

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**Facultad de Ciencias**

**"ESTUDIO DEL OVIDUCTO DE POLLOS RECIEN NACIDOS TRATADOS  
PRENATALMENTE CON ESTRADIOL Y TESTOSTERONA"**

**T E S I S**  
Que para obtener el Título de  
**B I O L O G O**  
P r e s e n t a

**LILIANA DEL P. SOTELO SALAS GARCIA**

**México, D. F.**

**1985**



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 está 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.

# I N D I C E ,

Resumen.	1
Introducción.	2
I.- Histología del oviducto.	3
II.- Desarrollo del oviducto.	16
III.- Hormona antimülleriana.	20
IV.- Aparición de las células esteroidogénicas.	22
Material y Método.	25
I.- Técnica para proteínas totales. Método de Lowry.	28
II.- Técnica para microscopía electrónica.	29
a).- Fijación.	29
b).- Deshidratación.	29
c).- Inclusión.	30
Resultados.	31
Discusión.	53
Conclusiones.	60
Bibliografía.	62.

## R E S U M E N .

Conociendo que el oviducto del pollo adulto es un órgano efector de las hormonas esteroides y basándonos en experimentos que demuestran la existencia de receptores a estradiol en el oviducto de embriones de pollo de 15 días de incubación, nos propusimos investigar los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen en el oviducto de pollo recién nacido, tratado con estradiol y testosterona durante la última semana de incubación.

Se inyectaron embriones de pollo con diferentes dosis de  $17\beta$ -estradiol (10-400 ng./embrión), sobre la membrana corioalantoidea, a los 15 y 17 días de incubación. Dentro de las primeras 24 horas de vida postnatal se sacrificaron los animales, se disecó el oviducto izquierdo, se registró el peso húmedo, el peso seco y se cuantificó el contenido de proteínas totales. Para el estudio morfológico se fijaron fragmentos de útero y magnum en glutaraldehído al 2.5% y se incluyeron en resinas epóxicas.

Los resultados muestran que con dosis de 200 ng. de estradiol se produce un aumento en la concentración de las proteínas corregidas por mg. de tejido y una disminución del peso húmedo y peso seco de este órgano.

Los estudios morfológicos permiten observar que el tratamiento con estradiol produce un aumento en la altura del epitelio de la mucosa uterina, con un inicio precoz de la formación de criptas epiteliales y una hipertrofia de las células de la lámina propia. Un fenómeno similar se observa en el magnum, con un aumento en la altura del epitelio e inicio de la formación de glándulas.

La testosterona no produce un aumento en la concentración de las proteínas del oviducto, de igual forma carece de efecto en la morfología del epitelio de la mucosa uterina.

Los resultados nos permiten concluir que el oviducto del pollo es un órgano efector del estradiol en la etapa prenatal y que este tratamiento aumenta la cantidad de proteínas y produce una citodiferenciación de la mucosa, en forma similar a lo descrito en la etapa adulta.

## I N T R O D U C C I O N .

## I.- HISTOLOGIA DEL OVIDUCTO.

El oviducto es un ducto muscular altamente circunvolucio- nado el cual se encarga de transportar al huevo hacia el exterior\_ así como de la deposición del albumen, membranas y cubiertas sobre éste para quedar terminado. Dentro del oviducto se lleva a cabo - la fertilización del huevo. El oviducto se encuentra suspendido en el lado izquierdo de la cavidad abdominal por un ligamento dorsal\_ y una membrana peritoneal delgada que se encuentra anexa dorsalmen- te a la superficie interna de la cavidad abdominal y ventralmente\_ a la superficie superior del oviducto, extendiéndose caudalmente - de la región de la 4° costilla torácica a la región de la cloaca -- (Bradley y Grahame, 1960). Figura 1.

El oviducto consta de cinco regiones específicas que son: el infundíbulo, el magnum, el istmo, la glándula secretora o útero y la vagina. Cada una de estas regiones posee la misma estructura\_ básica pero el desarrollo de las distintas capas varía de región a región.

La estructura de la pared del oviducto está compuesta de 7 capas: una exterior constituida por el epitelio peritoneal; dos\_ capas de músculo liso (una longitudinal externa y otra circular in- terna); con una capa intermedia de tejido conectivo en la cual ya- cen grandes vasos sanguíneos; una capa de tejido conectivo interna al músculo circular; una lámina propia que contiene glándulas en - la mayoría de las regiones del oviducto; y un revestimiento epite- lial interno. La mucosa, que consiste de las dos capas internas, - frecuentemente posee una considerable complejidad, la cual está re- presentada por pliegues bien desarrollados. Los límites de las sub- divisiones del oviducto se establecen principalmente mediante un - criterio macroscópico externo, pero finalmente se determinan me--- diante cambios en la estructura de las glándulas tubulares (Richar- dson, 1936).

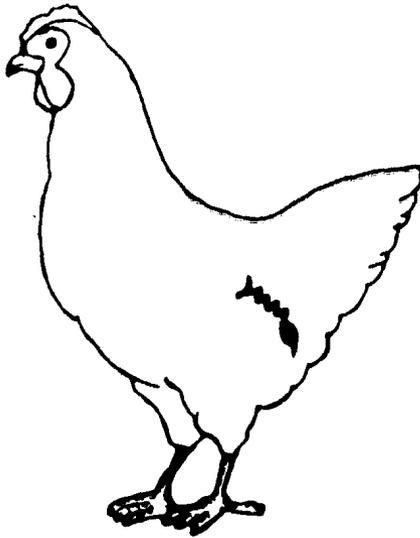


Figura 1. Diagrama que ilustra la posición del oviducto en una gallina adulta,

#### EL INFUNDIBULO.

##### Anatomía

El infundíbulo se subdivide en dos regiones; el embudo y el cuello. El primero consiste de una abertura de paredes delgadas, el cual adquiere una forma plana en la dirección dorsoventral con sus labios ensanchados y encontrándose en estrecha proximidad al ovario. Las paredes del embudo convergen rápidamente para formar el cuello infundibular, que es un tubo estrecho de paredes delgadas, el cual aumenta rápidamente de tamaño y grosor para formar el magnum.

En el embudo, aparecen bordes bajos orientados longitudi-

nalmente y aumentan en profundidad conforme éste se aproxima al cuello. No obstante que la superficie y los laterales de estos bordes están recubiertos por células ciliadas, grupos de células secretoras no ciliadas se encuentran en las bases de los canales y entre los bordes. A dichos canales Surface (1912) les ha denominado canales glandulares.

