



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EXPRESIÓN DEL FACTOR EXTEROIDOGENICO  
- 1 (cSF-1) DURANTE LA DIFERENCIACIÓN  
SEXUAL DEL EMBRIÓN DE POLLO  
(*White leghorn*)**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
DORYS MATA LOPEZ

ASESOR: DRA. MARÍA IRMA VILLALPANDO FIERRO.



MÉXICO, D.F.

283021

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
2000.

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE INVESTIGACION



Universidad Nacional  
Autónoma de México

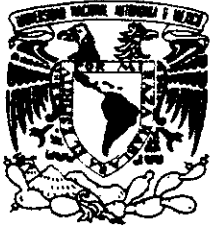


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Expresión del factor esteroideogénico - 1 (cSF-1) durante la diferenciación sexual del embrión de pollo White leghorn"

realizado por Dorys Mata López

con número de cuenta 9216080-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. María Irma Villalpando Fierro

Propietario Dra. María del Carmen Uribe Aránzabal *M<sup>a</sup> del Carmen Uribe*

Propietario M. en C. Claudia Karina Torres Villaseñor *[Firma]*

Suplente Biól. José Aquiles Bernal Moreno

Suplente Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda *[Firma]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

*Edna M. Suárez*

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

J FA  
E L  
ÓN

EXPRESIÓN DEL FACTOR ESTEROIDOGÉNICO - 1  
(cSF-1) DURANTE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL  
DEL EMBRIÓN DE POLLO (*White leghorn*)

*A Dios,  
por brindarme el  
maravilloso  
don de la vida*

*A mis padres,  
ejemplo  
de esfuerzo y superación*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por abrirme las puertas para realizar mis aspiraciones de estudio y conocimiento.

A la Dra. María Irma Villalpando Fierro, por brindarme la oportunidad de participar en su equipo de trabajo y por despertar en mí el interés hacia la investigación.

A la Dra. María del Carmen Uribe Aránzabal por haber aceptado ser parte del sinodo, contribuyendo con ello a mejorar este trabajo.

A la Dra. Janette Furuzawa Carballeda, ejemplo a seguir como profesionista, por todas sus ideas aportadas en la revisión de esta tesis.

A la M. en C. Claudia Karina Torres Villaseñor, por descubrirme el maravilloso mundo de la embriología y por su dedicación como docente.

Al Biól. José Aquiles Bernal Moreno por sus acertados puntos de vista que contribuyeron en mucho a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Enrique Pedernera, por su ayuda en la obtención e incubación de los embriones.

A la Lic. en IBB Lilia Galván Miranda, por ser mi primera maestra en el manejo y disección de los embriones.

Al M. en C. Horacio Villafán Monroy por su paciencia y enseñanza en el aislamiento de DNA y RNA.

A la Biól. Dolores Aguayo por su ayuda y su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Lilia, Amanda, Laura, Yetsi, Horacio, Gabriel, Miguel y Carlos, por hacer del laboratorio no sólo un lugar de trabajo, sino también un lugar de inolvidables convivencias.

A la señora Gloria Bustos por ser excelente en su trabajo y por guisar tan rico.

A las secretarias del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su ayuda y colaboración durante la realización de este trabajo: Cielo†, Isabel y Mari.

A mis amigos y compañeros de la carrera: Ere, Karla , Fer, Xóchitl, Nelly y Jerónimo, por todos los momentos compartidos y por su amistad.

Al CONACyT por la beca otorgada durante la realización de esta tesis con el proyecto 25287N a nombre de la Dra. Villalpando.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido a mi formación.

Y finalmente, al Biól. Iván R. Espinola que después de haber sido mi profesor, ahora es una parte importante en mi vida.

Gracias.

# ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	
2.0 <i>Dimorfismo sexual cromosómico en la Clase Aves</i>	2
2.1 <i>El factor determinante del testículo</i>	2
2.2 <i>Diferenciación gonadal en las aves</i>	3
a) Formación de la cresta genital	3
b) Etapa de gónada indiferenciada	4
c) Diferenciación sexual	
i) Testicular	5
ii) Ovárica	5
2.3 <i>Papel de los esteroides en la diferenciación sexual gonadal</i>	9
a) Transplantes	
i) Corioalantoideo	9
ii) Cavidad celómica	9
b) Función de la hormona inhibidora de los conductos de Müller	10
c) Administración exógena de esteroides	
i) Andrógenos	11
ii) Estrógenos	12
iii) Inhibidores de aromatasas	12
iv) Hormonas esteroides	12
2.4 <i>Metabolismo de hormonas esteroides gonadales</i>	13
a) Estructura química y nomenclatura	13
b) Clasificación química	13
c) Clasificación biológica	16
i) Progestinas	16
ii) Andrógenos	16
iii) Estrógenos	16
2.5 <i>El factor esteroideogénico - 1</i>	17
a) Organización del gen	17
i) Determinación del sitio iniciador de la transcripción	18
b) Localización tisular	
i) Etapa embrionaria	18
ii) Tejidos adultos	19
c) Similitudes y diferencias con el gen SF-1 de mamíferos	19

<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	21
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	22
<b>OBJETIVOS</b>	22
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
5.0 <i>Material biológico</i>	23
a) Técnica de ovoscopia	23
b) Disección y almacenamiento del tejido somático y gonadal	24
c) Determinación del sexo cromosomal	24
i) Aislamiento de DNA	25
ii) Amplificación del cromosoma W	26
d) Aislamiento de RNA total	26
e) Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa	
i) Oligonucleótidos sintéticos	28
ii) Obtención del DNA complementario	29
iii) Amplificación del RNA mensajero	29
f) Electroforesis del gen amplificado	30
g) Fotografías	30
<b>VI. RESULTADOS</b>	
6.0 <i>Determinación del sexo genético</i>	31
6.1 <i>Ontogenia del RNA mensajero del cSF-1 y expresión de la S-CF en el pollo</i>	
a) Ovario	33
b) Testículo	36
6.2 <i>Análisis de los RNA mensajeros por densitometría</i>	38
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	42
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	47
<b>IX. APÉNDICE</b>	48
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	50



## ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácidos
Ad4BP	“Ad4-binding protein”
cgp's	Células germinales primordiales
cSF-1	Factor esteroidogénico - 1 del pollo
D	Derecha
d.i.	Días de incubación
dATP	Desoxiadenosin trifosfato
dCTP	Desoxicitosin trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosin trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
FDT	Factor determinante del testículo
FTZ-F1	Gen fushi tarazu - 1. Detectado en <i>Drosophila melanogaster</i> , homólogo al SF-1
h.i.	Horas de incubación
H <sub>2</sub> O-DEPC	Agua tratada con dietilpirocarbonato
HAM	Hormona Anti-Mülleriana
HMG1	“High mobility group protein - 1”
HMG2	“High mobility group protein - 2”
I	Izquierda
o.d.	Ovario derecho
o.i..	Ovario izquierdo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAc	Ácido ribonucleico complementario
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa

RT	Transcriptasa reversa
S-CF	S-ciclofilina
SF-1	Factor esteroideogénico - 1
SRY	“Sex-determining region in Y chromosome” (en humanos)
Sry	“Sex-determining region in Y chromosome” (otros vertebrados)
t.d.	Testículo derecho
t.i.	Testículo izquierdo
U.V.	Ultravioleta

### UNIDADES

kb	kilobases
° C	Grados centígrados
μl	Microlitros
seg	Segundos
r.p.m.	Revoluciones por minuto
min	Minutos
pH	Potencial de hidrógeno
1X	Una vez concentrado
5X	Cinco veces concentrado
M	Molaridad

## I. RESUMEN

La diferenciación sexual gonadal en las aves ocurre durante la fase embrionaria. Sin embargo, actualmente no se ha esclarecido el (los) mecanismo(s) que determina este proceso. Se sabe que en otros grupos de vertebrados el Sry determina la diferenciación gonadal; en las aves, este gen se expresa tanto en machos como en hembras adultos. Se ha planteado que las hormonas esteroides juegan un papel fundamental en la diferenciación de las gónadas, aunque, se desconoce si son las responsables directas de este proceso o bien, si son una consecuencia del mismo. Hasta el presente se desconoce el mecanismo genético de la determinación sexual en las aves. En este trabajo se estudió la expresión del factor esteroideogénico - 1, en gónadas embrionarias de pollos machos y hembras a diferentes tiempos dentro del período crítico de la diferenciación sexual gonadal [5.5 días de incubación (d.i.), 6.0 d.i., 6.3 d.i., 6.7 d.i., 6.12 d.i. y 7.0 d.i.]. Asimismo, se cuantificó la expresión del RNA mensajero del cSF-1 por densitometría. Los resultados indican que la expresión del transcrito se detecta desde la primera edad estudiada hasta la última, tanto en machos como en hembras. El análisis densitométrico reveló que la expresión es más intensa en la gónada izquierda que en la gónada derecha de ambos sexos. En los machos, la intensidad del mensajero es mayor en la primera edad evaluada y disminuye en ambos testículos conforme avanza el tiempo de desarrollo. En las hembras, la mayor expresión del transcrito se detecta en la primera etapa, disminuye en las etapas siguientes, incrementándose notablemente en la última etapa. Con base en estos resultados, proponemos que el factor esteroideogénico - 1 además de participar o controlar la expresión de las enzimas que intervienen en el metabolismo de esteroides, podría activar otros genes críticos que conlleven a la diferenciación sexual gonadal.

## II. INTRODUCCIÓN

### *2.0 Dimorfismo sexual cromosómico en la Clase Aves*

Uno de los aspectos importantes durante la determinación sexual, es el dimorfismo cromosómico que se establece en las diferentes clases de animales del phylum Vertebrata.

En los mamíferos incluyendo al hombre, los gametos masculinos tienen un cromosoma Y, que está asociado a la diferenciación testicular, mientras que el ovocito posee un cromosoma X. Si éste es fertilizado por un espermatozoide Y, el individuo desarrollará testículos (XY); por el contrario, si el ovocito es fertilizado por un espermatozoide X tendrá ovarios (XX), denominándose heterogaméticos los primeros y homogaméticos los segundos.

En la Clase Aves se presenta el caso inverso, ya que los machos son homogaméticos porque poseen dos cromosomas sexuales denominados ZZ y las hembras son heterogaméticas, pues tienen una carga genética ZW (Mittwoch, 1971; Clinton, 1998). De tal manera que los embriones de pollo con dos cromosomas ZZ desarrollarán testículos y los que sean heterogaméticos (ZW) tendrán ovarios.

### *2.1 El factor determinante del testículo*

En organismos como los mamíferos, la determinación del sexo depende de la presencia o ausencia de un factor determinante de la diferenciación testicular expresado por el cromosoma sexual Y que conlleva a la diferenciación gonadal. En el caso de las aves este mecanismo de determinación sexual genética no se ha demostrado.

El primer factor determinante del testículo (FDT) propuesto para mamíferos fue el antígeno H-Y (Watchel y col, 1975). Sin embargo, en 1984 McLaren y colaboradores demostraron que éste no era necesario para la diferenciación testicular del ratón, pues se encontró que aún en la ausencia de este antígeno los ratones se desarrollaban como machos.

Posteriormente se identificó un nuevo gen denominado SRY en el humano y Sry en otros grupos de vertebrados (Tiersch y col, 1991). Este gen conservado filogenéticamente se localiza en el brazo corto del cromosoma Y en la región denominada pseudoautosomal. El Sry tiene alta homología con los genes que codifican para el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG1 y HMG2), las cuales se sabe son factores de transcripción en los mamíferos (Sinclair y col, 1990).

En las aves se desconoce el papel del Sry porque éste se expresa tanto en machos como en hembras adultas (Tiersch y col, 1991). No obstante, estudios recientes plantean que probablemente induzca la expresión de un gen denominado Sox9, el cual se detecta en la cresta genital de ambos sexos en las aves (Morais da Silva y col, 1996), y cuya expresión permanece en la gónada diferenciada de los machos y se apaga en las hembras (Kent y col, 1996). La expresión espacio-temporal del Sry es cuestionable debido a que no se sabe si es el gen primario determinante de la diferenciación sexual gonadal o si desencadena una cascada de genes que participan en la diferenciación gonadal en la Clase Aves.

