejido medular y el epitelio celómico. En este proceso las cgp's migran hacia la zona medular y el mesénquima y los vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica separan el área medular

del epitelio celómico, estableciéndose la túnica albúginea. Una de las características particulares de la Clase Aves presente en las hembras de la mayoría de las especies es la asimetría ovárica. Entre el 6° y 7° d.i. la gónada derecha comienza a perder su arreglo histológico y el epitelio germinal se transforma en una capa de células planas, carentes de cordones sexuales secundarios. El conducto de Müller también involuciona hasta quedar en un estado rudimentario (Josso y col., 1977) y a los 7 d.i. la asimetría ovárica es más evidente. Las cgp's realizan múltiples divisiones mitóticas que dan lugar a la formación de ovogonias, las cuales se organizan en grupos. La corteza de la gónada izquierda continúa su crecimiento y las células somáticas rodean los grupos de ovogonias formando de esta manera los cordones sexuales secundarios o corticales.

2.2 Genes involucrados en la diferenciación sexual de las aves

En el transcurso de las últimas décadas se han identificado algunos genes que pueden estar involucrados en la diferenciación sexual gonadal de aves y mamíferos.

a) Papel del SRY

Se ha demostrado que el brazo corto del cromosoma Y de los mamíferos incluye un fragmento de 34 kb que corresponde al gen responsable de la diferenciación del testículo. Esta secuencia se denomina SRY en humanos (Sinclair y col., 1990) y Sry en el resto de los vertebrados (Tiersch y col, 1991) y se caracteriza

por presentar la caja HMG, la cual es un motivo de unión al ADN característico de algunos factores de transcripción (Laudet y col., 1993). Asimismo, se ha demostrado que el Sry se expresa en las células somáticas de la cresta genital de embriones masculinos de ratón antes de que se lleve a cabo la diferenciación gonadal (Gubbay y col., 1990; Koopman y col., 1990 y Berta y col., 1990), lo que ha hecho posible considerarlo el candidato idóneo para la diferenciación testicular de los mamíferos.

En las aves, en etapa adulta, se ha detectado la presencia de un gen con alta homología con la caja HMG del Sry de los mamíferos; sin embargo, hasta el presente no se ha identificado la expresión de este gen en la fase embrionaria de las aves (Tiersch y col., 1991). Se ha sugerido que la determinación sexual de este grupo no emplea el mismo mecanismo genético que utilizan los mamíferos.

b) Función de los genes Sox

Dentro de los genes que se han relacionado con el proceso de determinación sexual en vertebrados se encuentra la familia de genes Sox, en particular el Sox 9 ya que la mutación de este gen origina el síndrome de displacia campomélica cuyo fenotipo en los mamíferos presenta anomalías que afectan la condrogénesis, el olfato, el corazón, el riñón, el sistema nervioso central y el aparato reproductor masculino (Foster y col., 1994, Wagner y col., 1994). Esta mutación resulta feminizante en los individuos masculinos, los cuales desarrollan los conductos de Müller que dan lugar al útero y a los oviductos, lo que implica una falla en la síntesis de AMH. Asimismo no existe masculinización en genitales

internos y externos, lo que sugiere la ausencia de testosterona (Foster y col., 1994; Wagner y col., 1994). En 1996, Morais da Silva y colaboradores encontraron transcritos del Sox 9 en la cresta genital de embriones de pollo de ambos sexos en la etapa 25 de desarrollo, lo que corresponde a una etapa morfológicamente indiferenciada de la gónada. En etapas posteriores (28 y 32) observaron una fuerte expresión en el testículo, mientras que en los ovarios la expresión fue ténue. Asimismo, propusieron que en las hembras la expresión del Sox 9 ocurre independientemente del mecanismo genético que dirige la diferenciación del ovario en el pollo, y en los machos los altos niveles de expresión de Sox 9 podrían estar dirigiendo la expresión de la AMH. Otros investigadores han detectado la presencia de transcritos del Sox 9 en machos y hembras de pollo de 6 d.i. (etapa 28); así como la expresión del gen de la AMH en machos a partir de los 6 d.i. con un marcado incremento, hasta los 10 d.i. (Clinton, 1997). Sin embargo, Oreal y colaboradores (1998) demostraron que la expresión de la AMH ocurre en la etapa 25, mientras que el mensajero del gen Sox 9 se detectó en la etapa 28. Asimismo, McBride y colaboradores (1997) evaluaron la expresión del Sry en la cresta genital y mesonefros de embriones de pollo de 5 a 7 d.i., lograron identificar seis clonas dentro de las cuales se encontró el Sox-9. Encontraron que la expresión del Sox-9 en las aves ocurre básicamente en los machos genéticos y propusieron que el locus está localizado en un autosoma, el cual no ha sido caracterizado. Debido a la expresión espacio-temporal del Sox 9, se ha planteado que los genes Sox pudieran estar participando en la regulación génica de la diferenciación sexual (Kent y col., 1996). Sin embargo, quedan por

realizar más estudios que permitan elucidar el papel del los genes Sox en relación con este proceso en la Clase Aves.

c) Hormona inhibidora de los conductos de Müller

El tracto reproductor de los vertebrados se diferencia a partir de los conductos de Wolff en los machos y los de Müller en las hembras. Debido a que los dos tipos de conductos se encuentran presentes en la etapa de gónada indiferenciada, el desarrollo de éstos depende del destino sexual de la gónada. En embriones de mamíferos las células de Sertoli producen la AMH la cual debido a su temprana presencia promueve la regresión de los conductos de Müller en los machos. Asimismo, se le ha adjudicado un papel fundamental dentro de la diferenciación gonadal masculina (Di Clemente y col., 1992). La AMH es una proteína homodimérica que forma parte de la superfamilia de factores de crecimiento β transformantes. El gen que codifica para esta proteína es conservado entre mamíferos y aves aunque en este último grupo la secuencia es más grande (Carré y col., 1996). En las aves, la síntesis de la AMH ocurre en machos y en hembras tanto en la embriogénesis como en la etapa adulta (Hutson y col., 1982). La presencia de esta hormona en embriones femeninos hace que el conducto derecho involucre, mientras que el conducto izquierdo se estabiliza y se diferencia (Josso, 1977). La proporción de andrógenos-estrógenos dirige este proceso: se ha propuesto que en los machos los niveles de estrógenos son tan bajos que no tienen ningún efecto sobre la AMH; en cambio la concentración de andrógenos la potencia. En las hembras los niveles de estrógenos son lo

suficientemente altos para proteger al conducto izquierdo de la acción de la AMH y la concentración de andrógenos es la necesaria para ejercer su efecto sobre el conducto derecho (MacLaughlin y col., 1983). Además, se ha demostrado que en los embriones femeninos de las aves el conducto de Müller izquierdo presenta una mayor concentración de receptores de estrógenos que el conducto derecho (Teng y Teng, 1975; MacLaughlin y col., 1983). Por otro lado, Oreal y colaboradores (1998) encontraron que el promotor del gen de la AMH contiene un elemento de respuesta al SF-1 (Steroidogenic Factor-1) el cual es un modulador de enzimas esteroideogénicas. Asimismo encontraron una secuencia palindrómica del elemento de respuesta a estrógenos, dos sitios de unión de la proteína Sox-9 y un elemento de respuesta para el Sry. Por otro lado, con el fin de demostrar que en las aves los estrógenos median el desarrollo del conducto se administró 17β estradiol y se observó que en los machos los conductos Müller prevalecieron y las gónadas se feminizaron (Hutson y col., 1982).

d) Aromatasa P-450

En 1987 Bogart propuso que el destino sexual de las aves y de los mamíferos dependía de la proporción entre andrógenos y estrógenos en la gónada durante la diferenciación sexual. En su hipótesis plantea que el sexo de un individuo depende de la concentración de la aromatasa P-450, enzima que transforma andrógenos en estrógenos. En aves se han realizado diferentes trabajos que apoyan esta hipótesis. Wartenberg y colaboradores (1992) evaluaron el efecto de la 1-metil-androstendiona, la cual es un inhibidor de la aromatasa en las células

gonadales de embriones de pollo femeninos durante la diferenciación sexual. Este autor observó la reversión sexual completa del organismo. Asimismo, se han realizado otros experimentos utilizando diferentes inhibidores de la aromatasa en los que además de mostrar reversión sexual se logró bloquear la inhibición administrando estradiol. Estas observaciones apoyan el papel de los estrógenos y en particular, de la aromatasa P-450 en la diferenciación sexual gonadal de las aves (Elbretch y Smith, 1992).

2.3 Modulación epigenética de la diferenciación sexual gonadal en los vertebrados

Los primeros trabajos en torno a la importancia de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal de los vertebrados fueron realizados por Lillie (1916,1917). Sus observaciones se llevaron a cabo en fetos gemelos de bovinos y ovinos de diferente sexo, los cuales se caracterizaban por presentar "Freemartinismo". Éste se define como una anastomosis coriónica que permite el paso de hormonas esteroides masculinas del feto macho hacia la hembra, causando la masculinización de ésta.

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

El efecto de los esteroides sobre la diferenciación sexual gonadal de los vertebrados y en particular de las aves, se ha evaluado utilizando diferentes

métodos experimentales. A continuación se mencionan algunas técnicas que desde principios de siglo han contribuido significativamente a este propósito.

a) Transplantes

i) Membrana corioalantoidea

En 1921 Minoura realizó implantes de tejido gonadal de pollo adulto en la membrana corioalantoidea de embriones de la misma especie. Sus observaciones indicaron la vascularización del implante y algunas modificaciones en los genitales internos del hospedero. Sin embargo, sus experimentos fueron cuestionados debido a la falta de un riguroso control en la temperatura y humedad, situación que podría haber influido en el desarrollo de los embriones.

ii) Cavidad celómica

En 1946, Wolff implantó gónadas de embriones de pollo de 6 a 11 d.i. dentro de la cavidad celómica de hospederos de la misma especie de aproximadamente 2 d.i. Al implantar testículos observó que los conductos de Müller de las hembras hospederas fueron inhibidos. Asimismo, los ovarios implantados dentro de la cavidad celómica de embriones machos inducían la diferenciación de la corteza ovárica en el testículo izquierdo del hospedero, mientras que el testículo derecho inhibía su crecimiento. Estos resultados llevaron al autor a la conclusión de que el implante secretaba alguna hormona cuya influencia sobre el aparato reproductor del hospedero era evidente.

b) Experimentos de castración

En 1951, Wolff y Wolff castraron embriones de pato y observaron el desarrollo del fenotipo masculino independientemente del sexo genotípico. A su vez, Jost (1970) demostró que al remover las gónadas embrionarias de conejos, invariablemente se obtenía un fenotipo femenino, a pesar del genotipo del organismo. Con estos experimentos quedó fundamentado el hecho de que en las aves se requiere la presencia del ovario o de sus hormonas para que la diferenciación sexual sea femenina.