Dentro del cuello del infundíbulo, los bordes longitudinales un tanto orientados espiralmente, aumentan en profundidad y aparecen pliegues secundarios pequeños sobre los bordes primarios. En este momento los paquetes de fibras musculares se acomodan para formar capas circulares y longitudinales no muy bien definidas. En el extremo posterior del cuello donde el infundíbulo se une al magnum, tanto las capas musculares como las mucosas aumentan en grosor como en complejidad.

#### Histología de la mucosa.

Aitken y Johnson (1963) describieron cuatro tipos de células epiteliales en la mucosa del oviducto. A saber:

- Células ciliadas no secretoras. Ubicadas principalmente en la superficie del epitelio.
- Células caliciformes no ciliadas, Secretoras de mucus y ubicadas entre las células ciliadas,
- Células secretoras de mucus. Ubicadas principalmente en el fondo de los canales y en medio de los bordes adyacentes. Estas son las células secretoras de los canales glandulares. Estas células no son ciliadas.
- Células glandulares tubulares. Las cuales revisten a las glándulas tubulares de la parte caudal del infundíbulo.

Las células ciliadas son células columnares con núcleos ovals situados centralmente (Aitken y Johnston, 1963) o con núcleos ovals situados apicalmente (Wyburn et al. 1970 b). La superficie a-

pical de la célula se encuentra provista de cilios y en ocasiones - de microvellosidades, así como de procesos citoplásmicos de ramificaciones complejas (Aitken y Johnston, 1963). Grandes mitocondrias - tienden a estar concentradas alrededor de las raíces de los cilios. El complejo supranuclear de "Golgi" consiste de sáculos aplanados, - vacuolas esféricas y numerosas vesículas pequeñas. Se encuentran ri bosomas libres esparcidos en toda la célula. Perfiles de retículo - endoplásmico rugoso se ven ocasionalmente en el citoplasma basal. - Una característica de estas células es un patrón concéntrico de pa- quetes de material fibroso con relación a la apariencia apical y la teral del núcleo (Wyburn et al. 1970 b).

En las células caliciformes, el núcleo oval casi esférico es basal, y la porción apical de la célula se encuentra hinchada - debido a un material granular, el cual frecuentemente se proyecta o penetra en el lumen en forma de ampolla o burbuja,

No obstante que los estudios en el microscópio de luz han sugerido que las células secretoras de los canales glandulares son - distintas a las células caliciformes secretoras de mucus de la su- perficie del epitelio, estudios realizados con el microscópio elec- trónico han demostrado que la estructura de éstos dos tipos celu- lares es esencialmente similar, y por tanto han sido descritas bajo - un solo nombre: Células granulares (Aitken y Johnston, 1936). Sin - embargo, Aitken (1971) ha demostrado algunas diferencias entre es- tos dos tipos celulares, particularmente en las reacciones histoquí micas de los gránulos secretores. En el caso de las células calici- formes la superficie apical está cubierta por típicas microvellosi- dades, excepto donde la célula está distendida por la secreción. En el citoplasma apical se encuentran pequeñas y claras vesículas que - pueden representar alguna forma de actividad secretora (Aitken, 19- 71). El complejo supranuclear de "Golgi" consiste de un extensivo - arreglo de sáculos alargados, numerosas vesículas y gránulos densos de tamaños variados. En las bases de los bordes epiteliales se en- cuentran los canales glandulares, los cuales están revestidos con -

células secretoras cuboidales. Estas células poseen grandes núcleos ovales situados en la región basal de la célula, ocupando aproximadamente la mitad de ésta. La superficie apical de las células secretoras; los cilios y procesos complejos similares a los de la superficie del epitelio no están presentes (Aitken, 1971). Poseen un complejo de "Golgi" prominente, así como cisternas de retículo endoplásmico rugoso bien desarrolladas y numerosas mitocondrias pequeñas.

En el cuello del infundíbulo, pasando caudalmente, los pliegues se vuelven más complejos, los canales glandulares se tornan más profundos y eventualmente pequeñas glándulas tubulares se desarrollan en los rincones de los canales (Bradley, 1928; Richardson, 1935). La célula glandular tubular infundibular es baja y de forma piramidal con solo moderadas cantidades de gránulos eosinófilos presentes en el citoplasma; éstos son invariablemente más pequeños, menos numerosos y más densos que aquellos encontrados en las glándulas tubulares del magnum (Aitken, 1971).

La célula glandular tubular contiene una cisterna grande de retículo endoplásmico rugoso y la morfología exacta de éste, -- tiende a variar de acuerdo al estado de secreción de la célula. El núcleo oval yace en el centro o justo abajo de la mitad de la célula. Encima del núcleo existe un complejo de "Golgi" que consiste de sáculos alargados, vacuolas y pequeñas cisternas.

En el origen del magnum los pliegues epiteliales se vuelven más sencillos y los canales glandulares desaparecen antes de -- que se desarrollen los típicos pliegues anchos y longitudinales del magnum (Richardson, 1935). En esta región de unión, los distintos tipos glandulares se traslapan, mezclándose grupos de glándulas infundibulares con glándulas tubulares del magnum (Aitken y Johnston, 1963), pero los tipos celulares epiteliales que revisten a las glándulas son siempre claros.

## EL MAGNUM.

### Anatomía.

El magnum o región secretora de albumen, es la parte más larga del oviducto, su diámetro es considerablemente mayor al del cuello infundibular. Este incremento se debe principalmente a un marcado aumento en el grosor de las paredes. Este desarrollo de las paredes del magnum, en parte, resulta de un incremento en el desarrollo de las capas musculares, así como del incremento en grosor de la mucosa, ya que las glándulas tubulares sufren un intenso desarrollo. El magnum posee pliegues primarios, con pliegues secundarios y terciarios adicionales. Sin embargo, Surface (1912) consideró que el desarrollo de la capa glandular, no obstante que incrementa el tamaño de los bordes, tiende a disminuir el grado de doblamiento.

Las capas musculares del magnum son algo más gruesas y los paquetes están claramente arreglados en capas, en comparación a aquellas del embudo infundibular. La capa muscular externa tiene una orientación esencialmente longitudinal, con una ligera torcedura espiral; y la capa muscular interna es claramente circular (Surface, 1912).