## *2.2 Diferenciación gonadal en las aves*

El desarrollo de las gónadas de la mayoría de los vertebrados comienza con un engrosamiento del epitelio celómico o epitelio germinal que se localiza en el área ventral del mesonefros en desarrollo. La proliferación de las células germinales y somáticas es lo que lleva a la formación del primordio gonadal conocido como cresta genital que es idéntica en ambos sexos (Hardisty, 1984).

### *a) Formación de la cresta genital*

En las aves, las células germinales primordiales (cgp's) se separan del hipoblasto para ubicarse en el endodermo del saco vitelino en las primeras 18 horas de incubación (h.i.)

(Hamburger y Hamilton, 1951). Posteriormente entre los 1.5 y 1.8 días de incubación (d.i.) migran a través del torrente sanguíneo y salen de los capilares en el mesenterio esplácnico posterior de la arteria onfalomesentérica del embrión (Ando y Fujimoto, 1983). Esta área coincide con el mesenterio dorsal en donde finalmente las cgp's migran hacia la cresta genital, la cual para entonces ha comenzado a diferenciarse como una estructura epitelial y mesenquimática (Fargeix y col, 1981) (fig 1A).

En la actualidad aún se desconocen los mecanismos específicos que dirigen el trayecto de las cgp's hacia la cresta genital. Se ha planteado que esta atracción esta mediada por factores quimiotácticos liberados por la cresta genital que pudieran estar atrayéndolas (Kuwana y col, 1986). Sin embargo, estos factores aún no se han identificado.

Por otro lado, se ha determinado que existe dimorfismo estructural entre las cgp's de embriones de pollo hembra y macho con respecto a la cantidad de retículo endoplásmico liso como rugoso, mitocondrias, partículas de glicógeno y lípidos (Zaccantí y col, 1990).

#### *b) Etapa de gónada indiferenciada*

Una vez que las cgp's llegan a la cresta urogenital se establecen en grupos distribuidos de manera irregular en donde son rodeados por células mesenquimatosas, formando cordones de tipo epitelial. Posteriormente hay una invasión de vasos sanguíneos que junto con las células del mesénquima aíslan a la gónada del tejido mesonéfrico y además, se forma una lámina basal que rodea al epitelio germinal. Las células mesenquimáticas dorsales a esta edad se agrupan y forman un segundo conjunto de cordones epiteliales que se incorporan dentro de la médula (Fargeix y col, 1981).

En el cuarto día de incubación, la cresta genital está completamente diferenciada de la cavidad celómica. La ausencia de lámina basal en la región de proliferación permite el contacto directo entre las células del mesénquima y el epitelio celómico (Carlson y Stahl,

1985). En cuanto a las células somáticas se han planteado diversos orígenes, Carlon y Stahl (1985), mencionan que los cordones sexuales primitivos se forman del epitelio germinal, mientras que Merchant-Larios y col. (1984b), proponen que el establecimiento de la gónada indiferenciada es el resultado de dos proliferaciones consecutivas del epitelio celómico. La primera daría origen a la médula y la segunda a la corteza, éstas se observan muy bien definidas al 5 d.i. en las aves. Simultáneo al desarrollo de las gónadas se diferencian los conductos de Wolff y de Müller (Mittwoch, 1971), los primeros darán lugar al epidídimo, los conductos deferentes y la vesícula seminal del tracto reproductor masculino; los segundos se diferenciarán en el útero y en las tres regiones del oviducto: el ostium, el magnum y el istmo, que forman el tracto reproductor femenino (Rugh, 1964) (fig 1B).

### *c) Diferenciación sexual*

#### *i) Testicular*

El tiempo en que ocurre la diferenciación morfológica de los testículos y los ovarios en las aves es motivo de controversia, varía de 120 h.i. hasta 216 h.i. (Merchant-Larios y col, 1984b; Carlon y Stahl, 1985). En los machos genéticos ocurre la separación del tejido medular y el epitelio celómico, migrando las cgp's hacia la zona medular; el mesénquima y los vasos sanguíneos invaden la región cortical de la gónada del macho, propiciando la formación de la túnica albúginea. El mesénquima se ubica entre los cordones sexuales que se empiezan a distinguir claramente, por el depósito de una lámina basal en la superficie del epitelio celómico y medular, cuando las dos zonas están ya separadas (fig 1D).

#### *ii) Ovárica*

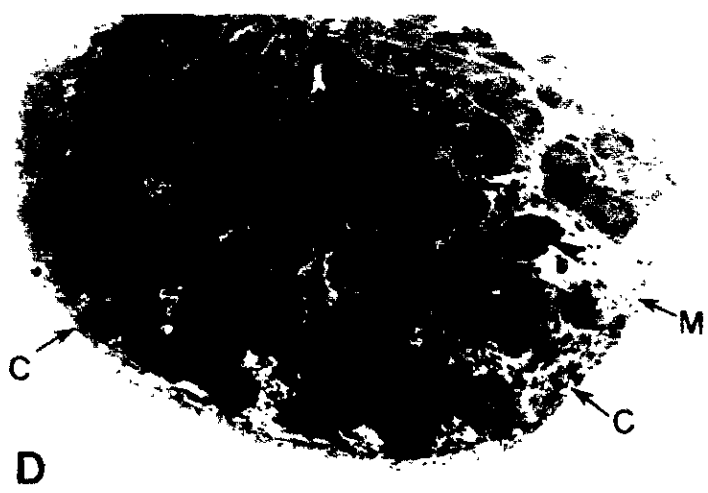
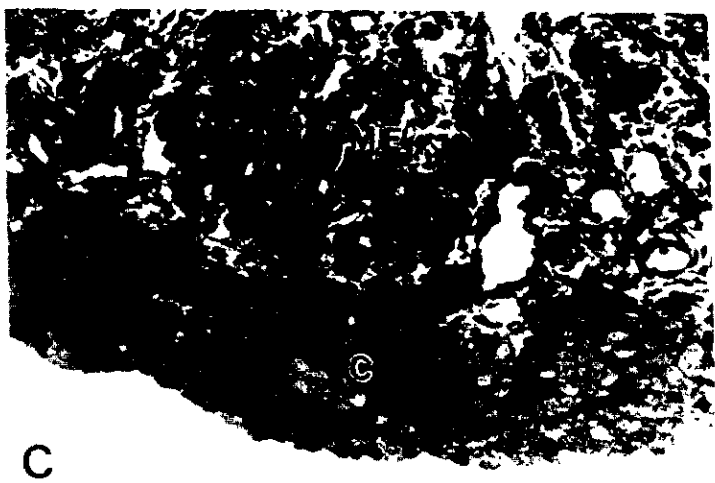
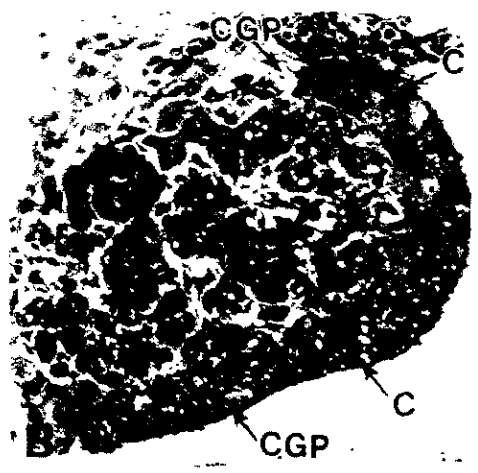
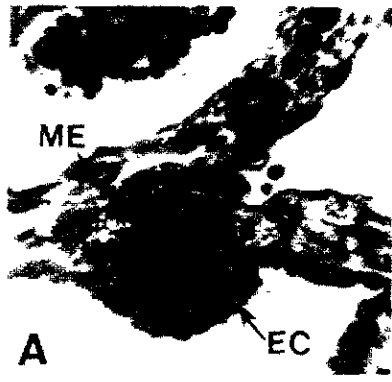
Una de las características particulares de la Clase Aves presente en la mayoría de las especies, es la asimetría ovárica que comienza a observarse a los 7 d.i. En las hembras, el epitelio de la gónada derecha pierde su arreglo histológico y se convierte en una capa de

células planas que se separan de los cordones epiteliales internos. El conducto de Müller derecho también involuciona hasta quedar en un estado rudimentario (Merchant-Larios y col, 1984b). El ovario, que está constituido por una médula y una corteza, crece lentamente desde el octavo hasta el décimo día de desarrollo embrionario, sufriendo una regresión, hasta que presenta un aspecto rudimentario en el día 15 y deja de ser funcional al nacimiento.

Por el contrario, el ovario izquierdo experimenta un crecimiento del tejido epitelial, acompañado por un crecimiento del estroma y de la vascularización, hasta que se forma un ovario con dos regiones topográficas bien definidas, la corteza y la médula. A los 10 d.i. la corteza ovárica muestra cordones corticales constituidos por ovogonias, ovocitos y células prefoliculares, que se caracterizan por presentar estructuras denominadas “lining bodies”. Mientras tanto, en la médula se desarrollan gran cantidad de cordones de células secretoras de esteroides, así como un tejido lacunar característico de la gónada femenina (Carlson y Stahl, 1985) (fig 1C).



Fig.1. Esquema que muestra el desarrollo gonadal del embrión de pollo. **(A)**: cresta genital (20X); formada por el epitelio celómico (EC) y el mesénquima (ME). **(B)**: etapa de gónada indiferenciada (20X), se observan los cordones sexuales primarios (cabeza de flechas) y las células germinales (CGP) que se encuentran en la región periférica llamada corteza (C). **(C)**: ovario de 18 d.i. (40X); los cordones sexuales primarios se reducen y son ocupados por tejido esponjoso y mesénquima (ME), las células germinales primordiales son todas las células mas claras localizadas en la corteza. **(D)**: testículo (40X); se observa la corteza reducida (C) y las células germinales ubicadas dentro de los cordones sexuales (cabeza de flechas). (Fotografías tomadas de material procesado en el laboratorio de la Dra. Irma Villalpando).



### *2.3 Papel de los esteroides en la diferenciación sexual gonadal*

Las hormonas esteroides gonadales participan como posibles reguladores que conducen a la diferenciación del sexo gonadal en los vertebrados (Miller, 1988). Unos de los primeros trabajos que demuestran la importancia de estas hormonas lo realizó Lillie (1916,1917), en el cual observó que embriones gemelos de diferentes sexos de bovinos y ovinos presentaban un fenómeno conocido como “freemartinismo”. Este es una anastomosis a nivel de corion que permite el paso de hormonas esteroides masculinas del feto macho hacia el feto hembra, causando la masculinización de ésta. Con base en estos trabajos comenzaron a desarrollarse líneas de investigación sobre la modulación epigenética de la diferenciación sexual gonadal en los vertebrados, con diferentes enfoques experimentales como se menciona a continuación.

#### *a) Transplantes*

##### *i) Corioalantoideo*

Investigaciones previas demostraron que la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, es un tejido que sirve de hospedero para el crecimiento de riñones embrionarios de ratón (Preminger y col, 1980), así como para el desarrollo y maduración de órganos como el corazón, hígado, glándulas adrenales, ovarios y testículos embrionarios de hámsters (Spanel-Borowski, 1989). Se ha observado que el corioalantoides provee de una enorme irrigación sanguínea a los transplantes, lo que probablemente contribuya a la maduración de los mismos.

##### *ii) Cavidad celómica.*

Estudios realizados en la época clásica de la embriología demostraron la influencia de las secreciones en los implantes en gónadas embrionarias, para tratar de conocer los mecanismos por los cuales se induce una reversión sexual gonadal en las aves.

En 1946, Wolff implantó gónadas de pollo de 144 a 264 h.i. dentro de la cavidad celómica de embriones de 48 h.i. En este estudio observó que los ovarios implantados dentro de la cavidad celómica de embriones machos inducían la diferenciación de la corteza en el testículo izquierdo, mientras que el testículo derecho quedaba inhibido en su crecimiento. Asimismo, determinó que al implantar testículos en hospederos con ovarios embrionarios se detenía el desarrollo de los conductos de Müller.

