

73



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACION TERMDEPENDIENTE EN LA PRODUCCION DE ESTROGENOS DURANTE LA DETERMINACION SEXUAL DE *Gallus gallus* (*White Leghorn*), COMO UNA REMINISCENCIA "reptiliana" DE LAS AVES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

GABRIEL ERNESTO GARCIA PEÑA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO



300256

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Modulación termodependiente en la producción de estrógenos durante la
determinación sexual de *Gallus gallus* (White Leghorn), como una reminis-
cencia "reptiliana" de las aves.

realizado por **Gabriel Ernesto García Peña**

con número de cuenta 9124455-0 , quién cubrió los créditos 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 Aranzábal

Propietario

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Suplente

Dra. Laura Roxana Torres Avilés

Suplente

Dr. Victor Hugo Reynoso Rosales

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

[Handwritten signatures and notes in the right margin, including names like 'María del Carmen Uribe Aranzábal' and 'Laura Roxana Torres Avilés']

A la memoria de mi padre y mi abuelo...

"El destino es nuestra voluntad contra la suerte"...

A mi madre...fuerte y sabia.

A mi querida hermana...

A mi familia...

A mis amigos y compañeros de momentos buenos y aciagos...: Julieta, Bárbara, Krivsova, Ofelia, Erika, Alejandra, Yssel, Edmundo, Gabriel Giovanni, Henry, Bernardo, Germán, Alfredo, Adrián... por enseñarme los matices del proceso.

A Adriana, por tan sensible recuerdo...

A los Evo-Devo, por la improbabilidad de ser totalmente único...

A Paul, David y Marianne mis entrañables y viejos amigos...

A los nuevos personajes de mi historia...

A todos, gracias...

A la Facultad de Ciencias de la
Universidad Nacional Autónoma de México,
por brindarme el espacio donde
realizar mis estudios profesionales.

A mis maestros por su enseñanza.

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

Agradecimientos:

A la Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro, por su asesoría durante la realización de este trabajo.

A las personas del laboratorio de Embriología Molecular: Horacio, Gloria, Laura y Dorys.

Al Sr. José del laboratorio del Dr. Horacio Merchant Laríos, por su ayuda en el procesado de tejido para el análisis histológico.

Al laboratorio 203 de la Facultad de Química, por permitirme usar el contador gamma.

Al Dr. David Crews de la Universidad de Texas.

...si los Reptiles, anticuados como eran, volvían a sacar miembros y tegumentos que nunca se habían necesitado hasta entonces, si, en una palabra, una criatura imposible por definición como un pájaro era posible..., entonces la barrera entre monstruos y no-monstruos saltaba por el aire y todo volvía a ser posible...

-No hay diferencia! Monstruos y no-monstruos han estado siempre cerca!
Lo que no ha sido continúa siendo...

Tiempo Cero, Italo Calvino

Índice

Resumen	4
I. Antecedentes	5
II. Introducción	6
A. Gonadogénesis en las aves	6
Formación de la cresta genital	6
Gónada indiferenciada	7
Diferenciación sexual	8
B. Mecanismo de determinación y señalización sexual	11
Determinación sexual primaria, los genes determinantes del sexo	12
Biosíntesis de esteroides sexuales, primeras señales de la determinación sexual secundaria	16
C. Evolución del mecanismo de determinación sexual de las aves	20
Ubicación filogenética de las aves	20
El sistema termodependiente de determinación sexual (TSD) en Crocodylia	22
Evolución del sistema ZW	23
III. Planteamiento del problema	25
IV. Objetivos e hipótesis	26
V. Materiales y Métodos	27
Diagrama de flujo	29
VI. Resultados	30
VII. Discusión	35

VIII.	Conclusiones	38
IX.	Apéndices	39
	1) Edad estandarizada de acuerdo al estadio 32 de Hamilton y Burger	39
	2) Medio M199 suplementado	40
	3) Radio Inmunoensayo para 17β estradiol	41
	4) Sexado por detección del cromosoma W	43
	5) Criterio de eliminación por viabilidad celular	46
	6) Análisis histológico	47
X.	Referencias	49

Resumen

Desde hace treinta años, se ha empezado a formalizar una nueva perspectiva en los análisis evolutivos, conocida como Biología Evolutiva del Desarrollo. En la cual se estudian las modificaciones que se han producido a lo largo de la evolución, en la información que dirige los patrones del desarrollo de los organismos.

En estos análisis, se han encontrado fenómenos conocidos como atavismos genéticos, en donde en un patrón de desarrollo dado, existe información que no es utilizada pero permanece como una reminiscencia del patrón de desarrollo ancestral.

La presente investigación, se enfoca al estudio del mecanismo de determinación sexual de las aves, en donde se ha propuesto que la determinación sexual cromosómica del grupo, derivó de la determinación sexual termosensible, sin cromosomas sexuales; y que ésto implicó una modificación en la biosíntesis de la hormona feminizante, 17β estradiol. Así, con el objetivo de encontrar un regulador termosensible en el mecanismo de determinación sexual cromosómica de las aves, se analizó el efecto de distintos tratamientos de temperatura (34, 37 y 40°C) sobre la biosíntesis de ésta hormona, en gónadas de *Gallus gallus*, en cultivo organotípico. Tratando de observar la producción de la hormona en los machos genéticos como un indicio de feminización o la no biosíntesis en las hembras genéticas como indicio de masculinización. Los resultados de ésta investigación, muestran que las hembras genéticas sufren una regulación positiva, dependiente de la temperatura y de la asimetría gonadal. Mientras que los machos genéticos, son incapaces de producir esta hormona. Sugiriendo que la determinación sexual cromosómica en el grupo, sólo permite la biosíntesis de la hormona en la condición heterocigótica ZW (hembras) pero que una vez que se cumple esta condición, la termosensibilidad ocurre.

I. Antecedentes

En 1981 en Berlín, se llevó a cabo la primera conferencia exploratoria con el objeto de crear una nueva disciplina llamada Biología Evolutiva del Desarrollo, en la cual se pretende explicar, la evolución de los procesos y mecanismos de regulación ontogenética que se producen en la formación de las distintas especies. Esto ha llevado al diseño de nuevos métodos de análisis comparativos morfológicos o moleculares donde se evalúa el grado de homología de la información presente en el genotipo y su función a lo largo del desarrollo entre las distintas especies (Raff, 1996; Holland, 1999; Marin & Baker, 1998). Los métodos de análisis son los siguientes:

- 1) Encontrar información (genes) homóloga en distintas especies
- 2) Encontrar algún grado de similitud en los patrones de expresión de los genes durante en el desarrollo, de dos distintas especies
- 3) Demostrar la conservación de la función biológica, en donde se observa el efecto de un gen particular en el contexto de otra especie

Un cuarto nivel de análisis, es el trabajo sobre los atavismos genéticos. Concepto que implica, que en la evolución de una especie, la pérdida de una característica no necesariamente implica la eliminación de toda la información. Esto hace posible, inducir el desarrollo de caracteres eliminados en la evolución de una especie, como los dientes en el pico de un ave o el desarrollo de extremidades en una serpiente, por la aplicación ectópica de algunas señales necesarias en un momento específico en el desarrollo, ya que la información sigue en el genotipo pero simplemente no es utilizada (Gould, 1995).

La presente tesis, se enfoca a éste último nivel de análisis, en donde se pone a prueba la existencia de un inductor termosensible en la determinación sexual de las aves, como sucede en el mecanismo termodependiente de los cocodrilos, dos grupos de arcosaurios, separados desde hace aproximadamente 250-300 millones de años.

II. Introducción

A) Gonadogénesis en las aves

La gónada es el órgano encargado de la producción de gametos en los metazoarios e induce la diferenciación de los dos fenotipos sexuales en los vertebrados: el masculino y el femenino (Gilbert, 2000). Para el caso de las aves el modelo de desarrollo más estudiado es el del pollo, *Gallus gallus*, por lo que la información que se da a continuación se enfoca principalmente a este organismo. El proceso de morfogénesis de esta estructura en el desarrollo de los vertebrados se puede dividir en tres etapas secuenciales: cresta genital, gónada indiferenciada y gónada diferenciada (Fig. 1).

Formación de la cresta genital

Con esta fase, inicia la formación del primordio gonadal e involucra la diferenciación de los componentes somáticos de la gónada desde el mesonefros y la migración de las células germinales primordiales (cgps), que son de origen extraembrionario y posteriormente darán origen a los gametos.

Componentes somáticos

La formación de la cresta genital en las aves ocurre al tercer día de incubación (d.i.), como un engrosamiento de la región ventral del mesonefros a la altura de los somitas 20 y 27 (Carlson & Stahl, 1985). La gónada comparte el origen de su desarrollo con la glándula interrenal, ya que de la parte dorsal del mesonefros provienen las células de la corteza de esta glándula (Witschi, 1956).

La cresta genital, es una región del mesonefros que se compone del mesotelio (epitelio germinal), mesénquima (tejido conectivo) y cgps. En *Gallus gallus*, la morfogénesis gonadal empieza a los 3 días de incubación (d.i.), con el engrosamiento del mesotelio y la formación de trabéculas de células epiteliales conectadas a las células mesenquimatosas. A los 3.25 d.i. se extiende una capa pluricelular de células epiteliales formando una médula primitiva que proviene de la formación de los cordones sexuales desde el blastema mesonéfrico, aunque algunos autores creen que su origen es el epitelio celómico y de células

mesenquimáticas libres que cruzan un lamina basal y se integran en el tejido (Merchant-Larios, 1979; Carlon & Stahl, 1985). Se ha propuesto que los cordones se conectan con los corpúsculos renales vecinos, dando lugar a la formación de los *túbulos eferentes primordiales de la gónada* (primordios de los conductos de Wolff y Müller) (Witschi, 1956). A los 3.5 d.i. (90 hrs) se puede identificar a la gónada como un órgano aislado en la cavidad celómica, formado de tres componentes, el epitelio superficial o corteza, la médula primitiva o parte central y las cgps. Entre la corteza y la medula aparece una lámina basal, indicando la separación de dos tipos celulares distintos y el establecimiento de interacciones celulares de corto alcance (Merchant-Larios, 1978).

Células germinales primordiales

Las cgps, se hacen evidentes tanto en la médula primitiva como en el epitelio germinal adonde llegan migrando por la arteria oftalomesentérica desde un área extraembrionaria del blastodermo y se reparten de manera asimétrica de acuerdo a la posición de la gónada (Hardisty, 1978). A los 4 y 4.5 d.i (100-110 hrs), las cgps se concentran en una relación corteza-médula de 1:3.6 en la gónada derecha y de 1:4.71 en la izquierda en los machos genéticos. En las hembras genéticas la proporción de cgps, está en una relación corteza-médula de 1:2.67 en la derecha y 1:5.455 en la izquierda. Así, la proporción de cgps es mayor en la gónada izquierda y ésta es más marcada en las hembras que en los machos (Limborg, 1968). Este fenómeno no se asocia con la diferenciación sexual, ya que la ausencia de cgps, más que producir modificaciones en la organización de los tejidos, únicamente produce infertilidad (Merchant-Larios, 1978).

