

26
de
jul.

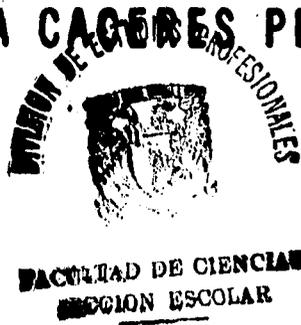


**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"MODIFICACIONES EN LAS POBLACIONES CELULARES
DEL OVARIO DEL EMBRION DE POLLO (*Gallus
domesticus*) POR LA ADMINISTRACION TEMPRANA
DE 17 B- ESTRADIOL"**

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a
LAURA CACERES PERALTA



México, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

MODIFICACIONES EN LAS POBLACIONES CELULARES DEL OVARIO DEL EMBRION DE POLLO
(Gallus domesticus) POR LA ADMINISTRACION TEMPRANA DE 17B-ESTRADIOL.

realizado por LAURA CACERES PERALTA

con número de cuenta 7203643-9 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Biol. Ma. del Carmen Méndez Herrera	<i>Carmen Méndez</i>
Propietario	Dr. Enrique Pedernera Astegiano	<i>Enrique Pedernera</i>
Propietario	Biol. Marco Antonio González Jiménez	<i>Marco Antonio González</i>
Suplente	M. en C. Guadalupe T. Zavala Padilla	<i>Guadalupe T. Zavala</i>
Suplente	M. en C. Patricia Rivas Manzano	<i>Patricia Rivas</i>

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de la Facultad de Biología
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

**TESIS DIRIGIDA POR:
DRA. CARMEN MENDEZ-HERRERA.**

**REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGIA .
DE LA FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.**

AGRADECIMIENTOS:

- ♦ A la Dra. Carmen Méndez-Herrera por su constante asesoría y atinada orientación en la realización de este trabajo.
- ♦ Al Dr. Enrique Pedernera por sus valiosas aportaciones y por haberme proporcionado todas las facilidades para desarrollar este trabajo en el Departamento de Embriología.
- ♦ Al M. en C. Marco Antonio González Jiménez por su inapreciable colaboración y orientación.

A MIS PADRES

Por el amor y el
apoyo que siempre me
han brindado.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
II.1 Diferenciación sexual en mamíferos ..	3
II.2 Diferenciación cromosómica	4
II.3 Determinación primaria del sexo	5
II.4 Origen de la línea germinal	6
II.5 Diferenciación de la gónada	9
II.6 Diferenciación del ovario	10
II.7 Diferenciación secundaria del sexo .	12
II.8 Diferenciación sexual en aves	12
II.9 Biosíntesis de hormonas gonadales .	15
II.10 Hormonas esteroides y diferenciación gonadal en aves.	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV. OBJETIVOS	21
V. MATERIALES Y METODOS	22
VI. RESULTADOS	27
VII. DISCUSION	33
VIII. CONCLUSIONES	40
IX. BIBLIOGRAFIA	42

I. RESUMEN

En los vertebrados, es conocida la importancia de las hormonas esteroides sexuales; andrógenos, estrógenos y progestágenos, en la reproducción y el dimorfismo sexual. La intervención de la hormona antimulleriana y los andrógenos testiculares en la formación del testículo y la diferenciación del aparato genital masculino está bien documentada; sin embargo, el conocimiento sobre la diferenciación y la formación del ovario se encuentra menos avanzado. Los estrógenos gonadales y el receptor a estrógenos se encuentran presentes durante el desarrollo embrionario del ovario de mamíferos, pero aún no se ha definido cuál es la participación de estas hormonas en la organogénesis gonadal. En este trabajo se hizo un estudio morfométrico, utilizando la digitalización de imágenes sobre cortes histológicos para estudiar la influencia del 17β -estradiol sobre las subpoblaciones celulares (ovocitos primarios, células pregranulosas, células esteroidogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas) que integran el ovario de pollo (*Gallus domesticus*) durante el desarrollo embrionario. Un pulso único de 17β -estradiol (600 ng), administrado antes de la diferenciación gonadal (día 5) modificó las células ováricas del embrión de pollo de 17 y 21 días de incubación. En la corteza ovárica, el 17β -estradiol aumentó el área celular promedio de los ovocitos primarios al día 17 de incubación, pero no así el área ocupada por las células pregranulosas, tampoco se encontraron cambios en las subpoblaciones celulares de la médula a esta edad. No se encontraron cambios en ninguna de las subpoblaciones celulares estudiadas entre ambos grupos experimentales al día 21 de incubación. El efecto del 17β -estradiol sobre la gónada indiferenciada, se observa en los ovocitos primarios, aún cuando no se descarta un efecto de esta hormona sobre las células pregranulosas y las células esteroidogénicas típicas.

II.- INTRODUCCION

Las primeras ideas acerca de los factores determinantes en la diferenciación sexual, consideraban en primera instancia los factores ambientales, como el calor, la nutrición, la constitución física de los organismos, la edad, etc. La concepción aristotélica consideraba que el calor del verano influía de manera significativa en la determinación del sexo de los descendientes en el ser humano.

Estas ideas prevalecieron hasta finales del siglo XIX, y no es sino hasta principios de este siglo en que los descubrimientos de Mendel y los trabajos de Mc. Clung acerca del cromosoma sexual, establecieron las bases para la correlación entre la determinación del sexo y la información genética, sugiriendo que el fenotipo sexual estaba determinado por algún componente nuclear.

La base cromosómica para la determinación del sexo fue establecida por T.H. Morgan y sus colegas entre 1910 y 1916, sin embargo, la naturaleza de la información genética responsable de la diferenciación sexual permanece desconocida.

Actualmente, se sabe que tanto los factores ambientales como los genéticos pueden intervenir en la diferenciación sexual en diferentes especies, por ejemplo, en los insectos, el sexo se determina mediante el número de cromosomas presentes, es decir el balance de determinantes femeninos presentes en el cromosoma X y los determinantes masculinos presentes en los autosomas, así, en *Drosophila*, las moscas que poseen genotipo XY o XO son machos, mientras

que la presencia de dos o mas cromosomas X confieren un fenotipo femenino (Gilbert, 1994).

En algunas especies de cocodrilos y tortugas, el sexo se establece de acuerdo a la temperatura a que están expuestos los huevos durante un periodo determinado del desarrollo embrionario. La principal desventaja de la determinación sexual dependiente de la temperatura es que este factor determina los límites permisibles para la existencia de estas especies (Bull, 1980). Ferguson y Joanen (1982) han especulado que probablemente en los dinosaurios, la determinación del sexo era dependiente de la temperatura, y que los cambios ambientales de ésta ocasionaron la producción únicamente de uno u otro sexo.

En los vertebrados superiores el sexo se establece genéticamente y no está influido por cambios medioambientales. En las aves, el sexo se establece también genéticamente al momento de la fertilización, sin embargo aún exhiben cierta flexibilidad para la inversión experimental del sexo mediante la intervención de los estrógenos (Scheib, 1983).

II.1 DIFERENCIACION SEXUAL EN MAMIFEROS

La diferenciación sexual en mamíferos es un proceso secuencial que se inicia con el establecimiento del sexo a nivel cromosómico, en el momento de la fertilización; posteriormente, con el desarrollo gonadal, se establecen las diferencias entre el testículo y el ovario, para culminar con la formación de los caracteres sexuales secundarios, conformando así los fenotipos masculino y femenino (George y Wilson, 1988).

II.2 DIFERENCIACION CROMOSOMICA

El desarrollo de las técnicas para la obtención de cariotipos en los años 60's permitió establecer que la presencia del cromosoma Y es necesaria para el desarrollo de los testículos. Si éste no se encuentra presente, los primordios gonadales se desarrollan como ovarios. En el cromosoma Y se encuentra por lo tanto el factor hereditario determinante del sexo.

Los trabajos de Jost, demostraron que en la ausencia de gónadas, los embriones de conejo desarrollaban el fenotipo femenino independientemente de su sexo genético. Así, el desarrollo en mamíferos se realiza en la dirección femenina a menos que la presencia del cromosoma Y induzca la formación de testículos (Jost, 1953).

Actualmente se sabe que el cromosoma Y produce un factor determinante para la formación del testículo, (Testis-determining factor ó TDF). El TDF organiza el desarrollo de la gónada indiferenciada hacia testículo e inicia la secreción de dos hormonas principales:

1. Sustancia inhibidora del conducto de Müller (MIS) o (AMH), que induce la degeneración del tejido que formaría el útero y oviducto.
2. La Testosterona, que estimula la formación de los genitales masculinos.

En el hombre, el TDF se localiza en el brazo corto del cromosoma Y. En los individuos que genéticamente son XY y que sin embargo son fenotípicamente femeninos se ha comprobado que existe una delección en el brazo corto de este cromosoma (Gilbert, 1994).

En los mamíferos, la presencia de una porción del cromosoma Y ubicada en la región 1 del brazo corto de este cromosoma es esencial para iniciar el desarrollo del testículo, y la diferenciación testicular depende de la expresión de genes del cromosoma Y en las células epiteliales de los cordones sexuales. Esto fue demostrado mediante la manipulación de blastómeros de ratones quiméricos XX y XY. Los trabajos de McLaren y col. (1984) con tales quimeras, mostraron que los ratones resultantes son usualmente machos fértiles. Las células de Leydig de los testículos de estos ratones se componen ambas de células XX y XY (mostrando que las células XX pueden formar estructuras testiculares), pero las células de Sertoli se derivan casi siempre del embrión XY (Palmer y Burgoyne, 1991; Patek y col., 1991). Así, el evento crítico en la diferenciación de testículos parece ser la expresión de los genes determinantes del sexo del cromosoma Y en el linaje de las células de Sertoli. Ya que las células de Sertoli son el primer tipo celular del testículo que se diferencia, es posible que el gene determinante del sexo del cromosoma Y funcione exclusivamente en estas células y desencadene los eventos subsecuentes en la formación del testículo (Gilbert, 1994).