Más tarde Stoll y colaboradores (1980) implantaron testículos embrionarios de pollo de 312 h.i. en el celoma extraembrionario de embriones de pollo hembra de 72 h.i. Ellos notaron diferentes niveles de reversión sexual, ya que al implantar un sólo testículo, éste podía atrofiar las dos gónadas de la hembra, o bien desarrollar un ovario en la gónada izquierda y un testículo en la gónada derecha. También observaron que al implantar dos testículos se inducía además, de los casos anteriores, un ovotestis en la gónada izquierda y un testículo en la gónada derecha, en el mayor de los casos se inducían dos testículos. Lo anterior llevó a pensar que el testículo jugaba un papel importante produciendo alguna sustancia inhibidora para los ovarios, observación que se confirmó posteriormente con los trabajos de Maraud y colaboradores (1990). Estos autores demostraron que los implantes de testículos en el celoma extraembrionario de embriones de pollo genéticamente hembras de 72 h.i. eran tanto cuantitativa como cualitativamente, el resultado de un efecto inhibidor hacia los componentes de las gónadas indiferenciadas cuando éstas debían desarrollarse en ovarios.

#### *b) Función de la hormona inhibidora de los conductos de Müller*

Se sabe que la Hormona Anti-Mülleriana (HAM) también llamada sustancia inhibidora de los conductos de Müller (Donahoe y col, 1982), es una proteína homodimérica de la

superfamilia de los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (Eusebe y col, 1996). Ésta causa la regresión de los conductos de Müller en la etapa embrionaria de machos genéticos, participa en la morfogénesis de los testículos, e inhibe la actividad de la enzima aromatasa P450, que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Elbrecht y Smith, 1992; Eusebe y col, 1996). Además, su síntesis ocurre en pollos machos y hembras durante la etapa embrionaria y adulta (Hutson y col, 1981). Sin embargo, en la actualidad se desconoce su función en esta última fase.

En 1990, Maraud demostró que la HAM estaba presente en todos los embriones genéticamente hembras que implantaron con testículos embrionarios. Considerando que posiblemente ésta sea el factor responsable de la regresión de los conductos de Müller, así como de las modificaciones producidas a los ovarios.

### *c) Administración exógena de esteroides*

#### *i) Andrógenos*

Un estudio muy completo sobre la administración exógena de esteroides en etapas embrionarias lo realizó Tanabe y colaboradores (1986). Su objetivo fue observar el efecto del 17- $\beta$  estradiol, androsterona y testosterona sobre la diferenciación de los conductos de Müller en embriones de pollo machos y hembras de 120 h.i. y 144 h.i. Observó que el 17- $\beta$  estradiol no produjo efectos en las hembras pero en los machos causó la retención de los conductos de Müller. La androsterona propició una diferenciación anormal y la degeneración de ambos conductos de Müller en las hembras, mientras que en los machos causó la retención del conducto izquierdo e indujo la masculinización de la gónada derecha. Así mismo, la testosterona no alteró el desarrollo de los conductos de los machos, pero en

las hembras causó una degeneración parcial del conducto de Müller izquierdo y algunas de ellas sufrieron masculinización (Tanabe y col, 1986).

### *ii) Estrógenos*

La administración exógena de estrógenos a embriones de pollo machos genéticos de 72 h.i. induce la feminización de las gónadas y del tracto reproductor masculino (MacLaughlin y col, 1983; Smith y col, 1997). El testículo izquierdo se transforma en un ovotestis y el testículo derecho sufre regresión (Faucounau y col, 1995). Asimismo, el empleo de inhibidores de estrógenos impide el desarrollo de ovarios en hembras genéticas (Nakabayashi y col, 1998).

### *iii) Inhibidores de aromatasas*

Uno de los trabajos más relevantes en aves fue el que realizó Elbrecht y Smith (1992) al administrar el inhibidor de la aromatasas P450 (1,4,6-androstatriene-3,17-diona) a embriones hembras genéticas, obteniendo una población 100% masculina fenotípicamente capaz de completar la espermatogénesis. Abinawanto y colaboradores (1996), realizaron experimentos en los cuales inyectaron un inhibidor de aromatasas (fadrozol) a embriones hembra de 120 h.i. resultando el 50% de la población con reversión sexual completa.

### *iv) Hormonas esteroideas*

Los esteroides sexuales además de participar en etapas embrionarias, también juegan un papel importante en la vida adulta propiciando la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios que se asocian con las conductas de reproducción (Sayag y col, 1991). Se ha demostrado que la administración de benzoato de estradiol a embriones machos genéticos de

240 h.i., causa una disminución del tamaño de los testículos e inhibe la conducta de apareamiento durante su madurez. Con lo anterior se demuestra que los esteroides sexuales intervienen en la diferenciación gonadal, pero hasta hoy no se ha logrado esclarecer si estas hormonas son responsables de la diferenciación sexual de la Clase Aves o si son una consecuencia de este proceso.

#### *2.4 Metabolismo de hormonas esteroides gonadales*

Las gónadas masculinas y femeninas de los vertebrados presentan actividad endócrina, además de cumplir su función primordial de producir las células sexuales fundamentales para la perpetuación de las especies. Los esteroides sexuales son los responsables de la maduración de los gametos, así como de la manifestación de los caracteres sexuales secundarios en los individuos (Sayag y col, 1991).

##### *a) Estructura química y nomenclatura*

Las hormonas esteroides son moléculas lipídicas que se caracterizan por presentar un núcleo tetracíclico en su estructura química, al cual se le denomina ciclopentanoperhidrofenantreno que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano). A los tres primeros anillos se les asigna las letras A, B y C y al último la letra D (Gorbman y Bern, 1962).

##### *b) Clasificación química*

La molécula precursora de todos los esteroides es el colesterol (fig. 2), que posee 27 átomos de carbono. Las hormonas esteroideas contienen 21 átomos de carbono como

máximo. La primera etapa de síntesis de hormonas esteroides, es la eliminación del C-6 de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona.

Al separarse los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral forman los pregnanos que presentan 21 átomos de carbono y que incluyen al grupo de las progestinas. Cuando se separan los carbonos 17 y 20 de la cadena lateral originan a los androstanos o esteroides C-19 en donde se ubican los andrógenos. Así también, los estranos o esteroides C-18 se forman por la salida de un grupo metilo unido al carbono 10, en cuyo grupo se incluyen a los estrógenos (Gower, 1988).



# ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SINTESIS DE ESTEROIDES GONADALES

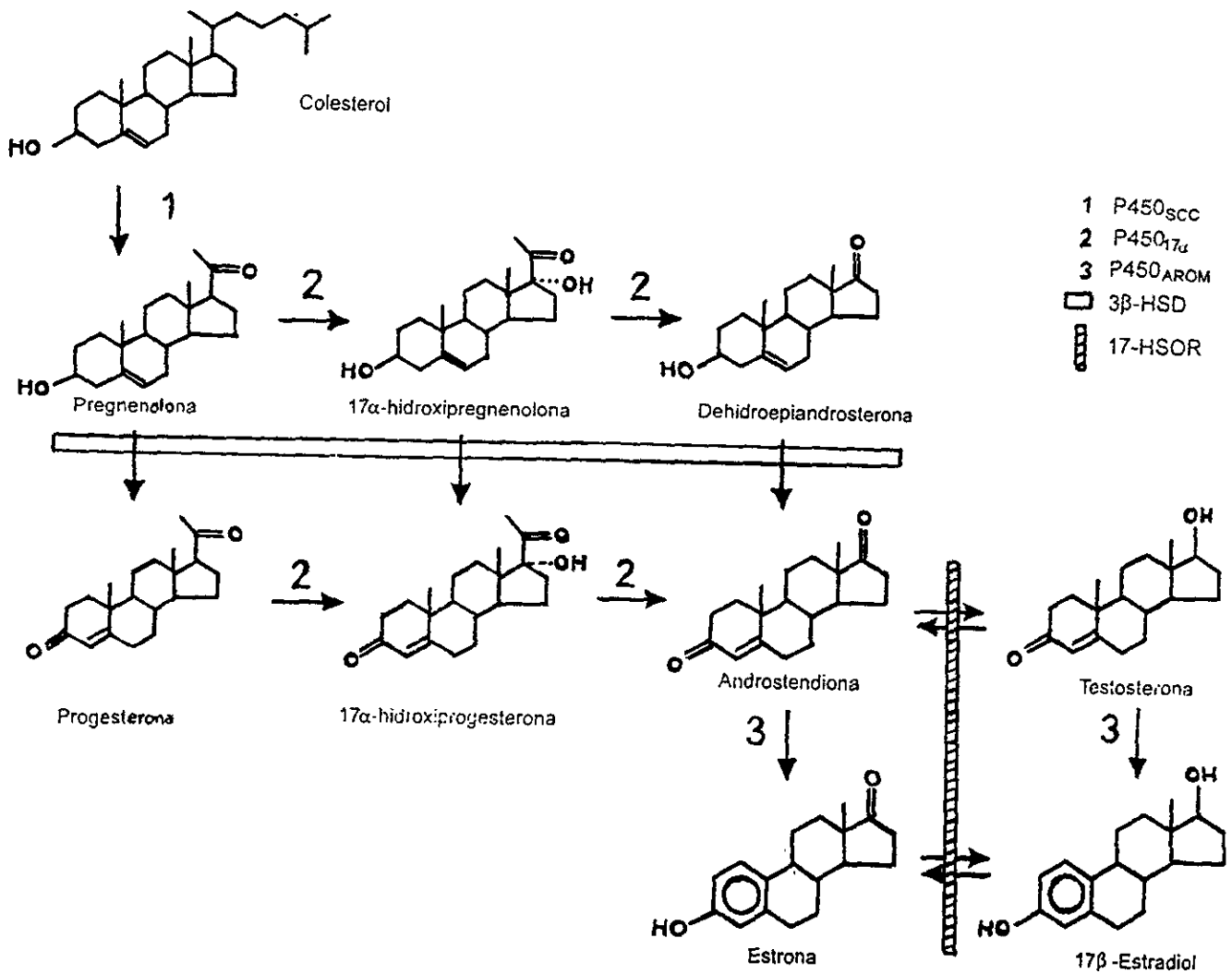


Fig. 2. Rutas metabólicas en la biosíntesis de hormonas esteroideas a partir del colesterol. (Hinshelwood y Demeter-Arlotto. 1993. The Ovary. Raven Press Inc. New York).

### *c) Clasificación biológica*

Las hormonas esteroides gonadales se clasifican en tres grupos: progestinas, andrógenos y estrógenos.

#### *i) Progestinas*

La progesterona es el metabolito producido en mayor cantidad, se sintetiza a partir de pregnenolona (3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona) que es un intermediario de la producción de andrógenos y estrógenos durante la biosíntesis (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

#### *ii) Andrógenos*

Son producidos principalmente por los testículos y en menor cantidad por los ovarios y la corteza suprarrenal. Los andrógenos, como la testosterona, son los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios del macho, ejercen efectos sobre el epitelio germinal de los túbulos del testículo e influyen en la producción de espermatozoides. En el ovario se sintetizan principalmente como intermediarios de la síntesis de estrógenos (Gower, 1988).

#### *iii) Estrógenos*

Son los esteroides sexuales producidos por las hembras de los vertebrados, los más importantes son la estrona y el 17 $\beta$ -estradiol que se sintetizan en el ovario embrionario (Villalpando y col, 2000), así como en el testículo maduro a partir de la aromatización de andrógenos (Gower, 1988). En las aves, su actividad biológica está relacionada con el establecimiento del aparato reproductor femenino y con el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Además, actúan en conjunto con los péptidos liberados por el hipotálamo y las hormonas hipofisarias controlando la conducta reproductiva femenina (Sutherland y col, 1988).