Gónada indiferenciada

La fase de gónada indiferenciada, se establece a los 4.5 d.i. y se caracteriza por la diferenciación más marcada entre los dos componentes de la gónada y su maduración, la **médula** (región interna) y la **corteza** (epitelio). En la primera, se forman los cordones sexuales que se reticularizan y anastomosan en una matriz de estroma. Separada por la lámina basal, la corteza izquierda prolifera y se transforma en un epitelio cilíndrico mientras que en la corteza derecha la proliferación es menos activa y el epitelio es cúbico (Carlon & Stahl 1985). A este

fenómeno se le conoce como asimetría gonadal que es único de la clase Aves y hace que solamente el ovario izquierdo se desarrolle (Raymond, 1984).

Es importante mencionar que hasta los 6 d.i. (144 hrs) las cgps se encuentran en la médula de la gónada indiferenciada y migrarán hacia la corteza según se produzca la diferenciación sexual femenina o bien se incorporarán a los túbulos seminíferos en el desarrollo de un testículo.

Diferenciación sexual

Esta fase se establece a los 6.5 d.i. y en ella, la gónada sigue un patrón de diferenciación de acuerdo al sexo genético del organismo.

Diferenciación ovárica

La formación del ovario se caracteriza por el desarrollo de la corteza de la gónada indiferenciada mientras que la médula primitiva (estroma y cordones sexuales) detiene su desarrollo. En los 6.5 d.i., la corteza del ovario izquierdo se engruesa, presenta células columnares estratificadas (prefoliculares) y progresivamente van apareciendo células esteroidogénicas. En cambio, la corteza derecha es un epitelio cúbico que no prolifera, haciendo más marcado el fenómeno de asimetría. A los 8 d.i. sólo la gónada izquierda es funcional; la corteza del ovario izquierdo se engruesa manteniendo su forma cilíndrica y aloja a las ovogonias, mientras que en el ovario derecho el epitelio se vuelve aplanado. A los 10 días de incubación aparecen las células prefoliculares en la gónada izquierda (Carion & Stahl, 1985).

Se han reportado experimentos donde la ablación de la gónada izquierda en hembras promueve la diferenciación de la gónada derecha en un testículo. Esto se atribuye a que la médula de la gónada no ha degenerado del todo y que la medula derecha sí es capaz de desarrollarse (Merchant-Larios, 1978).

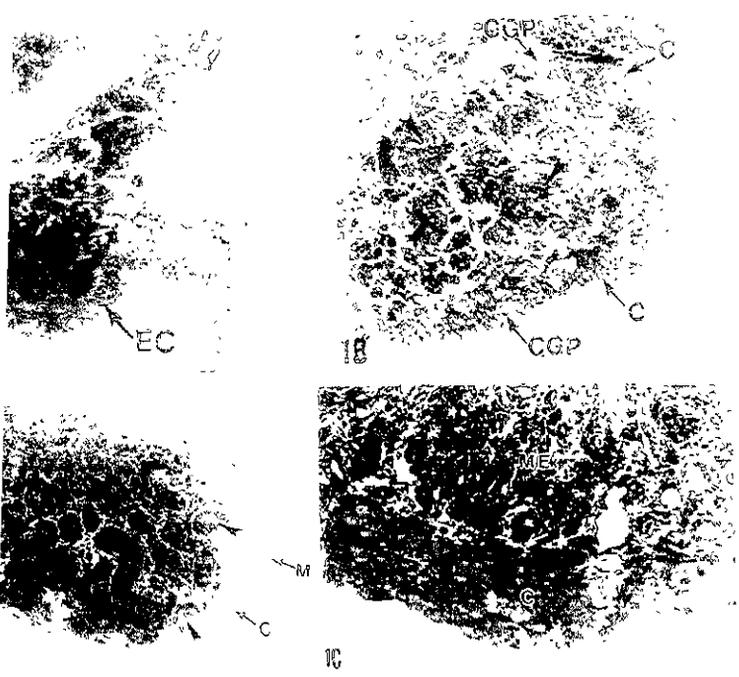
Diferenciación testicular

La diferenciación del testículo, se produce principalmente por el desarrollo del estroma y los cordones sexuales que conforman la medula primitiva. A los 6.5 d.i., las células que conforman los cordones, empiezan a diferenciarse en células de Sertoli, que alojarán y se encargarán de la maduración de las espermatogonias

(cgps). A diferencia de lo que ocurre en la diferenciación ovárica, ambos testículos se desarrollan.

A los 8 d.i. (192 hrs), los cordones sexuales se han separado de la corteza e inician su maduración en túbulos seminíferos. El epitelio gonadal degenera más marcadamente en la gónada derecha que en la izquierda y no se presentan células esteroideogénicas (Carlson & Stahl, 1985).

Después de que estos eventos han ocurrido, los programas de diferenciación se han establecido, originando una serie de cambios y relaciones entre las distintas partes del cuerpo, que conforman el fenotipo sexual. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, la gónada masculina induce la degeneración de los conductos de Müller, que son el precursor de los oviductos, útero y el tercio superior de la vagina en los mamíferos (Gilbert, 2000). Además de que se ha planteado, que la gónada establece una relación de señales con el sistema nervioso central, mediante el eje hipotálamo-hipófisis-gónada controlando la diferenciación sexual somática y conductual en el organismo (Pedemera et al., 1999).



desarrollo de la gónada en las aves 1A cresta genital, 1B gónada indiferenciada, y 1D testículo. M=médula; C= corteza; CGP= células germinales primordiales, médula. Tomado de Villalpando I (sin publicar)

B) Mecanismo de determinación y señalización sexual

La determinación del fenotipo sexual, se produce por dos procesos ontogénicos relacionados, la determinación sexual primaria y la determinación sexual secundaria. La primera se produce por la expresión de ciertos genes específicos del sexo que establecen la determinación de la gónada indiferenciada y en la segunda, la determinación de la gónada implica la producción de hormonas esteroides que constituyen las señales celulares que dirigen la diferenciación del fenotipo somático (Gilbert, 2000). Ambos procesos se encuentran estrechamente relacionados, ya que a lo largo de la cascada de expresión de los genes en la determinación sexual primaria, se expresa la maquinaria de la señalización hormonal, estrógenos en las hembras y andrógenos y AMH en los machos. A diferencia de los mamíferos, la señalización hormonal en las aves parece tener un papel más importante en la determinación sexual primaria, ya que es posible inducir la reversión sexual, por la administración ectópica de las hormonas esteroides sexuales, en la etapa de desarrollo en que se inicia la diferenciación sexual, desde los 6.5 y 8 d.i. en *Gallus gallus* (Burns, 1961).

En las aves y los mamíferos, la determinación sexual primaria se establece desde la fecundación, ya que su genotipo es portador de los cromosomas sexuales. A este mecanismo, se le conoce como determinación sexual genética ó GSD (de las siglas en inglés, Genetic Sexual Determination) y funciona con el siguiente principio: la condición homocigótica de un cromosoma determina un sexo y la condición heterocigótica determina al otro sexo. En las Aves el macho es homocigótico (ZZ) y la hembra es heterocigótica (ZW), mientras que en los mamíferos el macho es heterocigótico (XY) y la hembra es homocigótica (XX) (Cooke & Buckley, 1987; Raff, 1996). De este modo, si la condición cromosómica, implica un genotipo distinto, es decir distintos programas genéticos involucrados, en la información de la morfogénesis y la diferenciación gonadal, podemos distinguir tres programas de regulación de genes. Un "programa inicial", indistinto entre machos y hembras, que establece el desarrollo de la gónada indiferenciada, un programa que induce a la masculinización y otro que induce la feminización. Es decir que hay genes contenidos en los cromosomas relacionados a la formación de la gónada y otros relacionados a la determinación sexual (Fig.2).



Fig. 2: Los patrones de diferenciación son los mismos hasta los 6.5 d.i. donde aparecen las variantes específicas del sexo genético.

Determinación sexual primaria, los genes determinantes del sexo

Mediante el análisis molecular de la embriología gonadal, se han identificado una serie de genes que se encienden de forma particular durante el desarrollo y la diferenciación de la gónada de las aves, principalmente el pollo (*Gallus gallus*).

Genes de la gónada indiferenciada

Wt1 (Factor Tumoral de Wilm)

Es un gen autosómico formado por 10 exones que codifican para una proteína rica en prolina/glutamina y con cuatro dedos de zinc en la región próxima al grupo amino terminal. Produce cuatro isoformas que se expresan en tejidos como el riñón, cresta genital, gónadas fetales y mesotelio. En los mamíferos, la falta de expresión de dos de las isoformas, está asociado con el síndrome de Denys-Drash que implica malformaciones urogenitales. La delección del gen, produce la agenesia de riñones y gónadas causada por la degeneración de estos órganos durante la embriogénesis. En las aves se ha localizado desde la fase de gónada indiferenciada en ambos sexos, por lo que se piensa que participa en la formación de la cresta genital y en el mantenimiento de la gónada indiferenciada (Vilain & McCabe, 1998; McElreavey & Fellous, 1997; Smith *et al* , 1999).

Dax1

Es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares huérfanos de hormona (sin ligando conocido) ya que su transcrito presenta en el carboxilo terminal un dominio de unión a un ligando típico de esta familia. En los mamíferos tiene una mayor expresión en las hembras, pero en *Gallus gallus*, el patrón de expresión es el mismo en machos y en hembras, por lo que su función como factor feminizante no es aplicable para este grupo, pero se piensa que participa en la formación de la gónada (Western *et al.*, 2000; Vilain & McCabe, 1998; McElreavey & Fellous, 1997; Smith *et al.*, 1999).

Sf1 (Factor esteroideogénico 1)

Este gen también pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares huérfanos. Se considera determinante en la formación de la gónada debido a que su delección (en ratones transgénicos) provoca la agenesia del núcleo ventromedial del hipotálamo, gónadas y glándulas adrenales. Su expresión ocurre en el tejido esteroideogénico como la corteza adrenal, células de Leydig y Sertoli en el testículo y las células de la teca en el ovario en los mamíferos (McElreavey & Fellous, 1997). Se piensa que interviene en la señalización de esteroides de la diferenciación sexual. En las aves el gen se expresa en ambos sexos desde la fase de cresta genital pero disminuye en machos durante la diferenciación sexual, en una modalidad inversa a como ocurre en mamíferos (Smith, *et al.*, 1999).

Genes de la feminización

Aromatasa (P450arom)

P450arom es un citocromo que utiliza al NAD⁺ como cofactor y sintetiza estrógenos por la aromatización de los andrógenos. Su expresión ocurre en el momento de la diferenciación y está ligado a la feminización, aunque se ha observado una producción escasa en el testículo. Su expresión es asimétrica en los ovarios, se expresa en la médula de ambos y únicamente en la corteza del ovario izquierdo (Abinawanto, *et al.*, 1996; Nakabayashi, *et al.*, 1998; Yoshida, *et al.*, 1996; Andrews, *et al.*, 1997; Clinton & Haines, 1999; Villalpando, *et al.*, 2000).

Er (Receptor de estrógenos)

Codifica para una proteína nuclear específica que tiene como ligando a los estrógenos y se cree que actúa como factor de transcripción. El transcrito se detecta en etapas previas y posteriores a la diferenciación sexual, en la corteza del ovario izquierdo y la médula de ambos ovarios. Por lo que, dado que su expresión ocurre antes de la aromatasa, se piensa que posee una función alterna a la respuesta a los estrógenos, hasta ahora desconocida (Gilbert, 2000; Smith *et al.*, 1999; Nakabayashi, *et al.*, 1998; Andrews, *et al.*, 1997).