### Histología de la mucosa.

Existe un ciclo de secreción y regeneración en las células glandulares que revisten al oviducto (Surface, 1912; Richardson, 1935). Este ciclo es particularmente obvio en las glándulas del magnum en donde grandes cantidades de albúmen son producidas, dando lugar a considerables variaciones en el revestimiento epitelial. En esta región del oviducto, las glándulas tubulares están muy desarrolladas y los tubulos glandulares tienen una estructura compleja la cual sigue un curso muy tortuoso y se ramifica frecuentemente. La mucosa está revestida por un epitelio que consiste de células columnares ciliadas y células secretoras caliciformes. Estos dos tipos celulares parecen alternarse a todo lo largo del mag-

num, pero durante las diferentes fases de formación del huevo, uno u otro tipo parece predominar (Surface, 1912). Antes del paso de una yema através del magnum, parecen predominar en el epitelio las células caliciformes distendidas, y las células ciliadas aparecen como estructuras estrechas. Pero cuando las células caliciformes han descargado su material secretorio, éstas tienden a ser ocultadas por las células ciliadas y por tanto, la superficie tiene una apariencia ciliada. La mucosa secretada por el epitelio consiste de un mucopolisacárido ácido (Aitken, 1971).

Existen tres fases claramente distinguibles que pueden determinarse en la apariencia de las células que revisten a las glándulas tubulares durante el ciclo de formación del huevo (Surface, 1912; Richardson, 1935). La primera, una fase secretora la cual empieza justo antes de que la yema entra a la región del magnum. Antes y durante la fase secretora las células glandulares han cambiado y dan una apariencia más homogénea. Los límites de las glándulas individuales están esfumados y pocos detalles celulares son aparentes; el núcleo yace basalmente, está reducido y ya no se encuentra rodeado por una zona clara de citoplasma. Todo el citoplasma se llena de gránulos eosinofílicos, la lúmina glandular se encuentra dilatada por albúmen secretado y se puede observar también entre los pliegues mucosos.

La segunda, una fase de regeneración que tiene lugar después de que la yema ha salido del magnum. En el inicio de esta fase, las células se tiñen de un color pálido debido a las vacuolas citoplásmicas vacías, las cuales, originalmente contenían gránulos de albúmen; los núcleos se agrandan y el citoplasma se reorganiza cerca de los gránulos de secreción residuales, ya que nunca desaparecen totalmente. El lumen glandular vacío es claramente visible (Richardson, 1935); y en tercer lugar una fase inactiva que tiene lugar en las glándulas que se han regenerado, las cuales no son capaces de secretar durante algunas horas.

Los cuatro tipos celulares antes descritos, se propagan a todo lo largo del oviducto y su morfología puede variar de acuerdo a la fase del ciclo secretor. Es el caso de las células ciliadas -- que, justo antes de la ovulación producen gránulos electrodensos de glicoproteína, los cuales son secretados apicalmente (Sandoz et al. 1971). A su vez, el componente principal del material secretorio de las células granulares es probablemente la glicoproteína fibrosa, - ovomucina (Wyburn et al., 1970 b; Sandoz et al., 1971).

Con respecto a las células glandulares tubulares, y durante el ciclo secretor, Wyburn et al. (1970 b) han descrito tres ti--pos básicos de células, las cuales pueden observarse en todos los - niveles del magnum. El tipo A consiste de células con gránulos elec-- trodensos; el tipo B consiste de células con grandes áreas provis-- tas de material amorfo de baja densidad electrónica; y el tipo C es es ta compuesto por células que contienen pocos gránulos densos. Las - células del tipo A parecerán ser las células que producen ovoalbúmi-- na, la proteína más común del huevo. Las células del tipo C, las -- cuales se encuentran en el magnum inmediatamente después del paso - del huevo, deben de considerarse como una fase de recuperación de - las células del tipo A. Las células del tipo B son, tanto morfologi-- ca como funcionalmente distintas a las de los tipos A y C, y han si do implicadas en la secreción de la lisozima (Wyburn et al. 1970 b).

#### EL ISTMO.

##### Anatomía.

El límite entre el magnum y el istmo está claramente deli-- neado por una estrecha zona translúcida del oviducto, la cual no -- tiene glándulas tubulares. En el extremo posterior del magnum los - bordes longitudinales se reducen en grosor y altura, sin embargo, - los bordes incrementan nuevamente en altura conforme éstos entran - al istmo, pero no recuperan la altura y ancho encontrados en el mag-- num (Surface, 1912). En esta zona intermedia no están presentes las glándulas tubulares, siendo reemplazadas por una lámina propia de -

tejido conectivo moderadamente desarrollado.

El istmo es una sección del oviducto relativamente corta, y su diámetro total es algo menor que el del magnum. Las capas musculares de la pared, particularmente la capa circular, son más gruesas y mejor desarrolladas que en el magnum. El alineamiento de los bordes mucosos se ha vuelto casi longitudinal en vez de ser espiral y la capa de glándulas tubulares, dentro de los bordes, es similar en apariencia a la del magnum, aunque no está tan bien desarrollada. La capa de epitelio superficial tiene, tanto células ciliadas como células secretoras (Surface, 1912).

#### Histología de la mucosa,

La superficie del epitelio es alta y consiste de células glandulares secretorias ciliadas que se alternan. Las células ciliadas retienen su forma columnar con un núcleo apical durante todo el ciclo secretorio del istmo. Justo antes de que el huevo entra al istmo, estas células pierden sus cilios y el citoplasma se vuelve tenuemente vacuolar. Un material secretorio se acumula en el citoplasma y se desarrolla una ampolla o burbuja apical. La secreción tiene lugar vía la ampolla, y casi al final del ciclo la ampolla se atrofia y los cilios vuelven a aparecer (Richardson, 1935).

Las células glandulares tubulares del istmo no sufren fases secretorias distintas, aunque existen algunas diferencias entre las fases de actividad secretoria y de inactividad (Richardson, 1935). Cuando el istmo está secretando las membranas del cascarón, el epitelio glandular muestra una actividad máxima. La célula epitelial se llena de gránulos esféricos de tamaños variados. El lumen de las glándulas contiene material secretorio ya sea en forma de gránulos o de masas secretorias unidas.

Investigaciones histoquímicas sugieren que los gránulos de secreción de las glándulas tubulares contienen mucopolisacáridos neutrales así como proteínas que contienen azufre (Aitken, 1971).

#### EL UTERO.

##### Anatomía.

La glándula secretora o útero, es una zona expandida del oviducto en forma de saco o bolsa, en la cual, el huevo permanece aproximadamente 20 horas, y durante este período se llevan a cabo los procesos de secreción y formación del cascarón. La región inicial -- del útero tiene forma de tubo, y ya que las glándulas de esta región tienen una estructura diferente a las del istmo y a las del propio útero, ha sido llamada la región istmo-uterina.

La musculatura de las paredes del útero está bien desarrollada, particularmente la capa longitudinal exterior, y en general -- estas capas están mejor desarrolladas que en los segmentos anteriores del oviducto. La anatomía de la capa mucosa interna es distinta a la que se encuentra en el resto del oviducto. En lugar de los usuales bordes continuos, la mucosa está formada de numerosos pliegues, -- planos y discontinuos en forma de hoja; los cuales, sin embargo, se encuentran orientados longitudinalmente (Surface, 1912).