## 2.5 El factor esteroideogénico - 1

La familia de receptores nucleares a hormonas representa a un grupo de factores de transcripción tejido-específicos que modulan las acciones de diversos ligandos incluyendo las hormonas esteroideas (Parker y Schimmer, 1997). El factor esteroideogénico-1 (SF-1) pertenece a esta familia, como en su caso los ligandos no han sido identificados se les llama receptores huérfanos. El SF-1 también llamado Ad4BP (Ad4 binding protein) se identificó inicialmente como un regulador importante de los genes codificantes de las hidroxilasas esteroideas del citocromo P450 (Morohashi y col, 1992; Honda y col, 1993).

### a) Organización del gen

El gen del pollo cSF-1/Ad4BP (fig. 3), consiste de siete exones separados por seis intrones, con una extensión de 15 kb por región (Kudo y Sutou, 1999). La estructura intrón-exón se conserva en las aves, así como en los mamíferos, el empalme entre donadores y aceptores sigue la regla GT-AG; es decir la secuencia de éstos comienza con las bases guanina (G) y timina (T) y termina con adenina (A) y guanina (G) (Mount, 1982).

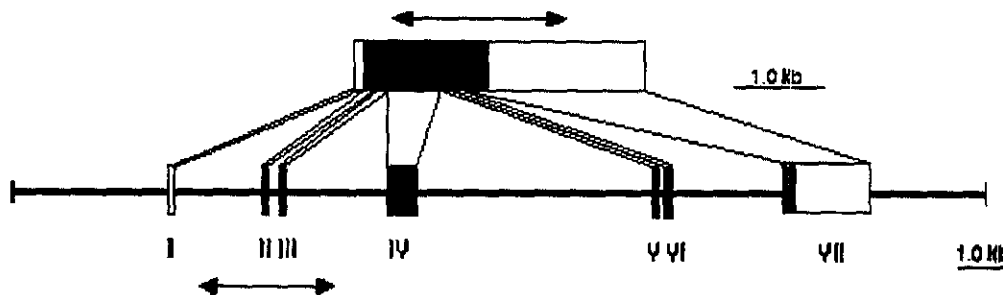


Fig. 3. Organización del gen *cSF-1*. Los rectángulos indican la localización y el tamaño de los siete exones, incluyendo el marco de lectura abierta. Cada exón se encuentra dividido por un intrón.

### *i) Determinación del sitio iniciador de la transcripción*

Kudo y Sutou (1999) clonaron los DNAs del gen SF-1/Ad4BP del pollo para determinar los sitios de inicio de la transcripción en tejidos esteroideogénicos. Encontraron que en los clones analizados de la glándula adrenal, el sitio iniciador de la transcripción se encuentra en la posición -115 (A) del sitio de empalme del exón 1. En el ovario y testículo varía la posición. En el primero, el sitio de inicio se encuentra disperso de G en la posición -117 a G en la posición -109, mientras que en el segundo, la transcripción comienza cerca de la posición -115 (A), en donde se localiza la caja TATA, 25 pb arriba del sitio de inicio. Estos investigadores consideran que el sitio más apropiado para el inicio de la transcripción probablemente se encuentre río arriba (A en la posición -115 del sitio de empalme del exón 1). Aunque en los mamíferos, el gen SF-1/Ad4BP carece de la caja TATA en su región promotora (Nomura y col, 1995).

### *b) Localización tisular*

#### *i) Etapa embrionaria*

En 1994, Ikeda y colaboradores analizaron por hibridación *in situ* con una sonda específica para RNAs del SF-1, el perfil de expresión espacial y temporal durante la diferenciación gonadal en embriones de ratón. Estos autores detectaron los transcritos en la glándula adrenal en estados muy tempranos de desarrollo (E9-9.5) tanto de hembras como de machos genéticos, la expresión continuó durante la gonadogénesis, pero disminuyó considerablemente en los ovarios coincidiendo con el tiempo de la diferenciación sexual, mientras que en los testículos perduró la expresión aún después de su diferenciación.

## *ii) Tejidos adultos*

Mediante análisis de Northern blot se identificó un único transcrito de 3.6 kb expresado en testículos, ovarios y glándulas adrenales de pollos adultos (Kudo and Sutou, 1997).

## *c) Similitudes y diferencias con el gen SF-1 de los mamíferos*

Los DNAC del SF-1 inician en regiones conservadas que corresponden a dominios funcionales conocidos de otros miembros de la familia de receptores nucleares. El SF-1 de aves y mamíferos presenta dos motivos de unión del tipo dedo de zinc que intervienen en la interacción con el DNA. El primer dedo de zinc, incluye la caja proximal (P); en el segundo dedo de zinc se encuentra la caja distal (D) (Parker y Schimmer, 1997). En los receptores a hormonas esteroideas clásicas, la caja P determina la secuencia de reconocimiento a DNA para la mitad de los sitios sensibles a hormonas, mientras que la caja D forma una interfase de dimerización que determina el espaciamiento apropiado de la otra mitad de esos sitios (Umesono y Evans, 1989).

Cada secuencia de SF-1/Ad4BP (tanto en aves como en mamíferos) contiene una caja P, que combina residuos característicos de glucocorticoides y subclases de receptores a estrógenos en los receptores nucleares (Mangelsdorf y col, 1995). Algunos de esos receptores comparten 30 a.a. en la región del carboxilo terminal adyacente al segundo dedo de zinc, designado como FTZ-F1 o caja A, que reconoce las bases adicionales 5' del hexámero AGGTCA. Estos 30 a.a. que comprenden la caja A se conservan en las proteínas del humano, bovino, rata y ratón (Wilson y col, 1992).

Los DNAC para SF-1 de mamíferos tienen homología en las regiones carboxilo-terminal que forman los dominios de unión de los receptores nucleares activados por ligando. En particular, el dominio de transactivación AF-2 que se encuentra en la posición carboxilo-terminal de muchos receptores nucleares inducibles por ligandos forma un  $\alpha$ -

hélice anfipática que aparentemente es esencial para la activación transcripcional (Danielian y col, 1992). Dentro de la región bisagra, se conserva un “alargamiento” de 7 (humano) u 8 (vaca, rata y ratón) prolinas consecutivas que se encuentran dentro del dominio rico en prolinas de aproximadamente 100 a.a. Este dominio ha sido propuesto como el mediador de la activación transcripcional del SF-1 (Honda y col, 1993). Otro motivo conservado dentro de la región carboxilo-terminal del SF-1 es el sitio potencial para la fosforilación por AMPc dependiente de la proteína cinasa (Honda y col, 1993).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diferenciación sexual en los vertebrados ocurre por medio de mecanismos que se inician con la determinación genética. En los mamíferos, los individuos heterogaméticos poseen en el cromosoma Y, el gen Sry responsable de la diferenciación testicular (Koopman y col, 1991; Tiersch y col, 1991). En las aves sucede el caso contrario, las hembras son portadoras del sexo heterogamético (ZW) (Mittwoch, 1971; Clinton, 1998). Se ha observado que el cromosoma W de las aves tiene características similares con el cromosoma Y de los mamíferos. Es casi totalmente heterocromático en todas las células del cuerpo a excepción de las germinales y presenta secuencias de DNA repetidas (Tone y col, 1982; Saitoh y col, 1991). Por lo que se plantea que el proceso determinante de la diferenciación ovárica en las aves pudiera ser regulado por uno o varios genes presentes en el cromosoma W. Sin embargo, este planteamiento permanece hipotético hasta la fecha. En los mamíferos, se ha sugerido que el Sry probablemente induce la expresión del Sox9, un gen que se detecta en la cresta genital de aves y mamíferos y cuyos transcritos permanecen en la gónada diferenciada de los machos y se apaga en las hembras en el caso de las aves (Kent y col, 1996; Morais da Silva y col, 1996). Sin embargo, la relación exacta entre estos genes no se conoce. Se ha planteado que un receptor nuclear huérfano, el SF-1, juega un papel importante en la diferenciación sexual ya que ratones mutantes carentes de este gen no desarrollan tejido gonadal ni glándula adrenal (Luo y col, 1994). Sin embargo, no se ha estudiado el perfil de expresión del SF-1 durante el período crítico de diferenciación sexual en las aves, ni tampoco se ha determinado su función en esta especie, aunque en mamíferos se ha propuesto que regula la expresión de las hidroxilasas (Ikeda y col, 1994). Con base en los antecedentes expuestos se plantea la siguiente hipótesis:

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las hormonas sexuales son las responsables de la diferenciación sexual gonadal y fenotípica en las aves. Este proceso depende de la hormona inhibidora de los conductos de Müller y de la aromatasa P450. De manera que, en la expresión del SF-1 podrían existir diferencias cuantitativas entre los machos y las hembras genéticas debido a su participación en la hidroxilación de la testosterona.

#### **OBJETIVOS**

1. Estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección de los RNAm del factor esteroideogénico - 1 (SF-1) y del gen constitutivo S-ciclofilina (S-CF).
2. Determinar la expresión del SF-1 en etapas tempranas del desarrollo embrionario del pollo *White leghorn* de las siguientes edades: 132 h.i. (26), 144 h.i. (27), 147 h.i. (27/28), 151 h.i. (29), 156 h.i. (29/30) y 168 h.i. (32).
3. Analizar la expresión del gen S-CF, empleándolo como marco de referencia (house keeping gene) durante el periodo crítico de diferenciación gonadal en embriones de pollo de las edades mencionadas, para determinar si existen variaciones cuantitativas reales en la expresión del SF-1.



## V.MATERIAL Y MÉTODOS.

### 5.0 Material biológico

Se utilizaron huevos fértiles de la cepa *White leghorn* procedentes de la granja avícola Aves Libres de Patógenos Específicos (A.L.P.E.S) y se incubaron a 37.7 °C y 80 % de humedad en una incubadora marca James MFG Co. Se emplearon aproximadamente 20 embriones para cada edad analizada. Los tiempos de incubación fueron de 132 h.i. (etapa 26), 144 h.i. (etapa 27), 147 h.i. (etapa 27/28), 151 h.i. (etapa 29), 156 h.i. (etapa 29/30) y 168 h.i. (etapa 32) según Hamburger y Hamilton, (1951), (tabla 1).

Tabla 1. Etapas del desarrollo embrionario del pollo y su equivalencia en horas (h.i.) y días de incubación (d.i.) (Hamburger y Hamilton. 1951).

d.i.	h.i.	Etapas
5.12	132	26
6.0	144	27
6.3	147	27/28
6.7	151	29
6.12	156	29/30
7.0	168	32

#### a) Técnica de ovoscopia

Con esta técnica se determina si el material biológico es viable y así se obtiene un seguimiento confiable del mismo. Ésta consiste en colocar al embrión de pollo en la zona de la cámara de aire en una lámpara a contra luz, en un cuarto oscuro. Si el embrión está vivo y

en desarrollo se observará la irrigación sanguínea que confluirá en el mismo (D.A.T. New, M.A., 1966)

*b) Disección y almacenamiento del tejido somático y gonadal*

A los embriones de pollo de las edades 132 h.i., 144 h.i., 147 h.i., 151 h.i., 156 h.i. y 168 h.i., se les realizó un orificio por la zona de la cámara de aire y se retiró la membrana papirácea, se extrajo al embrión con la ayuda de una cucharilla estéril y se colocó en una caja de petri esterilizada. Se decapitó al embrión, se colocó en una caja de petri en posición lateral y se realizó un corte diagonal para obtener el complejo mesonefros-gónada. Se aisló tejido somático, es decir, no gonadal en un tubo eppendorf tratado con H<sub>2</sub>O-Dietilpirocarbonato (DEPC) (ver apéndice) para la determinación del sexo genético. La separación de las gónadas se realizó bajo un microscopio estereoscópico Fisher Scientific modelo SCW-40L, se pusieron en medio MEM (minimal essential medium) de Gibco BRL y se enjuagaron con NaCl al 0.9%. El tejido gonadal se puso en un tubo Eppendorf estéril tratado con H<sub>2</sub>O-DEPC y se almacenó a -20° C en un congelador Puffer Hubbard, hasta que se utilizó para la extracción de RNA total.