II.3 DETERMINACION PRIMARIA DEL SEXO

Como ya se mencionó, el gene que codifica para el TDF se localiza con mayor precisión en la región de 35,000 pares de bases justo antes del final pseudoautosómico del cromosoma Y. En esta región, Sinclair y cols. (1990) encontraron una secuencia de DNA específica del hombre que codifica para un péptido de 223 aminoácidos. Este péptido es probablemente un factor de transcripción, ya que contiene un dominio de unión con el DNA similar al del

grupo de proteínas de alta movilidad, el cual se encuentra en muchos factores de transcripción. Esta región del DNA fué denominada SRY en el hombre y Sry en el ratón (Región determinante del sexo del cromosoma Y) y existen evidencias de que podría ser el gene determinante del testículo.

Dos genes más, involucrados en la diferenciación sexual secundaria, son los que codifican para la AMH y el citocromo P₄₅₀ aromatasa, enzima involucrada en la síntesis de esteroides, ambos genes contienen sitios de unión para el SRY en sus secuencias promotoras (Haqq y cols. 1993).

Koopman y cols. (1991) introdujeron la porción del DNA de 14 kilobases conteniendo el gen Sry y probablemente sus elementos reguladores en el pronúcleo de cigotos de ratones XX, obteniendo embriones con desarrollo de órganos masculinos, estos experimentos permitieron obtener evidencias para plantear que el gene SRY/Sry es el principal gene del cromosoma Y para la determinación de testículo en mamíferos.

II.4 ORIGEN DE LA LINEA GERMINAL.

El origen y establecimiento de la línea germinal es uno de los procesos más tempranos a partir de la activación del huevo. En aquellos organismos en donde existe una línea germinal establecida, las células germinales no aparecen en donde se genera la gónada sino que sus precursores, las células germinales primordiales (CGP's) migran desde su lugar de origen hacia las gónadas en desarrollo (Gilbert, 1994).

Hahnel y Eddy (1986) mostraron mediante el uso de anticuerpos monoclonales en embriones de ratón que las CGP's residen originalmente en el epiblasto. Posteriormente, Ginsburg y cols., (1990) localizaron esta región en el mesodermo extraembrionario en embriones de ratones de 7 días. Las CGP's migran desde el mesodermo extraembrionario hacia el embrión; primero al mesodermo de la línea primitiva y posteriormente hacia el endodermo a través del alantoides, aquí se distinguen de las células somáticas por su tamaño mas grande y su gran núcleo redondo.

La migración de las CGP's hacia la región urogenital se realiza mediante dos tipos de movimientos: Pasivo y Activo. El primer movimiento consiste en una traslocación de las CGP's, pasando al interior del embrión, junto con el endodermo y el mesénquima que formarán el intestino primitivo posterior y al primordio del mesenterio intestinal. A partir de este momento, se inicia la migración activa de las CGP's.

Actualmente se desconocen los mecanismos por los que las CGP's reconocen la ruta que deben seguir, sin embargo, se sabe que la fibronectina presente en la matriz extracelular es un sustrato importante para la migración de estas células. Existen tres hipótesis que explican la direccionalidad y los movimientos de las CGP's:

- a) Las CGP's se desplazarían por medio de un quimiotactismo positivo a través de un gradiente de concentración de la fibronectina, presente en las células mesenquimáticas.

b) Mediante señales moleculares de las células mesenquimáticas situadas en la trayectoria de las CGP's.

c) Mediante la orientación de las células mesenquimáticas y de la matriz extracelular misma que impide pasivamente que las CGP's sigan una trayectoria errónea.

Una vez que las CGP's alcanzan la región de la cresta genital, son rodeadas por células del epitelio celómico y junto con las células del mesénquima forman el **PRIMORDIO GONADAL**, en la región ventral del mesonefros.

En el primordio gonadal, las células somáticas se derivan del mesodermo intermedio y se diferencian en tres tipos: Mesenquimáticas (laxamente distribuidas), Mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (provenientes de los vasos que invaden la zona) (Merchant, 1991).

En el momento en que las CGP's llegan al primordio gonadal, las células mesenquimáticas y mesoteliales inician una gran actividad proliferativa formando el "BLASTEMA GONADAL", posteriormente, se inicia el depósito de la lámina basal que se compone principalmente de moléculas de laminina y colágena tipo I y las células mesenquimáticas y mesoteliales se agrupan para formar los "CORDONES SEXUALES". En este momento, la gónada se compone de tres tipos celulares:

1. Células germinales.
2. Células de soporte del epitelio celómico de la cresta gonadal, que darán origen a las células de

Sertoli en testículo o a las células de la capa granulosa en los ovarios.

3. Células intersticiales derivadas del mesénquima original de la cresta gonadal

(George y Wilson, 1988 y Merchant, 1991).

II.5 DIFERENCIACION DE LA GONADA.

El primordio gonadal, presenta dos opciones normales de desarrollo; puede diferenciarse hacia ovario o bien hacia testículo, en ambos casos, el establecimiento gonadal determinará la formación de los caracteres sexuales secundarios y el desarrollo sexual futuro del organismo.

En el humano, el primordio gonadal aparece durante la 4ª semana de gestación y permanece indiferenciado hasta la 7ª semana. Durante este tiempo, el epitelio de la cresta genital se introduce en el tejido conectivo. Las células epiteliales forman los cordones sexuales que rodearan a las CGP's que migraron hacia la gónada durante la 6ª semana de gestación.

La primera manifestación de diferenciación sexual de la gónada se hace evidente alrededor de la 6ª semana de gestación, siendo la diferenciación de las células de Sertoli y su agrupamiento en los cordones espermáticos en el testículo fetal el primer signo de dimorfismo sexual.

Si el sexo cromosómico del individuo es XY, los cordones sexuales continúan su proliferación hasta la 8ª semana de gestación extendiéndose a través del tejido conectivo. Los cordones se unen unos con otros formando una red que en su porción distal se denomina "rete testis". Los cordones sexuales pierden contacto con el epitelio

superficial y son separados de éste por una matriz extracelular; la túnica albuginea.

Durante el desarrollo fetal, algunas células del mesénquima del testículo se diferencian a células intersticiales o de Leydig, encargadas de la síntesis de testosterona y las células de los cordones del testículo se diferencian a células de Sertoli, que nutrirán a la línea germinal y secretarán la hormona antimülleriana (George y Wilson 1988).

II.6 DIFERENCIACION DEL OVARIO.

Entre la 6ª y 14ª semana de gestación en humanos el futuro ovario no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada, excepto por un cierto crecimiento debido a la proliferación de las células somáticas y de las germinales.

Durante la 8ª semana de gestación, los cordones sexuales primarios degeneran, sin embargo, el epitelio produce nuevamente una serie de cordones que no penetran profundamente en el mesénquima, sino que permanecen cerca de la superficie del órgano, por lo que se les denomina cordones sexuales corticales, estos cordones rodean a las CGP's formando las células de la capa granulosa, las células del mesénquima se diferencian para formar las células de la teca.

De esta manera, se integran los componentes de los futuros folículos primordiales, que son considerados como las unidades funcionales del ovario.

A diferencia del testículo, las primeras células en diferenciarse en el ovario son las ovogonias que se transforman en ovocitos al iniciarse la meiosis. De manera que son precisamente los ovocitos los que inducen la fragmentación de los cordones sexuales y la formación de los folículos, en torno a los cuales se diferencian las células esteroideogénicas de la teca interna.

En ovarios que han perdido los ovocitos antes de la fragmentación de los cordones sexuales, éstos permanecen indiferenciados, dando un aspecto embrionario aun después del nacimiento (Merchant, 1991)

En la 14ª semana de gestación, las ovogonias detienen su proliferación e inician la profase de la primera división meiótica. El número de células germinales del ovario queda limitado en la vida fetal, en contraposición con las espermatogonias, que mantienen su capacidad proliferativa durante toda la vida reproductiva del individuo.

Los ovocitos y ovogonias que se encuentran en el ovario fetal que son aproximadamente siete millones, sufren un proceso de degeneración masiva, de manera que al momento de nacer, la niña tendrá alrededor de dos millones de ovocitos en sus ovarios y al llegar a la adolescencia contará con 300 mil ovocitos.

Entre el quinto y sexto mes de gestación, en los ovarios se inicia el proceso de foliculogénesis.

El número de folículos se reduce a la mitad aproximadamente durante la infancia y la pubertad por el proceso de atresia folicular, de manera que los ovocitos

que llegan a ser ovulados en la vida de una mujer son alrededor de 400.

En la actualidad, sin embargo, la diferenciación primaria del sexo en los mamíferos permanece como un problema no totalmente resuelto.

II.7 DIFERENCIACION SECUNDARIA DEL SEXO

La diferenciación secundaria, involucra el desarrollo de los fenotipos masculino y femenino que se derivan de la secreción hormonal del ovario y el testículo.

La formación del fenotipo masculino es consecuencia de la secreción de las hormonas testiculares que promueven el desarrollo del conducto wolfiano y causan una atrofia del conducto müleriano mediante la secreción de la hormona antimüleriana por las células de Sertoli. La testosterona promueve la formación del epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales a partir del conducto wolfiano. En el fenotipo femenino el estrógeno secretado por los ovarios parece ser suficiente para inducir la diferenciación del conducto müleriano y formar útero, oviducto y cervix, sin embargo, estos mecanismos no han sido bien comprendidos (Gilbert, 1994).