2.4 Estructura y clasificación de los esteroides sexuales

a) Clasificación química

Las hormonas esteroides son moléculas lipídicas cuya estructura elemental consiste de tres anillos con seis átomos de carbono y un anillo con cinco átomos de carbono, por lo que recibe el nombre de núcleo ciclopentano-perhidrofenantreno. Los tres primeros anillos se denominan A, B y C, y el último D (Gorbman, 1962). La molécula precursora de todos los esteroides es el colesterol, el cual está constituido por un núcleo ciclopentano-perhidrofenantreno, grupos metilos unidos a los carbonos 10 y 13 y una cadena lateral formada por ocho carbonos unida al carbono 17. La separación de los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral origina la serie de los pregnanos o C21, las cuales son moléculas con 21 átomos de carbono que incluyen a los progestágenos. Cuando la segmentación ocurre en los carbonos 17 y 20 de la cadena lateral se forma la serie de androstanos o C19, que como su nombre lo indica dan lugar a los

andrógenos. Por último, la serie de los estranos o esteroides C18 queda constituida con la salida del grupo metilo unido al carbón 10; este grupo da lugar a los estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988) (Fig. 1).

b) Clasificación biológica

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

i) Progestinas

La progestina más importante es la pregnenolona (3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona) debido a que es el precursor de todas las hormonas esteroides. En las aves, la progesterona es sintetizada por las células de la granulosa de los folículos preovulatorios; es la hormona responsable de inducir la síntesis de LH y la ovulación; asimismo, está relacionada con la secreción de albúmen (Bahr y Johnson, 1991).

ii) Andrógenos

Los andrógenos son producidos principalmente en el testículo, aunque también se sintetizan en el ovario. Los andrógenos testiculares son sintetizados por las células de Leydig, de los cuales los aromatizables son la dehidroepiandrosterona (3 β -hidroxi-5-androste-17-ona), la androstendiona (4-androsten-3,17-diona) y la testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona). La aromatización de estos esteroides produce a los estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

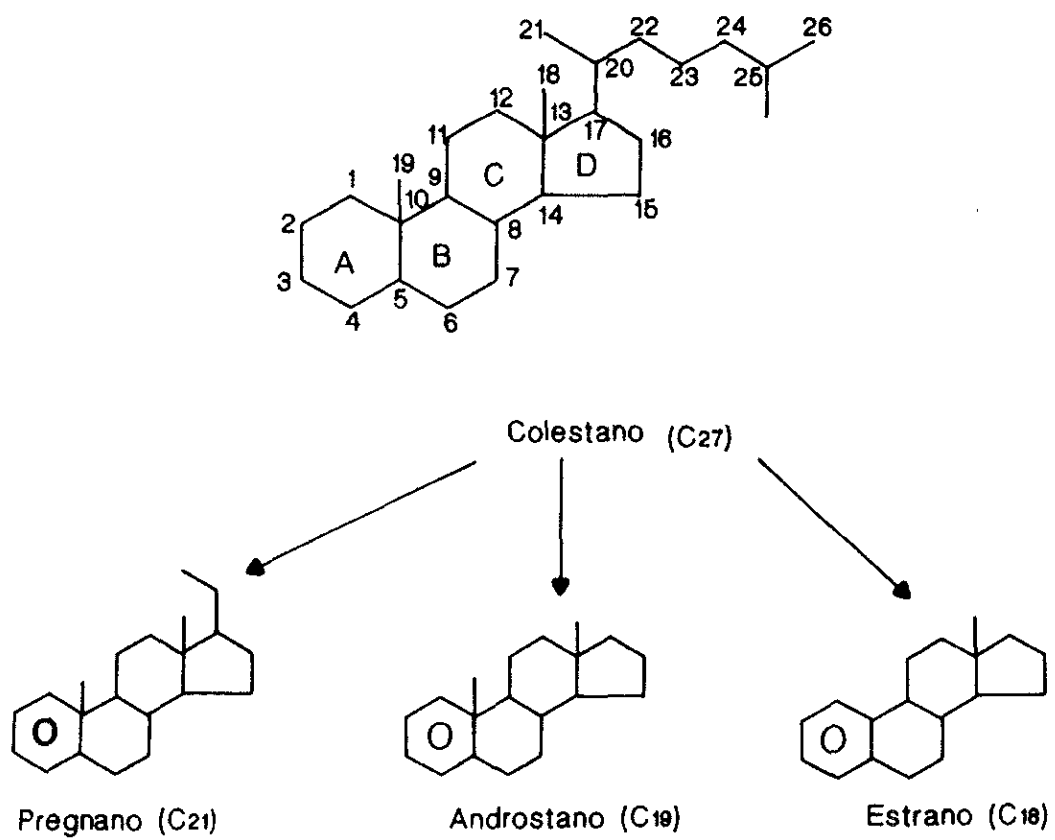


Figura 1. Clasificación química de las hormonas esteroides gonadales (Tomada de Gore-Langton y Armstrong, 1988).

iii) Estrógenos

Una de las funciones biológicas más importante de estas hormonas está relacionada con el establecimiento del aparato reproductor femenino y el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos secundarios de los vertebrados. En anfibios, reptiles y aves, el papel de los estrógenos ha sido fundamental en la producción de fosfoproteínas y lipoproteínas sintetizadas en el hígado para la incorporación del vitelo durante el desarrollo del ovocito (Wallace, 1978). En las aves, los estrógenos actúan en conjunto con los péptidos liberados por el hipotálamo y las hormonas hipofisarias controlando la conducta reproductiva femenina (Sutherland y col., 1988). Asimismo, se les ha considerado los responsables en el paso de la ovoviviparidad hacia la viviparidad (Ryan, 1982). Los estrógenos más importantes son la estrona y el 17β -estradiol, este último es diez veces más potente que la estrona y ambos son sintetizados por las células de la granulosa del ovario (GoreLangton y Armstrong, 1988).

En las aves, en particular los pollos de la cepa White Leghorn, se han detectado estrógenos en el hipotálamo de los machos adultos, mientras que en las hembras los órganos productores de estas hormonas son el hipotálamo y las gónadas (Simpson y col., 1994). Existen dos cepas de pollos llamadas Sebright y Campine en las cuales los machos exhiben un fenotipo feminizado como resultado de una mutación autosómica dominante expresada en etapa embrionaria (McPhaul y col., 1993). El dimorfismo sexual característico de los pollos normales está ausente en estas cepas debido a que la mutación de la que son portadores genera la

expresión de la aromatasa en tejidos extragonadales como la piel y el pulmón (Matsumine y col., 1991).

2.5 Aspectos relevantes de la función de la aromatasa

El paso final en la vía metabólica de las hormonas esteroideas es la biosíntesis de los estrógenos. La reacción está a cargo del complejo enzimático aromatasa P-450, la cual utiliza a los andrógenos, en particular a la androstendiona y la testosterona, como sustrato para la síntesis de estrona y 17β -estradiol respectivamente (Kellis y Vickery, 1987). El complejo enzimático está formado por la aromatasa la cual es una hemoproteína con función de oxidasa responsable de unirse al andrógeno y mediante una serie de reacciones, formar el anillo aromático "A" característico de los estrógenos. Asociado a la aromatasa se encuentra la flavoproteína NADPH-citocromo P-450 reductasa, la cual se localiza en el retículo endoplásmico. Su función es transferir el hidrógeno del NADPH a cualquier forma de citocromo P-450 (Simpson y col., 1994).

a) Organización molecular del gen

El gen de la aromatasa P-450 es miembro de la superfamilia de genes de los citocromos P-450 dentro de la cual se han caracterizado 220 miembros divididos en 36 familias (Nelson y col., 1993). En las aves, el gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (Tereba y col., 1991). El gen que codifica para la aromatasa es el único miembro de la familia 19 y es denominado CYP19 debido a

que en la aromatización de los andrógenos, el oxígeno ataca al grupo metilo angular que se encuentra unido al carbono 19 (Simpson y col., 1994). El gen tiene una longitud de aproximadamente 15 kilobases dividida en 9 exones (Fig. 2). La organización en las aves es similar a la que presenta el gen de la aromatasa de humano y lo único que cambia es el sitio de regulación. Asimismo, se ha demostrado que en las distintas cepas de pollos existen diferencias en la expresión del gen que dependen del sitio de regulación. En la cepa White Leghorn, el promotor de la transcripción está localizado a 147 nucleótidos hacia arriba del codón iniciador, que es el sitio de regulación (McPhaul y col., 1993).

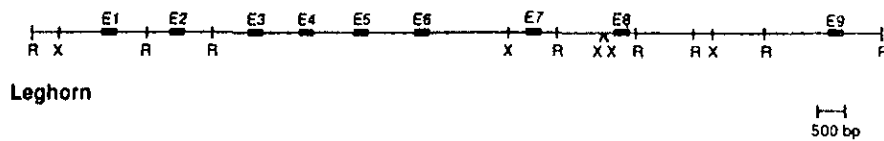


Figura 2. Se muestra la estructura del gen de la aromatasa de la cepa de pollo White Leghorn. Las barras gruesas representan los nueve exones de cada alelo. Asimismo, se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción: X es XbaI y R es EcoRI (McPhaul y col. 1993).

b) Función del complejo enzimático

La reacción de aromatización de los andrógenos utiliza 3 moléculas de oxígeno y 3 moles de NADPH por cada mol de andrógeno metabolizado. Como proceso simultáneo a la aromatización del anillo "A" de la molécula, se da la salida del grupo metilo angular unido al carbono 19 como ácido fórmico. Las primeras dos moléculas de oxígeno se utilizan para oxidar al grupo metilo angular a partir de dos hidroxilaciones, aunque hasta la fecha no se ha demostrado plenamente el modo en que ocurre la tercer oxidación. Sin embargo, se ha sugerido que el mecanismo consiste en un ataque peroxidativo sobre el grupo metilo angular del carbono 19, el cual aunado a la salida del hidrógeno -1β , da lugar al doble enlace 1,10. Asimismo, la protonación del grupo 3-oxo a partir de alguna lisina o histidina cercana, junto con el residuo carboxílico obtenido con la eliminación del hidrógeno 2β puede permitir la enolización del grupo cetona 3 (Korzekwa y col., 1993).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que el destino sexual de las aves depende de la proporción de andrógenos y de estrógenos sintetizados por las gónadas embrionarias, y que a su vez este proceso es controlado por la concentración de la enzima aromatasasa P-450 (Bogart, 1987). Asimismo, se ha observado la expresión de esta enzima en los ovarios de embriones desde los 6.5 d.i. (Yoshida y col., 1996). Por otro lado, existen experimentos de detección de esteroides que sugieren que las gónadas embrionarias del pollo son capaces de biosintetizar andrógenos desde los 3.5 d.i. y estrógenos a partir de los 4 d.i. (Woods y Erton, 1978), aunque estos resultados son cuestionables debido a que en esas edades se está terminando de establecer la cresta genital. Sin embargo, con experimentos de autorradiografía se ha encontrado que ciertas regiones de la gónada son capaces de unir de manera específica a los estrógenos desde los 5.5 d.i, situación que ha llevado a proponer que las hormonas esteroides pueden jugar un papel fisiológico fundamental a nivel celular en la diferenciación sexual gonadal de las aves (Gasc, 1980). En trabajos más recientes se detectaron transcritos de receptores a estrógenos en la región urogenital de las hembras y machos de embriones de aves a los 3.5 y 4.5 d.i. respectivamente (Smith y col., 1997). Con base en los antecedentes mencionados y con el fin de aportar nueva información en el esclarecimiento del papel que juegan los estrógenos en el proceso de diferenciación sexual gonadal de las aves, la presente investigación demuestra el momento preciso espacio-

temporal en el que se inicia la expresión del gen de la aromatasa P-450 y la relación con la actividad enzimática de la misma.