*c) Determinación del sexo cromosomal*

El sexo de los embriones se determinó utilizando la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). El principio en que se basa la PCR es la amplificación enzimática de fragmentos de DNA flanqueados por un par de oligonucleótidos sintéticos (a manera de cebadores) que hibridan con hebras opuestas de la secuencia seleccionada. Una serie de ciclos repetidos de desnaturalización térmica del templado (94 °C), acoplamiento de los oligonucleótidos a su secuencia complementaria (65 °C) y extensión de los mismos con una DNA polimerasa (72 °C) resultan en la amplificación de un segmento de DNA con un

tamaño definido por la distancia entre los extremos 5' de los oligonucleótidos. Debido a que los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como moldes en el siguiente, el número de copias de la secuencia deseada se duplica en cada ciclo (Erich y col, 1991).

En este caso se detectó la presencia del cromosoma W, presente sólo en las hembras (ZW) y ausente en los machos (ZZ) (Mittwoch, 1971). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados por Clinton (1994) para sexar aves es la siguiente:

W1 5' CCCAAATATAACACGCTTCACT 3'

W2 3' GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC 5'

Estos oligonucleótidos sintéticos fueron elaborados por GIBCO BRL y delimitan un fragmento de 500 pares de bases aproximadamente.

La técnica de sexado se realizó en dos etapas:

*i) Aislamiento de DNA*

Al tejido somático aislado previamente se le añadió 100 µl de amortiguador SET (ver apéndice) y se homogenó con un pistilo de teflón marca Wheaton y un homogenador marca Tri-R Instruments, modelo S63C. Posteriormente se agregaron: 5 µl de SDS al 10% y 0.5 µl de proteinasa K (10 mg/ml), se agitó en un vortex (Lab Line Instruments modelo 1119) y se incubó a 60 °C durante dos horas en un termomixer (Brinkmann Instruments modelo 5436). Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, en una microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415 C). Se tomaron 10 µl del sobrenadante y se llevaron a un volumen de 100 µl con agua estéril.

## *ii) Amplificación del cromosoma W*

Se preparó una mezcla maestra que contenía 0.2  $\mu$ l de cada oligonucleótido sintético (W1 y W2) (40 pmol/ $\mu$ l), 0.2  $\mu$ l de cada nucleótido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Perkin Elmer Cetus), 1.0  $\mu$ l de buffer MgCl<sub>2</sub> 10X, 0.1  $\mu$ l de Amplitaq polimerasa (5U/ $\mu$ l) (Perkin Elmer Cetus) y 6.7  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC. Del DNA obtenido se tomó 1  $\mu$ l y se desnaturalizó a 94 °C 5 min en un termociclador (Perkin Elmer Cetus modelo 9600). Se agregaron los 9  $\mu$ l de la mezcla maestra para tener un volumen final de 10  $\mu$ l. Se incubó en el termociclador con el programa que comprende las siguientes temperaturas:

94 °C - 30 seg

60 °C - 30 seg      20 ciclos

72 °C - 30 seg

94 °C - 30 seg

60 °C - 30 seg      1 ciclo

72 °C - 5 min

Como control se utilizó DNA de hígado de hembra (control positivo) e hígado de macho (control negativo) de 15 días de incubación.

## *d) Aislamiento del RNA total*

Se empleó la técnica reportada por Chomczynski y Sacchi (1987) para aislar el RNA total de las gónadas de pollo de las siguientes edades: 132 h.i. (etapa 26), 144 h.i. (etapa 27), 147 h.i. (etapa 27/28), 151 h.i. (etapa 29), 156 h.i. (etapa 29/30) y 168 h.i. (etapa 32).

El tejido previamente disecado 24 horas antes se descongeló a 4 °C. Se les añadieron 100 µl de solución D por gónada, que se preparó a partir de la solución stock de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, pH 7.0; sarcosyl al 0.5% y β-mercaptoetanol 0.1 M) y se homogenó (homogenador marca Tri-R Instruments, modelo S63 C) con un pistilo de punta de teflón (Weathon). Posteriormente se agregaron 10 µl por gónada de acetato de Na 2M pH 4.0, 100 µl por gónada de fenol saturado con agua (ver apéndice) y 20 µl por gónada de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), agitando la mezcla 10 segundos en el vortex después de agregar cada solución.

Las muestras se dejaron en hielo 15 min y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C, en una microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415C). Se transfirió la fase acuosa a tubos Eppendorf nuevos tratados con H<sub>2</sub>O-DEPC y se agregó un volumen igual de isopropanol, mezclando por inversión durante 10 seg. El RNA total se precipitó en hielo seco 10 min y se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se decantó la fase acuosa en una gasa estéril y se resuspendió el precipitado en 30 µl de solución D, se agregó un volumen igual de isopropanol y se precipitó en hielo seco 10 min para centrifugar a 14000 rpm a 4 °C por 20 min. Los tubos se decantaron en una gasa estéril para eliminar el isopropanol; posteriormente las muestras se lavaron tres veces de la siguiente manera: se agregaron 100 µl de etanol al 75% por gónada, se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante en una gasa estéril.

Finalmente se colocaron los tubos en un desecador durante 1 hora a 4 °C, se resuspendieron en 1.5 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC y se almacenaron a -20 °C por un período máximo de dos días.

*e) Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa*

*i) Oligonucleótidos sintéticos*

Los reactivos utilizados en esta técnica fueron obtenidos de Perkin Elmer Cetus y los oligonucleótidos sintéticos fueron elaborados por GIBCO BRL. Los oligonucleótidos se diseñaron con base en la secuencia publicada de DNAC de pollo para SF-1 (Kudo and Sutou, 1997). Como control se utilizó el gen de la S-CF que se expresa constitutivamente. Esta es una proteína citosólica abundante, ubicua, chaperona y acarreadora de esteroides que se ha conservado a través de la escala evolutiva desde las bacterias hasta el hombre y cuya expresión es más abundante en tejidos embrionarios que en tejidos adultos (Caroni y col, 1991). Los oligonucleótidos para S-CF se diseñaron a partir de DNAC de pollo, reportado por Caroni y col (1991). En general, se procuró que tuvieran las siguientes características:

- Tamaño aproximado de 18 bases
- Contenido de G,C 50-60%
- Presencia de C,G en el extremo 3'

Las secuencias 5' --- 3' de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

SF-1 5' AAGTTTGGGCCCATGTAC 3' (sentido)

SF-1 3' TTCACATCGAGGCTGAAG 5' (antisentido)

que delimitan un fragmento de 881 pares de bases.

S-CF 5' CGCAGTAGTTCCTGAAGT 3'

S-CF 3' ACCACGGCGTCAGTCGTT 5'

que delimitan un fragmento de 330 pares de bases.

Los ensayos de RT-PCR se realizaron por triplicado para cada edad y sexo, tanto para SF-1 como de la S-CF.

### *ii) Obtención del DNA complementario*

Se preparó una mezcla maestra con 2  $\mu\text{l}$  de solución  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{l}$  de amortiguador II 10X para PCR, 1  $\mu\text{l}$  de cada nucleótido (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.5  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAsas, 0.5  $\mu\text{l}$  de hexámeros y 1.5  $\mu\text{l}$  de la muestra de RNA total previamente desnaturalizado en el termociclador 5 min a 94 °C. Por separado se agregaron 0.5  $\mu\text{l}$  de la enzima transcriptasa reversa en cada una de las muestras experimentales y 0.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC en la muestra control. El volumen final de la reacción fue de 10  $\mu\text{l}$ . Se incubó utilizando un ciclo con las siguientes temperaturas:

25 °C    10 min

42 °C    60 min

99 °C    5 min

### *iii) Amplificación del RNA mensajero*

A cada muestra de DNAc se le agregaron 2  $\mu\text{l}$  de solución  $\text{MgCl}_2$ , 4  $\mu\text{l}$  del amortiguador II 10X para PCR, 31.75  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC, 0.25  $\mu\text{l}$  de la enzima Amplitaq polimerasa y 1  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido sintético SF-1 ó S-CF. Se incubó en el termociclador con el siguiente programa:

94 °C    2 min

55 °C    15 seg        1 ciclo

72 °C    30 seg

94 °C    15 seg

55 °C    15 seg        33 ciclos

72 °C    30 seg

94 °C 15 seg

55 °C 15 seg 1 ciclo

72 °C 10 min

Los productos se almacenaron a -20 °C.

#### *f) Electroforesis del gen amplificado*

Se preparó un gel de agarosa al 2% con amortiguador TBE 1X pH 8.2 (ver apéndice). Se utilizó un marcador de bajo peso molecular (Low DNA Mass Ladder GIBCO BRL) del cual se colocaron 2.5 µl por gel. De cada producto amplificado se tomaron 5 µl, se mezclaron con 4 µl de amortiguador de carga (ver apéndice) y se colocaron individualmente en los pozos del gel. Se aplicaron 100 volts durante 1 hora a temperatura ambiente. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.8% en agua destilada, durante 10 minutos; se enjuagó con agua destilada y se visualizó en un transiluminador de luz U.V. (Sigma modelo T1202).

#### *g) Fotografías*

Cada gel fue fotografiado con una cámara Polaroid Gelcam modelo PHC 34 Hoefer Scientific Instruments, se usó una película instantánea en blanco y negro Polaroid Polapan 667 ISO 3000/36° (8.5 x 10.8 cm), el tiempo de revelado fue de 90 seg.



## VI. RESULTADOS

### 6.0 Determinación del sexo genético.

En cada uno de los embriones se determinó el sexo cromosómico con base a la presencia o ausencia del DNAc del cromosoma W, ya que éste se encuentra solamente en los embriones de sexo femenino (ZW), mientras que los machos por ser el sexo homogamético (ZZ) no lo expresan. La figura 4 muestra las bandas correspondientes a la presencia del cromosoma W.

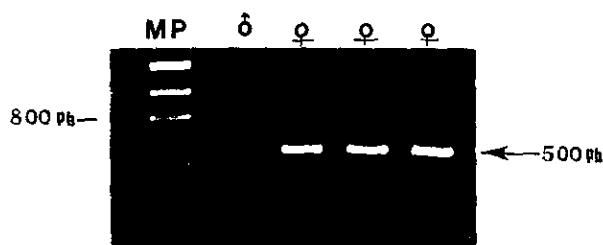


Fig. 4. Se muestran las pares de bases en el lado izquierdo. Se observa la banda de 500 pb correspondiente al fragmento amplificado del Cromosoma W. Como control negativo se utilizó hígado de macho de 15 d.i. (**carril 1**), note la ausencia de la banda amplificada en estos. El control positivo corresponde a hígado de hembra de la misma edad (**carril 2**). Los **carriles 3 y 4** corresponden a hembras de 6.0 d.i.