II.8 DIFERENCIACION SEXUAL EN AVES.

En las aves, como en la mayoría de los vertebrados, el sexo se establece a nivel cromosómico, sin embargo, éstas presentan la capacidad para la reversión experimental del sexo, es por esta razón que se consideran como buenos modelos en la investigación de la diferenciación sexual en vertebrados (Scheib, 1983).

Las gónadas en las aves se forman mediante cordones medulares primarios cubiertos con un epitelio superficial.

En los reptiles y en las aves, las CGP's se derivan de las células del epiblasto que migran desde la región central del área pelúcida hacia el borde anterior del hipoblasto. Esta región extraembrionaria se denomina creciente germinal y es el lugar en donde se multiplican las CGP's. A diferencia de los anfibios y mamíferos las CGP's en las aves y reptiles migran mediante el torrente sanguíneo y son acarreadas por éste desde la región del intestino primitivo, en este momento, las CGP's salen de la circulación y migran hacia la cresta genital (Gilbert, 1994).

En aves, después del día 3½ de incubación, la mayoría de las CGP's han alcanzado el epitelio genital. A lo largo de la región dorsal se distribuyen en grupos irregulares y son rodeadas por células mesenquimáticas. La zona genital se encuentra claramente aislada del área del mesonefros por medio de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas.

Al 4º día de incubación, la cresta genital se aprecia claramente como una protuberancia de la cavidad celómica, el epitelio superficial tiene un grosor de 3 a 4 células y es continuo en muchos puntos con las células epiteliales interiores. Las fotomicrografías obtenidas en este momento del desarrollo sugieren que el tejido epitelial crece por la proliferación de las células del epitelio superficial y por la incorporación de células mesenquimáticas localizadas en la proximidad del epitelio genital (Merchant, 1991). Este patrón de desarrollo toma nuevas direcciones dependiendo del sexo genético y la posición lateral de la gónada en las hembras.

En los machos, el epitelio superficial cesa de proliferar y la mayoría de las células germinales migran hacia los cordones epiteliales que se desprenden del tejido original y continúan su crecimiento y diferenciación.

En los embriones femeninos, el epitelio celómico continúa su crecimiento mediante la proliferación tanto del epitelio superficial como del interno acompañado de un incremento en el tejido estromático y mayor vascularización, hasta que el ovario se encuentra bien definido en dos regiones: corteza y médula (Merchant, 1978).

En las aves, las hembras presentan asimetría gonadal, es decir, que sólo se desarrolla el ovario izquierdo, mientras que el ovario derecho involuciona desde el desarrollo embrionario.

En la gónada derecha, que es similar a la izquierda al inicio del desarrollo, el epitelio superficial pierde su arreglo cúbico y se convierte en una delgada capa de células aplanadas separándose de los cordones epiteliales internos. Después del día 15 de desarrollo, los niveles de proteínas y DNA son francamente menores que en el ovario izquierdo y continúa involucionando hasta quedar como un vestigio.

Así, la diferenciación gonadal en las hembras es morfológicamente asimétrica, mientras que en los machos, se desarrollan en forma simétrica dos testículos funcionales (Scheib, 1983).

Los trabajos realizados por Wolff y Ginglinger, en 1935, al inyectar estrona en embriones de pollo de 5 días

de incubación y obtener varios grados de feminización en embriones genéticamente masculinos, dieron origen a una serie de revisiones posteriores que plantearon como hipótesis que la diferenciación hacia la formación del ovario se produce debido a la secreción temprana de estrógenos por la gónada indiferenciada (Weniger, 1991).

II.9 BIOSINTESIS DE HORMONAS GONADALES.

Los esteroides constituyen una subclase de lípidos que contienen una estructura esquelética básica de cuatro anillos fusionados denominada ciclopentanoperihidrofenantreno.

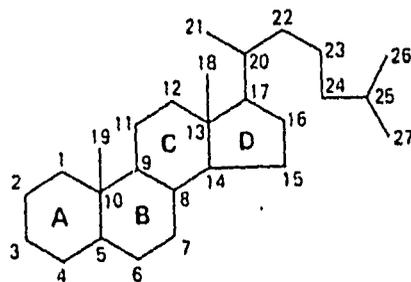
Las hormonas esteroides tienen como precursor el colesterol que contiene 27 átomos de carbono (Esq. 2.1) y las células con función esteroidogénica lo obtienen de tres formas:

1. A partir de lipoproteínas circulantes en la sangre
2. Colesterol almacenado en forma de ésteres
3. Síntesis a partir de acetato

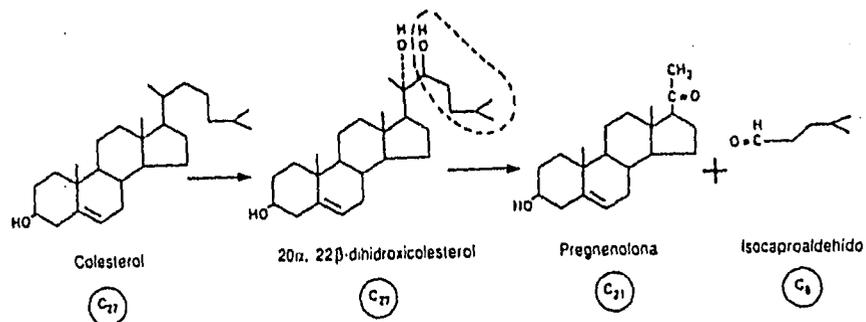
En general, las células esteroidogénicas del ovario lo obtienen principalmente de las lipoproteínas circulantes.

La formación de pregnenolona consiste en la hiroxilación del colesterol en las posiciones 22 y 20, lo que permite el corte de la cadena lateral, obteniendo como resultado un compuesto de 21 átomos de carbono (Esq. 2.2).

Esta molécula puede transformarse en dos compuestos dependiendo de la vía de biosíntesis; La vía de la



Esquema 2.1 Representación convencional de la estructura química básica del precursor común a las hormonas esteroides, el colesterol. (Tomado de: O'Malley, B.W. y col. 1993)



Esquema 2.2 A partir de la molécula de colesterol (27 C), se corta la cadena lateral para formar pregnenolona (21 C) de la que se sintetizan las hormonas esteroides (Tomado de: O'Malley, B.W. 1993).

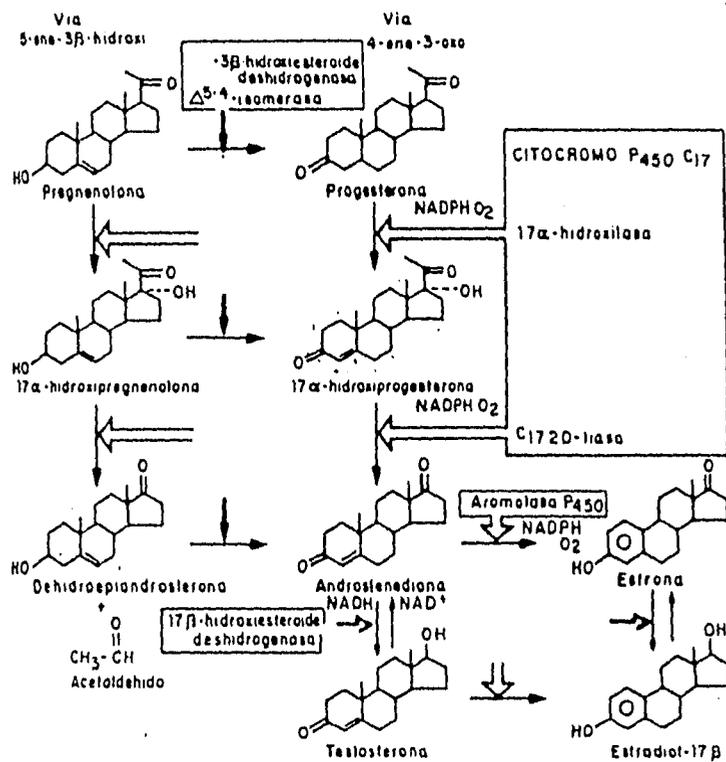
progesterona requiere de la presencia de un complejo enzimático microsomal; la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 5-4 isomerasa 3β (HSD).

La segunda vía (de la pregnenolona) se realiza mediante la participación del complejo 17 hidroxilasa C17-20 liasa produciendo dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstenediona en el caso anterior, ambos son andrógenos C19.

La vía metabólica que va desde la pregnenolona a DHEA se conoce como 5-ene, mientras que la secuencia de progesterona a androstenediona se conoce como 4-ene.

Los andrógenos (4-ene C19) son susceptibles de ser aromatizados y transformados a estrógenos C18 mediante la acción del complejo enzimático aromatasa, que tiene la función de hidroxilar en C19 y eliminar el grupo metilo en C10 dándole una estructura aromática al anillo A. (Esq. 2.3) (Pedrera, 1993).

Los esteroides biológicamente activos son secretados por las gónadas o por la corteza suprarrenal. Una vez que se encuentran en el torrente circulatorio, las hormonas esteroides se unen a proteínas plasmáticas, y por lo tanto se encuentran en dos formas, unidas y libres, la fracción biológicamente importante es la forma libre, ya que de esta manera pueden difundir libremente al interior de la células blanco. En el interior de la célula, se unen estrechamente a sus receptores específicos que son proteínas reguladoras de la función de los genes, formando un complejo esteroide-receptor que sufre un cambio configuracional (alostérico) de la estructura, ocasionando que el complejo esteroide-receptor se convierta a su forma activa. En este momento,



Esquema 2.3 Biosíntesis de estrógenos a partir de pregnenolona mediante las dos vías metabólicas; (5-ene 3β-hidroxi) y (4-ene-3-oxo) (Tomado de: Pedernera, E. 1993).

los receptores tienen la capacidad de unirse con los elementos reguladores de los genes denominados ERE (SRE) o Elementos de Respuesta a los Esteroides, que se encuentran topológicamente localizados cerca de los sitios promotores de los genes estructurales. Los ERE sirven como sitios fijadores del DNA para los complejos esteroide-receptor e interactúan con los sitios promotores para activar (o suprimir) el proceso de transcripción de los genes estructurales (O'Malley, B.W. y col, 1993).