La estructura de la mucosa de la porción terminal del útero es diferente a la del resto del saco uterino, y por consiguiente -- se le ha denominado "recessus uteri" (Fujii, 1963). Esta es una zona estrecha, la cual está revestida por pliegues de tipo intermedio entre aquellos del útero y la vagina (Fujii, 1963).

##### Histología de la mucosa.

La mucosa del útero consiste de un epitelio superficial -- que cubre los pliegues, y de una capa subyacente de glándulas tubulares ramificadas y complejas que se encuentran dentro del pliegue. Es

tas glándulas se abren sobre la superficie de los pliegues por medio de ductos cortos no muy visibles, revestidos por células glandulares (Surface, 1912). El epitelio superficial se compone de células apicales ciliadas y células basales no ciliadas que se alternan. La célula apical es cuneiforme con una región apical ancha que contiene al núcleo, así como otra región basal estrecha.

Las funciones de estos dos tipos celulares y de las células que revisten a las glándulas tubulares quedan aún por ser aclaradas. La compleja actividad secretora del útero hace difícil determinar sus funciones.

Recientes estudios fisiológicos (Gay y Schraer, 1971) han mostrado que el epitelio superficial puede estar asociado con el transporte de calcio en el útero. La secreción de la sustancia proteínica del cascarón y de la cutícula parecería tener lugar en el epitelio superficial, siendo probablemente, secretada tanto por las células apicales como por las basales (Breen y Bruyn, 1969), y la cutícula por las células apicales (Johnston et al., 1963; Aitken, 1971).

La capa superficial de núcleos en el epitelio superficial corresponde a las células apicales ciliadas. La superficie libre posee numerosos cilios esparcidos al azar con microvellosidades largas y delgadas de morfología complicada y que varía de acuerdo a la etapa de formación del cascarón. Esta morfología cíclica sugiere una función secretora, la cual posee una actividad máxima durante las etapas finales de la formación del cascarón. Esto ha conducido a la hipótesis de que estas estructuras están asociadas con la formación de la cutícula del cascarón (Breen y de Bruyn, 1969).

Los gránulos de secreción cuya aparición coincide con el comienzo de la secreción de la matriz del cascarón, son una característica constante del citoplasma de la región supranuclear de las células apicales. El aparato de Golgi parece estar involucrado en la

formación de los gránulos de secreción (Breen y de Bruyn, 1969). No obstante que el contenido de los gránulos de secreción no ha sido observado dentro del lumen, es evidente que este material es liberado hacia la cavidad uterina, y se ha sugerido (Johnston et al., 1963; Breen y de Bruyn, 1969), que los gránulos contribuyen a la formación de la porción proteínica de la matriz del cascarón del huevo.

En la unión istmo-uterina no existe ningún cambio brusco entre las glándulas tubulares del istmo y las del útero. En lugar de esto, existe un área en donde los dos tipos celulares se entremezclan dentro de la capa glandular de los pliegues. Sin embargo, también existe un tercer tipo glandular el cual se presenta en grupos en esta región de unión y a la cual se le ha denominado "zona glandular de unión".

En las células de las glándulas tubulares del saco uterino hay poco o ningún rastro de gránulos de secreción, aún en la plenitud de actividad secretora, aunque Johnston et al. (1963) han descrito numerosas vacuolas pequeñas, algunas de las cuales contienen sustancias de densidad variable. La actividad secretora parece estar asociada con las microvellosidades, las cuales sufren cambios cíclicos. Durante la formación activa del cascarón, todas las superficies celulares, aparte de la membrana basal, están considerablemente modificadas. Estos cambios estructurales pueden estar asociados con la elaboración de un líquido acuoso que contiene calcio, el cual da lugar a la parte inorgánica del cascarón del huevo (Johnston et al., 1963; Breen y de Bruyn, 1969).

#### LA VAGINA.

##### Anatomía.

La vagina es un ducto muscular corto y estrecho. El extremo posterior del útero está delimitado por un esfínter muscular bien desarrollado; la vagina se extiende desde este esfínter hasta -

la pared cloacal. El ducto vaginal no es recto, tiene una clara articulación doble inicial seguida por pequeñas circunvoluciones (Fujii, 1963). Estas circunvoluciones están estrechamente unidas al útero y entre sí por capas exteriores bien desarrolladas de tejido conectivo. La zona más gruesa de la pared vaginal está compuesta por capas de músculos. La capa longitudinal exterior está moderadamente desarrollada y consiste de paquetes de fibras musculares esparcidas por todo el estroma del tejido conectivo, mientras que la capa interior circular está altamente desarrollada, siendo más gruesa en esta región que en cualquier otra parte del oviducto (Surface, 1912). No existe capa de glándulas tubulares dentro de la lámina propia de los pliegues de la mucosa vaginal. En la parte posterior, la vagina se abre hacia el urodeo de la cloaca a través de la pared izquierda.

#### Histología de la mucosa,

El epitelio superficial de los pliegues mucosos consiste de células ciliadas alternantes y células glandulares no ciliadas secretoras de mucus. La altura del epitelio, es mayor que la que se encuentra en el útero (Richardson, 1935). Sin embargo, en las depresiones entre los pliegues las células tienden a ser cortas; también existe una acumulación de las células glandulares no ciliadas dentro de estas áreas (Surface, 1912). Fujii (1963) ha mostrado que estas células contienen mucopolisacáridos.

Al ser más altas que de costumbre, las células epiteliales también son más estrechas que lo normal; y lo mismo sucede a las células glandulares las cuales a menudo no se ven con facilidad entre los apices de las células ciliadas a pesar de la capa de núcleos basales que es muy obvia. La lámina propia de tejido conectivo que reviste a los pliegues está libre de glándulas tubulares; la única excepción son las glándulas anfitrionas de esperma que se encuentran en la región útero-vaginal bien distribuidas.

## II.- DESARROLLO DEL OVIDUCTO.

### EL SISTEMA GENITAL.

El Sistema genital de las aves está constituido por los órganos primarios o gónadas, en las cuales las células germinales se desarrollan; y órganos accesorios genitales. Las gónadas masculinas son un par de testículos en tanto que las gónadas femeninas poseen un ovario funcional izquierdo así como un ovario derecho rudimentario. Los testículos consisten de tubulos que producen células germinales, mientras tanto el ovario tiene cordones sexuales, los cuales dan origen a los folículos u óvulos jóvenes. Los ductos accesorios incluyen un par de vasos deferentes, un derivado del ducto mesonefrico en el macho, y el oviducto en la hembra. El oviducto derecho degenera y solo el izquierdo es funcional.