Genes de la masculinización

Dmrt1

La proteína para la cual codifica, posee un dominio DM identificado en los reguladores sexuales doublesex de *Drosophila melanogaster* y *Caenorabditis elegans*; por lo que se propone que tiene la función de factor de transcripción. El dominio posee cisteínas, histidinas y quelatos de zinc característicos, que le confieren la capacidad de interactuar con el DNA. En las aves se localiza en el cromosoma Z y se ha visto que su expresión es mayor en el sexo homocigótico (ZZ). Se expresa en la gónada desde la fase de cresta genital, antes de la diferenciación sexual (Raymond *et al.*, 1999).

Sox9

Es un gen autosómico con un dominio HMG, que pertenece a la familia de genes asociados al Sry. Está relacionado con los procesos de condrogénesis y determinación sexual y las mutaciones en él, llegan a producir malformaciones en el esqueleto y reversión sexual parcial o total, conocida en humanos como el síndrome de displasia campomélica. Su expresión es exclusiva para la masculinización de la gónada indiferenciada y ocurre en el momento en que empieza su diferenciación hacia testículo. La expresión del SOX9 está relacionada con la diferenciación de células de Sertoli que son consideradas células clave en la diferenciación sexual, ya que producen hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) y que son las encargadas de alojar y madurar a las espermatogonias en los tubos seminíferos. Sin embargo, en las aves el gen se

expresa después que la producción de AMH por lo que su papel como gen inductor de esta hormona no es claro (Marshall & Graves, 1998; Kent, *et al.*, 1996; Bergstrom, *et al.*, 2000; Lovell-Badge & Hacker, 1995; Western, *et al.*, 1999; Morais-da-Silva, *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Emmanuelle *et al.*, 1998).

Amh (Hormona Inhibidora de los conductos de Müller)

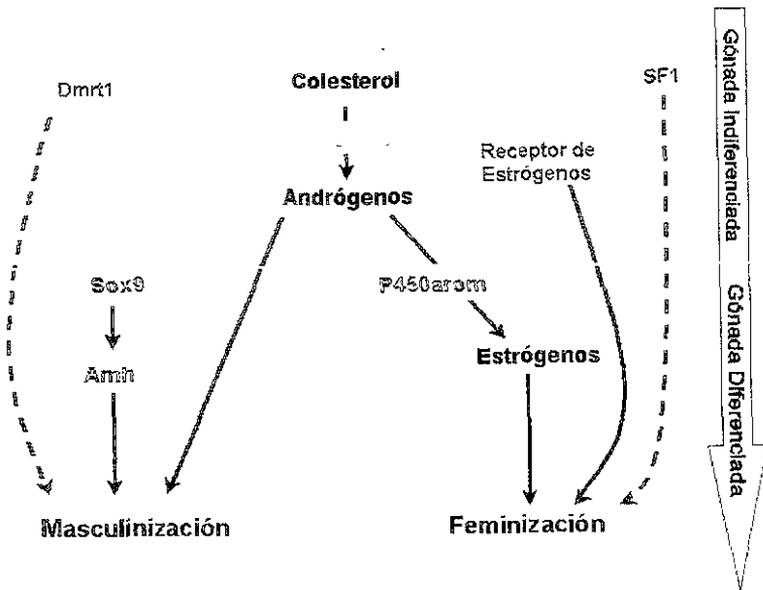
Es un gen autosómico de la familia de los TGF- β y produce una glicoproteína de 560 residuos de aminoácidos. Esta hormona, constituye una de las señales principales de la masculinización, ya que regula la degeneración de los conductos de Müller, que darán origen a los oviductos, el útero y el cervix. La hormona está asociada a la masculinización en los mamíferos, en donde ha mostrado tener un promotor asociado al Sf1 y al SrY (Haqq, *et al.*, 1994; Shen, *et al.*, 1994). Sin embargo, en las aves, aun no se ha encontrado un homólogo al Sry y el Sf1 es un gen asociado a la feminización.

Desde la etapa de gónada indiferenciada, Amh, se expresa en machos y también en las hembras aunque en menor cantidad. En las hembras, se expresa antes de la diferenciación produciendo la regresión del conducto de Müller derecho (Western, *et al.*, 1999; Yvette *et al.*, 1996; McKeown, 1994; Rashedi & Maraud, 1987; Hutson, *et al.*, 1981; Emmanuelle *et al.*, 1998).

P45017 α hidroxilasa

Su proteína participa en la hidroxilación de la pregnenolona, que constituye el primer paso de la biosíntesis de andrógenos (Morato, 1979a; Morato 1979b). La expresión de este gen, ocurre desde los 5 d.i. en ambos sexos y se mantiene al menos hasta los 9 d.i. (Abinawanto, *et al.*, 1996; Smith, *et al.*, 1999).

De este modo, como se observa en la fig. 3, la información obtenida hasta ahora, muestra que el programa genético de la feminización, parece estar en torno a la biosíntesis de estrógenos por la aromatasa y el receptor de esta hormona. En cambio, en el programa de masculinización, existen dos señales: la producción de la hormona antimülleriana, regulada por SOX9 y la biosíntesis de andrógenos por P45017 α hidroxilasa.



... muestran los genes responsables de la determinación sexual y las hormonas sexuales, andrógenos y estrógenos.

Síntesis de esteroides sexuales, primeras señales de la diferenciación sexual secundaria

... mencionó anteriormente, la feminización ocurre con la expresión de la enzima 17βHSD, la cual es responsable de la transformación de testosterona a estrógenos, producida previamente en la fase de la gónada indiferenciada por la enzima 17αHSD, encargada de producir testosterona a partir del colesterol (Fig. 4).

Las hormonas esteroides, son moléculas hidrofóbicas pequeñas, derivadas del colesterol y que se solubilizan en el medio extracelular al unirse a moléculas transportadoras. Al llegar a la célula blanco, la hormona se une a receptores específicos en el citoplasma o el núcleo y una vez que los han activado, estos se...

pueden unir directamente al DNA o asociarse con factores de transcripción, promoviendo la expresión de otros genes que se reflejan en una respuesta celular (Alberts *et al.*, 1999).

Hormonas esteroideas sexuales

En el tejido esteroideogénico, la biosíntesis de las hormonas esteroideas empieza con el colesterol que proviene principalmente del torrente sanguíneo, de la síntesis hepática y de la biosíntesis a partir del acetato. Para ser incorporados dentro de la célula, se deben unir a complejos lipoprotéicos de alta y baja densidad (HDL y LDL, respectivamente) y una vez en el citoplasma, son liberados para ser utilizados o almacenados en forma de ésteres, formando gotas lipídicas en el citoplasma. El catabolismo de ésta molécula ocurre dentro de la mitocondria, donde es hidroxilada en los carbonos 20 y 22 por la acción de la desmolasa, produciendo a la pregnenolona. Dentro de la gónada, la síntesis de las hormonas esteroideas ocurre desde este precursor de manera específica del sexo (Morato, 1979a).

Andrógenos

Los andrógenos son hormonas preferentes de la masculinización aun que su biosíntesis no es exclusiva de los machos. Se clasifican en dos tipos: adrenales (androstendiona, 11 β -hidroxiandrostendiona y dehidroepinadosterona) y testiculares (testosterona).

La biosíntesis de testosterona ocurre de la siguiente manera: un complejo de hidroxilasas y una desmolasa, transforman al colesterol en 5-pregnenolona, que a gracias a la Δ^5 - Δ^4 -isomerasa y la 3 β -hidroxideshidrogenasa puede ser transformada en progesterona. Estas dos moléculas (pregnenolona y progesterona) sirven de sustrato a la P450 17 α -hidroxilasa para producir 17 α -hidroxiprogesterona y 17 α -hidroxipregnenolona. Que sirvan de sustrato a la 17,20-desmolasa para producir dehidroepinadosterona y 4-androstendiona. Esta última se reduce en su carbono 17 produciendo testosterona en una reacción catalizada por la 17 β -hidrodeshidrogenasa. La dehidroepinadosterona será isomerizada en sus carbonos 5 y 4 por la Δ^5 - Δ^4 -isomerasa y posteriormente reducida por la 3 β -hidroxideshidrogenasa generando testosterona (Fig. 4).

Estrógenos

Estos se consideran como las hormonas esteroides de la feminización. Derivan de la androstendiona y la testosterona por la aromatización de uno de los tres anillos aromáticos de los andrógenos, gracias a la acción de la enzima aromatasa. Existen dos tipos de estrógenos: la estrona, derivada de la 4-androstendiona y el estradiol que se produce de la testosterona. Esta última constituye el compuesto más activo de los estrógenos (Baulieu & Kelly, 1990; Weniger, 1991).

La teoría más aceptada para explicar el fenómeno de la diferenciación sexual en los vertebrados, es la teoría cuantitativa del balance. En donde se propone que las hormonas de la masculinización (andrógenos) y de la feminización (estrógenos) están presentes en ambos sexos, pero es la proporción relativa de ellos la que induce la masculinización o la feminización (Woods & Erton, 1978; Bogart, 1985). Esta teoría se apoya en la potencialidad de un sexo (testículo u ovario) para formar el otro. Como se mencionó anteriormente, la expresión de P45017 α hidroxilasa muestra que los andrógenos participan en el desarrollo de ambos sexos y que en las hembras, en la etapa de determinación sexual (6.5 d.i.), cuando inicia la feminización, la aromatasa biosintetiza a los estrógenos a partir de los andrógenos.

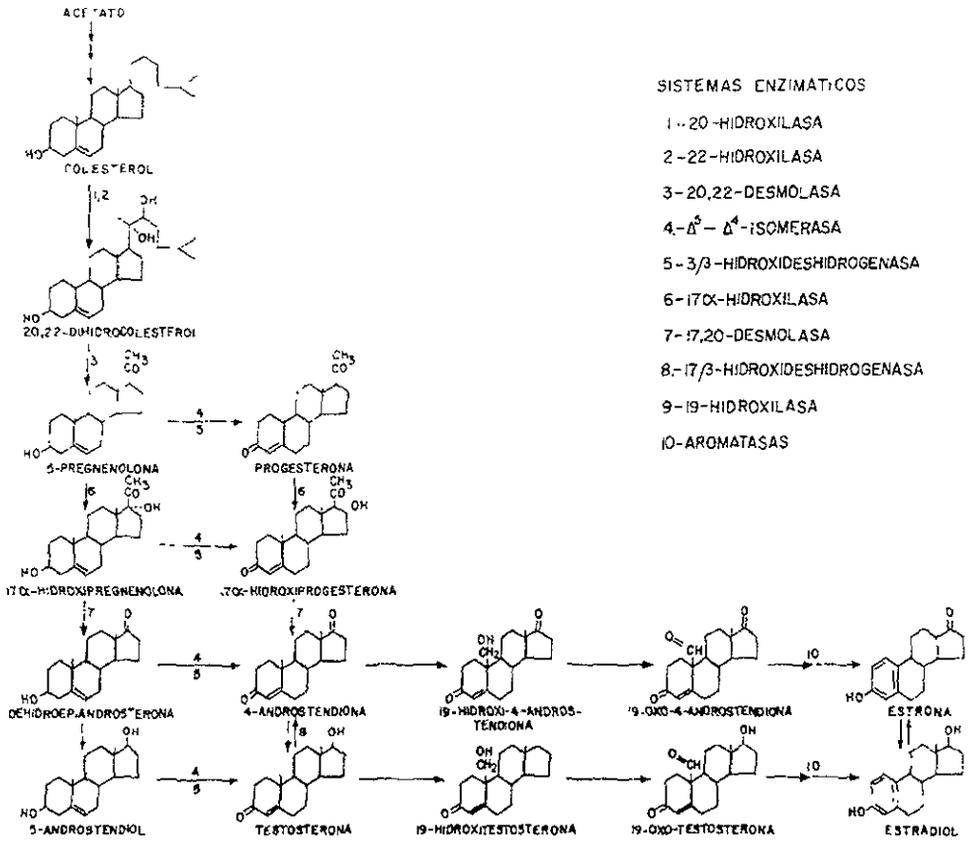


Fig. 4: Biosíntesis de las hormonas esteroideas sexuales a partir del colesterol.