II.10 HORMONAS ESTEROIDES Y DIFERENCIACION GONADAL.

Se ha estudiado la secreción hormonal de las gónadas mediante experimentos "in vitro" que fueron realizados con precursores radioactivos para hormonas esteroides. Antes de su diferenciación morfológica, las gónadas de pollo sintetizan estrógenos a partir de progesterona, a los cinco días y a los seis días a partir de acetato. Al día 7, las gónadas femeninas y no así las masculinas producen estrógenos. Cantidades crecientes de estrógenos son producidas por los ovarios desde los 7 días en adelante siendo la dehidroepiandrosterona (DHEA) el mejor precursor.

Las gónadas masculinas convierten los precursores marcados en testosterona que puede identificarse al día 7-10 cuando la DHEA es utilizada como precursor.

El balance hormonal entre los estrógenos y andrógenos parece ser un factor específico del sexo. En testículos, las tasas T/E2 son siempre mayores a 1 y se incrementan con la edad. En los ovarios, las proporciones son siempre menores a 1, mientras que en las gónadas femeninas derechas las proporciones exceden el valor de 1.

Los experimentos para cambiar el curso normal de la diferenciación sexual incluyen tratamientos con estrógenos y antiestrógenos, injertos testiculares y la ovariectomía.

El tratamiento de embriones femeninos con el antiestrógeno tamoxifen (TAM), confirma que la proliferación cortical en la gónada femenina es dependiente de estrógenos (Scheib, 1983).

En el bloqueo de la síntesis de estrógenos mediante el empleo de un inhibidor del complejo enzimático aromatasa que convierte la testosterona en estradiol al día 5 de incubación, se obtuvo reversión sexual definitiva de las hembras genéticas. Estas observaciones demuestran que las hormonas esteroides están involucradas en la diferenciación sexual en el pollo (Elbrecht y Smith, 1992).

La participación de los estrógenos en la conformación del ovario de las aves ha sido estudiada por varios autores; Wolff y Ginglinger (1935), Weniger y Zeis (1969), Woods y Weeks (1969), Elbrecht y Smith (1992)

La administración de 17β -estradiol entre el día 11 y 15 de desarrollo a embriones de pollo incrementa el número de células indiferenciadas de la médula, comparados con los embriones testigo. El número de ovocitos, de células pregranulosas y células esteroidogénicas no se afecta con este mismo tratamiento (Méndez y cols., 1993) a pesar de que en todos los tipos celulares existen evidencias de la presencia del receptor a estrógenos (Méndez y cols., 1994).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los vertebrados, la diferenciación gonadal está determinada genéticamente por los cromosomas sexuales, sin embargo, se encuentra bien documentado que este proceso recibe influencia de factores hormonales que ayudan a lograr la correcta formación tanto del ovario como del testículo. En la literatura encontramos numerosos trabajos que abordan el papel de las hormonas en la diferenciación y conformación del testículo, pero existe menos información sobre el desarrollo del ovario. Cabe mencionar al 17β -estradiol como la hormona de mayor actividad biológica en el ovario, y su presencia se ha reportado desde el inicio de la diferenciación morfológica del mismo.

La secreción de hormonas esteroides por la gónada femenina y la presencia de proteínas que unen estrógenos en las células que la integran, hace suponer que estas hormonas pueden ser necesarias para la organogénesis del ovario.

La obtención de evidencias sobre el efecto del 17β -estradiol en las diferentes subpoblaciones celulares que conforman el ovario del embrión de pollo, así como la discriminación de los tipos celulares que responden a éste, permitirá aportar más elementos al estudio de las hormonas sexuales en el ovario embrionario y su posible papel como factores que contribuyen en la organogénesis del mismo.

En este trabajo se pretendió estudiar el efecto a nivel morfométrico del 17β -estradiol exógeno, administrado antes de la diferenciación gonadal sobre las diferentes

subpoblaciones celulares que integran el ovario de pollo de la especie (Gallus domesticus) al momento del nacimiento.

Para abordar este problema, se trataron embriones de pollo con 17β -estradiol al día 5 de incubación y se hizo un estudio morfométrico en cortes semifinos de corteza y médula ovárica para cuantificar los cambios en el área de los ovocitos primarios y de las células somáticas del ovario en embriones de pollo de 17 y 21 días de incubación.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

El objetivo del presente trabajo fué estudiar el efecto de la administración temprana del 17β -estradiol en las subpoblaciones celulares (ovocitos primarios, células pregranulosas, células esteroidogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas) del ovario del embrión de pollo mediante un estudio morfométrico, aplicando la digitalización de imágenes.

Objetivos Particulares:

1. Medir el área celular promedio de los ovocitos y células pregranulosas en la corteza del ovario de embriones de pollo de 17 y 21 días de incubación en ejemplares pretratados con 17β -estradiol al día 5 de incubación y en animales testigo.
2. Medir el área celular promedio de las células esteroidogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula ovárica en embriones de pollo, en los grupos descritos anteriormente.

V. MATERIALES Y METODOS

Los animales experimentales (Gallus domesticus, raza White Leghorn Babcock B300) provinieron de huevos fértiles comprados a ALPES, S.A., Tehuacán, Puebla. Los huevos se colocaron en incubadora Jamesway durante los primeros 5 días posteriores a la postura a 37° C con circulación de aire forzado y 80% de humedad relativa. Al día 13 de incubación, se seleccionaron los huevos embrionados mediante ovoscopia (60 embriones por experimento).

Se administraron a cada embrión 600 ng de 17 β -estradiol (Steraloids, Wilton, NH) disuelto en solución alcohólica (etanol 4% agua ultrapura 96% v/v) en un volumen final de 100 μ l sobre la membrana corioalantoides. Los animales testigo recibieron sólo la solución alcohólica.

La administración de los dos grupos se realizó mediante la técnica de cámara falsa que consiste en lo siguiente:

1. Con aguja de disección se perfora el cascarón a la altura de la cámara de aire.
2. En la parte media lateral del huevo se corta un pequeño triángulo de 5 mm por lado con segueta comercial.
3. Se retira el cascarón cortado con ayuda de la aguja de disección.
4. La porción expuesta de la membrana se humedece con agua destilada estéril, para facilitar la separación de la membrana corioalantoidea. La membrana papirácea se desgarró con cuidado.

5. Con un bulbo de látex se succiona en el orificio de la cámara de aire para que descienda la membrana corioalantoidea.

6. Una vez que el embrión descendió, se retira la membrana papirácea con pinzas de punta fina, teniendo cuidado de no romper algún vaso sanguíneo.

7. Ambos orificios son sellados con cinta adhesiva transparente.

8. Una vez que se procesaron todos los embriones, se preparan las soluciones en condiciones estériles y se procede a la administración de la hormona, utilizando una micropipeta Gilson (200 μ l) con punta estéril.

Los grupos experimentales se dispusieron de la siguiente manera:

Grupo Testigo:

Embriones que recibieron 100 μ l de solución alcohólica al día cinco de incubación.

Grupo Experimental:

Embriones que recibieron 600 ng de 17 β -estradiol en 100 μ l de solución alcohólica al día cinco de incubación.

Los animales de los dos grupos experimentales se sacrificaron al día 17 de incubación y al momento de la

ecolición (día 21). Los ovarios se disecaron y se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm³ que se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, en buffer de fosfato a pH 7.2 a 0.16 M dejándose durante 90 min.. Se realizaron 3 lavados con el mismo buffer para posfijarse en tetraóxido de osmio al 1% durante 90 min. Pasado este tiempo se realizan 3 lavados para eliminar el exceso del fijador. Las deshidrataciones se realizaron en alcoholes graduales de 70, 80, 96, y 100 %, en los tres primeros se realizaron 2 cambios de 10 min. en cada uno y en el absoluto se realizaron 3 cambios de 10 min., para posteriormente colocar las muestras en óxido de propileno en el cual se efectuaron 2 cambios de 15 min. cada uno.

Las muestras se colocaron en una mezcla de preinclusión con una parte de óxido de propileno y una parte de resina (Polybed 812) se dejaron durante 24 hrs a temperatura ambiente, y finalmente se incluyeron en resina pura y polimerizaron a 60 °C durante 24 hrs. Los bloques obtenidos se trabajaron para obtener cortes semifinos de 0.5 a 1 µm de espesor, las laminillas con los cortes se tñieron con azul de toluidina al 1%.

Las preparaciones se observaron al microscopio óptico con un aumento de 100X y mediante una cámara de video adaptada al ocular se captó la imagen de corteza y médula del ovario tanto del grupo testigo como del experimental, la señal de la imagen obtenida se envió a un monitor de alta resolución conectado a una microcomputadora para realizar las mediciones respectivas utilizando el paquete de digitalización de imágenes IMAGE PRO PLUS.

De cada preparación se obtuvieron tres mediciones al azar en áreas de $3000 \mu\text{m}^2$ en promedio. En todos los casos se restó el área ocupada por los espacios lacunares y vasos sanguíneos.