HIPÓTESIS

La aromatasa se expresa diferencialmente en las gónadas de machos y hembras en un período crítico de la diferenciación sexual.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la ontogenia de la expresión del ARN mensajero de la aromatasa P-450 y determinar si existe una relación con su actividad enzimática en las gónadas del embrión de pollo durante la diferenciación gonadal.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la expresión del mensajero de la aromatasa P-450 en la cresta genital de embriones de pollo de 96, 108, 120 y 132 h.i.
2. Analizar la expresión del ARN mensajero de la aromatasa en un período crítico para la diferenciación sexual de la gónada de embriones de pollo desde las 144 hasta las 156 h.i., a intervalos de 1 hora.
3. Evaluar la biosíntesis de la estrona a partir de androstendiona tritiada en distintos momentos del período crítico de la diferenciación sexual gonadal (144, 147, 151, 155, 156, 168 y 192 h.i.).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.0 Material biológico

Se utilizaron huevos fértiles de la cepa White Leghorn obtenidos en la granja avícola A.L.P.E.S. (Aves Libres de Patógenos Específicos), ubicada en Tehuacán, Pue. y se colocaron a 37°C de temperatura y 80% de humedad, en una incubadora marca James MFG CO.

5.1 Técnica de ovoscopia

Una vez transcurrido el tiempo de incubación requerido para cada experimento, se colocó cada huevo a contraluz de una lámpara en un cuarto oscuro y se determinó la viabilidad por la presencia del embrión unido a la red de vasos sanguíneos (New M.A., 1966).

5.2 Obtención del tejido embrionario

Se hizo un corte circular en la zona de la cámara de aire del huevo, se retiró la membrana papirácea y se sacó al embrión. Las etapas de desarrollo se determinaron para cada edad de acuerdo con la descripción de Hamburger y Hamilton (1951). Los embriones se decapitaron, se disecó el complejo urogenital (gónadas y mesonefros) y se sumergió en el medio de cultivo Medio Esencial Mínimo con sales Earle y L-glutamina de Gibco BRL pH=7.0. Las gónadas utilizadas para la extracción del ARN fueron colocadas en

tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y congeladas a -70°C en un ultracongelador Forma Scientific. El tejido obtenido para realizar otras técnicas se procesó como se describe en cada una de éstas.

5.3 Determinación del sexo genético por hibridación puntual

El sexo de los embriones obtenidos en etapa de gónada indiferenciada, (96 h.i. etapa 22-23, 108 h.i. etapa 24, 120 h.i. etapa 26, de 132 a 148 h.i. etapa 27-28, de 149 a 156 h.i. etapa 29, y 168 h.i. etapa 32) se determinó utilizando la técnica de hibridación puntual, con la cual se detectó la presencia del cromosoma W, característico de las hembras en este grupo de vertebrados (Ohno y col., 1959).

a) Marcaje de la sonda del cromosoma "W" con radionucleótidos

Por el método de Random Primer obtenido de GIBCO BRL se marcaron 300 ng de la sonda pUGD1201 dirigida contra el cromosoma "W" (proporcionada por el Dr. E. Pedernera quien la recibió del Dr. A. Mizuno). El ADN se desnaturalizó a 90°C en baño María, 5 minutos, y se colocó en hielo. Secuencialmente se agregaron 0.01mM de dCTP, dGTP y dTTP, 15 μl del amortiguador de Random Primers constituido por 0.67 M de HEPES, 0.17 M de TRIS-HCl, 17 mM de MgCl_2 , 33 mM de 2-mercaptoetanol, 1.33 mg/ml de BSA y 18 U/ml OD_{260} ; 5 μl de $\alpha\text{dATP-P}^{32}$ (50 μCi) y el agua destilada necesaria para ajustar 49 μl . La mezcla se resuspendió y se agregaron 3 U del fragmento Klenow, se agitó unos segundos y se mantuvo a temperatura ambiente, 2 horas.

La reacción se detuvo con 5 μ l de amortiguador EDTA 0.25 M, pH=7.0. La sonda se separó en una columna de sephadex G50 empacado en una jeringa de insulina. A los 55 μ l de la reacción se les agregó 105 μ l de amortiguador TE 10 mM (ver apéndice I) junto con EDTA 1 mM pH=8.0. La radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido Techical Associates, modelo PUG 1AB, y se expresó en cpm. La actividad específica fue de 57×10^6 cpm/ μ g de ADN.

b) Preparación del tejido

Se obtuvieron fragmentos de hígado, intestino y corazón de aproximadamente 0.03 g de cada embrión y se colocaron en tubos Eppendorf estériles individualmente junto con 400 μ l de set-buffer (ver apéndice I). Se homogeneizó con un pistilo de teflón Wheaton y un homogenizador Tri-Instrument, modelo S63-c. Secuencialmente se agregaron 15 μ l de SDS (ver apéndice I) y 1.5 μ l de proteinasa K marca Boehringer Mannheim (10mg/ml) y las muestras se incubaron a 60°C, 2 horas. En una membrana Hybond-N+ de Dupont se colocaron 5 μ l de cada una y se guardó a temperatura ambiente hasta realizar el experimento.

c) Prehibridación e hibridación de las muestras

Las membranas se hornearon a 80°C al vacío, 2 horas y se desnaturalizaron con una solución de NaOH 0.4 N y NaCl 0.5 M, 1 hora. A continuación se neutralizaron con TRIS 1 M, pH=7.0, 1 hora y se secaron a temperatura

ambiente. Se prehibridaron con una solución de formamida 50%, sulfato de dextrán 25%, NaCl 1 M y SDS 0.5%. Por cada 10 ml de esta solución se agregaron 200 μ l de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) y se incubaron a 42°C, 18 horas en agitación constante. La sonda marcada se desnaturalizó a 95°C y se agregaron 1×10^6 cpm por cada 10 ml de la solución arriba mencionada. La membrana se incubó a 42°C, 18 horas. A continuación, se lavó dos veces con SSC IX y SDS al 0.5% a 60°C, 5 minutos.

d) Autorradiografía

Las membranas se expusieron a una película X-OMAT, XK-1 de Kodak y se mantuvieron a -70°C de 1 a 2 semanas. Las autorradiografías se revelaron con un revelador Kodak D-19, 5 minutos y se lavaron con agua corriente. Finalmente se fijaron con un fijador rápido durante 5 minutos.

5.4 Extracción del ARN total gonadal

El tejido procesado por medio de esta técnica se dividió en tres grupos formados por 10 gónadas embrionarias de cada edad. El primer grupo consistió de gónadas de 96, 108, 120, 132 y 144 h.i.; el segundo estuvo constituido por tejido gonadal de 144, 156, 168, 180, 192, 216, 240, 264, 288, 312 y 324 h.i. El tercer grupo estuvo formado por gónadas embrionarias de 144 h.i. a 156 a intervalos de 1 hora. De acuerdo con la técnica de Chomczynsky y Sacchi (1987) se aisló el ARN total de las muestras realizando las modificaciones requeridas para la cantidad de tejido manejado. Se realizaron cuatro repeticiones por

experimento y se extrajo por separado el ARN total del ovario izquierdo y del derecho de las hembras. Las gónadas se homogenizaron en 100 μ l/gónada de Solución 1 (ver apéndice I) para lo cual se usaron pistilos con punta de teflón marca Weathon y un homogenizador marca Tri-Instrument, modelo S63c. Secuencialmente se agregaron 10 μ l/gónada de acetato de sodio, pH=4.0 y 100 μ l/gónada de fenol saturado con agua (ver apéndice I). La purificación se hizo con una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Los tubos se agitaron y se incubaron a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm, 20 minutos a 4°C en una ultracentrífuga marca Eppendorf modelo 5402. Las fases acuosas se transfirieron por separado a tubos Eppendorf junto con 100 μ l/gónada de isopropanol. Los tubos se agitaron con la mano y se precipitaron a -70°C, 30 minutos; se centrifugaron a 14000 rpm 20 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 30 μ l/gónada de solución 1. Se agregó un volumen similar de isopropanol y se precipitó a -70°C, 30 minutos. Las muestras se centrifugaron en las condiciones mencionadas anteriormente y se decantó el sobrenadante. A continuación se lavaron con 100 μ l de etanol al 75% y se centrifugaron a 14000 rpm 10 minutos a 4°C, dos veces. Los tubos se colocaron en un desecador a -20°C, toda la noche. El ARN de cada muestra se resuspendió en 3 μ l de agua tratada con DEPC (ver apéndice I) y se utilizó inmediatamente para realizar la técnica de RT-PCR.