El Sistema reproductivo de las aves, así como de otros vertebrados, se origina en el individuo con el surgimiento de células primordiales germinales. Subsiguiente a este evento, todas las partes de las gónadas y las estructuras accesorias sexuales tienen como función la perpetuación de la línea germinal de descendencia. Estas varias partes del Sistema genital surgen como engrosamientos localizados de unidades morfológicas, las cuales han sido derivadas de una o más de las tres capas germinativas del embrión. El primordio gonadal comienza como un engrosamiento de la pared celómica de la cresta urogenital; ésta, es una unidad estructural compleja formada desde el mesodermo a través de una serie de cambios morfogenéticos. Cuando las células germinales ya formadas migran a su posición definitiva, el desarrollo gonadal se lleva a cabo,

La gónada primitiva está localizada en la mitad de la superficie del mesonefros. Anteriormente, el mesonefros da lugar a la cresta de la cual la gónada es formada y, posteriormente, los ductos

mesonéricos constituyen a los ductos sexuales del macho; en la hembra, éstos están cercanamente asociados con el oviducto antes de volverse rudimentario.

El primordio gonadal está típicamente compuesto de una médula y corteza, las cuales aparecen como una sucesiva proliferación de los cordones sexuales desde el epitelio germinal. La corteza es potencialmente tejido ovárico y la médula es típicamente testicular. El primordio gonadal izquierdo posee una incipiente corteza ovárica que rodea o envuelve a la médula; mientras que el primordio derecho consiste de un gran componente medular y trazas de corteza. De este modo, la gónada derecha posee más potencialidad masculina desde el comienzo, entre tanto la gónada izquierda es potencialmente bisexual; en la hembra, la gónada derecha está destinada a desaparecer totalmente. La predominancia de un sexo u otro es cuestión de la degeneración de un componente y la adicional diferenciación del otro.

#### ESTRUCTURAS ACCESORIAS,

Las estructuras sexuales accesorias tienen la función de conducir a las células germinales o productos sexuales. El conducto de Wolff de los machos y el conducto de Muller u oviducto de la hembra, están presentes en ambos sexos durante el estado primitivo embrionario. Antes del nacimiento, sin embargo, el conducto de Wolff degenera en la hembra, así como también el oviducto en el macho. El tubérculo genital está también presente en ambos sexos durante la embriogénesis. Este, sufre una regresión en la hembra y se desarrolla más ampliamente en el macho para formar el pene u órgano copulatorio.

En pollos hembra, el conducto de Wolff persiste como una estructura vestigial después del nacimiento y algunas veces durante toda la vida.

### CONDUCTO DE MULLER.

De acuerdo con la visión más moderna de los embriólogos - (Josso, 1977), los conductos de Muller en mamíferos y aves son derivados del epitelio celómico, y no como en invertebrados inferiores, de la duplicación de los conductos de Wolff.

Los conductos de Muller son un derivado de la cresta urogenital. En el macho, los conductos se vuelven rudimentarios y desaparecen; en las hembras se convierte en el oviducto en el lado izquierdo y degenera en el lado derecho. En el pollo, el pliegue tubal o tira de peritoneo, la cual da origen al conducto, aparece primero en la extremidad anterior del mesonefros (4<sup>o</sup> día de incubación). Al principio, el conducto es puramente una invaginación parecida a surco del epitelio que envuelve a la cresta urogenital. En su extremidad anterior el surco permanece abierto y se comunica con la cavidad celómica. Las porciones más caudales del surco se cierran debido a la fusión de las orillas (5<sup>o</sup> día de incubación), y el conducto alcanza la cloaca en el onceavo día.

El conducto de Muller es aparentemente dependiente de la acción inductora del conducto de Wolff, conforme lo muestran las investigaciones de Huijbers (1951). El crecimiento terminal del conducto de Muller ocurre en estrecha proximidad al conducto de Wolff; de hecho, éstos comparten una membrana basal común (Gruenwald, 1952). El desarrollo del conducto de Muller en el embrión de pollo macho cesa en el 8<sup>o</sup> día y es seguido inmediatamente por una regresión, la cual se completa aproximadamente en el doceavo día (Wolff y Wolff, 1947). Stoll (1944) notó crecimiento hasta el onceavo día, y cuando los conductos tienen 9 mm. de longitud, primero se vuelven más angostos en la región media del canal y la degeneración parece progresar hacia ambas direcciones (Romanoff, 1960). Los conductos desaparecen por el doceavo día.

La regresión del conducto de Muller en pollos macho se lo

gra através de una rápida necrosis del epitelio, las células se vuelven picroticas y el lumen se llena de desecho. Después una absorción progresiva de la cuerda sólida se lleva a cabo, convirtiéndose en un remanente después del treceavo día (Wolff y Ostertag, 1950). El papel de los lisosomas en la degeneración de los conductos de Muller de aves, ha sido también estudiado mediante análisis bioquímicos (Brachet et al., 1958; Scheib-Pfleger y Wattiaux, 1962). Entre el séptimo y noveno día de incubación en conductos de macho, los lisosomas incrementan su contenido de hidrolasas ácidas. La síntesis de protefna continúa en aumento, aunque en un ritmo más lento que en la hembra (Sjoquist y Hultin, 1969). El inicio de la degeneración Mulleriana a los 9 días es marcada por una solubilización de las enzimas proteolíticas y un descenso en la síntesis de protefnas.

Estos cambios, sin embargo, representan la consecuencia más bien que la causa de la muerte celular.

Wolff et al. (1953) postularon que las hormonas masculinas secretadas por los testículos determinan directamente la necrosis de los conductos de Muller, y causan su desaparición através de enzimas proteolíticas, cuya presencia se detectó "in vitro" mediante los métodos citoquímicos y ultramicroquímicos.

Stoll (1950) mostró que los andrógenos causaban agénesis definitiva de los conductos de Muller si se administraban durante la etapa sexualmente indiferenciada (Romanoff, 1960). El estradiol, una hormona sexual femenina estimuló el desarrollo de los conductos de Muller tanto en embriones femeninos como en masculinos (Romanoff, 1960). Tran y Josso (1977) llegaron a la conclusión de que tanto en mamíferos como en aves la testosterona no es la hormona fisiológica antimulleriana; concepto que será explicado más detalladamente.