Mediante la opción de **Adquisición Continua** del paquete se realizaron las siguientes mediciones:

En Corteza:

Los nidos de ovocitos se delimitaron en la imagen mediante el trazado manual de contornos, utilizando el "mouse" o ratón y se obtuvo el área del nido (AO) que es calculada en forma automática por el paquete. Se realizó un conteo del número de núcleos de ovocitos (NO) dentro del área delimitada.

El tamaño celular promedio de los ovocitos se obtuvo dividiendo el área del nido entre el número de núcleos de los ovocitos; $(AO)/(NO)$.

Para las células pregranulosas, se delimitaron áreas (AT) utilizando la misma técnica para el caso de los ovocitos y mediante la opción de **Selección de Intensidades de Gris y Segregación de Objetos**, se obtuvo el área ocupada por las células pregranulosas (AP) en el área delimitada inicialmente (AT). El porcentaje del área ocupada por este tipo celular se calculó dividiendo el área de pregranulosas (AP) entre el área total (AT) y multiplicando por 100.

La técnica de segregación por intensidades de gris se utilizó aprovechando la mayor avidez de las células pregranulosas por el colorante (azul de toluidina) comparada con el resto del tejido ovárico.

En Médula:

En el caso de las células esteroideogénicas típicas, se delimitaron los cordones de estas células mediante la misma técnica utilizada para los ovocitos, obteniendo el área del cordón (AE) y se realizó un conteo de los núcleos (NE) incluidos en el área del cordón. El tamaño celular promedio se obtuvo dividiendo $(AE)/(NE)$.

Para las células epiteliales relativamente indiferenciadas, se delimitaron áreas fijas con la opción de trazado de cajas en donde se localizaron este tipo de células (AI). Se realizó un conteo de núcleos (NI) en el área de la caja. Para obtener el tamaño celular promedio de este tipo celular se dividió $(AI)/(NI)$.

El tamaño celular promedio obtenido para los ovocitos, células esteroideogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas, así como el porcentaje del área ocupada por células pregranulosas fue analizado estadísticamente con la prueba de t de Student.

VI.- RESULTADOS

En los cortes semifinos del ovario del embrión de pollo, se pueden observar las dos zonas que lo conforman; corteza y médula (Fig.1). En la corteza se localizan los ovocitos primarios y las células pregranulosas (Fig.2) y en médula se encuentran las células epiteliales relativamente indiferenciadas y las células esteroideogénicas típicas que se caracterizan por contener inclusiones de lípidos (Fig.3).

El tamaño celular promedio de los ovocitos primarios y el área celular ocupada por las células pregranulosas, (expresadas en porcentaje) en el ovario de embriones de pollo de 17 y 21 días de desarrollo se representa en la tabla 1.

Se observa que en la corteza del ovario de 17 días de desarrollo, el área celular promedio de los ovocitos primarios es significativamente mayor en los ejemplares que recibieron 17β -estradiol, comparados con el grupo testigo. Al día 21 de desarrollo, los ovocitos primarios de ambos grupos presentan tamaños similares, de acuerdo a la prueba estadística de t de Student (Fig.4).

EDAD	GRUPO	n	OVOCITOS PRIMARIOS	CELULAS PREGANULOSAS.
17 Días	Testigo	3	262.34 μm^2 ± 85.88	29.04 % ± 14.03
17 Días	17β -estradiol	3	* 455.60 μm^2 ± 79.36	14.34 % ± 5.87
21 Días	Testigo	3	172.26 μm^2 ± 19.67	14.62 % ± 0.99
21 Días	17β -estradiol	3	175.69 μm^2 ± 21.65	14.44 % ± 4.20

Tabla 1. Tamaño celular promedio de los ovocitos primarios y porcentaje del área ocupada por las células pregranulosas en los grupos testigo y pretratados con el 17β -estradiol.

Se muestra el promedio \pm la desviación estándar (σ).
* $p < 0.01$ vs. testigo de 17 días.

El área celular promedio ocupada por las células pregranulosas no se modifica por efecto del 17β -estradiol en ninguna de las edades estudiadas (Fig. 5).

Los datos obtenidos como resultado de las mediciones en médula al día 17 y 21 de desarrollo, se presentan en la tabla 2. Se puede observar que el tamaño celular de las células esteroideogénicas típicas de los ejemplares que recibieron el 17β -estradiol no presentan diferencias comparado con el control, de acuerdo a la prueba estadística de t de Student (Fig. 6). A los 21 días, el tamaño de las células esteroideogénicas del grupo testigo aumenta significativamente. En el caso de los tratados con 17β -estradiol, no se observa este aumento.

EDAD	GRUPO	n	CELULAS ESTEROIDOGENICAS	CELULAS EPITELIALES REL. INDIF.
17 Días	Testigo	3	114.80 $\mu\text{m}^2 \pm 16.33$	61.50 $\mu\text{m}^2 \pm 12.78$
17 Días	17β -estradiol	3	134.51 $\mu\text{m}^2 \pm 27.60$	88.11 $\mu\text{m}^2 \pm 31.03$
21 Días	Testigo	3	* 179.72 $\mu\text{m}^2 \pm 38.00$	74.90 $\mu\text{m}^2 \pm 10.52$
21 Días	17β -estradiol	3	102.87 $\mu\text{m}^2 \pm 38.42$	95.38 $\mu\text{m}^2 \pm 14.78$

Tabla 2. Tamaño celular promedio de células esteroideogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas a los días 17 y 21 de desarrollo. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar (σ). * $p < 0.05$ testigo de 17 días vs testigo de 21 días.

El tamaño celular de las células epiteliales relativamente indiferenciadas no se modifica por efecto del 17β -estradiol en ninguna de las edades estudiadas (Fig. 7)

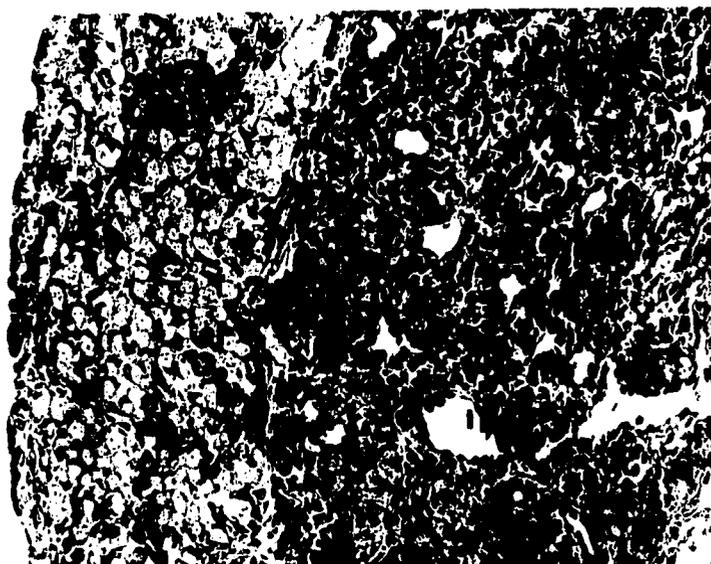


Fig. 1 En el ovario de pollo recién nacido podemos observar dos zonas; la corteza y la médula. La primera contiene a los ovocitos primarios (O) y a las células pregranulosas (Pg). En la médula se observan células esteroidogénicas típicas (E) y células epiteliales relativamente indiferenciadas (I).

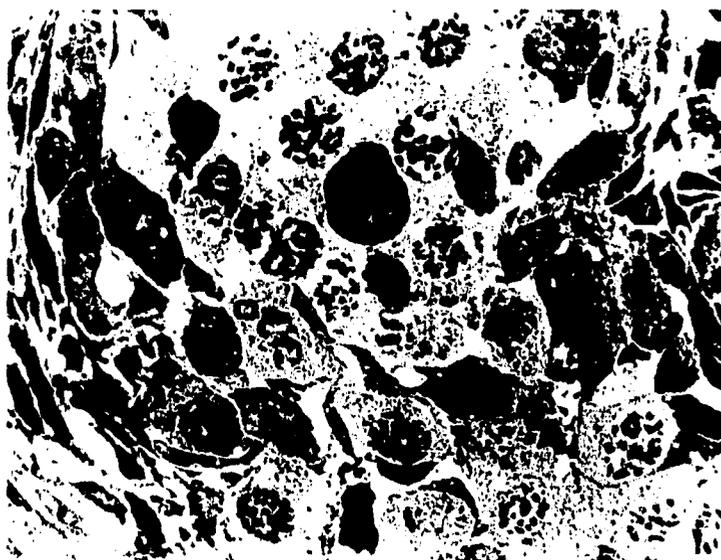


Fig. 2 En la zona cortical, las células germinales se han diferenciado a ovocitos (O) desde antes del nacimiento. El día de la eclosión, se observan ovocitos primarios en diferentes estadios de la profase I de la meiosis. Las células pregranulosas (Pg) se observan rodeando a los ovocitos.

Resultados
15 de Noviembre de 1995

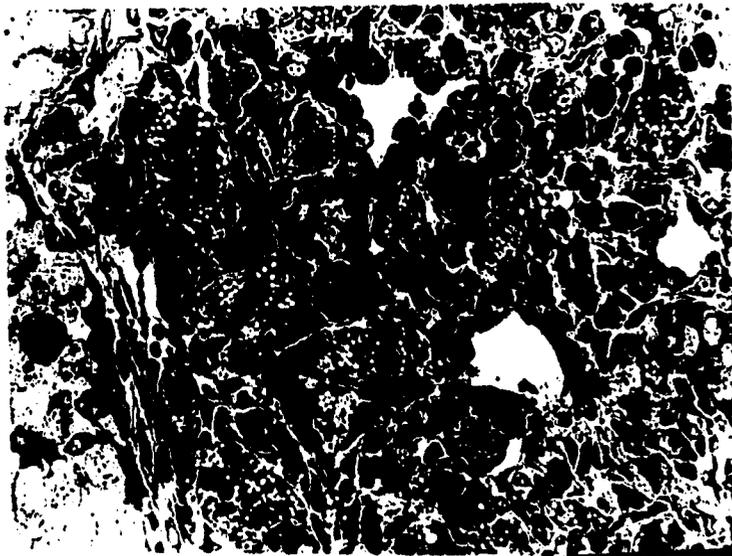


Fig. 3 En la médula ovárica del pollo recién nacido, se distinguen cordones de células que contienen abundantes inclusiones de lípidos en su citoplasma, y corresponden a las células esteroideogénicas típicas (E); también se encuentran las células epiteliales relativamente indiferenciadas (I).