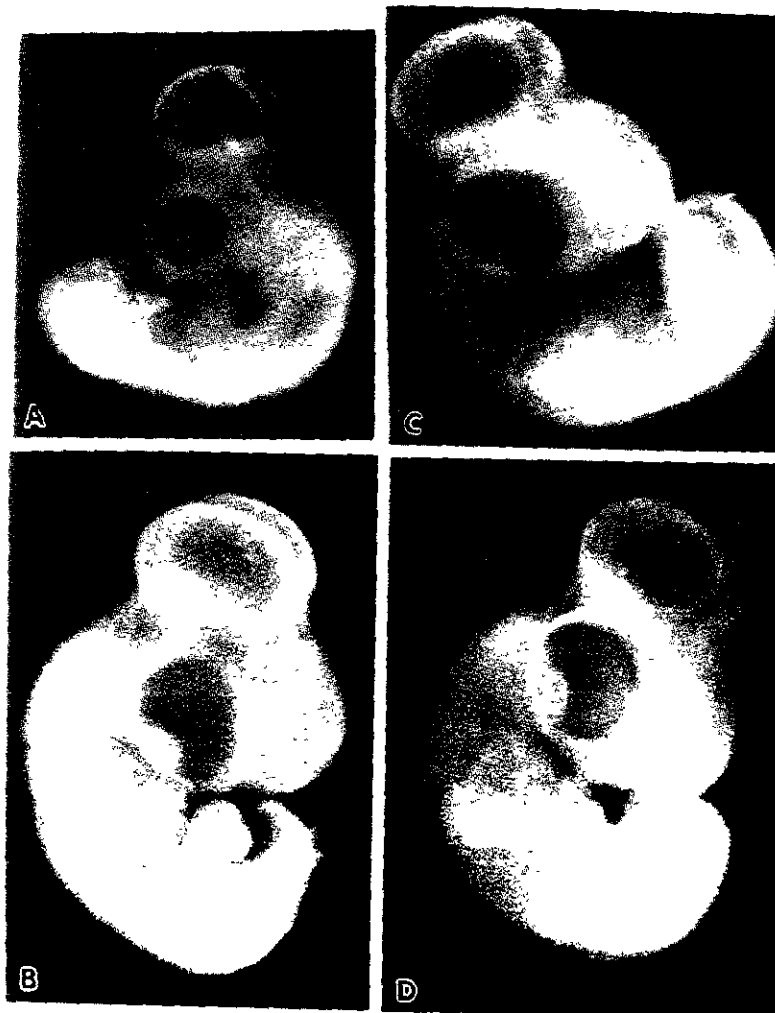


Fig. 5. Etapas empleadas del desarrollo embrionario del pollo (A): Se muestra un embrión de 5.5 d.i. (etapa 26), se distinguen los primordios de los miembros anteriores y posteriores en forma de U. (B): Embrión de 6.0 d.i. (etapa 27), los primordios se observan más definidos y de mayor tamaño. (C y D): Embriones de 6.12 d.i. (etapa 30) y 7.0 d.i. (etapa 32) respectivamente, se distinguen los dígitos en las extremidades posteriores. Todos los embriones fueron fijados en solución de Bouin's.

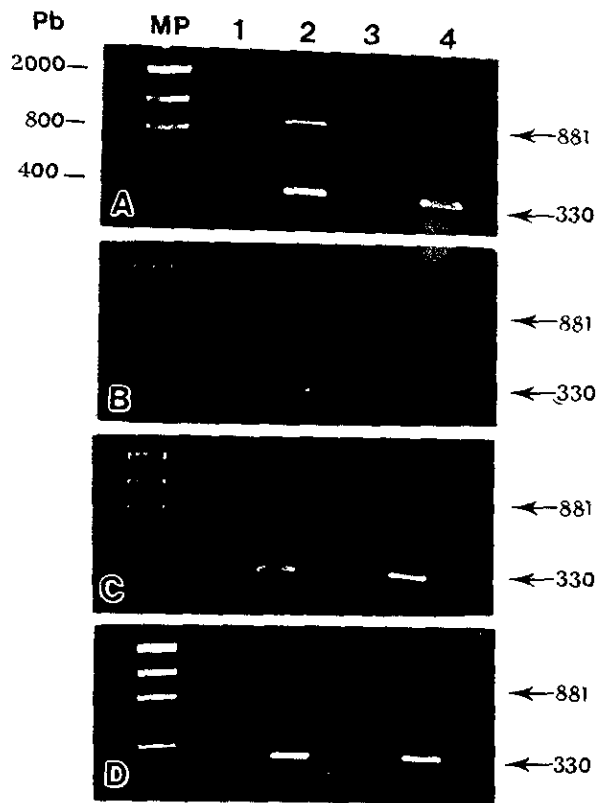
## *6.1 Ontogenia del RNA mensajero del cSF-1 y expresión de la S-CF en el pollo.*

### *a) Ovario*

La expresión del cSF-1 se detectó a partir de las 132 h.i. (etapa 26) hasta las 168 h.i. (etapa 32), tanto en la gónada izquierda como en la gónada derecha. Estos resultados se analizaron por densitometría y se pueden observar en las tablas 2 y 3.

El mensajero de SF-1 se detecta desde la primera edad estudiada (etapa 26) (5.12 d.i.), en donde la expresión es mayor en la gónada izquierda que en la derecha. Desde la etapa (27) (6.0 d.i.) hasta la etapa (30) 6.12 d.i.), la expresión se ve disminuida en ambos ovarios, manteniéndose la mayor intensidad del transcrito en la gónada izquierda. En la etapa (32) (7.0 d.i.) la expresión en ambas gónadas se incrementa notablemente siendo muy similar en los dos ovarios y a la observada inicialmente (fig 6).

Figura 6. Detección del RNAm del cSF-1. MP: marcador de pares de bases. **(A)**: Se distingue que la banda correspondiente al ovario izquierdo (carril 2) (881 pb), es más intensa que la del ovario derecho (carril 4) a las 132 h.i. (etapa 26). A partir de las 144 h.i. **(B)** hasta las 156 h.i. **(C)** se observa una disminución en la detección del transcrito de cSF-1 tanto en la gónada izquierda como en la gónada derecha. Finalmente, a las 168 h.i. (etapa 32) la detección del mensajero de cSF-1 se incrementa notablemente en ambas gónadas **(D)**. Los carriles 1 y 3 **(A-D)** son los controles sin la enzima RT. Se puede observar que la S-CF (330 pb) se expresa constitutivamente en ambas gónadas desde la primera edad (5.12 d.i.) hasta la última edad evaluada (7.0 d.i.).



*b) Testículo*

La detección del mensajero de cSF-1 se observa en ambos testículos desde la primera etapa (26) hasta la última estudiada (32) (fig. 7). Se distingue que la expresión en la gónada izquierda es mayor que la expresión de la gónada derecha en todas las edades analizadas. Sin embargo, en ambas gónadas, la detección del transcrito de cSF-1 va disminuyendo conforme avanza el tiempo de desarrollo, hasta casi no detectarse la del testículo derecho en las etapas 30 y 32. Estos resultados se analizaron por densitometría y se pueden observar en las tablas 4 y 5.

## 6.2 Análisis de los RNA mensajeros por densitometría

Se realizó en un densitómetro con el programa Ambis Radio Analytic Image System Inc., (San Diego, CA). En este programa, los resultados se expresan como unidades arbitrarias de la relación entre la expresión de los dos RNA mensajeros (cSF-1 y S-CF). Los valores obtenidos para el ovario se muestran en las tablas 2 y 3 y, para el testículo en las tablas 4 y 5.

Tabla 2. Cuantificación del RNAm del SF-1 del embrión de pollo hembra por densitometría

Sexo	Etapas de desarrollo					
Femenino	(26)	(27)	(27/28)	(29)	(29/30)	(32)
o.i	669.1	145.6	167.4	98.4	77.8	548.5
o.d	211.1	114.9	66.4	22.7	20.5	368.5

o.i: ovario izquierdo

o.d: ovario derecho

La tabla 2 muestra que la expresión más alta del SF-1 del embrión de pollo es en la gónada izquierda de las hembras en la etapa 26 (132 h.i.), y el valor de la expresión disminuye en las etapas 27-30 (144-156 h.i.). En la etapa 32 (168 h.i.), se observa un incremento en la expresión de este gen, similar a la primera edad evaluada. En la gónada derecha los valores de la expresión del cSF-1 son menores con respecto a la gónada izquierda, no obstante se mantiene el mismo patrón de expresión que en la izquierda.

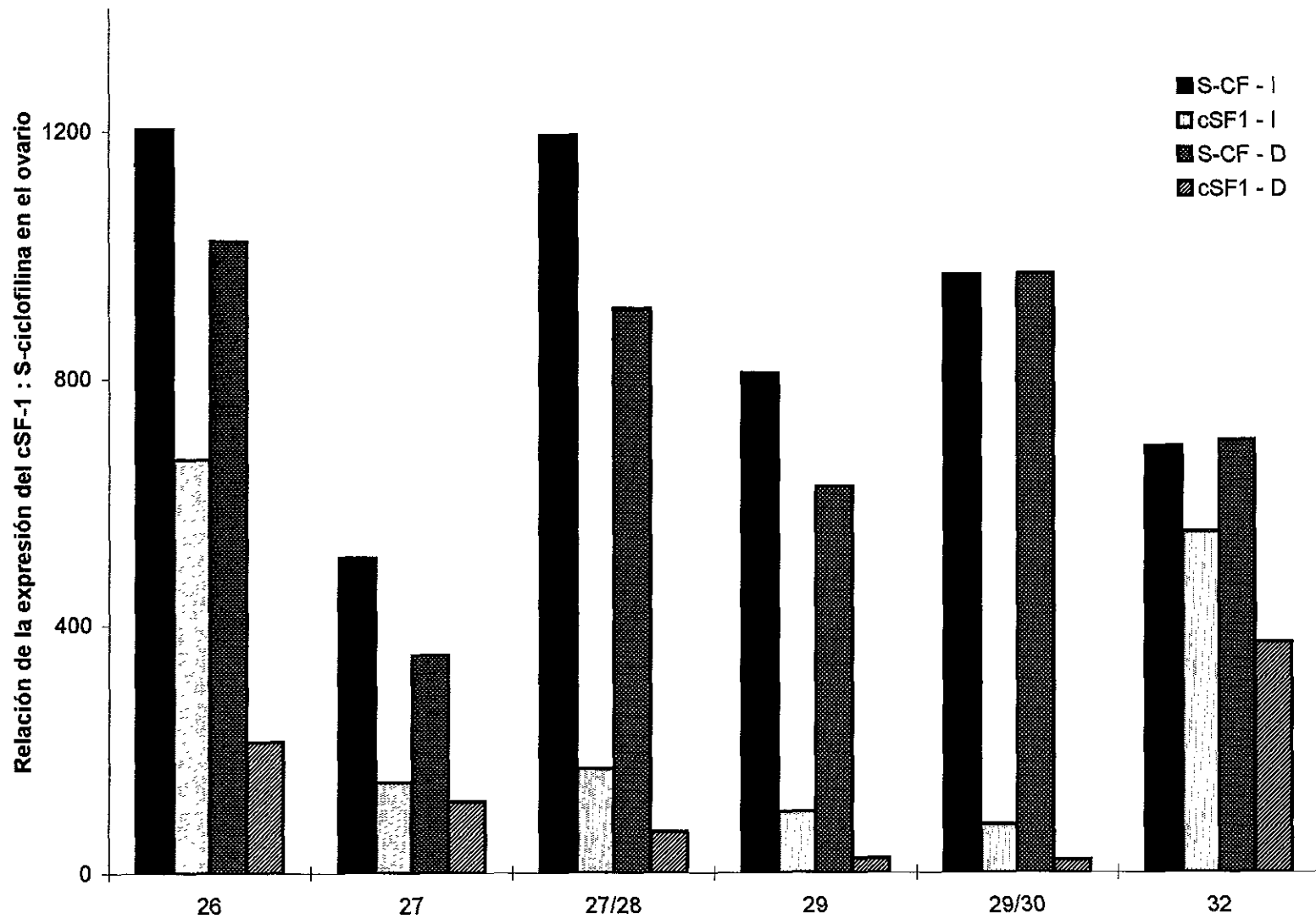


Tabla 3. Se muestra la expresión de S-CF y cSF-1 en gónadas embrionarias de pollo hembra durante las horas de incubación estudiadas. S-CF: S-ciclofilina; cSF-1: factor esteroideogénico - 1; I: Izquierda; D: Derecha