C) Evolución del mecanismo de determinación sexual de las aves

Mecanismos de Determinación Sexual

En los tres grandes grupos de amniotas (Reptilia, Aves y Mammalia), podemos encontrar distintos mecanismos de determinación sexual de acuerdo al factor que lo regula. Podemos encontrar mecanismos genéticos de determinación sexual (GSD de Genetic Sex Determination) en donde el sexo se establece desde la fecundación como en el caso de las aves y los mamíferos; o bien mecanismos ambientales (ESD de Environmental Sex Determination) en los cuales el sexo del individuo es determinado por un factor ambiental en las condiciones de incubación. El factor más importante en este tipo de sistemas es la temperatura, por lo que a veces se refiere a él como mecanismo termodependiente de determinación sexual (TSD de Termodependent Sex Determination) (Janzen & Pautskits, 1991). La gran diversidad de formas para determinar el sexo y su distribución en los distintos grupos de amniotas (Fig 5), muestra que a pesar de regular algo tan importante en la reproducción sexual, estos han evolucionado rápidamente y de manera polifilética. De tal forma que los mecanismos genéticos XY y ZW no son necesariamente homólogos (Raff, 1996; Marin & Baker, 1994) y será necesario ubicar a los grupos más próximos a las aves.

Ubicación filogenética de Aves

A pesar de que se considera al grupo Aves como un taxon aparte, los análisis filogenéticos muestran que esta muy emparentado al taxon Reptilia, y se ubica dentro del mismo en el linaje de los diápsidos, en el grupo de los arcosaurios. El grupo actual más cercano a las aves es Crocodyllia y se piensa que divergieron a mediados del periodo Jurásico (MacFarland, *et al.*, 1977). En este periodo, el origen de las aves se ubica con el género *Archeopteryx* (Qiang, *et al.*, 1996; Chiappe, 1995) y los análisis paleontológicos sobre el crecimiento y la fisiología, indican que existieron cambios fisiológicos importantes, como un aumento en la tasa de desarrollo y la aparición de las plumas como aislante térmico (Chiappe, 1995).

Así, se piensa que el mecanismo de determinación sexual de las aves tiene mayor similitud con el de los cocodrilos, que con el de los mamíferos, aunque ambos sean del tipo GDS (Fig. 5).

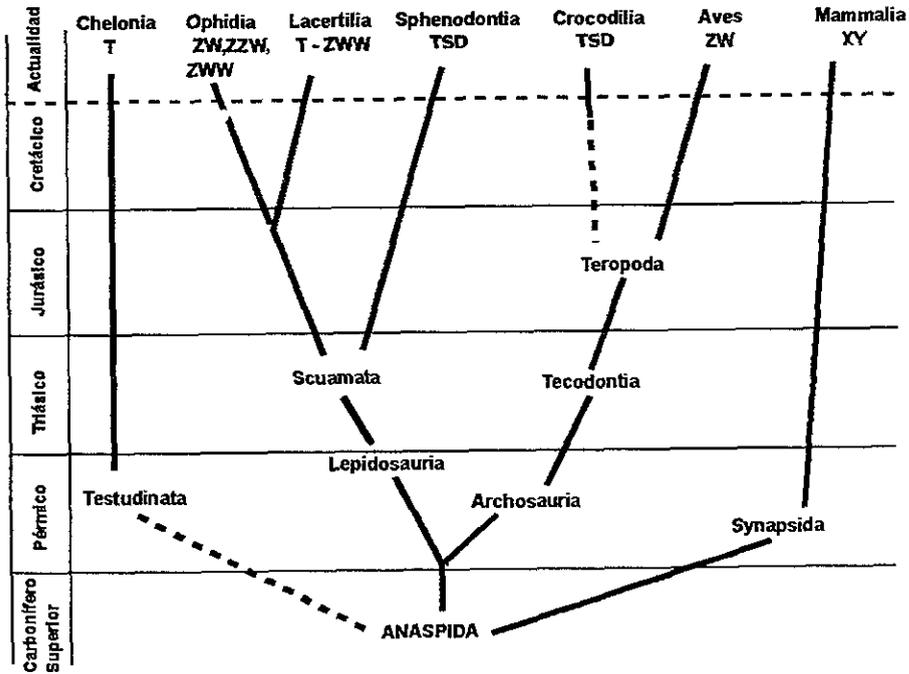


Fig. 5: Esquema de los grupos actuales de amniotos y los linajes en su evolución. Se muestran los distintos mecanismos de determinación sexual descritos por Janzen & Pautskits (1991). T= Todos los mecanismos (XY, XXY, XO, ZW, ZZW ZWW), TSD = Mecanismo ambiental de determinación sexual. Modificado de McFarland *et al.*, (1977).

El Sistema de Determinación Sexual Termodependiente (TDS) en Crocodylia

Los cocodrilos tienen cromosomas homomórficos, es decir, que no existen cromosomas morfológicamente distintos entre un sexo y otro. El mecanismo de determinación sexual en este grupo es del tipo TSD, lo cual implica que a una temperatura de incubación específica en un momento del desarrollo conocida como periodo termosensible de determinación sexual, se produce la determinación de un fenotipo sexual particular. Así, en los estudios realizados con *Alligator mississippiensis*, la temperatura masculinizante es de 33-34°C y la temperatura feminizante es de 30°C (Simith & Joss, 1993). Aunque se ha reportado que temperaturas arriba de los 35°C, producen el 95% de hembras pero arriba de esta temperatura la mortalidad de los embriones aumenta dramáticamente (Willow et al., 2001). La diferencia entre las temperaturas, produce un desarrollo asincrónico entre los sexos, en los machos el desarrollo completo dura 64 días y en las hembras 72 días. La diferenciación ovárica ocurre a los 40-45 días y la diferenciación de testículo a los 28-32 días (Fig. 6).

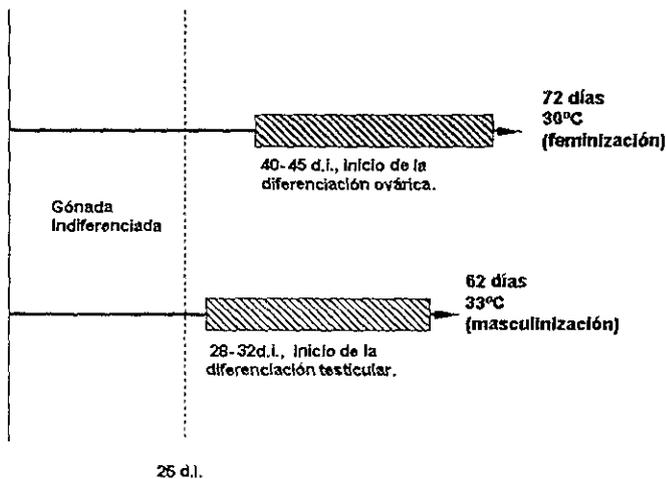


Fig. 6 Se representa la diferencia en el tiempo de desarrollo de *A. mississippiensis* a temperaturas feminizantes y masculinizantes. Los tiempos en que inicia la diferenciación sexual son también distintos.

Es importante mencionar que a pesar de que la determinación sexual se establece por la influencia del medio, la susceptibilidad al medio es una característica heredable y reproducible.

Los análisis moleculares enfocados al mecanismo de los cocodrilos, muestran varias similitudes con el de las aves que no comparten con los mamíferos. El gen SF1 esta asociado a la feminización, Dax1 no muestra preferencias por un sexo y la Amh se expresa antes que Sox9 (Western, *et al.*, 1999; Western, *et al.*, 2000). En este sistema se ha reportado que la aromatasa no participa en la determinación sexual pero sí en la diferenciación ovárica. Es decir que una vez que la temperatura ha establecido la feminización en el periodo termosensible, se produce un aumento en la biosíntesis de 17- β estradiol (Conley, *et al.*, 1997; Pieau, 1999; Willow, *et al.*, 2001). Los trabajos sobre el TSD de este y otros reptiles, han mostrado que la feminización se debe principalmente a la biosíntesis de esta hormona y la masculinización a los efectos de la testosterona y a la regulación positiva de Amh por Sox9 (Crews, 1993, 1994; Crews, *et al.*, 1994; Western, *et al.*, 2000)

Evolución del sistema ZW

Como se mencionó anteriormente, los sistemas de determinación sexual ZW de las aves y TSD de los cocodrilos se encuentran estrechamente emparentados, y se ha propuesto al mecanismo TSD como sistema ancestral del ZW (Janzen & Pautskits, 1991, Smith & Joss, 1993). Uno de los principales argumentos que apoyan esta idea, proviene del hecho que los cocodrilos presentan cromosomas homomórficos y el desarrollo del cromosoma heteromórfico (W) deriva de la degeneración de uno de los cromosomas. La evidencia de esto es la existencia de secuencias pseudoautosomales entre el cromosoma Z y el W, que no llevan a cabo el intercambio de alelos durante la meiosis (Graves & Reed, 1993; Marin & Baker, 1994). Siguiendo este razonamiento, se ha planteado que en los sistemas ZW, donde la condición heterocigótica es la feminización, el cromosoma W es un inductor del complejo aromatasa que cambia la balanza andrógenos/estrógenos (a/e) hacia la diferenciación ovárica. Por lo que, en una forma general, la evolución del sistema TSD al ZW implica la adquisición de un inductor de la

aromatasa sobre un sistema termodependiente (Bogart, 1987) y no necesariamente la eliminación del inductor termosensible.

Por otro lado, la evolución TSD al GSD implica una serie de cambios importantes en la biología del grupo, es decir que existen características ecofisiológicas asociadas al TSD que tuvieron que cambiar con la aparición del cromosoma W.

En reptiles con TSD se han propuesto al menos tres hipótesis para explicar las ventajas adaptativas de este mecanismo de determinación sexual (Shine, 1999):

- 1) El TSD persiste en los organismos por efectos de inercia filogenética, es decir que constituyen un carácter sin significado adaptativo.
- 2) El TSD evita la endogamia al producir nidos con un sólo sexo, si los lugares de anidación se mantienen en los grupos familiares como ocurre en organismos con filopatría.
- 3) El TSD está asociado a la adecuación diferencial, es decir que un sexo presenta mayor adecuación en ciertas condiciones relacionadas a la incubación, como la temperatura.

Así, se sugiere que la aparición del cromosoma W en un sistema reptiliano, implicó en cierta forma la independencia de la determinación sexual de un factor como la temperatura de incubación y por tanto modificaciones en la ecofisiología aviar. Por otro lado, si pensamos en una población con TSD donde la proporción sexual es 1:1 y en una fracción de esta se degenera un cromosoma que se vuelve capaz de determinar el sexo femenino, independientemente de la temperatura. Entonces se produciría un sesgo en la proporción sexual en favor a tener mas hembras, dado que unos lo hacen independientemente de la temperatura y otros lo siguen haciendo por la temperatura. De este modo, con un razonamiento simplista y sin considerar otras modificaciones en la biología de la población, parece lógico pensar que el cambio TSD al ZW trae como consecuencia modificaciones relacionadas con la proporción sexual y a su vez con fenómenos relacionados a esto como la selección sexual (Clutton-Brock, 1991)

III. Planteamiento del Problema

De los antecedentes expuestos, podemos proponer que el mecanismo de determinación sexual de las aves proviene de uno termodependiente, probablemente parecido al de los cocodrilos. En los que de manera general, la feminización se produce por un aumento en la biosíntesis del 17β -estradiol y la masculinización por la producción de andrógenos y AMH.