Resultados
15 de Noviembre de 1995

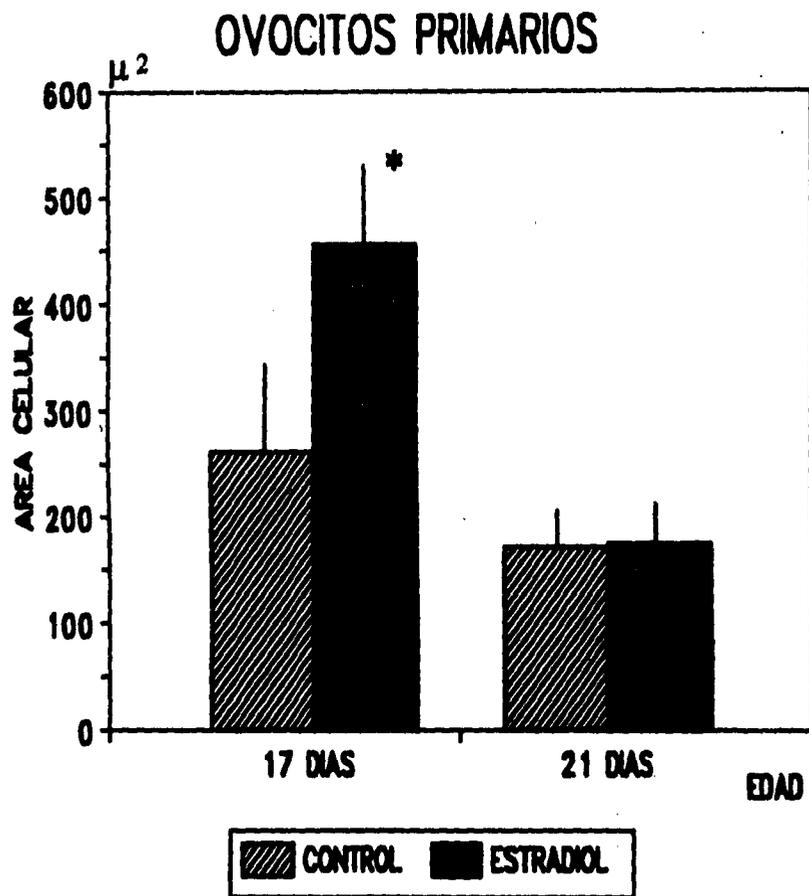


Fig. 4 Tamaño celular de ovocitos primarios al día 17 y 21 de incubación.
 * $p < 0.01$ vs. testigo de 17 días.

CELULAS PREGRANULOSAS

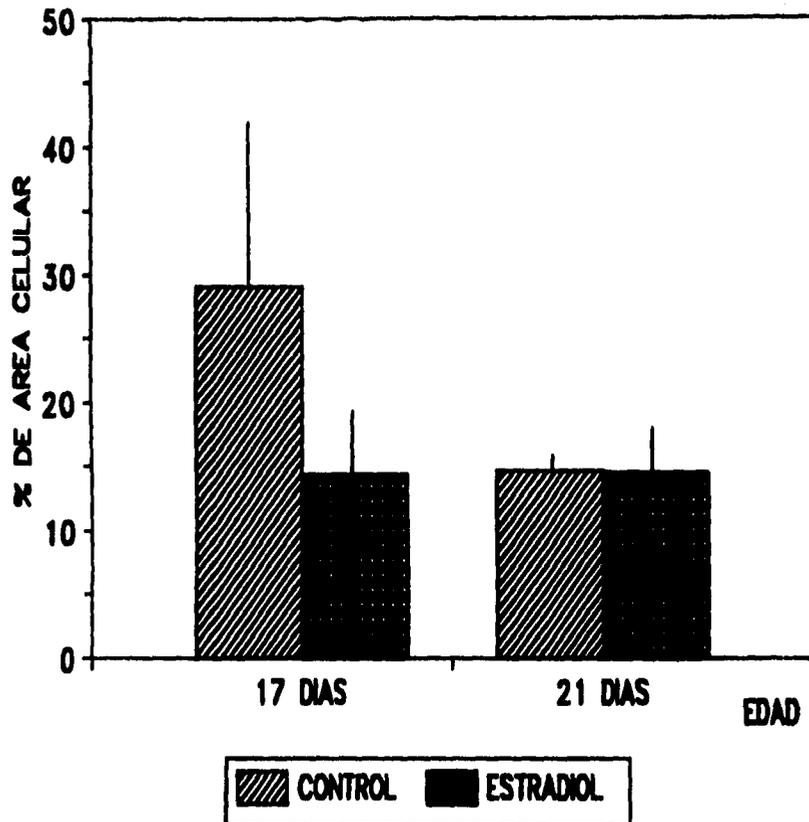


Fig. 5 Porcentaje del área ocupada por células pregranulosas al día 17 y 21 de desarrollo.

CELULAS ESTEROIDOGENICAS TIPICAS

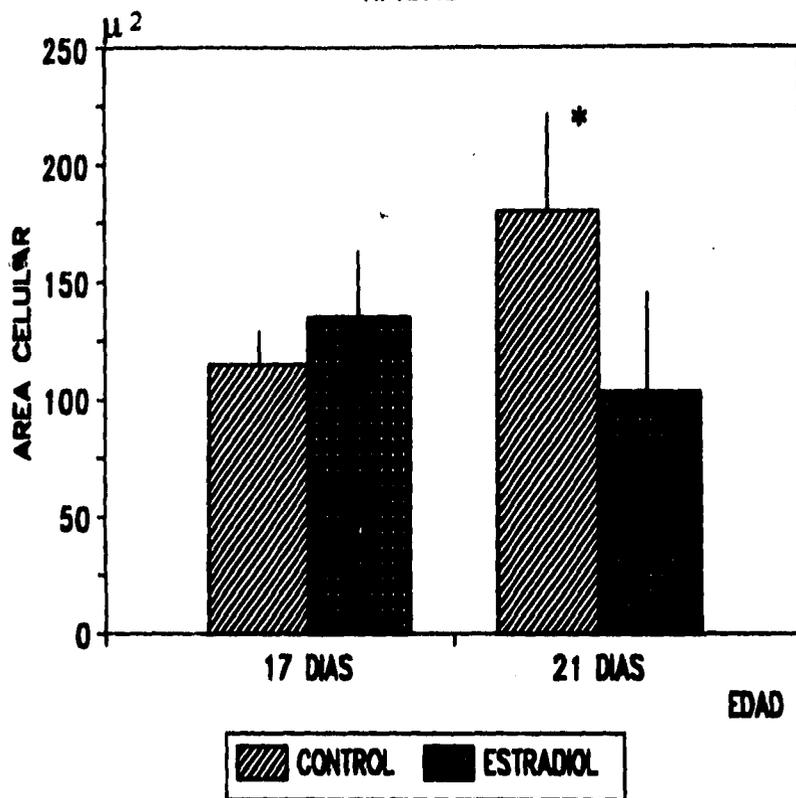


Fig. 6 Tamaño celular promedio de células esteroidogénicas típicas a los días 17 y 21 de desarrollo.
* p < 0.05 testigo de 17 días vs. testigo de 21 días.

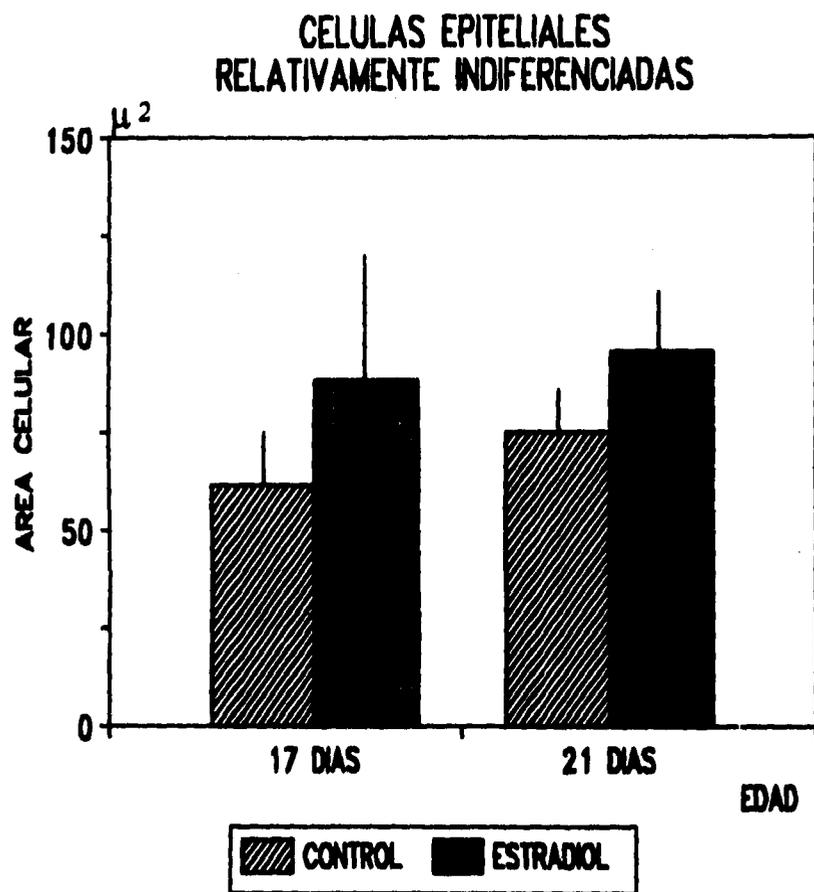


Fig. 7 Tamaño celular promedio de células epiteliales relativamente indiferenciadas a los días 17 y 21 de desarrollo.