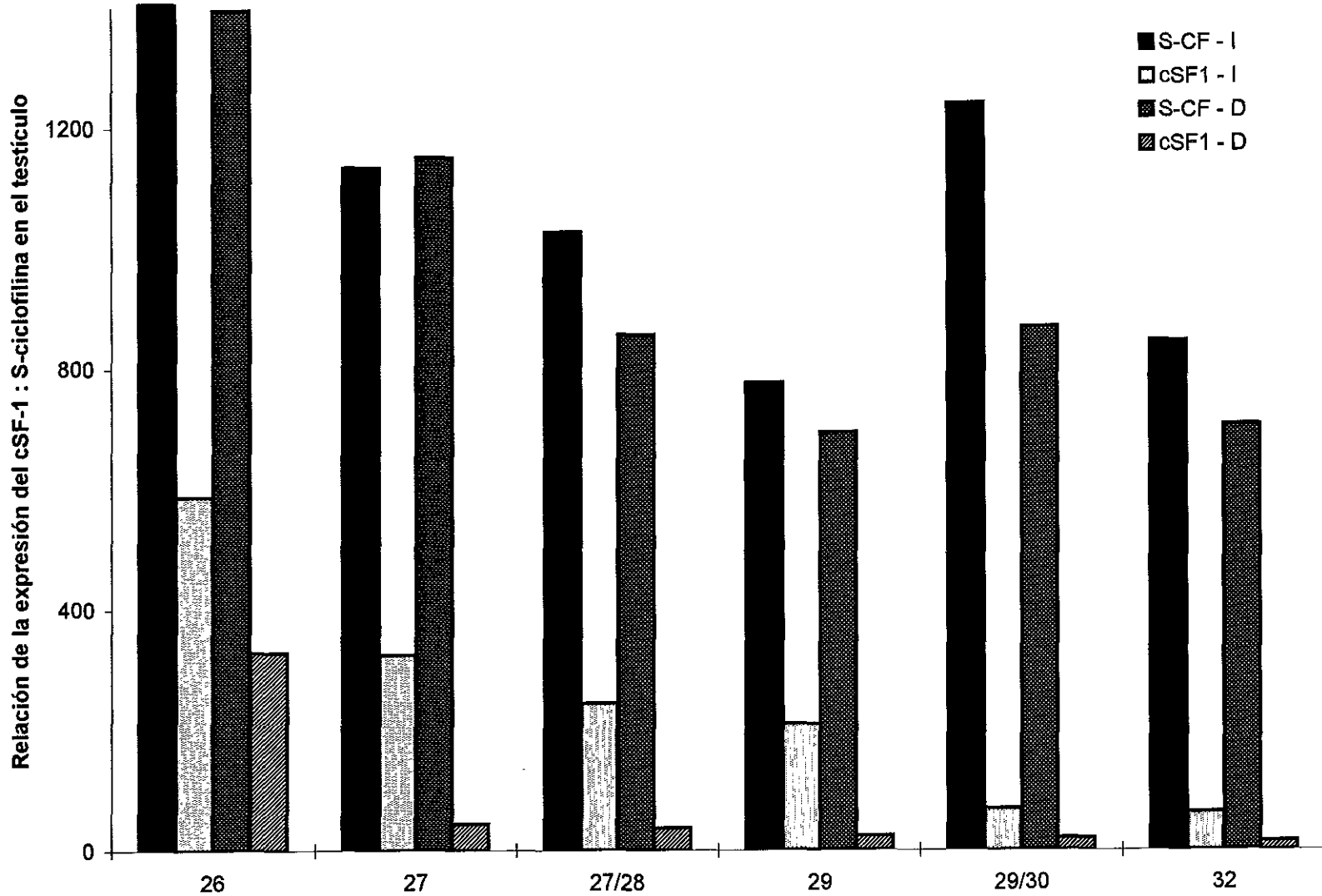


Tabla 5. Se muestra la expresión de S-CF y cSF-1 en gónadas embrionarias de pollo macho durante las horas de incubación estudiadas. S-CF: S-ciclofilina; cSF-1: factor esteroideogénico - 1; I: Izquierda; D: Derecha

## VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación se estudió la expresión del RNAm del SF-1 en las gónadas embrionarias de pollo, tanto de machos como de hembras genéticas en diferentes etapas de desarrollo (26-32) durante el periodo crítico de diferenciación sexual gonadal.

En nuestros estudios se observó que el RNAm del cSF-1 se detectó a partir de las 132 h.i. (etapa 26) tanto en machos como en hembras, donde la expresión es mayor en la gónada izquierda y menor en la gónada derecha en ambos sexos. Detectamos que en el caso de las hembras, la expresión del cSF-1 en las etapas 28-30 disminuye de 6 a 7 veces con respecto a la etapa inicial, y en la etapa 32 aumenta considerablemente en ambas gónadas a niveles similares a los determinados en la etapa 26. Estos datos están en desacuerdo con las investigaciones de Smith y colaboradores (1999) quienes detectaron una disminución del cSF-1 en el caso de las hembras a partir de las 132 h.i. (etapa 28) en adelante, ya que nosotros la detectamos desde la etapa 27. Asimismo, a los 6.5 d.i. (etapa 30), encontramos una disminución del RNAm en ambas gónadas de hembras y machos, en donde la expresión del transcrito para el cSF-1 es similar en ambos sexos a esta edad. Smith y col, (1999), también detectan el mensajero del cSF-1 en machos y hembras, mostrando que la expresión es mayor en los primeros y casi no se distingue en las segundas, contrario a lo observado por nuestro grupo. En la última etapa 32 (168 h.i.) observamos un incremento nuevamente en la expresión del mensajero del cSF-1 en ambas gónadas de la hembra; datos que coinciden con el trabajo de Smith y col, (1999), ya que este grupo observó que la expresión aumenta considerablemente en las hembras a partir de la etapa 32 a la 40. Sin embargo, nosotros no estudiamos estas etapas. En los embriones machos, detectamos que la expresión del mensajero del SF-1 en ambos testículos disminuye conforme avanza el periodo de incubación, hasta casi no detectarse en la última etapa estudiada (32) (168 h.i.). Smith y

colaboradores (1999), también distinguen que en los machos la expresión inicial es alta en las etapas 28-32, sin embargo, después hay una caída en la expresión del RNAm del cSF-1 en las etapas (35-40). La posible discrepancia entre nuestras observaciones y las de Smith y col, (1999), podría deberse a un problema en la cantidad de templado que emplearon para hacer la RT-PCR. En nuestras investigaciones nosotros estudiamos simultáneamente la expresión de un gen constitutivo, la S-CF (house keeping gene), para tener un control sobre la variación en la expresión del cSF-1, mientras que Smith y col, (1999) emplearon otro gen, la  $\beta$ -actina, el cual analizaron separadamente, de tal forma que no se puede comparar la expresión real del SF-1. Corroboramos que el inicio de la expresión del cSF-1 es a los 5.5 d.i. (etapa 26), esta expresión temprana sugiere que el factor probablemente tiene otra función, como la de participar en la secreción de catecolaminas, además, de participar en la diferenciación sexual gonadal, la cual ocurre en nuestras condiciones a los 7.0 d.i. (etapa 32). Una observación interesante en la Clase Aves es que el perfil de expresión del cSF-1 no se conserva después de la diferenciación sexual gonadal, ya que se mantiene constante en el ovario comparado con los testículos. Lo opuesto sucede en mamíferos, ya que la expresión del cSF-1 es mayor en los testículos con respecto a los ovarios (Parker y Schimmer, 1997).

Los altos niveles en la expresión del cSF-1 observados en nuestro trabajo en la etapa 32, sugieren que las hembras requieren de una mayor expresión de este factor para estimular la actividad enzimática de la  $17\alpha$ -hidroxilasa, la cual cataliza la reacción de síntesis de andrógenos que originan a los estrógenos (Guichard y col, 1979). En el caso de las aves el ovario es esteroideogénicamente más activo que el testículo (Elbrecht y Smith, 1992; Yoshida y col, 1996), mientras que en los mamíferos se presenta el caso inverso, en un estadio temprano del desarrollo (Jost, 1970). El papel concreto del cSF-1 durante la formación de la gónada del embrión de pollo no es claro, ya que en general, nosotros detectamos que la

expresión del factor se observa en ambos sexos, disminuyendo a lo largo de las edades estudiadas. Una investigación sobre la delección en el gen codificante del SF-1 en el ratón, indica que éste es esencial para el desarrollo de las glándulas adrenales y de las gónadas (Luo y col, 1994). No obstante, en los embriones de pollo no se sabe si tiene la misma función, porque los transcritos se detectan desde un estadio temprano de desarrollo gonadal (132 h.i.) etapa (26) como se mencionó anteriormente. Sin embargo, habría que considerar las diferencias cuantitativas, así como la presencia de otros factores que intervengan en el desarrollo gonadal, por lo que se requiere la realización de otros estudios para esclarecer dichas posibilidades.

En los mamíferos, el gen SRY ligado al cromosoma Y actúa como un dominante en la determinación del sexo masculino, iniciando la diferenciación testicular de la gónada bipotencial (Sinclair y col, 1990, Koopman y col, 1991). En ausencia del SRY, el desarrollo de la gónada indiferenciada será hacia un ovario, mientras que en las aves, éste gen se expresa tanto en machos como en hembras adultos (Tiersch y col, 1991). En la actualidad aún no se ha esclarecido si existe un gen maestro determinante del testículo u ovario en las aves. Sin embargo, el SF-1 es uno de los componentes de la cascada de desarrollo participantes en la diferenciación gonadal en los mamíferos, y este gen está filogenéticamente conservado durante el desarrollo gonadal de los vertebrados. Aunque se observa que el patrón de expresión del SF-1 es diferente entre las aves y mamíferos, esta diferencia específica de especie pudiera reflejar las diferentes capacidades esteroidogénicas durante el desarrollo del ovario y del testículo en las dos especies.

Otros estudios realizados en etapas tempranas de desarrollo involucran a la HAM (Eusebe y col, 1996), la  $17\alpha$ -hidroxilasa (Yoshida y col, 1996) y aromatasa (Smith y col, 1997; Villalpando y col, 2000) como genes que se expresan más tardíamente durante el

desarrollo. De tal forma que la expresión de SF-1 puede estar relacionada con el sexo que es más activo esteroideogénicamente (ovario en las aves, testículo en los mamíferos), aunque aún queda por determinar su función en la Clase Aves. Los patrones de expresión de cSF-1 y de la aromatasa son similares, ambos se expresan en los cordones medulares del ovario en desarrollo. Además, ambos genes muestran una regulación de la expresión al mismo tiempo entre los días 6 y 7 de la embriogénesis (Yoshida y col, 1996). En estudios previos se identificó un sitio de unión putativo para el SF-1 en la región promotora del gen de la aromatasa del pollo (Kudo y col, 1996). Así mismo, se ha planteado que el SF-1, además, podría activar la expresión de las aromatasas como parte del camino determinante de la diferenciación sexual del ovario en las aves. Probablemente este factor no actúe solo, ya que su expresión la detectamos a partir del 5.5 d.i., etapa 26 y los transcritos de la aromatasa se observan a los 6.3 d.i. (Villalpando y col, 2000), esto implica que otros factores podrían estar involucrados en la activación de la expresión del gen de la aromatasa, juntos o independientes al SF-1.

En las aves, el conducto de Müller derecho e izquierdo producen HAM, sin embargo, se ha propuesto que la temprana producción de estrógenos protege al ovario y oviducto izquierdo de involucionar, mientras que el ovario y oviducto derecho sufren regresión (Teng, 1987). En el día 5 de la embriogénesis en ambos sexos expresan el gen de la HAM, pero los niveles más altos se detectan en los machos en el sexto día de incubación (Oreal y col, 1998). El SF-1 podría activar la expresión de la HAM en las gónadas embrionarias del pollo, como es el caso de los mamíferos, pero la marcada elevación de la expresión de la HAM en machos desde el día 5.5 (etapa 27) es contrastante con los niveles de expresión de cSF-1 (Shen y col, 1994). Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que los niveles de expresión del cSF-1 en embriones machos podrían ser suficientes para estimular la

síntesis de la HAM, o bien, que sólo se requiera de este factor para la activación, pero no para la regulación de la expresión de esta hormona. La temprana detección de transcritos del cSF-1 a las 132 h.i. (etapa 26) en los embriones de pollo, plantea que este factor además de participar o controlar la expresión de las enzimas que intervienen en el metabolismo de esteroides, podría activar otros genes críticos que conlleven a la diferenciación sexual gonadal. Consideramos que es necesario realizar más estudios para determinar el papel del cSF-1 durante el desarrollo gonadal de las aves en la fase embrionaria.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó la técnica de RT-PCR para el análisis del RNAm del cSF-1.
2. Se estandarizó la técnica de RT-PCR para la detección del RNAm de la S-CF.
3. El cSF-1 se expresa antes de la diferenciación sexual de la gónada en hembras y en machos.
4. Este gen (SF-1) tiene un patrón diferencial de expresión entre hembras y machos (mayor en el sexo femenino) que se asocia a la etapa crítica de la diferenciación sexual gonadal.
5. Existe una asimetría en la expresión del cSF-1 entre la gónada izquierda y la gónada derecha tanto de machos como de hembras.