Por otro lado, el cambio TSD al ZW es parte de una serie de inovaciones importantes durante el Jurásico, como la adquisición de plumas y el aumento en la tasa metabólica, que permitieron la endotermia en el grupo de las aves. De tal forma que al cambiar del mecanismo TSD al ZW esto significó evitar la termosensibilidad en la biosíntesis del 17β -estradiol, lo cual pudo haber ocurrido de dos formas:

- 1) Enmascarar la termosensibilidad de la maquinaria feminizante en las aves por efectos de la endotermia y otros mecanismos de aislamiento térmico. Por lo que podríamos encontrar esta capacidad como un atavismo genético.
- 2) Eliminar la termosensibilidad por su incompatibilidad con el sistema, ya que de no ser capaz de mantener la temperatura interna del embrión en un intervalo adecuado, entonces mantener la termodependencia del sistema, constituiría un problema en función de que se podrían producir fenotipos sexuales revertidos.

De este modo, en la presente investigación se exploró la primer alternativa, dado que la segunda puede ser inferida si el atavismo genético no existe.

IV. Objetivo e hipótesis

Objetivo

Probar de manera experimental, la existencia del inductor termodependiente en el proceso de determinación sexual en las aves, usando como modelo a *Gallus gallus* de la cepa White Leghorn.

Objetivos particulares

- 1) Determinar si la producción de 17β estradiol, es afectada por la temperatura de incubación en hembras genéticas.
- 2) Establecer si un macho genético es capaz de producir 17β estradiol al variar la temperatura de incubación.

Hipótesis

Dado que la evolución del mecanismo de determinación sexual TSD a uno ZW puede implicar la existencia de un inductor termodependiente, que regule la cascada de feminización en las aves, en particular la actividad de la aromatasa. Entonces será posible invertir el sexo de la gónada de las aves, al ser cultivadas a distintas temperaturas, en un periodo crítico de la diferenciación sexual.

Así, si la termosensibilidad en el mecanismo existe y es parecida al de *A. mississippiensis*, una variación de ± 2 °C será capaz de feminizar a los machos genéticos y por tanto producirán 17β -estradiol. De igual forma, esto sucederá con las hembras genéticas y se predice una disminución en la producción de la hormona a una temperatura específica.

V. Material y Método

Se incubaron huevos fertilizados de *Gallus gallus* (White leghorn) libres de patógenos de la granja ALPES, durante siete días a 37.5°C y 80% de humedad. La edad de los embriones se estandarizó para el estadio 32 de acuerdo a la tabla de Hamilton y Burger (Apéndice 1, fig.7). En este estadio el proceso de diferenciación ha iniciado y es posible mantenerlo en cultivo organotípico (Jordanov & Angelova, 1984). Posteriormente se extrajeron y cultivaron las gónadas de los embriones en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar marca VELCO. El cultivo organotípico se realizó colocando a la gónada en un filtro millipore de 0.2 μm flotando en 0.5 ml de medio M199 suplementado (Apéndice 2), en un pozo estéril de 1 cm de diámetro. Se cultivó así durante cinco días dentro de una estufa con 5% de CO₂ y 80% de humedad a distintas temperaturas de cultivo de acuerdo al tratamiento a probar (variable independiente) que podían ser: 34, 37 o 40°C.

Se realizaron 250 cultivos en total (83 cultivos por tratamiento), al término de los cuales, se colectó el medio de cultivo. Los cultivos se agruparon de acuerdo al sexo genético, la posición de la gónada (izquierda o derecha) y al tratamiento de temperatura. Cada tratamiento de temperatura quedó representado por dos grupos de seis individuos para obtener el volumen necesario para la cuantificación de 17 β estradiol, mediante un análisis radio inmuno-ensayo con ¹²⁵I (Apéndice 3), la cual fue la variable dependiente.

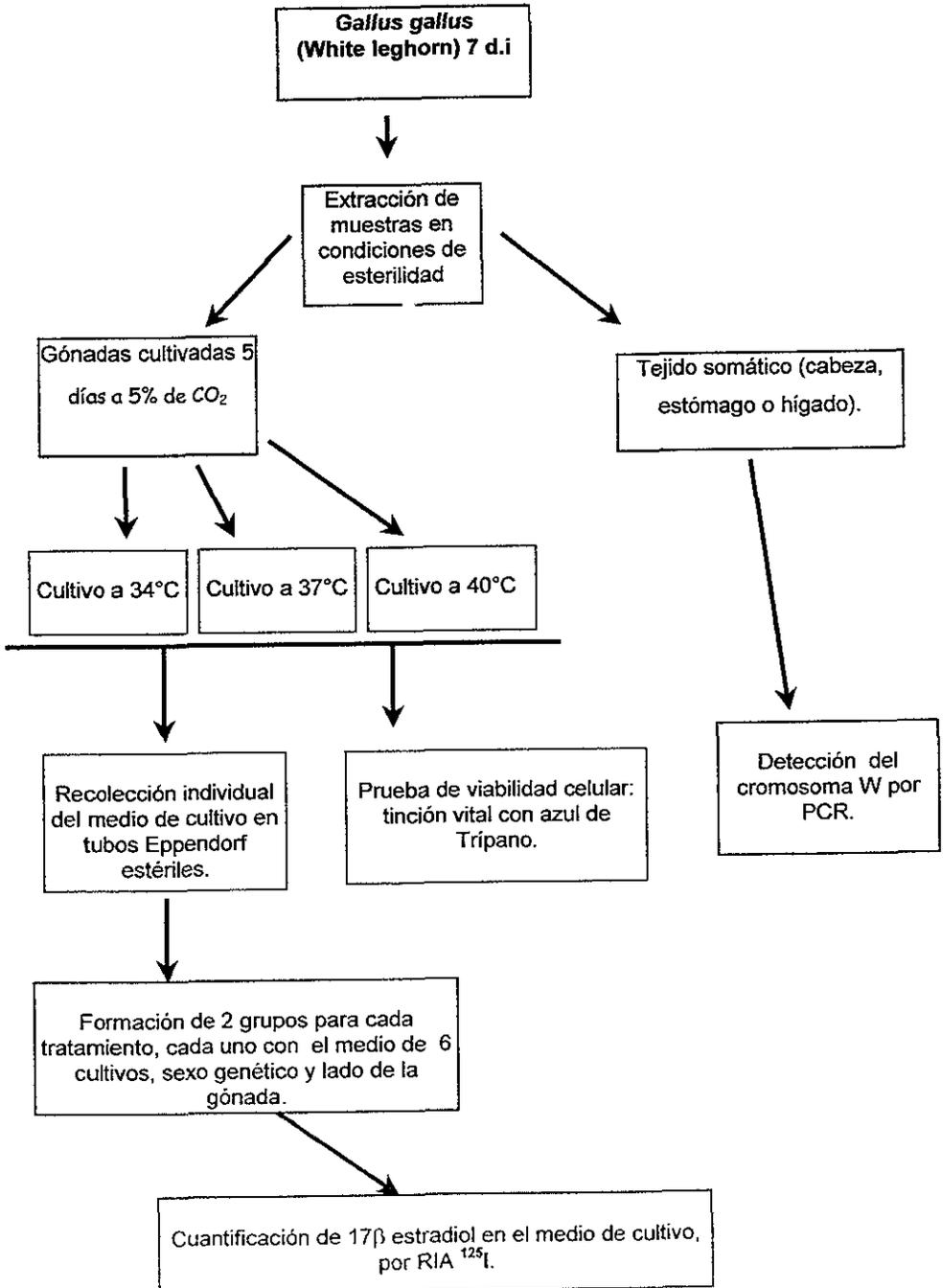
En el caso de los machos genéticos no fue posible hacer los grupos anteriormente descritos ya que la población de 250 cultivos presentó únicamente el 17% (= 43 cultivos) de machos genéticos. Por lo cual se optó por hacer dos para grupos cada tratamiento de temperatura cada uno de seis cultivos, sin importar el lado de la gónada, esto se hizo considerando que datos preliminares mostraban valores de 0 pg/ml de 17 β estradiol.

Para establecer si los datos mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamiento de temperatura. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía), para cada categoría. Posteriormente, se realizó una prueba Multi-Rango basado en la prueba de la diferencia menos significativa de Fisher, que permite distinguir cual de los tratamientos es distinto respecto a los demás. Lo anterior se realizó con el paquete estadístico Statagraphics Plus 5.0.

El sexo de los embriones, fue determinado por la detección del cromosoma W, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a M. Clinton en 1994 (Apéndice 4, fig. 8) usando tejido somático de cada uno, colectado durante la extracción de las gónadas.

Con el fin de excluir los cultivos no logrados, después de cada cultivo se realizó una prueba de viabilidad celular mediante una tinción con azul de tripano al 0.2% en solución salina al 0.7%, que es un colorante que se incorpora exclusivamente a las células muertas. De este modo se eliminaron del análisis a todos los cultivos que presentaron alguna tinción (Apéndice 5, fig. 9). Para observar la condición histológica de las gónadas cultivadas se realizó un análisis histológico de para cultivo a 37°C (Apéndice 6, fig.10).

Diagrama de flujo

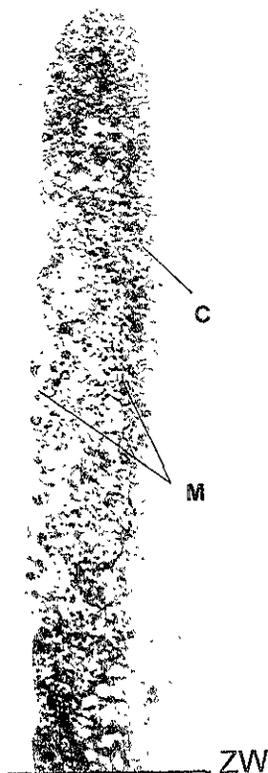


Resultados

transversales de gónadas izquierdas
en cultivo organotípico a 37 °C. Se
la médula (M) y la corteza (C) en
ión cromosómica (A) ZZ y (B) ZW.
za es mas abundante en las
(ZW) que en los machos (ZZ).



A.



B.

is histológico (Fig. 10) muestra la condición de las gónadas cultivadas a
n donde se observa, que si bien se ha mantenido la integridad
pica, al presentar corteza y medula, el desarrollo no concuerda con una
de 12 días (7 d.i + 5 días en cultivo). Esto es, que las gónadas
mas (ZZ) y femeninas (ZW) presentan ambos componentes (corteza y
como si se tratara de una gónada indiferenciada o en inicio de su
nacion a diferencia de lo reportado por Jordanov & Angelova en 1984.