VII. DISCUSION

La digitalización de imágenes para la medición de áreas celulares es una herramienta muy útil en estudios morfométricos. Las imágenes se transmiten desde el microscopio óptico hacia el monitor por medio de una cámara de video, y previa la adecuada calibración del programa, se obtienen mediciones directas de los perímetros y áreas celulares. Además es posible manipular la imagen de acuerdo al grado de coloración de las células, para medir áreas por segmentación de color, cuando los límites son difíciles de contornear manual o automáticamente. (en: Media Cybernetics, 1992)

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se encontraron evidencias morfológicas de la acción hormonal del 17β -estradiol en los ovocitos primarios, y en las células esteroideogénicas típicas, mientras que en los demás tipos celulares estudiados (células pregranulosas, y células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula) no se observaron cambios significativos.

Se ha demostrado la secreción de estrona y estradiol de la gónada embrionaria de pollo antes de la diferenciación gonadal (Woods y Erton, 1978; Weniger y Zeis, 1971; Weniger, 1991) y existen evidencias de la presencia del receptor a estrógeno en las células germinales y somáticas de la cresta genital de embriones de pollo, desde el día cuatro de incubación (Méndez y cols., 1995). En el presente estudio, la acción del 17β -estradiol se ejerce sobre las células germinales, ya que son los ovocitos primarios uno de los tipos celulares que se modificaron con este tratamiento. Aún cuando no se estudió

si este efecto se manifiesta antes de las edades estudiadas, es importante destacar que por el día de aplicación del tratamiento, son las células germinales primordiales quienes reciben el estímulo hormonal y éste se traduce posteriormente en un aumento del área celular de los ovocitos primarios a los 17 días de incubación, comparándolos con los animales testigo.

Existen varias posibilidades para explicar este hecho; una de ellas podría ser que se debe a una mayor acumulación de vitelo en los ovocitos, ya que como se sabe el 17β -estradiol regula la vitelogénesis, aumentando la síntesis hepática de las proteínas precursoras del vitelo que el ovocito incorpora a su citoplasma por micropinocitosis (Dumont, 1978). En las aves se ha demostrado que los estrógenos estabilizan el ARN mensajero para la síntesis de vitelogenina y ovoalbúmina en las gallinas adultas (Shapiro y cols., 1987). Sin embargo, es difícil explicar de acuerdo a ésta hipótesis, el hecho de que en el ovario de pollo recién nacido, el área celular de los ovocitos disminuya a cifras similares a las encontradas en el grupo testigo.

La segunda explicación se basa en el efecto proliferativo que ejercen los estrógenos en sus tejidos blanco. Se sabe que los estrógenos ováricos estimulan la proliferación de las células granulosas y del tejido endometrial durante el ciclo sexual. Durante la fase folicular del ciclo ovárico, los folículos primordiales entran en una fase activa de crecimiento, en este mismo periodo, los niveles séricos de estrógenos se incrementan y estimulan la proliferación de las células granulosas y el crecimiento de la cavidad antral en la que se encuentran

proteínas y hormonas que también contribuyen al crecimiento folicular (Gilbert, 1994).

En el presente modelo de estudio, las células germinales recibieron el estímulo estrogénico cuando se encontraban proliferando, si éste indujera posteriormente, una mayor actividad mitótica de las ovogonias, habría mayor número de las mismas entrando a la primera división meiótica para formar ovocitos primarios. Es importante considerar que los nidos de ovocitos que provienen de una sola ovogonia permanecen unidos entre sí por puentes citoplásmicos (Gilbert, 1994), fenómeno que también se observa durante el desarrollo del ovario de mamíferos (Beaumont y Mandl, 1962; Baker, 1963; Ioannou, 1964), además de que existe un efecto protector de los estrógenos sobre el proceso de atresia, ya que en ratas inmaduras hipofisectomizadas, los estrógenos disminuyen la atresia folicular (Goldenberg y col., 1972), de esta manera, el fenómeno de apoptosis (muerte celular programada) puede ser inhibido por estrógenos y aumentado por andrógenos como sucede en el ovario de la rata adulta (Billing y cols., 1993).

En consecuencia, podría ser que en los animales tratados con 17β -estradiol hubiera mayor número de ovocitos, ya sea por aumento en la proliferación o bien por disminución del fenómeno de atresia que sufren las ovogonias y los ovocitos primarios (Tokarz, 1978). Este hecho concuerda con otros experimentos, donde se encontró que el número total de ovocitos primarios por ovario se incrementa significativamente en los embriones de pollo de 17 días que recibieron este mismo esquema de tratamiento (Méndez y col., comunicación personal). Si consideramos que los puentes intercelulares agrupan a los ovocitos en una

estructura parecida a un sincicio, al haber mayor número de éstos, el área citoplásmica en los cortes histológicos aparecería aumentada y podría explicar la observación de una mayor área celular de los ovocitos primarios, como se describió en los resultados.

Para el día de la eclosión, el área de los ovocitos primarios de los animales tratados con estrógenos disminuye significativamente comparada con este mismo grupo al día 17 de desarrollo, pero no se encontraron diferencias en el área de los ovocitos primarios entre los grupos testigo de 17 y 21 días de desarrollo ni entre el grupo testigo y el experimental al nacimiento.

La disminución en el área de los ovocitos primarios entre el día 17 y el día 21 de incubación, podría explicarse por el inicio de la foliculogénesis que en las aves se lleva a cabo antes de la eclosión (Tokarz, 1978). En el día 17 se observa el pico máximo de proliferación ovogonial (Hughes, 1963) y después de éste, los ovocitos en diplóteno son rodeados por las células pregranulosas individualizándolos para formar los folículos primordiales. Una consecuencia de esta individualización es la ruptura de los puentes intercelulares que mantenían unidos a los ovocitos y por lo tanto el área celular que ocupa cada uno de ellos es menor comparada a cuando se encuentran formando "sincicios".

Debido a la forma de las células pregranulosas, no es posible la individualización manual o automática de éstas, por lo que se utilizó la segmentación por color, aprovechando que se tiñen más densamente con azul de toluidina. Esto nos llevó a estimar el área ocupada por las

células pregranulosas en relación con el área total de corteza medida, expresada en porcentaje.

En las células pregranulosas de la corteza ovárica no se encontraron modificaciones morfológicas estadísticamente significativas, en ninguna de las edades estudiadas. Sin embargo, es notoria una reducción en el área ocupada por estas células en el embrión de pollo de 17 días de desarrollo tratado con 17β -estradiol. Como los valores son relativos, es de esperarse una reducción en el área celular ocupada por las células pregranulosas como consecuencia del aumento en el área celular que tienen los ovocitos primarios a los 17 días de desarrollo, tal como se observa en el grupo tratado. Debe considerarse también, que las células del epitelio celómico que forman los cordones sexuales en la gónada indiferente tienen receptor a estrógenos (Méndez y cols., 1995); a partir de las mismas se van a originar las células pregranulosas, por lo tanto no se puede descartar totalmente un efecto de los estrógenos sobre las células pregranulosas.

La médula del ovario embrionario del pollo, está compuesta principalmente por células epiteliales, dentro de las cuales se distinguen básicamente dos subpoblaciones celulares; las células esteroidogénicas típicas, que contienen abundantes inclusiones de lípidos y se encuentran agrupadas en cordones; y las células epiteliales relativamente indiferenciadas que se encuentran rodeadas por una lámina basal bien definida. Las células esteroidogénicas típicas son productores de andrógenos y las células epiteliales relativamente indiferenciadas sintetizan estrógenos, ambas subpoblaciones son sensibles al estímulo con gonadotropina coriónica humana durante el

desarrollo embrionario. (González del Pliego y cols., 1988; Pedernera y col., 1988).

Comparando el tamaño de las células esteroidogénicas típicas entre los 17 y 21 días de incubación se observa un crecimiento significativo de estas células en el ovario de los animales testigo ($P < 0.05$). Este incremento en el tamaño celular puede relacionarse a la actividad de síntesis y secreción de hormonas sexuales que presenta el ovario inmaduro de las aves, actividad que aumenta con la edad del animal (Tanabe y col., 1986). No se observó el mismo fenómeno en el ovario de los embriones que recibieron 17β -estradiol, lo que sugiere que este crecimiento se encuentra inhibido. Como es conocido, el desarrollo gonadal de aves y mamíferos se encuentra regulado por la hipófisis, que a su vez recibe estímulos del hipotálamo.

Aunque se postula que en el embrión de pollo, la regulación adenohipofisiaria de la esteroidogénesis gonadal se inicia al día 13 de desarrollo (Woods y Weeks, 1969), se ha demostrado la presencia de gonadotropinas desde el día 4 de incubación en la bolsa de Rathke (tejido del cual se origina la adenohipófisis) (en: Woods, 1987).