5.5 Amplificación en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

Los reactivos usados en esta técnica fueron obtenidos de Perkin Elmer Cetus, por edad se manejaron tres muestras experimentales y un control negativo en el cual se omitió el uso de la R-T.

a) Obtención de ADN complementario

Se preparó una mezcla de solución de $MgCl_2$ 5mM, amortiguador II PCR 10X constituido por KCl 0.65mM y Tris-HCl 0.13mM, 1mM de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), 1U de inhibidor de ARNasas, 2.5 μ M de hexanucleótidos con secuencias al azar y 3 μ l de la muestra de ARN total. Por separado se agregaron 2.5 U de la enzima R-T en cada una de las muestras experimentales y 1 μ l de agua-DEPC en la muestra control. El volumen final por tubo fue de 20 μ l.

b) Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos fueron elaborados en la Unidad de Análisis y Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo con el ADNc de la aromatasa P-450 publicado por McPhaul y colaboradores (1988). Cada uno está constituido por 24 pb no complementarias que delimitan un fragmento de 548 pb:

(SENTIDO 5'→3')

CTC GAT TTG GGA GCA AGC TTG GAT

(ANTISENTIDO 5'→3)

GAC ATT CTC AGC AGT CAG ATG TCC

Para realizar el adecuado análisis de los resultados se amplificó simultáneamente un fragmento de 285 pb del gen de la β -actina de pollo. Los oligonucleótidos fueron diseñados por Smith y colaboradores (1997) de acuerdo al ADNc de la β -actina (Kost y col. 1983). Cada uno estuvo constituido por 19 pb no complementarias y fueron sintetizados por Gibco, BRL.

c) Amplificación del ARN mensajero de la aromatasa P-450

Los eventos moleculares que ocurren durante la amplificación son tres:

1. La desnaturalización del ADN, la cual se lleva a cabo a 94°C.
2. El alineamiento de los oligonucleótidos sintéticos iniciadores en cada una de las hebras por separado en dirección 3'→5', a 55°C.
3. La síntesis de ADN a 72°C.

Con estos tres pasos se obtiene un ciclo de la reacción, la cual se comporta de manera exponencial al generar copias idénticas del fragmento flanqueado por los oligonucleótidos sintéticos que sirven como moldes para la síntesis de nuevas copias del ADN (Erlich et al., 1991).

A cada muestra de ADNc se agregó una solución de $MgCl_2$ 5mM, amortiguador II PCR 10X constituido por KCl 2.6 mM y Tris-HCl 0.53 mM, 65.5 μ l

de agua tratada con DEPC, 0.012 U de la enzima Ampli-Taq ADN polimerasa, 40 pmol de cada oligonucleótido sintético y se incubó en el termociclador a 94°C-2 minutos, 55°C-15 segundos y 72°C-30 segundos, un ciclo; 94°C-15 segundos, 55°C-15 segundos y 72°C-30 segundos, 33 ciclos; 94°C-15 segundos, 55°C-15 segundos y 72°C-10 minutos, un ciclo. El producto de la amplificación se almacenó a -20°C.

d) Electroforesis del gen amplificado

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1X, pH=8.0 (ver apéndice I). El marcador de peso molecular utilizado fue el Low DNA Mass Ladder de Gibco del cual se colocaron 345 ng por gel. De cada producto amplificado se tomaron 20 µl, se mezclaron con el amortiguador de carga (ver apéndice I) y se colocaron individualmente en los pozos del gel.

Se agregaron 500 µl de amortiguador TBE 1X, pH=8 a la cámara de electroforesis y se aplicaron 100 volts durante 2 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio al 0.8% en agua destilada, 10 minutos. A continuación se enjuagó con agua destilada tres veces y se visualizó en un transiluminador de luz u.v. marca Sigma modelo T1202 . Cada gel fue fotografiado con una cámara Hofer.

5.6 Biosíntesis de estrona

Se utilizaron gónadas de embriones de pollo de 144 , 147 (etapa 28) , 151, 155, 156 (etapa 29) , 168 (etapa 32) y 192 (etapa 34). De acuerdo con los

sexos se formaron series de 9 a 12 gónadas de 144 a 192 h.i. y se agruparon en tres categorías: ovario izquierdo, ovario derecho y testículo; estos últimos fueron utilizados como control negativo. Asimismo, el ovario izquierdo de 192 h.i. se consideró control positivo.

Los reactivos, cromatofolios y cromatoplasmas fueron comprados a los laboratorios de Merck, México. La hormona marcada se obtuvo en DuPont NEN Research y los estándares se adquirieron en Steraloids Inc. (ver apéndice II).

a) Determinación de la pureza de la hormona radioactiva

Se utilizaron cromatofolios AL de sílica gel con indicador fluorescente F254. Con lápiz se trazaron tres carriles. En cada uno se colocó una alícuota del estándar de androstendiona disuelta en acetona ($10 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$) junto con $100 \mu\text{l}$ de androstendiona tritiada. La placa se puso sobre una hoja de papel filtro dentro de una cámara de vidrio con 50 ml de diclorometano:acetato de etilo (8:2) y se dejó secar bajo una campana de extracción. El estándar se reveló con ácido sulfúrico al 10% y calor y la hormona marcada se visualizó con luz u.v. La placa se cuadrículó de acuerdo a la posición de las muestras, se cortó y los fragmentos se colocaron individualmente en viales de vidrio junto con 5 ml de líquido de centelleo (ver apéndice I). A continuación, las muestras se colocaron en un contador de centelleo marca Beckman, modelo LS6000. La pureza de la androstendiona tritiada se expresó en porcentaje mediante la comparación de la cantidad de cpm de cada muestra con respecto a las cpm totales.

b) Purificación de la androstendiona tritiada

Debido a que en la prueba anterior se detectó una pureza de la hormona menor del 97% fue necesario purificarla, para lo cual se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel en vidrio sin indicador fluorescente. Éstas se pusieron sobre una hoja de papel filtro dentro una cámara de vidrio con 150 ml del sistema de separación metanol:cloroformo (3:1). A continuación se secaron bajo una campana de extracción 20 minutos. Se trazaron los carriles en la placa, se aplicaron alícuotas de 10 μ l del estándar de androstendiona y de 100 μ l de la hormona tritiada, evaporando con nitrógeno inerte. La cromatoplasma se colocó sobre una hoja de papel filtro dentro de una cámara de vidrio, junto con 100 ml del sistema de separación diclorometano:acetato de etilo (80:20). Una hora después se retiró la placa de la cámara y se dejó secar 15 minutos. Los carriles con el estándar se revelaron con ácido sulfúrico al 10% y calor. La ubicación de la androstendiona tritiada se determinó con luz u.v. Con una navaja se desprendió la sílica y se colocó en un sistema de filtración construido con un embudo relleno de fibra de vidrio. Asimismo, se realizaron tres lavados de 18 ml de cloroformo cada uno. En la primera fracción se obtuvo el 98% y en las dos últimas se obtuvieron el 1.8% y 0.2% de la androstendiona tritiada. El cloroformo se evaporó con nitrógeno inerte en un baño con agitación a 37°C y 70 ciclos/minuto. Los cristales se resuspendieron en 600 μ l de etanol cromatográfico, se tomaron 25 μ l y se colocaron en un vial junto con 5 ml de líquido de centelleo. La muestra se leyó en el contador de centelleo y se obtuvo

un total de 87000 cpm. Se determinó la pureza de la androstendiona tritiada de acuerdo como se describió anteriormente.

c) Incubación del tejido con androstendiona tritiada

Cada gónada se colocó individualmente en tubos de ensaye de vidrio a los cuales se les agregó previamente alícuotas de 100 μ l de una solución preparada con 1.0 ml de medio de cultivo Dulbecco enriquecido con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA), 10 μ l de solución etanólica preparada con 0.1 μ Ci de androstendiona tritiada equivalente a 1.170 fmol, cada uno se gasificó 5 segundos con 95% de aire y 5% de CO₂ y se incubaron durante 1 hora a 37°C en un baño con agitación (90 ciclos/min). La reacción se detuvo al almacenar las muestras a -40°C en un ultracongelador Revco. Se procedió a realizar el sexado los embriones.

d) Extracción total de esteroides

Se recuperó el contenido de los tubos y se formaron los grupos de ovario izquierdo, ovario derecho y testículo. A continuación se agregaron 10 ml de éter etílico en cada vial y se almacenaron a -40°C. Una vez congelado el medio de cultivo se recuperó el éter en viales de centelleo y se dejó secar por evaporación a 37°C en un baño con agitación (90 ciclos/min). Este último paso se repitió hasta completar tres extracciones. Los esteroides se reconstituyeron con 100 μ l de etanol absoluto cromatográfico. Para conocer la naturaleza de los

metabolitos biosintetizados se procedió a evaluar las muestras mediante la técnica de cromatografía en capa fina.

e) Cromatografía en capa fina de la estrona

Se usaron cromatofolios AL de sílica gel con indicador fluorescente F254 . Se trazaron los carriles correspondientes a cada una de las muestras; los estándares utilizados fueron: androstendiona, testosterona, estrona y 17β -estradiol (ver apéndice II), de los cuales se tomaron 10 μg y se diluyeron en 500 μl de acetona. Se colocaron alícuotas de estas soluciones por separado y junto con 40 μl de cada una de las muestras problema evaporando con nitrógeno inerte. El cromatofolio fue colocado en una cámara para cromatografía junto con 100 ml del sistema de separación diclorometano:acetato de etilo (8:2). Una hora cuarenta minutos después se sacó la placa y se dejó secar bajo la campana de extracción. Los estándares se revelaron con ácido sulfúrico al 10% y calor; las muestras experimentales se observaron y se señalaron bajo luz u.v. Se cortó el cromatofolio de acuerdo con la posición de los estándares, cada fragmento se sumergió en 5 ml de líquido de centelleo y se introdujo en un contador de centelleo marca Beckman Modelo LS6000. La recuperación de la radioactividad se obtuvo a través de la comparación del total de cpm finales con respecto a las iniciales. Asimismo, se calcularon los porcentajes de transformación de los sustratos hacia sus metabolitos.

f) Actividad específica constante de la estrona a partir de cristalizaciones

Para corroborar la identidad de la estrona se tomaron alícuotas de las muestras problema, se incubaron de 15 a 60 minutos y se detuvo la reacción con éter frío. En tubos de vidrio de peso conocido, se colocaron 15 mg del estándar de la estrona, se disolvió con calor y se agitó con el vórtex. La muestra problema se resuspendió en etanol y se agregó una alícuota de aproximadamente 3000 cpm a los tubos con los estándares fríos. Se agregó agua bidestilada (menos del 50% del volumen total del solvente). Las muestras se almacenaron 24 horas a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm, 20 minutos para separar el medio líquido (aguas madres) de los cristales. Se recuperó el sobrenadante y se calculó la radioactividad. Los cristales se secaron en una estufa a 80°C, 24 horas; se pesaron para conocer la recuperación y se disolvieron para tomar una alícuota y cuantificar la radioactividad. Las cristalizaciones se realizaron cuatro veces.