Producción de 17β estradiol vs. temperatura

Ovario derecho

17β estradiol detectado en el medio de cultivo (pg/ml)

Temperatura (°C)	Grupo 1 (pg/ml)	Grupo 2 (pg/ml)	Promedio (pg/ml)	Varianza	Desviación Estandard
34	1.21033064	0.79905847	1.00469456	0.0845724	0.29081334
37	1.78448417	2.17026486	1.97737451	0.07441337	0.27278814
40	2.48140259	2.3379392	2.40967089	0.01029087	0.10144393

El ANOVA realizado para esta categoría muestra diferencias significativas ($F=18.35$, $P=0.0208$) indicando que la producción de 17β estradiol se comporta de manera dependiente de los tratamientos de temperatura probados con un 95% de confianza.

La prueba de Multi-Rango mostró las siguientes diferencias entre los distintos tratamientos:

Comparación entre los tratamiento	Diferencia	+/-
34 vs 37°C	-0.97268 *	0.755961
34 vs 40°C	-1.40498 *	0.755961
37 vs 40°C	-0.4332	0.755961

* = Las diferencias entre las medias son estadísticamente significativas con un 95% de confianza.

Lo cual muestra que el tratamiento estadísticamente distinto con respecto a los demás, es el de los 34°C.

Ovario izquierdo

17β estradiol detectado en el medio de cultivo (pg/ml)

Temperatura (°C)	Grupo 1 (pg/ml)	Grupo 2 (pg/ml)	Promedio (pg/ml)	Varianza	Desviación Estandard
34	0.76194801	0.81158842	0.78676821	0.00123208	0.03510107
37	2.00817275	1.29720273	1.65268774	0.25273918	0.50273172
40	3.92128251	6.35694474	5.13911362	2.96623108	1.72227105

(F= 9.89, P= 0.0478) Se considera que la producción de 17β estradiol es dependiente de la temperatura con un 95% de confianza.

Multi-Rango:

Comparación entre tratamientos	Diferencia	+/-
34 vs 37°C	-0.86592	3.29718
34 vs 40°C	-4.35235 *	3.29718
37 vs 40°C	-3.48643 *	3.29718

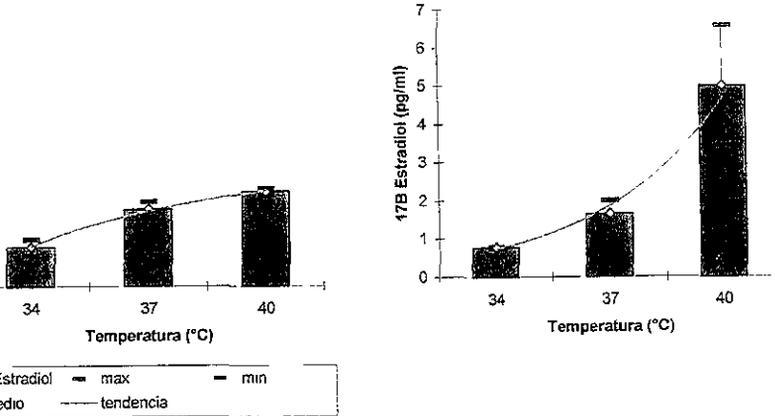
* = Las diferencias entre las medias son estadísticamente significativas con un 95% de confianza.

A diferencia de lo observado en el ovario derecho, no hay diferencias entre el tratamiento de los 34 y los 37°C; y el tratamiento más significativo en el análisis es el de los 40°C.

Testículo

Tratamiento (°C)	17β estradiol detectado en el medio de cultivo (pg/ml)
34	0
37	0
40	0

B)



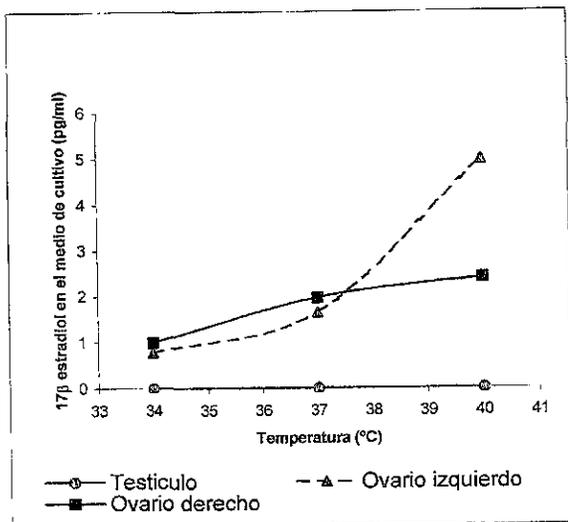
Síntesis de 17β estradiol vs. Temperatura

Se analizaron la concentración de la hormona (pg/ml) detectada en el medio de cultivo de los ovarios de ovario derecho y el efecto positivo en la biosíntesis de la hormona con respecto a la temperatura. A) ovario derecho, B) ovario izquierdo.

Las hembras genéticas, muestran se comportan de manera distinta con respecto a la temperatura de acuerdo a los análisis probados. En el caso del ovario izquierdo (Fig. 11-A) la cantidad de 17β estradiol producido aumenta con respecto a la temperatura pero este se vuelve 0 de acuerdo al análisis de varianza, que indica que no hay diferencias significativas entre el tratamiento de 37°C y 40°C. En cambio para el caso del ovario izquierdo (Fig. 11-B) se observó un aumento importante en el tratamiento de los 40°C, en donde se duplicó la cantidad de hormona con respecto al producido a los 37°C.

Comparación de las s (pg/ml vs. °C)

paran las tendencias
en la producción de
s de las tres categorías,
tres tratamientos de
ra.



observa en la fig. 12, al comparar los promedios, entre el ovario derecho
erdo, la tendencia es similar en los intervalos de 34 a 37 °C, pero a los 40
enta en el ovario izquierdo mientras que en el derecho se mantiene
La cantidad de hormona producida promedio a 40°C es de 5.13 pg/m en
izquierdo y de 2.41 pg/ml en el ovario derecho lo cual indica un
to del 100% para este tratamiento.

VII. Discusión

En la presente investigación, se evaluó el efecto de la temperatura en la biosíntesis de 17β estradiol durante la diferenciación sexual de *Gallus gallus*, tratando de encontrar una regulación termodependiente en un período crítico de la diferenciación sexual, reflejando el mecanismo ancestral TSD en las aves.

La primero que hay que considerar, es que de acuerdo con el análisis histológico (Apéndice 6 fig. 10) la diferenciación no se mantuvo en los cultivos, por lo que el experimento debe considerarse como un ensayo bioquímico y no como la continuación del proceso de diferenciación. A pesar de esto se obtuvieron datos interesantes respecto a la termodependencia en la biosíntesis de 17β estradiol.

Los resultados obtenidos, muestran que en los distintos tratamientos de temperatura, los machos no biosintetizan este esteroide o lo producen en cantidades no detectables por la técnica de RIA. Lo cual nos lleva a pensar que no es posible inducir la feminización de un macho en el intervalo de temperaturas probado.

En cambio, los experimentos con hembras genéticas muestran que las gónadas en cultivo son capaces de biosintetizar a la hormona en forma dependiente de la temperatura. Pero los ovarios en cultivo muestran distintos patrones de modulación, de acuerdo a su posición (izquierda o derecha), lo cual es una prueba de que la relación entre la temperatura y la biosíntesis de la hormona no se debe a un incremento de cinética enzimática por efecto de la temperatura, ya que de ser así, aun que la cantidad fuese distinta se obtendría el mismo comportamiento.

Para el ovario derecho hay un decaimiento en la actividad enzimática al acercarnos a los 34°C , pero a los 40°C no hay modificación por la temperatura. Este dato es relevante ya que en los experimentos de reversión sexual en *Gallus gallus*, se ha observado que el ovario derecho se diferencia en un testículo mientras que el ovario izquierdo forma una estructura denominada ovotesis, donde coexisten estructuras ováricas con testiculares (Merchant, 1978). Así, este fenómeno podría indicar la masculinización del ovario derecho aunque para afirmar esto se deben medir indicadores de la masculinización

En el caso del ovario izquierdo no se comprobó el mismo decaimiento, lo cual concuerda con lo anterior. Sin embargo, a diferencia del ovario derecho, se observó un efecto positivo de la temperatura sobre la biosíntesis de la hormona, que acaba con la duplicar su producción a los 40°C.

Esta diferencia coincide con el fenómeno de asimetría gonadal, la cual implica la existencia de células prefoliculares y su actividad endócrina, únicamente en la corteza del ovario izquierdo (Carlton & Stahl 1985). De acuerdo con los antecedentes, la aromatasa se expresa durante la feminización en la médula de los ovarios derecho e izquierdo y sólo en la corteza de éste último (Nakabayashi 1994), por lo que podemos proponer que la sobreproducción de estrógenos a los 40 °C, se debe a la actividad de la corteza izquierda que finalmente será la estructura que producirá el único ovario funcional.

De este modo, lo anterior hace considerar que la corteza izquierda produce 17 β estradiol de manera termosensible, pero que esto no participa en la determinación sexual, dado que no se pudo revertir el sexo de un macho genético. Así, la termosensibilidad en la actividad de la aromatasa se ha conservado, pero en algún momento de la evolución se rompió la relación con el proceso de determinación sexual.

Por otro lado, esto sugiere que la termosensibilidad en el ovario podría estar participando en otros fenómenos en la ontogenia, por ejemplo, se ha planteado que la cantidad de luz en las épocas migración y anidación en las aves adultas, produce un aumento en la esteroidogénesis y el tamaño del ovario (Connor, 1984), sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos, una aumento de 2°C en la temperatura corporal normal (37-38 °C), podría incrementar la esteroidogénesis del fenómeno. De tal forma, que al considerar que las épocas de anidación son generalmente las mas calurosas podemos plantear la alternativa de que la termosensibilidad en el ovario regule estos procesos.

Otro aspecto importante es la relación entre el aumento de estrógenos por la temperatura y la feminización del sistema nervioso. En reptiles con TSD se ha propuesto que las temperaturas feminizantes coinciden con una mayor biosíntesis

de estrógenos durante el desarrollo y la producción de hembras adultas conductualmente más receptivas al apareamiento (Crews, 1993; Crews, 1994). De tal forma que si la termosensibilidad se ha mantenido, el fenómeno puede ser similar en las aves, es decir que la temperatura de incubación podría estar generando hembras que en su edad adulta tendrían una conducta reproductiva menos estricta en la selección de machos. Ahora bien, al considerar que la temperatura de incubación depende principalmente del cuidado parental (Clutton-Brock, 1991), esto propone que las hembras con mayor adecuación serán aquellas cuya conducta mantenga a los nidos a mayor temperatura, dentro de un intervalo no letal.

Evidentemente lo anterior es una especulación un poco riesgosa ya que no se ha probado si la feminización del sistema nervioso en las aves es parecida a como ocurre en reptiles con TSD. O bien si el cuidado parental es suficiente para mantener la temperatura del huevo estable. Se ha reportado que si la temperatura del nido baja, el embrión es capaz de llamar la atención de los padres, promoviendo su calentamiento (Evans, 1989). Sin embargo, cuando esto sucede, el periodo crítico de la diferenciación sexual ya ha ocurrido.

Otro aspecto no considerado es si la cantidad de la hormona tiene efectos letales en el embrión y de ser así entonces se plantean otros tipos de regulación ecofisiológica en contra del sobrecalentamiento.

Así se demuestra que en la embriología de las aves, o al menos en el modelo experimental, persiste una relación estrecha entre la temperatura y la feminización que podría tener efectos importantes en la biología aviar. Planteándonos que a pesar de ser sistemas endotermos, éstos siguen siendo susceptibles a cambios en la temperatura y hace considerar que dentro de 100 años cuando la temperatura en la superficie terrestre sea 4°C mayor, podría haber cambios importantes que no han sido contemplados.