En el pollo hembra el desarrollo del conducto de Muller

derecho cesa por el octavo día, seguido de la degeneración. El lumen se pierde y el conducto se vuelve más corto, desapareciendo en su extremidad anterior, dejando rastros en la región de la cloaca. Stoll (1944) sostiene que ambos conductos en el pollo hembra, crecen hasta el onceavo día y que el conducto derecho se empieza a atrofiar después del doceavo día y continúa haciéndolo hasta el 16 ° día, después del cual éste crece un poco hasta el nacimiento (Romanoff, 1960). La regresión del conducto derecho de Muller en hembras tiene lugar entre el 9° y 16° día de incubación (Romanoff, 1960).

El conducto izquierdo de Muller sufre un desarrollo más profundo para formar el oviducto. El ostium, la parte glandular del tubo y la glándula secretora se vuelven aparentes por el 12° ó 13° día (Romanoff, 1960). El extremo inferior, no obstante que se expande para formar la glándula secretora, no se abre hacia la cloaca sino después del nacimiento. El crecimiento del conducto izquierdo de Muller es esencialmente debido a la formación de colágena por los fibroblastos que rodean al epitelio Mulleriano.

### III.- LA HORMONA ANTIMULLERIANA.

Los conductos de Muller son el primordio del oviducto de los vertebrados y fueron por primera vez descritos por J. Muller - en el año de 1930. La causa de su regresión en los machos fué analizada por Jost en 1947; quien en el año de 1953 llegó a la conclusión de que los resultados de sus experimentos se podían explicar solo por la existencia de una clara secreción morfogenética testicular la cual es responsable de la regresión de los conductos de Muller en los fetos machos. Reiterando lo antes dicho, se sabe que el Sistema de conductos de Muller se desarrolla normalmente en ausencia de estímulo hormonal de cualquier gónada, pero la regresión

de dicho Sistema se debe a una hormona protéica de los testículos - que se ha denominado "Hormona Antimulleriana" (A.M.H.), o bien "Factor Inhibidor de los conductos de Muller" (F.I.M.). Se cree que esta hormona estimula el crecimiento de las células mesenquimáticas - que rodean a los conductos de Muller provocando su regresión activa.

Históricamente, se han ofrecido varias hipótesis para explicar la regresión de los conductos de Muller tanto en embriones - de pollo femeninos como masculinos. Como ya lo habíamos mencionado - anteriormente, Wolff (1959) propuso que un andrógeno de la gónada - causaba regresión de ambos ductos de Muller en el macho y el ducto - derecho de la hembra. Hamilton (1963) concluyó que una hormona no - andrógena causaba regresión en ambos sexos, pero únicamente el con - ducto derecho era sensible a este factor en el embrión femenino. -- Teng y Teng (1979) han sugerido que el ovotestis derecho controla - la regresión del conducto de Muller derecho mediante una secreción - local de un factor desconocido. Groenendijk-Huijbers (1962) propu - sieron que la regresión en el macho era controlada por una hormona - testicular, mientras que la regresión del conducto derecho en la -- hembra era controlada por una interacción de una hormona masculini - zante y feminizante.

La presencia del F.I.M. en el ovario de pollo femenino y - su prolongada producción en la vida adulta a pesar del fracaso a la - regresión por parte del ducto izquierdo, indica una diferencia en - la respuesta del conducto de Muller que no puede ser explicada solo - por la producción del F.I.M.. Puede existir una diferencia en la - susceptibilidad al F.I.M. de cada conducto o una inhibición del F.I. - M. por parte de los esteroides del ovario en los sitios receptores - del conducto izquierdo de Muller. Los estrógenos pueden interferir - con la ligadura en el receptor del F.I.M. Debido a esto, existe la - teoría de que la naturaleza asimétrica de la diferenciación de los - conductos de Muller femeninos se debe a una diferencia en la sensi - bilidad del conducto izquierdo y el conducto derecho, diferencia --

tal que puede depender de la información genética.

Un estudio más intenso del Sistema genitourinario del pollo puede proporcionar respuestas con respecto al papel que juega la producción del F.I.M. después del nacimiento. La evidencia que existe de la naturaleza de glicoproteínas del F.I.M. es poderosa. El aparente antagonismo de glicoproteínas - esteroides que ocurre en el sitio receptor, puede ayudar a aclarar el mecanismo sobre la regresión del conducto de Muller, dado que las glicoproteínas probablemente actúan en la superficie de la célula y los esteroides en el citosol.

#### IV.- APARICION DE LAS CELULAS ESTEROIDOGENICAS.

La síntesis de hormonas esteroides por los ovarios y testículos durante el desarrollo del embrión de pollo es un fenómeno bien establecido; y ya que las hormonas sexuales han sido relacionadas con los procesos de diferenciación gonadal y del aparato reproductor, es importante conocer el tiempo o tiempos durante el desarrollo embrionario en el cual estas glándulas sintetizan andrógenos y estrógenos.

Actualmente se sabe que durante el período de indiferenciación sexual de la gónada en desarrollo en el embrión de pollo de los dos presuntos ovarios y testículos sintetizan estrógenos y andrógenos ( Woods y Erton, 1978; Woods y Podczaski, 1974 ). La producción total de esteroides aumenta durante el desarrollo de las gónadas de ambos sexos, con niveles significativamente más altos en las hembras ( A. Guichard et al., 1977 ).

Se sabe que la testosterona es producida en pequeñas -- cantidades por las gónadas de ambos sexos entre los 7.5 y 10 días

de desarrollo ( Guichard, A. et al., 1977 ) presentando un incremento estadísticamente significativo durante el día 13.5 de incubación ( Woods, Simpson, Moore; 1975). Galli y Wassermann (1972) encontraron que los testículos y los ovarios izquierdos a los 15 días de desarrollo, producen ya los mismos esteroides que producen los organismos adultos ( O'Grady, 1968; O'Malley et al., 1968; Schrocksnadel et al., 1971 ).

En cuanto al papel de la hipófisis sobre la función endócrina del ovario, Woods y Weeks (1969) demostraron que en el día 13.5 - 14.5 la adenohipófisis inicia la regulación hormonal de esteroides del ovario izquierdo. De este modo, aseveran que anterior a los 13.5 días la síntesis de estrógenos es autónoma, mientras que después de este período embrionario, la síntesis de estrógenos está bajo el control de gonadotropinas producidas por la adenohipófisis.

Es un hecho bien documentado que el crecimiento y diferenciación del conducto izquierdo de Muller de embriones de pollo hembras está bajo la influencia de los estrógenos ováricos (Wolff, 1959; Groenendijk - Huijbers, 1962; Hamilton, 1963; Hamilton y --- Teng, 1965; Willier, 1939, 1942, 1952; Romanoff, 1960; Burns, --- 1961). A este respecto es de interés notar que Teng y Teng ( 1975 a y b, 1976) descubrieron receptores citoplásmicos para el  $17\beta$ -estradiol en el conducto izquierdo de Muller de embriones de pollos hembras a partir de los 8 días de edad. Los receptores incrementan en número hasta el 12° día, después de este período su número permanece constante. No obstante, Gasc (1981) sostiene que estos receptores aparecen a partir del 15° día de desarrollo. A pesar de esta pequeña discrepancia, ambos autores coinciden en que los receptores ya están presentes a partir del 15° día de desarrollo.