En el ovario maduro de mamíferos, los estrógenos intervienen estimulando a las células de la granulosa para la síntesis de inhibina, que junto con los primeros actúan inhibiendo la secreción de la hormona folículo estimulante durante el desarrollo folicular. (Carlson, 1990)

En este trabajo, se administró el 17β -estradiol al día 5 de incubación por lo que éste podría actuar sobre las células hipofisiarias secretoras de gonadotropinas, de tal forma que, cuando ya se ha establecido el eje hipotálamo-

hipófisis-gónada, exista una producción reducida de LH que ocasione que las células esteroidogénicas típicas se encuentren mas pequeñas.

Para saber si el 17β -estradiol modifica la esteroidogénesis ovárica, tal como lo sugieren los cambios en las células esteroidogénicas típicas, es necesario realizar pruebas funcionales, como por ejemplo, la incubación "in vitro" de las células ováricas y la detección posterior de esteroides en el medio de cultivo.

Con respecto a las células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula ovárica que se propone sintetizan estrógenos (Pedernera y col., 1988), no se cuantificaron cambios significativos por el tratamiento con 17β -estradiol. Sin embargo, en otros estudios se observó que bajo condiciones de estimulación con gonadotropina coriónica humana, se incrementa la secreción de estrógenos "in vitro" cuando los embriones reciben 200 ng de 17β -estradiol, a los 11, 13 y 15 días de incubación (Méndez y col, comunicación personal). Además, existen evidencias de la presencia del receptor a estrógenos en las células del mesénquima de la cresta urogenital y en las células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula ovárica del pollo recién nacido (Méndez y cols., 1993; 1995) por lo que no podemos descartar que esta subpoblación de células ováricas sea blanco de los estrógenos. Sería interesante saber si la secreción de estrógenos se incrementa en respuesta al estímulo estrogénico, cuando éste se aplica antes de la diferenciación gonadal, al igual de lo que se observa cuando la gónada ya se ha diferenciado en ovario.

VIII. CONCLUSIONES

El estudio morfométrico del ovario en el embrión de pollo de 17 días, demuestra que los ovocitos primarios incrementan su tamaño por la administración temprana de 17β -estradiol.

El área ocupada por las células pregranulosas, en la corteza del ovario en esta misma edad, parece ser menor en los embriones que recibieron 17β -estradiol antes de la diferenciación gonadal.

El tamaño celular de las células esteroideogénicas típicas y las células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula ovárica, a los 17 días de incubación, no se modifica por efecto del tratamiento con 17β -estradiol antes de la diferenciación gonadal.

El tamaño celular promedio de los ovocitos primarios, en el ovario de pollo recién nacido no se altera por efecto de la administración del 17β -estradiol antes de la diferenciación gonadal.

El área ocupada por las células pregranulosas, en la corteza del ovario de pollo recién nacido, no se modifica en los embriones que recibieron 17β -estradiol antes de la diferenciación gonadal.

El tamaño de las células esteroideogénicas típicas, aumenta en los animales testigo entre los 17 y 21 días de incubación. Este fenómeno no se observa en los embriones que recibieron 17β -estradiol antes de la diferenciación gonadal.

El tamaño de las células esteroideogénicas típicas y el de las células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula en el ovario de pollo recién nacido, no se modifica por efecto del tratamiento con 17β -estradiol.

Los estrógenos actúan sobre la gónada indiferenciada de pollo, y este efecto se observa en el ovario embrionario de 17 días. La acción hormonal del 17β -estradiol se manifiesta en los ovocitos primarios, aunque no se descarta que también actúe en las células pregranulosas y las células esteroideogénicas típicas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Baker, T.G. (1963) A quantitative and cytological study of the germ cells in human ovaries. Proc. R. Soc. London Ser. B 158: 417-433.
- Beaumont, H.M., y Mandl A.M. (1962) A quantitative and cytological study of oögonia and oöcytes in the foetal and neonatal rat. Proc. R. Soc. London Ser. B 155:557-579.
- Billing, H., Furuta, I., y Hsueh, A.J. (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology 133 (5):2204-2212.
- Bull, J.J., (1980). Sex determination in reptiles. Q. Rev. Biol. 55: 3-21.
- Carlson, B.M. (1990) Gametogénesis y fecundación. En: Embriología básica de Patten. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. pp. 111-112
- Dumont, J.N., (1978) Oögenesis in Xenopus laevis. VI Route of injected tracer transport in follicle and developing oöcyte. J. Exp. Zool. 204: 193-200.
- Elbrecht, A., Smith, R.G., (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chicken. Science 255: 467-470.
- Ferguson, M.W.J. y Joanen, T. (1982) Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississippiensis. Nature 296: 850-853
- George, F.W., Wilson, J.D., (1988) Sex determination and differentiation. En: The physiology of reproduction. pp 3-21
- Gilbert, S., (1994) Sex determination. En : Developmental Biology. Ed. Sinauer. pp. 754-772.
- Ginsburg, M., Snow, M.H.L. y McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development 110:521-528

- Goldenberg, R.L., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T. (1972) Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. Endocrinology 90: 1492-1498.
- González del Pliego, M., González-Morán, G., y Pedernera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. Cell Tiss. Res. 253: 665-670.
- Hahnel, A.C., y Eddy, E.M. (1986). Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. Gamete Res. 15:25-34.
- Haqq, C.M., King, C.Y., Donahoe, P.K. y Weiss, M.A. (1993). Sry recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1097-1101.
- Hughes, C.G. (1963) The population of germ cells in the developing femal chick. J. Embryol. Exp. Morph. 11(3): 513-536.
- Ioannou, J.M., (1964). Oögenesis in the guinea pig. J. Embryol. Exp. Morphol. 12:673-691.
- Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. Recent. Prog. Horm. Res. 8: 379-418.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. y Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351:117-121.
- McLaren, A., Simpson, E., Tomonari, K., Chandler, P. y Hogg, H. (1984) Male sexual differentiation in mice lacking the H-Y antigen. Nature 312: 552-555
- Media Cybernetics., (1992). Image Pro Plus. The software standard for micro-imaging. Media Cybernetics Inc.
- Mendez, C.H., Hofmann, P., Pedernera, E., (1993). Effect of 17 β -estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of de newly hatched chick. Gen. Comp. Endocrinol. 89: 182-188.

- Méndez, C.H., Echerverría O., Vázquez-Nin, G.H., Pedernera, E., (1993). Inmunocytochemistry of estrogen receptors in subpopulations of somatic and germ cells in the ovary of 1-day-old-chick. Second Interamerican Congress on Electron Microscopy. Can-Cun.
- Méndez, C., Chávez, B., Vilchis, F., Pedernera, E., (1994). Estrogen receptors in somatic and germ cells of the chicken ovary. Acta 6: 331-342.
- Méndez, C., González Jiménez M.A., Pedernera, E., (1995). Inmunolocalización del receptor a estrógeno del ovario del embrión de pollo. Acta Microscópica 4(A): 246
- Merchant, H., (1978) Ovarian Differentiation. En: The vertebrate ovary. Comparative biology and evolution. pp.47-81.
- Merchant, H., (1991) Gametogénesis. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. Coordinación de la Investigación Científica. U.N.A.M. Ed. Porrúa pp. 11-29.
- O'Malley, B.W., Strott, Ch.A., (1993) Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: Endocrinología de la reproducción. Ed. Interamericana. pp. 179-203
- Palmer, S.J. y Burgoyne, P.S. (1991). In situ analysis of fetal, prepubertal and adult XX ↔ XY chimaeric mouse testes; Sertoli cells are predominantly, but not exclusively XY. Development 112:265-268
- Patek, C.E., Kerr, J.B, Gosden, R.G., Jones, K.W., Hardy, K., Muggleton-Harris, A.L., Handyside, A.H., Whittingham, D.G., Hooper, M.L. (1991). Sex chimaerism, fertility, and sex determination in the mouse. Development. 113:311-325.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M.A., y González del Pliego, M., (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. Gen. Comp. Endocrinol. 71: 153-162.

- Pedernera, E., (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: Comunicación neuroendócrina. Bases Celulares y moleculares. Soc. Mex. Ciencias Fisiol. 1ª Ed. pp.33-46.
- Shapiro, D.J., Blume, J.E., Nielsen, D.A., (1987). Regulation of messenger RNA stability in eukaryotic cells. Bioessays 6:221-226.
- Scheib, D., (1983). Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. Differentiation Supl. 23:89-92.
- 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., Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346: 240-244.
- Tanabe, Y. Saito N y Nakamura T. (1986) Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (Gallus domesticus) Gen. Comp. Endocrinol. 63:456-463.
- Tokarz, R.R. (1978). An autoradiographic study of the effects of mammalian gonadotropins (follicle stimulating hormone and luteinizing hormone) and estradiol 17 β on ³H thymidine labeling of surface epithelial cells, prefollicular cells, and oögonia in the ovary of the lizard Anolis carolinensis. Gen. Comp. Endocrinol. 35:179-188.
- Weniger, J.P., y Zeis, A. (1969) Formation d'oestrone et d'oestradiol radioactifs, à partir d'acétate de Na-1-¹⁴C, par les ébauches gonadiques d'embryon de Poulet de 5 a 6 jours. C.R. Acad. Sci. Paris Ser D 268: 1306-1309.
- Weniger, J.P., Zeis A. (1971) Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. Gen. Comp. Endocrinol. 16:391-397.
- Weniger, J.P. (1991) Estrogen secretion by the chick embryo ovary. Exp. Clin. Endocrinol. 98(1):9-14.

- Wolff, E.T., y Ginglinger, A. (1935). Sur la transformation des poulets mâles en intersexués par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. Arch. Anat. Hist. Embr. 20: 219-278
- Woods, J.E., Weeks, R.L. (1969) Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 13:242-254.
- Woods, J.E., Erton, L.H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 36:360-370.
- Woods, J.E. (1987). Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. J. Exp. Zool. sup 1:265-271.