VIII. Conclusiones

De acuerdo a las predicciones probadas se concluye que:

- 1) La gónada de los machos genéticos no es capaz de producir 17β estradiol por efecto de los tratamientos de temperatura probados en este estudio, $34-40^{\circ}\text{C}$.
- 2) La gónada de las hembras genéticas, conservan la termosensibilidad en la producción de 17β estradiol por el ovario funcional (izquierdo).
- 3) Se sugiere la masculinización del ovario derecho al bajar la temperatura hacia los 34°C ; lo cual no sucede para el ovario izquierdo.
- 4) En el mecanismo de determinación sexual de las aves, la temperatura no es capaz de inducir la biosíntesis de 17β - estradiol en un individuo ZZ pero si de modularla en uno ZW.

Metas a futuro

- Los datos anteriores deben ser cotejados con un análisis histológico y con la expresión de genes marcadores de la diferenciación sexual.
- Lo observado en los cultivos de ovario a 40°C deben ser comparados con datos cuantitativos de proliferación celular y por histología para esclarecer si el aumento en la biosíntesis de la hormona, depende del aumento en la proliferación de células de la corteza o en la acción de la aromatasas.
- Aunque la viabilidad celular es muy baja, es importante probar la temperatura de 30°C para evaluar la feminización de los testículos en una modalidad similar a *A. mississippiensis*, ya que la disminución de la hormona a los 34°C podría indicar la masculinización en una modalidad parecida a la de los cocodrilos.
- Observar la importancia de la relación entre la temperatura y la biosíntesis de estrógenos con la ecofisiología de las aves.

Índices

Índice 1

estandarizada de acuerdo al estadio 32 de Hamilton y



Tabla de Hamilton & Burger



Estadio de trabajo 7 d.i.

Se muestra el estadio de desarrollo con que se trabajó y que corresponde a
estadio 32. Tomado de Hamilton & Burger

Apéndice 2

Medio M199 suplementado

Medio M199	100ml
NaHCO ₃ 7.5%	2.9ml
HEPES 2M	1.25ml
Piruvato de Sodio 11mg/ml	1ml
Penicilina/streptomina	0.5ml
L-Glutamina 200mM	1ml

El medio M199 contiene colesterol el cual sirve de sustrato para la biosíntesis de hormonas esteroides

Apéndice 3

Radio Inmuno-ensayo para 17 β estradiol

La técnica de RIA fue desarrollada en 1960 por S.A. Berson y Rosalyn Yalow, para determinar los niveles de insulina en diabéticos. El principio del RIA se basa en la afinidad antígeno anticuerpo en una reacción que sigue la ley de acción de masas. Un anticuerpo de alta afinidad (Ab) se unirá con la misma eficiencia a su antígeno marcado radiactivamente (Ag*) o a uno no marcado (Ag) y entonces los antígenos (Ag* y Ag) se unirán al anticuerpo proporcionalmente a su concentración. Así, cuando conocemos la cantidad de Ag* y Ab en la reacción y agregamos una cantidad de muestra con antígeno desconocido. Este competirá por reaccionar con el antígeno con una fuerza proporcional a su concentración. A su vez, entre mas reacciones Ag-Ab ocurran, menores serán las reacciones Ag*-Ab, es decir que la marca radioactiva (cpm) en el pozo decrecerá de manera inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. Generalmente se utiliza la marca radioactiva de un isótopo emisor de rayos gamma como el 125I.

Para este caso se utilizó un paquete RIA 125I para estrógenos totales, marca ICN modelo: 07140202 y la marca radioactiva se midió con un contador gamma ICN.

Construcción de la curva standard

La cuantificación de antígeno en el medio, se produce de la comparación de los datos de las muestras con una curva standard. La cual se construye agregando gradientes de concentraciones conocidas de antígeno en reacción con el Ag* y el Ab y cuantificando la marca con un contador gamma. En nuestro ensayo, el Ag usado fue 17 β estradiol en las siguientes concentraciones:

17 β -Estradiol (μ g en 0.5ml de solución)	0.025	0.050	0.100	0.350	0.500	0.700	1.000	2.500
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Las cpm leídas en el contador gamma se transformaron a porcentajes contemplando la especificidad de la reacción. A esto se le llama porcentaje de unión al Ag^* (%B/Bo) y se calcula bajo la formula:

$$\%B/Bo = \frac{cpm (M) - cpm C}{cpm (S0) - cpm C} \times 100$$

M = muestra

C = control, cuantificación de unión no específica (Ag^* sin Ab ni Ag)

S0 = standard cuando $Ag = 0$ ($Ag^* + Ab$), corresponde a la unión máxima de Ag^* .

Nota: Ag^* y Ab son cantidades conocidas.

Al graficar %B/Bo vs. concentración de Ag, se obtiene una curva para la cual debemos calcular su ecuación. Dado que la relación fue de tipo exponencial se graficó en papel semi-log (%B/Bo vs log Ag) y se ajustó la recta con una regresión lineal.

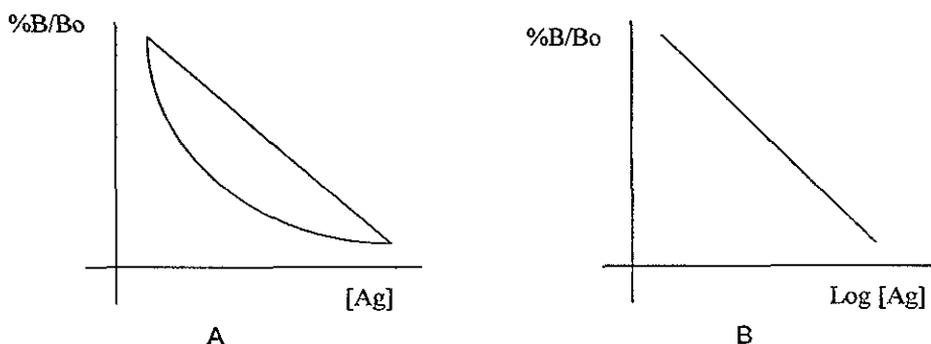


Fig : (A) es un tipo de curva que no se ajusta a una recta de manera directa por lo que se recomienda cambiar la variable [Ag] por log [Ag] (B). Como la relación no siempre es lineal y depende de factores como la temperatura de incubación, es necesario que la curva patrón abarque todo el rango de datos para la muestra ya que una extrapolación podría no ser cierta. Por esta razón se recomienda hacer una curva estándar por cada ensayo que se realice.

la región específica. Se utiliza una DNA polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* ya que soporta las temperaturas de desnaturalización.

Extracción del DNA

Se homogenizó el tejido con un pistilo de teflón y 0.3 ml de SET buffer por cada 0.3g de tejido. Se agregaron 15µl de SDS al 10% y 3µl de Proteinasa K (10mg/ml). Se incubó a 60 °C durante 2 horas y se centrifugó a 12,000 rpm / 15 min a 4 °C. Se hizo una dilución 1:50 con 10µl del sobrenadante + 490µl de agua desionizada estéril.

Amplificación del cromosoma W por PCR:

2.5µl de la solución (1:50) se colocaron en tubos para PCR. El DNA contenido en la solución, se desnaturalizó sometándolo 5min a 94 °C en un thermocycler marca Perkin Elmer Cetus MOD:9600.

Se preparó la siguiente MASTER MIX con reactivos de la casa Perkin Elmer y dNTPs de Boherringer Mannheim:

H ₂ O desionizada estéril	(3.9µl) (x)
Buffer II 10x sin MgCl ₂	(1µl) (x)
DNTPs 10mM por cada base (A,G,T,C)	(0.2 µl) (x)
Oligo W3	(0.4µl) (x)
Oligo W5	(0.4µl) (x)
Taq polimerasa 5 U/µl	(0.5µl) (x)
MgCl ₂ 25 mM	(1.5µl) (x)

Oligos sacados de Clinton M. (1994):

W5= 5'CCCAAATATAACACGCTTCACT3'

W3= 5'GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC3'

Posteriormente se agregaron 7.5 µl de Master Mix a cada muestra y se corrió en el siguiente programa en el thermocycler:

Programa de amplificación

94 °C (30s)	20 ciclos +	94 °C (30s)	1 ciclo
60 °C (30s)		60 °C (30s)	
72 °C (30s)		72 °C (5min)	

Detección por electroforesis, de los productos del PCR

El producto del PCR se observó con una electroforesis a 110V en gel de agarosa al 2% y Buffer TBE. Los productos se diluyen en amortiguador de carga (azul de bromofenol+glicerol) en una proporción de 2 μ l de amortiguador : 5 μ l de producto. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio por 10min en solución 4 μ l : 50ml de H₂O y se observó a luz UV.

de eliminación por viabilidad celular

**Fig. 9**

Gónada de 7 d.i. en cultivo organotípico por cinco días. La tinción con azul de tripano muestra una región de muerte celular en la parte central de la gónada. Las gónadas que no presentaron ninguna tinción después de ser tratadas con este colorante, fueron incluidas en la cuantificación de 17β estradiol.

Apéndice 6

Análisis histológico

Para observar la morfología en temperatura normal de cultivo (37°C) se hicieron cortes semifinos en EPON. La preparación de la muestra consta de cuatro etapas: Fijación, Deshidratación, Impregnación e Inclusión. Y después se cortó el tejido en un ultramicrotomo.

Fijación

Se fijó el tejido con Karnovsky durante una hora al menos, (4°C). Se lavó con buffer de Cacodilato de Sodio 0.1M durante 1hr (4°C). Se hizo una tinción sumergiendo el tejido en Tetraóxido de Osmio (OsO₄) Zelterqust al 1% durante 1 hora (4°C) y se lavó tres veces con agua destilada.

Soluciones de Deshidratación:

Solución	# de Cambios	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
EtOH 70%	3	10	25
EtOH 80%	3	10	25
EtOH 90%	3	10	25
EtOH 95%	3	10	25
EtOH 100%	6	20	25
Oxido de propileno	2	20	25

Impregnación

Se hizo (25°C) bajo la luz de una lámpara para evitar la hidratación:

EPON: Oxido de propileno 1:1 1hr

EPON: Oxido de propileno 2:1 1hr

EPON puro 24 hrs

Inclusión

Se relleno el molde de EPON con la muestra orientada y la etiqueta, dejando polimerizar 24hrs en una estufa a 60°C.

La proporción de reactivos utilizada fue:

7.0ml A + 3.0ml B + 0.15ml DMP-30 (catalizador)

Solución A:		Solución B:	
Medcast (EPON)	50ml	Medcast (EPON)	50ml
DDSA	81ml	NMA	44ml

X. Referencias

- ✚ Abinawanto, Shimada K, Yoshida K, Saito N. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17 alpha) and P450 arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *General and Comparative Endocrinology*;102 (2):241-6. May (1996).
- ✚ Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. 2a ed. (1989).
- ✚ Andrews J. E., Smith C. A. & Sinclair A. H. Sites of Estrogen Receptor and Aromatase Expression in the Chick Embryo. *General and Comparative Endocrinology* 108, 182-190 (1997).
- ✚ Baulieu E. & Kelly P. *Hormones, from molecules to disease*, Herman Publishers New York 1990.
- ✚ Bergstrom D., Young M., Albrecht K. & Eicher E., Related Function of Mouse SOX3, SOX9 and SRY HMG Domains Assayed by Male Sex Determination. *Genesis* 28: 111-124 (2000).
- ✚ Bogart, Mark H. Sex Determination: A Hypothesis Based on Steroid Ratios. *Journal of theoretical Biology* 128,349-357 (1987).
- ✚ Burns R.K., Role of hormones in the differentiation of sex. En Young W.C. ed. *Sex and internal secretions*. Baltimore: Williams & Wilkins, 76-158 (1969).
- ✚ Campbell, *Biology*. 3ª edición The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. New York (1993).
- ✚ Capel B. The role of Sry in cellular events underlying mammalian sex determination. *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 32 Editor. Roger H. Pedersen & Gerald P Schatten. Academic Press Inc. New York (1996).
- ✚ Carlton N. & Stahl A. Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archives in Anatomy Microscopy and Morphological Experiments*. Tomo 74, nº 1 pp. 52-59 (1985).
- ✚ Clinton M. & Haines L.C. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 876-886 (1999)
- ✚ Clutton T. *The evolution of parental care*. Princeton University Press, New Jersey (1992).