VI. RESULTADOS

6.0 Determinación del sexo cromosómico

El sexo femenino de los embriones se detectó mediante la señal de hibridación de la sonda marcada del cromosoma W con el ADN del tejido evaluado. Los puntos negros corresponden al genotipo heterogamético característico de las hembras de la Clase Aves. La ausencia de señal en la membrana representa el tejido procedente de embriones masculinos, Fig. 3.

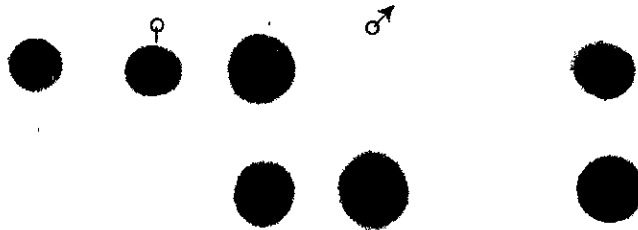


Figura 3. Se muestra la membrana de hibridación en la cual los puntos negros indican la presencia del cromosoma W característico del genotipo femenino "♀" de las aves (ZW). Los espacios en blanco corresponden al genotipo masculino "♂" (ZZ).

6.1 Ontogenia de la expresión del ARNm de la aromatasa P-450

a) Etapa de gónada indiferenciada

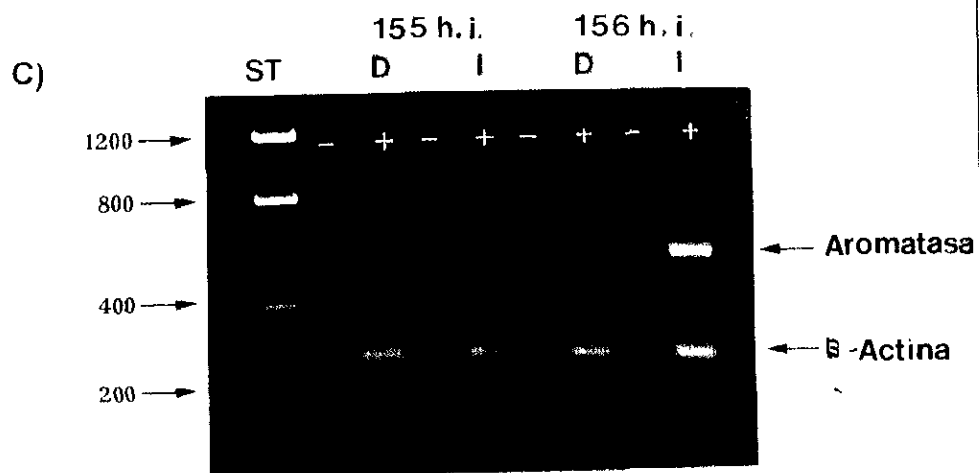
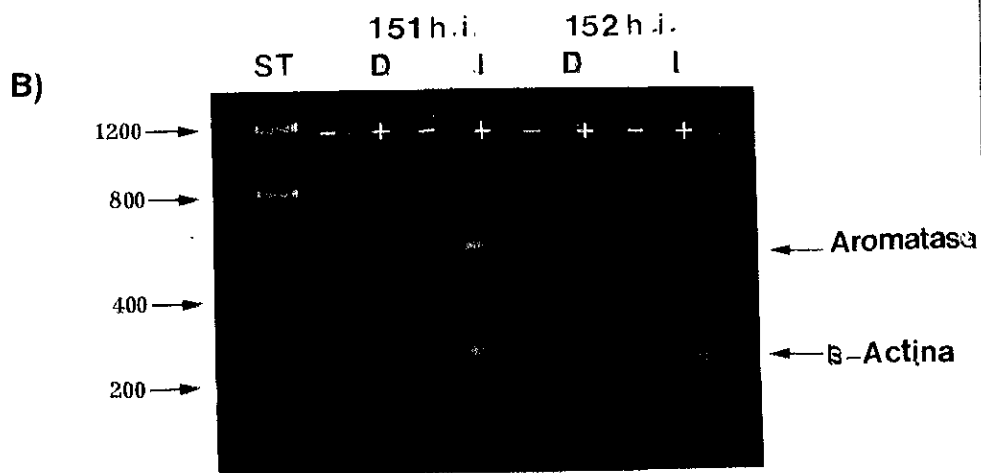
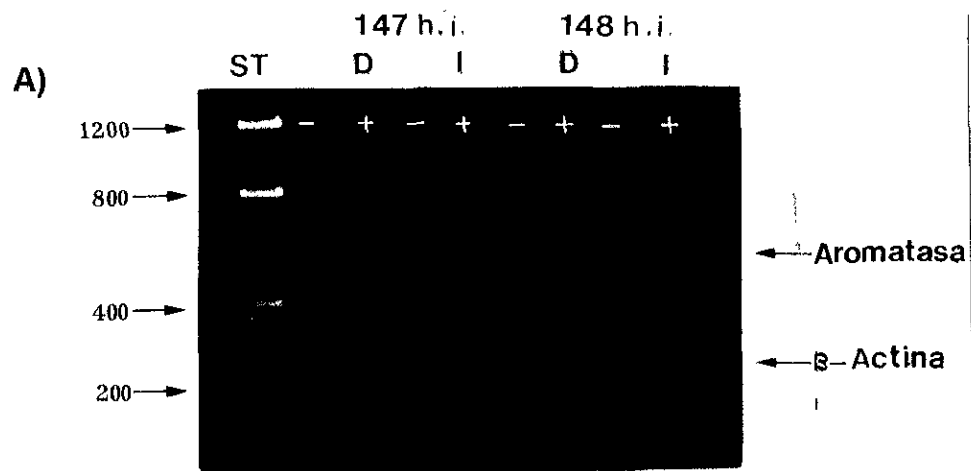
Con la técnica de RT-PCR se evaluó la expresión del mensajero de la aromatasa en las gónadas de los embriones de pollo de ambos sexos a las 96, 108, 120 y 132 h.i.; estas edades corresponden a las etapas de desarrollo 22-23, 24, 26 y 27-28 respectivamente (Hamburger y Hamilton, 1951). En ninguna de las edades mencionadas se detectó la expresión del gen.

b) Diferenciación sexual temprana

Se investigó la expresión del ARNm de la aromatasa en las gónadas derecha e izquierda de las hembras y machos genéticos de 144 a 156 h.i., correspondientes a las etapas 28-29 de desarrollo (Hamburger y Hamilton, 1951) a intervalos de una hora. Las gónadas masculinas no mostraron la expresión de la aromatasa.

Sin embargo, se encontró que la expresión del gen comienza a los 147 h.i. en los ovarios derecho e izquierdo y que es débil en ambas gónadas (Fig. 4A). En la figura 4B se observan las bandas que corresponden a las 151 y 152 h.i. A las 156 h.i., la banda correspondiente al ovario izquierdo es más intensa (Fig. 4C). Asimismo, la expresión de la aromatasa en el ovario derecho se mantiene tenue a lo largo del período estudiado.

Figura 4. Expresión del ARNm de la aromatasa P-450 en las gónadas femeninas del embrión de pollo. Se muestran los fragmentos de DNA de la aromatasa (548 pb) y de la β -actina (298 pb) del ovario derecho (D) e izquierdo (I) amplificados por RT-PCR en diferentes edades del desarrollo embrionario: A) El inicio de la expresión del mensajero ocurre a las 147 h.i. en ambas gónadas, B) se observan las bandas de ambos ovarios a las 151 y 152 h.i.; C) a las 156 h.i. la banda de la aromatasa correspondiente al ovario izquierdo se intensifica. La expresión del ovario derecho se observa ténue a lo largo del período estudiado. El primer carril (ST) corresponde al marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder. Se utilizaron controles sin transcriptasa reversa (-).



6.2 Metabolismo de la androstendiona

Los datos que se muestran en la tabla 1 indican la actividad de la aromatasa en el ovario izquierdo, el derecho y en el testículo, expresada en porcentaje de transformación de la estrona. Los grupos de 10 a 12 gónadas se estudiaron a las 144, 147 (etapa 28), 151, 155, 156 (etapa 29), 168 (etapa 32) y 192 h.i. (etapa 34), esta última edad se consideró como control positivo.

a) Actividad enzimática de la aromatasa P-450 en el período crítico de la diferenciación sexual gonadal en el embrión de pollo

En la tabla 1 se observa que no se detectó la biosíntesis de estrona en las gónadas de 144 h.i. El inicio de la actividad de la aromatasa se observó simultáneamente a partir de las 147 h.i. en el ovario izquierdo y en el derecho, y el porcentaje de biotransformación de la androstendiona fue de 0.3% en ambas gónadas. A las 151 h.i. tanto el ovario izquierdo como el derecho incrementaron ligeramente la producción de estrona a 0.4%. Sin embargo, a las 155 h.i. se pudo observar en el ovario izquierdo un aumento en el porcentaje de transformación a 0.7%, mientras que en el ovario derecho se mantuvo en 0.45%. En las siguientes dos edades evaluadas, 156 y 158 h.i., la biosíntesis en el ovario izquierdo propiamente se duplicó a 1.5% y 2.8% respectivamente, y a las 192 h.i. se mantuvo en 2.5%, los controles positivos indican una clara tendencia creciente en la síntesis de estrona por el ovario izquierdo. La biotransformación en el ovario derecho a las 156 h.i. y a las 158 h.i. fue de 0.5% y 0.35% respectivamente, sin embargo a las 192 h.i. aumentó a 1.6%. Al igual que en los ovarios la

transformación de la estrona en el testículo no se detectó a las 144 h.i. Asimismo, el inicio de la producción de estrona fue simultáneo con las gónadas femeninas estudiadas a las 147 h.i. (Fig. 5); sin embargo, el porcentaje de producción fue de 0.1%. A las 151 h.i. la síntesis aumentó a 0.3% y a las 155 h.i. incrementó a 0.5%. Una hora después, a las 156 h.i. se mantuvo a 0.3% para aumentar ligeramente a las 168 h.i. a 0.45% y alcanzar el 0.6% lo cual representa el porcentaje más alto evaluado en el testículo a las 192 h.i. (Fig 5).

El análisis de regresión con comparación de pendientes permitió comparar la producción de la estrona en los tres diferentes tejidos entre 147 y 192 h.i., con un nivel de significancia de 0.05. Del resultado de la comparación entre el ovario izquierdo y el ovario derecho se obtuvo un valor calculado de $F = 3.11$, valor de tablas 4.96, no significativo. Al comparar el ovario izquierdo con el testículo se observó una $F = 8.16$, valor de tablas 4.96, $R < 0.05$ y finalmente el valor calculado al comparar las pendiente del ovario derecho y del testículo fue de $F = 6.78$, valor de tablas 4.96, (Fig.5).