## IX. APÉNDICE

### AGUA TRATADA CON DEPC

Se coloca un litro de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 1000 ml. Se agita el contenido con una barra magnética y se agrega 1 ml de DEPC. Se mantiene la solución en agitación hasta que el DEPC este completamente disuelto en el agua. Se cubre el recipiente con papel aluminio y se esteriliza a una presión de 15 libras durante 40 minutos, dos veces.

### AMORTIGUADOR DE CARGA

Para preparar 10 ml se agregan: 0.2 ml de amortiguador TBE 5X, 10  $\mu$ l de SDS al 20% y 1 g de Ficoll 400 al 10%. Por otro lado, se prepara una mezcla de azul de bromofenol al 0.05% y verde de xilencianol al 0.05%. Se agrega 1 ml de la mezcla de colorantes al amortiguador de carga. Todo se almacena a 4 ° C.

### AMORTIGUADOR TBE 1X

A 1000 ml de agua bidestilada en agitación se le agregan: 10.8 g de TRIS, 5.5 g de ácido bórico y 0.93 g de EDTA. Se ajusta el pH a 8.2 y se almacena en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

### AMORTIGUADOR SET

Para preparar 10 ml de esta solución se agregan: 0.2 ml de TRIS 0.5 M pH=8.0, 1 ml de EDTA 0.5 M pH= 8.0 y 8.8 ml de agua bidestilada estéril. Se almacena a temperatura ambiente.



## FENOL SATURADO CON AGUA

Los cristales de fenol se tienen que mantener almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cuando se utilicen se dejan estabilizar a temperatura ambiente. Posteriormente, bajo la campana de extracción se funden los cristales en baño de María. Se coloca una barra magnética estéril dentro del frasco con fenol y se añaden 100 ml de agua tratada con DEPC, se deja saturar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 horas. Se retira el agua con una pipeta pasteur estéril, utilizando un sistema de vacío. Se añaden 0.1 g de hidroxiquinoleína y se agregan 100 ml de agua tratada con DEPC. Se agita la solución 30 minutos y se almacena a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 horas. Se retira el agua con la pipeta Pasteur estéril utilizando el sistema de vacío. Por último, se añaden 200  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol marca GIBCO BRL y 100 ml de agua tratada con DEPC, se agita 30 minutos y se almacena cubierto con papel aluminio a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## SOLUCIÓN “D”

En un frasco estéril tratado con DEPC, se añaden 5 ml de solución de tiocianato de guanidina y se agregan 36  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se almacena cubierto a temperatura ambiente. Nota: el tiempo máximo de almacenamiento de esta solución es de 1 mes.

## X. BIBLIOGRAFIA

- Abinawanto, Shimada K, Yoshida K and Saito N. 1996. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17 alpha) and P450 arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen Comp Endocrinol* 102(2): 241-246.
- Ando Y and Fujimoto T. 1983. Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. *Dev Growth Differ* 25: 345-352.
- Carlson N and Stahl A. 1985. Origin of the somatic components in the chick embryonic gonads. *Archiv Anat Microsc Morphol Exper* 74: 52-59.
- Caroni P, Rothenfluh A, McGlynn E and Schneider C. 1991. S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J Biol Chem* 266(17): 10739-10742.
- Clinton M. 1994. A rapid protocol for sexing chick embryos (*Gallus g. domesticus*). *Anim Genet* 25(5): 361-362.
- Clinton M. 1998. Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J Exp Zool* 281(5): 457-465.
- Chomczynsky P and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium - thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Danielian PS, White R, Less JA and Parker MG. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11(3): 1025-1033.
- DAT. New MA. 1966. The chick. In: The culture of vertebrate embryos. pp 55 Acad. Press.
- Donahoe PK, Budzik GP, Trelstad R, Mudgett-Hunter M, Fuller A Jr, Hutson JM, Ikawa H, Hayashi A and MacLaughlin D. 1982. Mullerian-inhibiting substance: an update. *Recent Prog Horm Res* 38: 279-330.
- Elbrecht A and Smith RG. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255(5043): 467-470.
- Erlich HA, Gelfand D and Sninsky JJ. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252(5013): 1643-1651.

- Eusebe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N and Picard JY. 1996. Cloning and expression of the chick anti-müllerian hormone gene. *J Biol Chem* 271(9): 4798-4804.
- Faucounau N, Ichas F, Stoll R and Maraud R. 1995. Action of testosterone on the estradiol-induced feminization of the male chick embryo. *Anat Embryol* 191(4): 377-379.
- Fargeix N, Didier E and Didier P. 1981. Early sequential development in avian gonads. An ultrastructural study using selective glycogen labeling in the germ cells. *Reprod Nutr Develop* 21(3): 479-496.
- Gorbman A and Bern H. 1962. Steroid hormones and steroidogenesis. In: a textbook of comparative endocrinology. pp. 230-246. Wiley J and Sons Inc. New York USA.
- Gore-Langton RE and Armstrong DT. 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of reproduction. Knobil E, Neil JD, Edwing LL, Greenwald GS, Markert CL and Pfaff DW (eds) Vol. 1 pp. 331-335 Raven Press De., New York.
- Gower DB. 1988. The biosynthesis of steroid hormones: an up-date. In: New comprehensive biochemistry, hormones and their actions I. Cooke BA, King RJB and van der Molen (eds). Chap 1 pp. 3-28 Elsevier.
- Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D and Haffen K. 1979. Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors. *Gen Comp Endocrinol* 39(1): 9-19.
- Hamburger V and 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) Chap 1 pp. 1-46. Plenum Publishing Corp.
- Hinshelwood M, Demeter-Arlotto M, Means G and Simpson E. 1993. Molecular biology of genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary. In: The ovary. Adashi E and Leung P (eds). Chap 9 pp 166. Raven Press Inc. New York
- Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M and Omura T. 1993. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 268(10): 7494-7502.
- Hutson JM, Ikawa H and Donahoe PK. 1981. The ontogeny of müllerian inhibiting substance in the gonads of the chick. *J Pediatr Surg* 16(6): 822-826.

- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA and Parker KL. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8(5): 654-662.
- Jost A. 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 259(828): 119-130.
- Kent J, Wheatley S, Andrews JE, Sinclair AH and Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122(9): 2813-2822.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow PN and Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351(6322): 117-121.
- Kudo T, Yamamoto H, Sato S and Sutou S. 1996. Comparison of 5' upstream regions of chicken and quail aromatase genes. *J Reprod Dev* 42, 101-107.
- Kudo T and Sutou S. 1997. Molecular cloning of chicken FTZ-F1- related orphan receptors. *Gene* 197(1-2): 261-268.
- Kudo T and Sutou S. 1999. Structural characterization of the chicken SF-1/Ad4BP gene. *Gene* 231(1-2): 261-268.
- Kuwana T, Maeda-Suga H and Fujimoto T. 1986. Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage "in vitro". *Anat Res* 215(4): 403-406.
- Lillie FR. 1916. The theory of freemartin. *Science* 43: 611-613.
- Lillie FR. 1917. The freemartin: a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle. *J Exp Zool* 23:371-452.
- Luo X, Ikeda Y and Parker KL. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77(4): 481-490.
- MacLaughlin DT, Hutson JM and Donahoe PK. 1983. Specific estradiol binding in embryonic müllerian ducts: a potential modulator of regression in male and female chick. *Endocrinology* 113(1): 141-145.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6): 835-839.
- Maraud R, Vergnaud O and Rashedi M. 1990. New insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chick embryos. *Am J Anat* 188(4): 429-437.

- McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P and Hogg H. 1984. Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312(5994): 552-555.
- Merchant-Larios H, Popova L and Reyss-Brion M. 1984b. Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonefros. *Dev Growth and Differ* 26(5): 403-417.
- Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis *Endocr Rev* 9(3): 295-318.
- Mittwoch U. 1971. Sex determination in birds and mammals. *Nature* 231: 432-434.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A and Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14(1): 62-68.
- Morohashi KI, Honda S, Inomata Y, Handa H and Omura T. 1992. A common trans-acting factor, Ad4BP, to the promoters of steroidogenic P450s. *J Biol Chem* 267(25): 17913-17919.
- Mount SM. 1982. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10(2): 459-472.
- Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi I and Mizuno S. 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol* 20(2): 193-202.
- Nomura M, Bartsch S, Nawata H, Omura T and Morohashi K. 1995. An E box element is required for the expression of the ad4bp gene, a mammalian homologue of *ftz-fl* gene, which is essential for adrenal and gonadal development. *J Biol Chem* 270(13): 7453-7461.
- Oreal E, Pieau C, Mattei M, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D and Magre S. 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* 212(4): 522-532.
- Parker KL and Schimmer BP. 1997. Steroidogenic factor I: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18(3): 361-377.
- Preminger GM, Koch WE, Fried FA and Mandell J. 1980. Utilization of the chick chorioallantoic membrane for in vitro growth of the embryonic murine kidney. *Am J Anat* 159(1): 17-24.
- Rugh R. 1964. The chick: a shelled vertebrate. In: *Vertebrate embryology*. Chap IV pp. 104-114. Harcourt, Brace and World, Inc.

- Saitoh Y, Saitoh K, Ohtomo K and Mizuno S. 1991. Occupancy of the majority of the DNA in the chicken W chromosome by bent repetitive sequences. *Chromosoma* 101(1): 32-40.
- Sayag N, Robinzon B, Snapir N, Arnon E and Grimm VE. 1991. The effects of embryonic treatments with gonadal hormones on sexually dimorphic behavior of chicks. *Horm Behav* 25(2): 137-153.
- Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL and Ingraham HA. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77(5): 651-661.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R and Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281): 240-244.
- Smith CA, Andrews JE and Sinclair AH. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60(5-6): 295-302.
- Smith CA, Smith MJ and Sinclair AH. 1999. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234(2): 395-402.
- Spaniel-Borowski K. 1989. Vascularization of ovaries from golden hamsters following implantation into the chick chorioallantoic membrane. *Exp Cell Biol* 57(4): 219-227.
- Stoll R, Rashedi M and Maraud R. 1980. Hermaphroditism induced in the female chick by testicular grafts. *Gen Comp Endocrinol* 41(1): 66-75.
- Sutherland RL, Watts CKW and Clarke CL. 1988. Oestrogen actions. In: New comprehensive biochemistry, hormones and their actions I. Cooke BA, King RJB and Van Der Molen (eds). Chap 12 pp. 197-215 Elsevier.
- Tanabe Y, Saito N and Nakamura T. 1986. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 63(3): 456-463.
- Teng CS, Wang JJ and Teng JI. 1987. Purification of chicken testicular mullerian inhibiting substance by ion exchange and high-performance liquid chromatography. *Dev Biol* 123(1): 245-254.
- Tiersch TR, Mitchell MJ and Watchel SS. 1991. Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum Gen* 87(5): 571-573.

- Tone M, Nakano N, Takao E, Narisawa S and Mizuno S. 1982. Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Chromosoma* 86(4): 551-569.
- Umesomo K and Evans RM. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57(7): 1139-1146.
- Villalpando I, Sánchez-Bringas G, Sánchez-Vargas I, Pedernera E and Villafán-Monroy H. 2000. The P450 aromatase (p450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 117(3): 325-334.
- Wachtel SS, Ono S, Koo GC and Boyse EA. 1975. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257(5523): 235-236.
- Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA and Milbrandt J. 1992. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256(5053): 107-110.
- Wolff E. 1946. Recherches sur l'intersexualité expérimentale produite par la méthode des greffes ed gonades à l'embryon ed poulet. *Arch Anat Microscop et Morphol Expér* 36: 69-91.
- Yoshida K, Shimada K and Saito N. 1996. Expression of P450 17 $\alpha$  hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Mol Biol* 102(2): 233-240.
- Zaccantí F, Vallisneri M and Quaglia A. 1990. Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos. *Differentiation* 43: 71-80.