- ✚ Connor R. O., *The Growth and Development of Birds* ed. John Wiley & Sons, New York, (1984).
- ✚ Cooke F. & Buckley P.A. *Avian Genetics and Ecological Approach*. Academic Press, London (1987).
- ✚ Crews D. Temperature, steroids and sex determination. *Journal of Endocrinology* 142, 1-8 (1994).
- ✚ Crews D. The Organizational Concept and Vertebrate without Sex Chromosomes. *Brain Behaviour and Evolution*. 42:202-214 (1993).
- ✚ Crews D., Bergeron J.M., Bull J.J., Flores D., Tousingnant A., Skipper J.K. & Wibbels T. Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles: Proximate Mechanisms, Ultimate Outcomes, and Practical Applications. *Developmental Genetics* 15:297-312 (1994).
- ✚ Darwin C., *On the origin of the species by means of natural selection, or the preservation of favored races in the struggle for life*. (1859) Trad. José P. Franco, Ed. Grijalbo (1992).
- ✚ Emmanuelle O., Claude P., Marie-Genevieve M., Nathalie J., Jean-Yves P., Danièle C. & Solange M. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Developmental Dynamics* 212:522-532, (1998).
- ✚ Evans R.M. Egg temperatures and parental behavior during the transition from incubation to brooding in american white pelican. *The Auk* 106: 26-33 (1989).
- ✚ Foster, J. W. *et al*, Campomielinic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372, 525-530 (1994).
- ✚ Willow W., Bruce B., Stacy S., Allen P. & Valentine L., Alligator Aromatase cDNA Sequence and its Expression in Embryos at Male and Female Incubation Temperatures. *Journal of Experimental Zoology* 290:439-448 (2001).
- ✚ Gilbert S. *Developmental Biology*, Sinauer Associates Inc. Publishers Soundeland Massachusetts USA, (2000).
- ✚ Gould S. J. *Ontogeny and phylogeny*. The Belknap press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, London, England (1977).
- ✚ Gould S. J., *Dientes de gallina y dedos de caballo*. Ed. Drakontos, España. 1995.

- ✚ Graham H., May R. M. & Pendleton L. Environmental determination of sex in reptiles. *Nature* Vol. 329 19 September (1987).
- ✚ Haffen K. Sex differentiation of Avian gonads in vitro. *American Zoology*, 15: 257-272 (1975).
- ✚ Holland P.W., The future of evolutionary developmental biology. *Nature* Dec 2;402 (1999) (6761, Suppl:C41-4)
- ✚ Hutson J., Ikawa H. & Donahoe P.K. The Ontogeny of Müllerian Inhibiting Substance in the Gonads of the Chicken. *Journal of Pediatric Surgery*. 16: 6 December (1981).
- ✚ Janzen F.J. & Paukstis G.L. Environmental sex determination in reptiles. *Nature* Vol. 332, 28 April (1988).
- ✚ Janzen F.J. & Paukstis G.L. Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution and Experimental Design. *The Quarterly Review of Biology*. 66, No 2 Jun (1991).
- ✚ Jordanov & Angelova P. Effects of steroid sex hormones on chick embryo gonads in organ culture, with special reference to hormonal control of gonadal sex differentiation. *Reproduction Nutrition Development*, 24 (3). 221-233. (1984).
- ✚ Kent J, Wheatley S. C., Andrews J. E., Sinclair A. H. & Koopman P., A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 9, 2813-2822 September (1996).
- ✚ Kettlewell J. R., Raymond C. S. & Zarkower D. Temperature-Dependent Expression of Turtle Dmrt1 Prior to Sexual Differentiation. *Genesis* 26: 174-178 (2000).
- ✚ Kuby J. Immunology. Freeman & Co. 2^{ed} New York. (1994)
- ✚ Limborg Van J., Le premier indice de la différenciation sexuelle des gonades chez l'embryon de poulet. *Archives d'Anatomie microscopique*, Tome 57, 1: 79-90 (1968).
- ✚ Lofts B. & Murton R. K. en *Avian Biology* (ed. Farmer D. S. & King J. R.) Vol. 3, Cap 1. Academic Press, (1973).
- ✚ Lovell- Badge, R. & Hacker, A. The molecular genetics of Sry and its role in mammalian sex determination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci.* 305: 205-214 (1995).

- ✚ MacLaughlin D., Hutson J. & Donahoe P. Specific estradiol binding in embryonic Müllerian ducts: A potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology* vol. 113 No. 1. U.S.A. (1983)
- ✚ Marín I. & Baker B. S. The Evolution Dynamics of Sex Determination. *Science* 281: 25 September (1998).
- ✚ Marshal J. A. & Graves M., Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *BioEssays* 20: 264-269 (1998).
- ✚ McElreavey K. & Fellous M. Sex Determining Genes. *TEM* 8: 9 342-346 (1997).
- ✚ McFarland W. N, Pough F. H, Cade T.J & Heiser J. B. Vertebrate Life. Mcmillan Publishing Co. Inc. New York. (1979).
- ✚ McKeown M. Sex Determination and Differentiation. *Developmental Genetics*. 15: 201-204 (1994).
- ✚ Merchant-Larios H. en *The Vertebrate Ovary, Comparative Biology and Evolution* (ed. Jones R.) Cap 2., Plenum press, New York, (1978).
- ✚ Mittwoch U. Sex determination in Birds and Mammals. *Nature* vol. 231 June 18 1971.
- ✚ Mittwoch U. Sex-determining mechanisms in animals. *TREE Reviews* Elsevier Science vol. 11. No. 2 February (1996).
- ✚ Morais-da-Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A. & Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics* 14. September, (1996).
- ✚ Morato T., Biosíntesis y Metabolismo de los Estrógenos, en: Reproducción, Ed. Edgard Cobo, Guillermo Lopez Escobar & Gregorio Pérez Palacios, CCRP, Bogotá Colombia (1979b).
- ✚ Morato T., Regulación Neuroendocrina de la función Gonadal Masculina, en: Reproducción, Ed. Edgard Cobo, Guillermo Lopez Escobar & Gregorio Pérez Palacios, CCRP, Bogotá Colombia (1979a).
- ✚ Nakabayashi O , Kikuchi H. & Mizuno S. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *Journal of Molecular Endocrinology* 20, 193-202. Great Britain. (1998).

- ✚ Nishikimi H, Kansaku N, Saito N, Usami M, Ohno Y & Shimada K. Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Molecular Reproduction Development*.;55(1):20-30. Jan (2000).
- ✚ Omar Granados Portillo. Papel del factor IGF-I en la producción de esteroides en las células de la granulosa en el ováριο del raton *Mus musculus*. Tesis de licenciatura para QFB de la UNAM. México D.F. (1996).
- ✚ Pedernera E, Solis L, Peralta I, Velázquez PN. Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *General and Comparative Endocrinology*. Nov;116(2):213-20 (1999).
- ✚ Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell and Molecular Life Sciences*. Jun;55(6-7):887-900.
- ✚ Qiang J., Curris P. Norell M. & Shu-an J. Two feathered dinosaurs from northeastern China. *Nature*. Vol. 393, 25 June. (1998)
- ✚ Raff R.A. The Shape of Life, Genes, Development and the Evolution of Animal Form. The University of Chicago Press. Chicago (1996).
- ✚ Rashedi Par M. & Maraud R. Secretion of the Anti-Müllerian Hormone by Gonads of Experimentally Sex Reversed Female Chick Embryos. *General and Comparative Endocrinology* 65: 87-91 (1987).
- ✚ Raymond C. S., Kettlewell J. R., Hirsch B., Bardwell V. J. & Zarkower D. Expression of Dmrt1 in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development. *Developmental Biology*. 215, 208-220 (1999).
- ✚ Raymond O. Connor, The Growth and Development of Birds (John Wiley & Sons, New York, (1984)
- ✚ Sheldon J. Segal Sexual differentiation in Vertebrates. The Origin and Evolution of Sex. Editores: Harlyn O. Halvorson & Alberto Monroy. *MBL Lectures in Biology*. Vol. 7. New York. (1984).
- ✚ Shimada K. Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *Journal of Experimental Zoology*. 1;281(5):450-6. Review. Aug (1998).
- ✚ Shine Richard. Why is sex determined by nest temperature in many reptiles? *TREE* 14(5) May (1999).

- ✚ Smith C. A., Smith M. J., Sinclair A. H., Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234, 395-402 (1999).
- ✚ Smith C., Andrews J. & Sinclair A. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: Expression of estrogen receptor and aromatase genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 60, No. 5-6, pp. 295-302. Great Britain. (1997)
- ✚ Smith Craig A. & Joss Jean M.P. (1993) Temperature-Dependent Gonadal Differentiation in the Alligator, Cap 2. Sex Chromosomes and Sex determining Genes.
- ✚ Vilain E & McCabe E. R. B. Mammalian Sex Determination: From Gonads to Brain, *Molecules Genes and Metabolism* 65, 74-84 (1998).
- ✚ Villalpando I., Sanchez-Brigas G., Sánchez-Vargas, Pedernera E. & Villafan-Monroy H. The P450 Aromatase (P450arom) Gene Is Asymmetrically Expressed in a Critical Period for Gonadal Sexual Differentiation in the Chick. *General and Comparative Endocrinology* 117, 325-334 (2000).
- ✚ Wagner, T. *et al* Autosomal sex reversal and campomielinic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111-1120 (1994).
- ✚ Western P. S., Harry J. L., Graves J. A. M. & Sinclair A. H. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241, 223-232 (2000).
- ✚ Western P. S., Harry J. L., Graves J. A. M. & Sinclair A. H. Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator: AMH Precedes SOX9 Expression. *Developmental Dynamics*. 216: 411-419 (1999).
- ✚ Wistschi E., Development of vertebrates. W. B. Saunders, 1956 , 588 p Philadelphia.
- ✚ Woods J. & Ertan L. The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo *General and Comparative Endocrinology*. Nov;36(3):360-70 (1978)
- ✚ Woods J. & Podczaski. Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology* 24, 413-423 (1974).
- ✚ Yoshida K, Shimada K, Saito N. Expression of P450(17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual

differentiation. *General and Comparative Endocrinology*.;102 (2):233-40. May (1996).

✦ Yvette W.A. Jeske, Yuji Mishina, Donna R. Cohen, Richard R. Behringer & Peter Koopman Analysis of the Role of Amh and Fra1 in the Sry Regulatory Pathway. *Molecular Reproduction and Development* 44: 153-158 (1996).