Cuando el análisis se hizo hasta las 168 h.i. el porcentaje de transformación del ovario izquierdo presentó una regresión significativa (con $R^2 = 0.93$) es decir, la pendiente de la recta resulta diferente de cero. Al analizar el porcentaje de transformación del ovario derecho y del testículo hasta las 168 h.i. la regresión resultó no significativa lo cual indica que la pendiente de la recta en ambos casos no es distinta de cero.

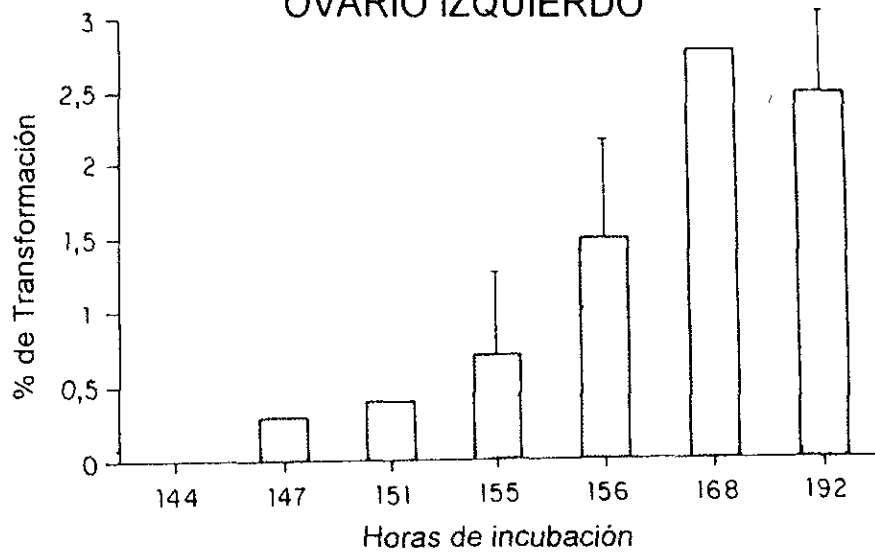
Porcentaje de transformación de la androstendiona en las gónadas embrionarias del pollo

Edad (h.i.)	144	147	151	155	156	168	192
Etapa	28	28	29	29	29	32	34
O. I.	0	0.3	0.4	0.7	1.5	2.8	2.5
O.D.	0	0.3	0.4	0.45	0.5	0.35	1.6
T	0	0.1	0.3	0.5	0.3	0.45	0.6

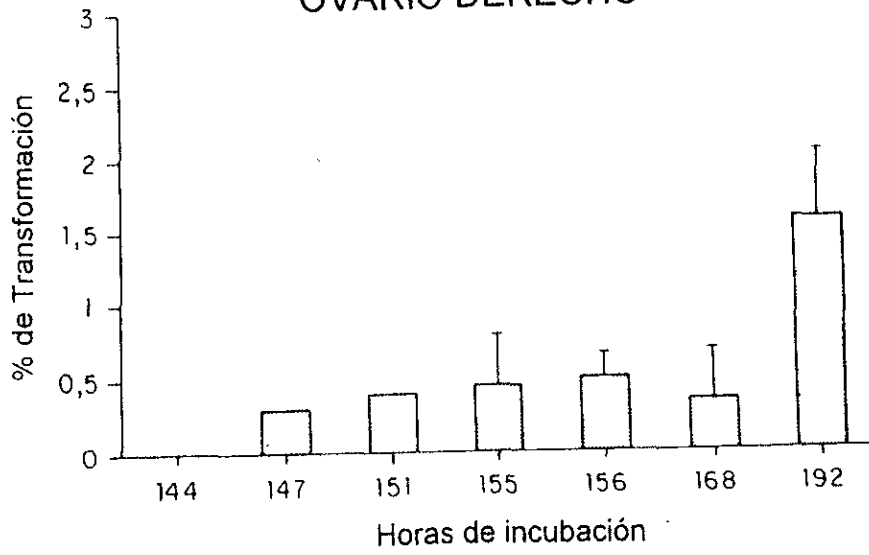
Tabla 1. Se muestra la síntesis de la estrona en el tejido gonadal de embriones a diferentes edades. Las etapas de desarrollo se determinaron de acuerdo a la descripción de Hamburger y Hamilton (1951). Los datos expresan el % de transformación a estrona liberada al medio después de cultivar grupos de 10-12 gónadas durante 1 hora con androstendiona tritiada. Ovario izquierdo (O.I), ovario derecho (O.D.), testículo (T).

Figura 5. Biotransformación de androstendiona a estrona por las gónadas embrionarias del pollo. Los grupos de 10 a 12 gónadas de diferentes edades se incubaron 1 hora con 1 μCi de androstendiona tritada equivalente a 1.170 fmol. La recuperación de la estrona se evaluó por cromatografía en capa fina y se expresó como porcentaje de transformación. El análisis estadístico de la comparación de pendientes mostró los siguientes valores calculados: ovario izquierdo vs. ovario derecho $F = 3.11$, ovario izquierdo vs. testículo $F = 8.16$ y ovario derecho vs. Testículo $F = 6.78$.

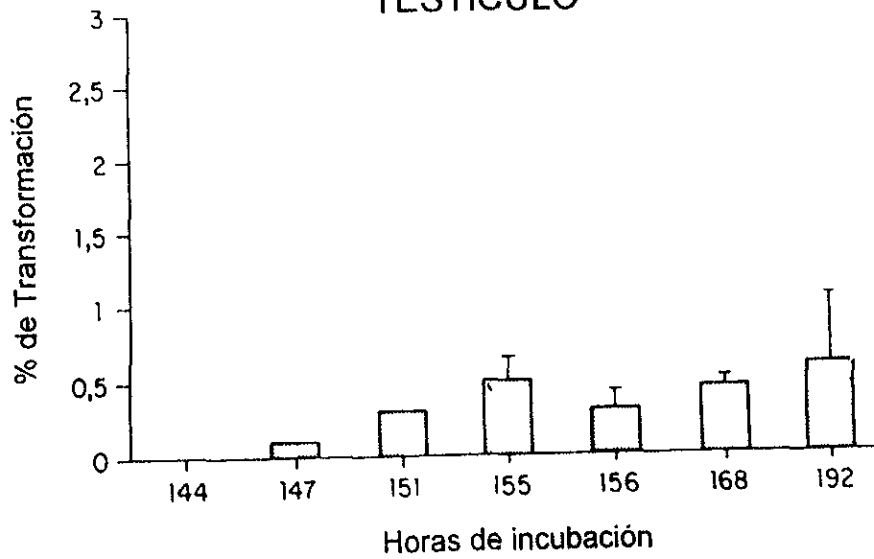
OVARIO IZQUIERDO



OVARIO DERECHO



TESTÍCULO



La presencia de la estrona se constató mediante la actividad específica obtenida a partir de cuatro cristalizaciones sucesivas de la mezcla del metabolito radioactivo con 25-30 mg del estándar de la estrona y una solución de etanol:agua (1:1, v/v). En un contador de centelleo se cuantificó la radioactividad de las aguas madres y de los cristales obtenidos de la última cristalización. Los datos de la actividad específica de la estrona se observan en la tabla 2.

Actividad específica de la estrona

Cristalizaciones (cpm)			
C1	C2	C3	C4
603.74	321.59	329.4	290.6

Tabla 2. Se muestra la actividad específica de la estrona. C1, C2, C3 y C4: cristalizaciones del estándar en presencia del metabolito tritado. El solvente utilizado fue etanol:agua 1:1 v/v.

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la expresión del ARNm de la aromatasa P-450 y su actividad enzimática en las gónadas embrionarias de hembras y machos genéticos de pollo en edades muy tempranas del desarrollo embrionario (96, 108, 120, y 132 h.i.) y a diferentes tiempos dentro del período crítico de la diferenciación sexual gonadal (144 a 156 h.i. a intervalos de una hora). Es importante señalar que se realizaron cuatro repeticiones por experimento obteniendo resultados similares. Asimismo, el uso del gen de la β actina permitió asegurar que la técnica se realizó adecuadamente. A pesar de que el PCR utilizado en este análisis no es de carácter cuantitativo, consideramos importante indicar los tiempos evaluados en donde detectamos claras variaciones en la intensidad del producto amplificado.

Los experimentos de RT-PCR realizados en el testículo embrionario no mostraron la expresión de la aromatasa, lo cual coincide con estudios reportados previamente (Yoshida y col., 1996). Sin embargo, el inicio de la expresión del mensajero se detectó a las 147 h.i. correspondiente a la etapa 28 (Hamburger y Hamilton, 1951) en los ovarios derecho e izquierdo (Fig. 4). Este resultado difiere de otros trabajos publicados recientemente en los cuales se afirma que el inicio de la expresión del gen de la aromatasa ocurre a las 156 h.i., (Yoshida y col. 1996; Smith y col., 1997), cabe mencionar que estos autores no reportan la etapa de desarrollo de los embriones que evaluaron. Las bandas correspondientes a las siguientes tres horas evaluadas (148, 149 y 150 h.i. de la etapa 29 de desarrollo) mantuvieron un patrón similar y la expresión del mensajero en el ovario derecho

permaneció constante hasta la última edad evaluada, 156 h.i. (etapa 29) (Fig. 4B y C). Sin embargo, en el ovario izquierdo el incremento del grosor de la gónada sugiere un aumento de la expresión de la aromatasa P-450 a las 156 h.i. (Fig. 4C). Con base en los resultados obtenidos de la amplificación del gen procedimos a estimar la actividad total de la aromatasa en las horas en que observamos cambios en la expresión del mensajero de esta enzima. Asimismo, se aumentaron dos edades al experimento (168 y 192 h.i., correspondientes a las etapas 32 y 34 respectivamente) con la finalidad de ampliar el intervalo de estudio. Para este efecto se contó con dos opciones de técnicas a usar: el radioinmunoanálisis y la cromatografía en capa fina. La primera resultó ser poco sensible para la cantidad de tejido que manejamos (10 a 12 gónadas por grupo), por esta razón se decidió emplear la técnica de cromatografía en capa fina. La dificultad para obtener el tejido debido al tamaño de las gónadas fue un factor que restringió la posibilidad de corregir nuestros resultados por peso o concentración de proteína, por lo que desde el principio manejamos las gónadas individualmente como se describe en el método, con el fin de uniformizar las condiciones y reducir en lo posible el error. Debido a que en los experimentos de cromatografía en capa fina obtuvimos una recuperación de 90-95% se puede afirmar que los resultados reflejan el metabolismo real de la gónada.