Asimismo, Gasc (1981) reporta que los conductos de Muller en embriones de pollos hembras no presentan receptores citoplásmicos.

micos para la testosterona sino hasta después del nacimiento. Debido a esto, y contrario al caso de los estrógenos, las hormonas andrógenas no tienen efectos aparentes sobre el oviducto de embriones de pollos hembras, posterior a la diferenciación morfológica.

Teng y Teng (1975 b) mostraron que el conducto de Muller de embriones de pollo hembras exhiben dos fases de crecimiento, una fase lenta ( 8°al 12°dfa ) y una fase rápida ( 14°al 18°dfa ), y sugirieron que ya que los sitios de unión del 17  $\beta$ -estradiol citoplásmicos del conducto de Muller ya han alcanzado una saturación en el día 12, las actividades metabólicas dependientes de estradiol relacionadas con el crecimiento y desarrollo del conducto de Muller se inician en este momento. Sin embargo, la existencia de receptores para estradiol a partir del 8° día de desarrollo en embriones hembras de pollo, nos sugiere que el 17  $\beta$ -estradiol cumple un papel importante en el crecimiento y diferenciación del oviducto. Hay evidencias de que el estradiol impide la involución del canal de Muller izquierdo en embriones de pollo hembras ( Wolff y Giglinger, 1935; Hamilton, 1963 ).

En el presente trabajo, investigamos los efectos provocados por la administración de 17  $\beta$ -estradiol a embriones de pollos a los 15 y 17 días de incubación, observando los cambios producidos en el oviducto de los animales recién nacidos. Este estudio nos permite tener información sobre el efecto de esta hormona en la etapa de crecimiento de este órgano y previa al desarrollo de las estructuras glandulares en la mucosa.

M A T E R I A L

Y

M E T O D O .

## METODOLOGIA.

Huevos fértiles de gallinas de la raza Rhode Island obtenidos de la Granja Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. fueron incubados a 37.8°C en una incubadora de aire forzado. En el día 15 de incubación, se observaron cada uno de los huevos bajo una lámpara de luz para descartar aquellos embriones cuyo desarrollo no se llevó a cabo. Posteriormente los huevos viables fueron limpiados con una solución de alcohol al 70%, y bajo una cámara de aire esteril reciclado se procedió a hacer una pequeña abertura para permitir el tratamiento hormonal. La abertura se realizó de la siguiente manera:

a).- Con una aguja de disección se perfora el cascarón en la zona correspondiente a la cámara de aire,

b).- En la parte media lateral del huevo se procede a cortar un pequeño triángulo de 0.5 cm. de lado con una cegueta comercial, retirando el cascarón.

c).- Con una gota de agua destilada y esteril se humedecen las membranas para facilitar la separación de la membrana corioalantoidea.

d).- Con un bulbo de latex se succiona en el orificio de la cámara de aire para obligar a la membrana corioalantoidea a descender.

e).- Con unas pinzas de puntas delgadas se retira la membrana papiracea y se sellan ambos orificios con cinta adhesiva transparente.

La aplicación de las hormonas esteroides, 17  $\beta$ -estradiol ó testosterona ( Sigma Chemical Co. ), fué realizada en 544 huevos a los 15 y 17 días de incubación sobre la membrana corioalantoidea. Las dosis utilizadas fueron: 10 ng., 100 ng., 200 ng., ó 400 ng. de 17  $\beta$ -estradiol; y 200 ng. de testosterona.

La hormona se disolvió en etanol y luego se diluyó a la concentración adecuada en una solución final del 1% de etanol en agua destilada. Considerando que el volumen del huevo es de 50 ml. y que la hormona se distribuye homogéneamente, la concentración de la hormona cuando se inyectan 100 ng. es aproximadamente de  $10^{-8}$  M.

Los huevos fueron limpiados nuevamente con una solución de alcohol al 70% y puestos en la cámara de aire estéril reciclado. La cinta adhesiva fué retirada del orificio lateral y las inyecciones fueron llevadas a cabo con una micropipeta. Los huevos una vez inyectados, fueron sellados nuevamente con la misma cinta e introducidos a la incubadora.

El lote control incluyó huevos que fueron tratados de igual forma pero en este caso las inyecciones fueron hechas con solución estéril del 1% de etanol en agua destilada.

En el día 21 de desarrollo, los pollos eclosionaron y 24 horas después se procedió a pesarlos en una balanza granataria registrando los pesos obtenidos, seguidamente se sacrificaron por decapitación. Fué hasta este momento que se determinó el sexo de los pollos, utilizando unicamente a las hembras (231). Los oviductos fueron cuidadosamente disecados y mantenidos en solución fisiológica de Hank's hasta ser pesados en una balanza analítica. Para pesarlos se les secó en un papel filtro y se les introdujo en una cápsula de plástico hermética. Cuando se registró el peso seco, los oviductos fueron colocados en papel aluminio de peso conocido y mantenidos a 130°C durante 18 horas para eliminar el agua. La totalidad de los oviductos obtenidos fué procesada con la técnica de Lowry (1951) para la cuantificación de las proteínas totales.

## 1.- TECNICA PARA PROTEINAS TOTALES. METODO DE LOWRY.

Todos los oviductos fueron homogenizados en 500  $\mu$ l. de agua destilada individualmente; de cada muestra se tomaron 50  $\mu$ l. y se le agregaron 100  $\mu$ l. más de agua destilada a cada una.

Los reactivos utilizados fueron:

Solución "A": 50 ml. de  $\text{NaCO}_3$  al 2% en NaOH 0,1N.

Solución "B": 0.5 ml. de tartrato de sodio (Na) y potasio (K) al 2%.

Solución "C": 0.5 ml. de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%.

Una vez obtenidas las muestras y momentos antes del procesamiento, se mezclan las tres soluciones perfectamente bien y de esta solución resultante se agrega 1 ml. a cada tubo, dejándolos reposar durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se agrega a cada tubo 100  $\mu$ l. de reactivo Folin-Ciocalteus (Merck) 1 N, y se agita enérgicamente. Nuevamente se dejan reposar durante 30 minutos para, posteriormente las muestras ser leídas en el espectrofotómetro a 750 nm.