Nuestros experimentos de biotransformación de la estrona indican que el comienzo de la actividad enzimática de la aromatasa en las gónadas embrionarias coincide con el inicio de la expresión del mensajero, es decir a las 147 h.i. (etapa 28). Esta información difiere con algunos resultados publicados recientemente en

los cuales se afirma que la biosíntesis de estrógenos en las gónadas embrionarias comienza a las 156 h.i. (Yoshida, 1996), nueve horas después de lo que nosotros encontramos. La importancia de este hallazgo es visible si se considera que en organismos como las aves los eventos morfogenéticos ocurren a gran velocidad durante el desarrollo embrionario. En la etapa 28 de desarrollo (Hamburger y Hamilton, 1951) se observa la asimetría gonadal característica de las aves (Carlson y Sthal, 1985); en esta etapa la médula se encuentra bien constituida por cordones sexuales y por numerosas células germinales primordiales. El epitelio de la gónada derecha es aplanado y sin la estructura característica de un epitelio germinal, mientras que la gónada izquierda presenta un mesotelio formado por numerosas cgp's y células columnares (Carlson y Sthal, 1985). A las 156 h.i. la etapa de desarrollo es la 29 (Hamburger y Hamilton, 1951) esto es, una etapa más avanzada de lo que nosotros observamos. Esta diferencia de tiempos representa cambios importantes en el desarrollo de la gónada, ya que en la etapa 29 el ovario izquierdo presenta un epitelio germinal marcadamente engrosado, formado por abundantes cgp's y células columnares estratificadas. Asimismo, se observa una lámina basal que separa la médula de la corteza. En el ovario derecho el epitelio superficial ha involucionado y las células que lo constituyen se encuentran completamente aplanadas. Sin embargo, en ambos ovarios se pueden distinguir los indicios de tejido lagunar, característico del ovario de las aves, diferenciándose dentro de los cordones sexuales (Carlson y Stahl, 1985).

Como se puede observar en la figura 5, desde las 147 h.i. (etapa 28) el ovario izquierdo presentó una tendencia a incrementar la biosíntesis de la estrona, lo cual habla de la capacidad de aromatización de andrógenos en ese tejido. Este evento podría resultar lógico si se considera que el ovario funcional de las aves es el izquierdo; sin embargo, no hay que olvidar que las primeras cinco edades evaluadas (144, h.i. (etapa 28) 147, 151, 155 y 156 h.i. (etapa 29) corresponden a un período temprano de diferenciación gonadal, de manera que no se puede hablar de un ovario completamente funcional, pero se puede decir que se encuentra en proceso de adquirir esas características. Por otro lado, en términos de las edades evaluadas, también se puede observar que la tendencia en la biosíntesis de la estrona por parte del ovario derecho no es significativa hasta las 168 h.i. la cual corresponde a la etapa 32 (Hamburger y Hamilton, 1951). Como se puede observar en la figura 5, a las 192 h.i. (etapa 34) existe un incremento en el porcentaje de transformación del ovario derecho de 1.6%, lo que permite decir que a esa edad la gónada derecha aumenta su capacidad de metabolizar la estrona, a pesar de que morfológicamente se le considera como un ovario vestigial (Carlson y Sthal, 1985). Por otro lado, el testículo presenta un perfil de transformación de la estrona muy bajo. Considerando nuevamente las primeras cinco edades estudiadas se puede ver que el comportamiento es muy parecido al que desarrolla el ovario derecho, pero a diferencia de este último, aparentemente guarda este patrón constante ya que el resto de las horas estudiadas no se observa un incremento importante.

La estadística se realizó mediante un análisis de regresión en el que se usó la prueba F para igualdad de pendientes. Se compararon las pendientes que describen las tendencias del porcentaje de transformación de la estrona para cada uno de los tejidos evaluados. Al comparar el ovario izquierdo con el derecho en las edades evaluadas (144 a 192 h.i.) se obtuvo un valor de $F = 3.11$, lo cual significa que la pendiente de ambas rectas es igual y por lo tanto, sigue el mismo comportamiento. Sin embargo, cuando se comparó el ovario izquierdo con el testículo ($F = 8.16$) y el ovario derecho con el testículo ($F = 6.78$) se observó que en los dos casos las pendientes son desiguales, por lo que se puede decir que la recta que define el porcentaje de producción de la estrona en el testículo desde las 144 hasta las 192 h.i. es diferente de la de los ovarios izquierdo y derecho. Al realizar el análisis estadístico hasta las 168 h.i., sólo el ovario izquierdo presentó una regresión significativa ($R^2 = 0.93$), lo que indica que ese tejido fue el único que mantuvo el modelo de crecimiento lineal. En cuanto al ovario derecho y al testículo la regresión no fue significativa, lo que quiere decir que la pendiente en ambos casos es igual a cero.

Los resultados obtenidos en estos experimentos podrían indicar que aunque la biosíntesis de la estrona inicia a las 147 h.i. (etapa 28) en los tres tejidos evaluados, a las 168 h.i. (etapa 32) el ovario derecho y el testículo presentan un porcentaje de biotransformación de la estrona similar que difiere de la biosíntesis del ovario izquierdo. Posiblemente este comportamiento biológico tan parecido entre el ovario derecho y el testículo puede presentarse dentro de un intervalo transitorio desde momentos tempranos de la diferenciación sexual gonadal y una

de las manifestaciones podría deberse a la baja actividad de la aromatasa. Por otro lado, el haber observado la transformación de estrona en el testículo pudiera cuestionar nuestros experimentos debido a que los estrógenos son esteroides característicos del ovario. Sin embargo, existen trabajos en los cuales se demuestra que los testículos de embriones de pollo son capaces de biosintetizar estrógenos "in vitro" a partir de precursores radioactivos a diferentes edades del desarrollo embrionario (Guichard y col., 1973; 1977). Asimismo, con la técnica de autorradiografía, aparentemente se han detectado células capaces de unirse a estrógenos en regiones específicas del testículo embrionario del pollo (Gasc, 1980). Más recientemente los trabajos de Smith y colaboradores (1997) demostraron la presencia de transcritos de receptores de estrógenos en las gónadas masculinas de embriones de pollo desde los 4.5 d.i. Estos trabajos junto con otros son evidencia de que en las aves la determinación sexual no es tan rígida, como en el caso de los mamíferos (Mittwoch, 1996). Si se considera la hipótesis de que las aves evolucionaron de los reptiles, y que en estos últimos la determinación sexual no depende sólo del componente genético sino que existen factores epigenéticos como la temperatura que influyen en este proceso, se podría pensar que las aves poseen cierta carga genética que les confiere una mayor plasticidad en la diferenciación sexual. Esta idea podría explicar que el testículo posea elementos moleculares tales como los transcritos de receptores de estrógenos que en un momento dado le permitan responder a éstas hormonas sexuales femeninas. Sin embargo, ¿cómo se puede explicar el no haber detectado el mensajero de la aromatasa en el testículo y sí haber observado la

biosíntesis de estrona en este tejido?. Una alternativa podría ser que nuestros experimentos de cromatografía en capa fina se hubieran contaminado, lo cual resulta difícil pues se trabajó con una gran rigurosidad. Otra opción podría ser que el testículo sintetice una cantidad mínima de transcritos de aromatasa que a su vez sean procesados inmediatamente o bien, que se desnaturalicen durante el proceso de extracción por lo que no son detectados con la técnica de RT-PCR. Si existe producción de estrógenos tanto en las gónadas masculinas como en las femeninas de embriones de pollo en las etapas iniciales de la diferenciación sexual gonadal, entonces ¿qué papel juega la aromatasa P-450 en este proceso?

Una posible explicación se encuentra al estudiar la hipótesis planteada por Bogart (1987). Este investigador propuso que la proporción de andrógenos/estrógenos determina el fenotipo sexual de las aves y que esto depende a su vez de los patrones de transcripción genética. Cuando la concentración de andrógenos es baja con respecto a estrógenos, se obtiene un fenotipo femenino y viceversa; la clave de estas proporciones está a cargo del complejo enzimático aromatasa P-450. El gen que codifica esta enzima está localizado en el autosoma 1 (Tereba, 1991) y Bogart propone la presencia de un inductor del gen de la aromatasa en el cromosoma "W", es decir en el genotipo femenino. En presencia de este inductor la síntesis de transcritos de la aromatasa sería elevada y por lo tanto la proporción de estrógenos/andrógenos sería mayor. Si por el contrario el inductor no estuviera presente, como en el genotipo homogamético (ZZ), la aromatasa tendría una síntesis de transcritos muy baja y como consecuencia los

niveles de la biosíntesis de estrógenos serían bajos, lo que daría lugar al fenotipo masculino.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo y los generados en esta investigación se propone que el complejo enzimático aromatasa P-450 juega un papel clave en los primeros eventos que ocurren en la diferenciación sexual gonadal de la Clase Aves.

VIII. CONCLUSIONES

1. La expresión del ARNm de la aromatasa P-450 se inicia a las 147 h.i. en las gónadas femeninas del embrión de pollo. En los testículos no se detectaron transcritos en las edades estudiadas.
2. La biosíntesis de la estrona comienza a las 147 h.i. en los ovarios y testículos de embriones de pollo.
3. La síntesis de estrona en el ovario izquierdo de embriones de pollo presenta un comportamiento lineal creciente desde las 147 hasta las 192 h.i., mientras que en el ovario derecho se observan dos patrones espacio-temporales diferentes: hasta las 168 h.i., la actividad enzimática es semejante a la del testículo, sin embargo a las 192 h.i. tiende a incrementar como en el ovario izquierdo.
4. Existe una correlación entre la expresión del ARNm de la aromatasa P-450 y la actividad enzimática ya que ambos procesos comienzan al mismo tiempo, a las 147 h.i.

Debido a la temprana aparición de estos eventos moleculares y fisiológicos y a sus consecuencias en el desarrollo embrionario, se propone que el complejo enzimático aromatasa P-450 cumple una función determinante en los primeros eventos de la diferenciación sexual gonadal de las aves.

IX. REFERENCIAS

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

Bahr JM, Johnson PA 1991 Reproduction in poultry. En:Reproduction in domestic animals. Cupps PT (ed) Academic Press Inc. Chap17:555-573.

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

Bogart MH 1987 Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. *J theoret Biol* 128:349-357.

Carlson N and Stahl A 1985 Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archiv Anat Microsc Morphol Exper* 74:52-59.

Carré D, di Clemente , Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N, Picard J 1996 Cloning and expression of the chick anti-Müllerian hormone gene. *J Biol Chem* 271:4798-4804.

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

Clinton M Differentially expressed genes in the developmental chick gonad. En: First International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Abril 7-11. Honolulu, Hawaii.

Di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, Vigier B 1992 A quantitative and interspecific test for biological activity of antimüllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Development* 114:721-727.

Elbretch A, Smith RG 1992 Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 252:1643-1650.

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

Fargeix N, Didier E, Didier P 1981 Early sequential development in avian gonads. An ultraestructural study using selective glycogen labeling in the germ cells. *Reprod Nutr Dévelop* 21:479-496.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ 1994 Campomelic dysplasia and autosomal sex reversed caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530.

Fujimoto T, Yoshinaga K 1986 The role of fibronectin in the interstitial migration of primordial germ cells in amniotes. *Cong Anom* 26:187-196.

Gasc JM 1980 Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J Embryol Exp Morphol* 55:331-342.

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

Gore-Langton RE, Armstrong DT 1988 Follicular steroidogenesis and its control. En: Physiology of reproduction. Knobil E, Neil JD, Edwing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds) Raven Press. New York Vol 1 pp331-335.

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

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

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

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

Hardisty MW 1984 Primordial germ cells and the vertebrate germ line. In: the vertebrate ovary. Jones (ed) Plenum Publishing Corp. Chap 1 pp 1-46.

Hutson JM, Ikawa H, Donahoe PK 1982 The ontogeny of Müllerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. *J Pediatr Surg* 16:822.

Josso N, Picard JY, Tran D 1977 The antimülleriane hormone. *Recent Prog Horm Res* 33:117-163.

- Jost A 1970 Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Phil Trans Roy Soc London Ser B*, 259:119-131.
- Kellis JT, Vickery LE 1987 The active site of aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem* 262:8840-8844.
- Kent J, Wheatley S, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P 1996 a male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122(9):2813-2822.
- Koopman P, Müstenberg A, Capel B, Gubbay J, Collignon J, Economou A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R 1990 Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- Korzekwa KR, Trager WF, Mancewicz J, Osawa Y 1993 Studies on the mechanism of aromatase and other cytochrome P450 mediated demethylation reactions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:367-373.
- Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH 1983 The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucl Acids Res* 11 8287-8301.
- Kuwana T 1993 Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Develop Growth & Differ* 35:237-243.
- Laudet V, Stehelin D, Clevers H 1993 Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucl Acids Res* 21:2493-2501.
- Lillie FR 1916 The theory of freemartin. *Science* 43:611-613.
- Lillie FR 1917 The freemartin: a study of the action of the sex hormones in the fetal life of cattle. *J Exp Zool* 23:371-452.
- McBride D, Sang H, Clinton M 1997 Expression of *Sry*-related genes in the developing genital ridge/mesonephros of the chick embryo. *J Reprod Fert* 109:59-63.
- MacLaughlin DT, Hutson JM, Donahoe PK 1983 Specific estradiol binding in embryonic müllerian ducts: a potential modulator of regression in male and female chick. *Endocrinology* 113:141-145.
- McPhaul MJ, Noble JF, Simpson ER, Mendelson CR, Wilson JD 1988 The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450 arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen. *J Biol Chem* 263:16358-16363.

McPhaul MJ, Herbst MA, Matsumine H, Young M, Lephart DE 1993 Diverse mechanisms of control of aromatase gene expression. *J Steroid Biochem Molec Biol* 44:341-346.

Matsumine H, Herbst MA, Ignatius Ou SH, Wilson JD, McPhaul MJ 1991 Aromatase mRNA in the extragonadal tissues of chickens with the henny-featherin trait is derived from a distinctive promoter structure that contains a segment of a retroviral long terminal repeat. *J Biol Chem* 266:19900-19907.

Minoura T 1921 A study of testis and ovary grafts on the hen's and their effects on the embryos. *J Exp Zool* 33:1-16.

Mittwoch U 1996 Sex-determining mechanisms in animals. *TREE* 11:63-67.

Morais daSilva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R 1996 Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Gen* 14:62-68.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW 1993 The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12:1-51.

New MA 1966 The chick. In: The culture of vertebrate embryos. Acad. Press. P 55.

Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R 1959 On the sex chromatin of *Gallus domesticus*. *Exp Cell Res* 19:180-183.

Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carré-Eusèbe D, Magre S 1998 Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dynamics* 212:522-532.

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

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Greham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Micheal MD, Mendelson CR, Bulun SE 1994 Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342-355.

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

- Smith CA, Andrews JE, Sinclair AH 1997 Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J Steroid Biochem Molec Biol* 60:295-302.
- Sutherland RL, Watts CKW, Clarke CL 1988 Oestrogen actions. En: new comprehensive biochemistry, hormones and their actions. I. Cooke BA, King RJB and Van Der Molen HJ (eds) Elsevier Chap 12 pp 197-215.
- Teng CS, Teng CT 1975 Studies on sex-organ development. Isolation and characterization of oestrogen receptor from chick müllerian duct. *Biochem J* 150:185.
- Tereba A, McPhaul MJ, Wilson JD 1991 The gene for aromatase (P450arom) in the chicken is located on the long arm of chromosome 1. *J Her* 82:80-81.
- Tiersch TR, Mitchell MJ, Wachtel SS 1991 Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum Gen* 87:571-573.
- Wagner T, Writth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup M, Scempp W, Scherer G 1994 Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9 *Cell* 79:1111-1120.
- Wallace RA 1978 Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In *The vertebrate ovary*. RE Jones (ed) Plenum Publishing Corp. New York. pp 469-502.
- Wartenberg H, Lenz E, Schweikert U 1992 Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. *Andrologia* 24:1-6.
- Wolff E 1946 Recherches sur l'intersexualité expérimentale produite par la méthode des greffes de gonades à l'embryon de poulet. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 36:69-90.
- Wolff E, Wolff E 1951 The effects of castration on bird embryos. *J Exp Zool* 116:59-97.
- Woods JE, Ertan LH 1978 The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol.* 36:360-370.
- Yoshida K, Shimada K, Saito N 1996 Expression of P450_{17 α} hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Mol Biol* 102: 233-240.

Zaccanti F, Vallisneri M, Quaglia A 1990 Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos. *Differentiation* 43:71-80.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

X. APÉNDICE I

AGUA TRATADA CON DEPC

Colocar un litro de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 1000 ml. Agitar el contenido con una barra magnética y agregar 1 ml de DEPC marca Fluka Biochemica. Mantener la solución en agitación hasta que el DEPC esté completamente disuelto en agua. Cubrir con papel aluminio y esterilizar a una presión de 15 libras, 80 minutos.

FENOL SATURADO CON AGUA

Los cristales de fenol obtenidos en Fluka Biochemica deben mantenerse almacenados a -20°C . Antes de utilizarse se deben estabilizar a temperatura ambiente. Fundir los cristales en baño María, en una campana de extracción. Colocar una barra magnética estéril dentro del frasco de fenol, añadir 100 ml de agua tratada con DEPC y dejar saturar a 4°C , 24 horas. Retirar el agua con una pipeta Pasteur estéril, utilizando un sistema de vacío. Añadir 0.1g de hidroxiquinoleína y agregar 100 ml de agua tratada con DEPC. Mantener la solución en agitación 30 minutos y almacenarla a 4°C , 24 horas. Retirar el agua con una pipeta Pasteur utilizando un sistema de vacío. Añadir 200 μl de β -mercapto-etanol marca GIBCO BRL. Agregar 100 ml de agua tratada con DEPC, agitar 30 minutos y almacenar a 4°C .

SOLUCIÓN DE TIOCIANATO DE GUANIDINA

A 100 g de tiocianato de guanidina marca Fluka Biochemica agregar 117.3 ml de agua tratada con DEPC, filtrada. Incubar el reactivo en un agitador a 65°C, 15 minutos. Agregar 7.04 ml de citrato de sodio 0.75 M, pH=7.0. Añadir 10.56 ml de sarkosyl al 10% en agua tratada con DEPC. Agitar suavemente 10 minutos. Cubrir el frasco con papel aluminio y almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN 1

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

SET BUFFER

Para preparar 10 ml de esta solución agregar 0.2 ml de TRIS-HCl 0.5 M pH=8.0, EDTA 0.5 M pH=8.0 y 8.8 ml de agua bidestilada estéril. Guardar a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR TBE 5X

A 500 ml de agua bidestilada en agitación agregar 30.25 g de TRIS, 15.42 g de ácido bórico y 1.86 g de EDTA-Na₂. Ajustar el pH=7.2 y almacenar a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE CARGA

Para preparar 20 ml agregar 0.2 ml de amortiguador TBE 5X; agregar 50 mg de azul de bromofenol al 0.25%, 50 mg de verde de xilencianol al 0.25% y 8 g de sacarosa al 40%. Almacenar a 4°C.

LÍQUIDO DE CENTELLEO

De acuerdo con el protocolo de MILES YEDA LTD, agregar 0.2 g de POPOP por cada 320 ml de tritón 100X y mezclar.

XI. APÉNDICE II

Androstendiona tritiada: Androst - 4 - ene - 3,17 - dione [1,2,6,7, ^3H (N)]
[1.000 mCi/ml]

Estrona: 1,3,5(10) - estratrien - 3 - ol - 17 - one
P.F. 263-265
Rot. +162° Diox
P.M. 270.4
 $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$

Estradiol: 1.3.5(10) - estratrien - 3,17 β - diol
P.F. 176-177
Rot. +80° Diox
P.M. 272.4
 $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$

Androstendiona: 4 - androsten - 3,17-dione
P.F. 170-172
Rot. +126.5° Diox
P.M. 286.4
 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$

Testosterona: 4 - androsten - 17 β - ol - 3 - one
P.F. 154-155
Rot. +101 Diox
P.M. 288.4
 $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$

XII. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMH	Del inglés: Antimüllerian hormone
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DEPC	Dietilpirocarbonato
d.i.	Días de incubación
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatos
dATP	Desoxiadenosín trifosfato
dCTP	Desoxicitosín trifosfato
dGTP	Desoxiguanosín trifosfato
dTTP	Desoxitirosín trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
h.i.	Horas de incubación

HMG	Del inglés: High mobility group
pb	Pares de bases
PCR	Del inglés: polimerase chain reaction
R-T	Del inglés: reverse transcriptase
SRY	Del inglés: sex region in the "Y" chromosome
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
U	Unidades
u.v.	Ultravioleta

UNIDADES

°C	Grados centígrados
cpm	Cuentas por minuto
fmol	Femtomas
g	Gramos
mg	Miligramos
ng	Nanogramos

μg	Microgramos
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
M	Molar
ml	Mililitros
μl	Microlitros
pH	Potencial de hidrógenos
rpm	Revoluciones por minuto
μCi	Microcuries