Para poder determinar la cantidad de proteínas totales en cada uno de los oviductos, requerimos de una curva patrón de albúmina de bovino (Sigma Chemical Co.) en la cual las concentraciones -- fueron conocidas y por lo tanto, con sus lecturas en el espectrofotómetro, nos permitió la extrapolación de nuestros datos en organismos tratados.

La albúmina de bovino fué diluída en agua destilada quedando una concentración final del 1  $\mu$ gr/ml. Esta solución fué colocada en varios tubos y en cantidades distintas: 10  $\mu$ l., 20  $\mu$ l., 30  $\mu$ l., 50  $\mu$ l., 70  $\mu$ l. y 100  $\mu$ l. para posteriormente agregar agua destilada y llevar cada tubo a 150  $\mu$ l. Una vez que todos los tubos tu

vieron un volumen de 150  $\mu$ l. y distintas concentraciones se procesaron con la técnica para proteínas descrita anteriormente. Todos los datos fueron registrados para su posterior conversión.

Algunos de los oviductos, tanto tratados como controles, fueron procesados bajo la técnica de microscopía electrónica para poder observar los cambios morfológicos celulares ocasionados en el epitelio del oviducto debido a la presencia del  $17 \beta$ -estradiol y testosterona.

#### TECNICA PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Los oviductos, una vez disecados y sumergidos inmediatamente en fijador, fueron cortados separando el útero y el magnum; dichas zonas fueron nuevamente cortadas en pedazos más pequeños. El material se procesó de la siguiente manera:

##### a).- FIJACION,

El fijador utilizado fué el Glutaraldehído al 2.5% con un amortiguador de fosfatos 0,15 M. El tejido se sumergió en este fijador durante 2 horas, para posteriormente realizar tres lavados con amortiguador de fosfatos, cada lavado tuvo una duración de aproximadamente 15 minutos. Finalmente se realizó una postfijación con tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1%, amortiguado con fosfatos y nuevamente tres lavados de 15 minutos cada uno con una solución de fosfatos para, posteriormente continuar con la deshidratación.

##### b).- DESHIDRATAACION.

El tejido fué deshidratado con soluciones de alcohol a distintas concentraciones ( 60%, 70%, 80%, 90% ). El tejido estuvo

bañado por espacio de 15 minutos en cada una de las soluciones y seguidamente en tres cambios de alcohol absoluto, cada uno de 15 minutos. Posteriormente se trató con óxido de propileno, dos cambios - de 15 minutos cada uno. Al finalizar, el tejido se sumerge en una mezcla 1:1 de óxido de propileno - Epon 812 y se mantiene en el de secador durante 24 horas a temperatura ambiente.

c).- INCLUSION.

Una vez transcurrido este tiempo, se coloca el tejido en cápsulas de inclusión y se introducen en una estufa a 60°C durante 24 horas, tiempo en el cual se lleva a cabo la polimerización.

El tejido en inclusión se somete a cortes semifinos con un ultramicrotomo MT 1 de un grosor aproximado de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$ . Estos cortes se colocan en portaobjetos y se adhieren a él por calor; una vez adheridos se tiñen con azul de toluidina al 1% hasta que el color de las orillas del corte vire a violeta. Se enjuaga con agua destilada hasta que ya no exista excedente de colorante y se dejan secar a temperatura ambiente. Se montan con resina, o bien con bálsamo de Canadá.

**R E S U L T A D O S**

EFECTOS DEL 17  $\beta$ -ESTRADIOL SOBRE EL OVIDUCTO,

Los valores obtenidos en el peso de los oviductos tratados con las distintas dosis de estradiol ( 10 ng., 100 ng., 200 ng. y 400 ng. ); se observa una diferencia entre el grupo testigo y los grupos tratados, observandose una disminución progresiva del peso conforme aumenta la dosis utilizada ( Figura 2 ). En el análisis de varianza se obtiene una  $F = 3.917$ ,  $P < 0.005$ . La prueba de Scheffé nos demuestra que la reducción del peso del oviducto en el grupo tratado con 200 ng. de estradiol, es significativa.

Un fenómeno similar se observa al comparar las cifras obtenidas con los pesos secos de los oviductos en dos de los grupos experimentales: organismos tratados con 200 ng. de estradiol y testigos ( Figura 3 ); siendo el peso seco de los oviductos de los animales tratados con estradiol ( 200 ng. ) inferior al de los animales testigos. El análisis estadístico con la prueba de "t" de Student nos da un valor de  $t = 2.66$ ,  $P < 0.02$ .

Los datos obtenidos de la cuantificación de proteínas totales en los oviductos demuestra que la diferencia existente entre el grupo tratado con estradiol ( 200 ng. ) como los testigos no es significativa. En el análisis de varianza el valor alcanzado fué de  $F = 0.411$  ( Figura 4 ).

En la Figura 5, donde se encuentran graficados los resultados obtenidos de las protefnas corregidas por mg. de tejido, se observa que los oviductos tratados con las distintas dosis de estradiol ( 10 ng., 100 ng., 200 ng. y 400 ng. ) muestran un aumento progresivo de las protefnas conforme se aumenta la dosis de estradiol aplicada. El análisis de las protefnas de los oviductos, corregidas por mg. de peso húmedo muestra un valor de  $F = 3,256$  y una  $P < 0,014$ . La prueba de Scheffé nos indica una comparación significativa entre el grupo testigo y los grupos tratados con 200 ng. y 400 ng. de estradiol. Lo cual demuestra que los oviductos de los organismos tratados con estas dosis tienen más protefnas totales por mg. de tejido húmedo.

Todos los resultados obtenidos del tratamiento con estradiol citados anteriormente se encuentran resgistrados en la Tabla 1.

Los datos morfológicos muestran que los oviductos tanto testigos como tratados con 200 ng. de estradiol, revelan un mayor desarrollo del epitelio de la mucosa del oviducto en la región del magnum así como en el epitelio del útero de los organismos tratados ( Figuras 6 A y 7 A ). Este fenómeno se verificó por las mediciones hechas al tejido, que demuestran que el epitelio del útero y magnum de los animales tratados con 200 ng. de estradiol son más altos que los testigos ( Tabla 2 ).

En el oviducto de los organismos tratados con estradiol, también se observa una tendencia a una mayor diferenciación del epitelio debido a la mayor frecuencia de observación de células ciliadas ( Figura 9 ), a la aparición de células con signos de secreción ( Figura 8 ), y la formación de pliegues más profundos en el epitelio ( Figuras 8 y 9 ). Asimismo se observa en el estroma de la lámina propia imágenes de células con un mayor volumen citoplásmico ( Figuras 8 y 9 ); sin embargo, como no se hicieron estudios cuantitativos de estos hechos, no se pueden tomar como fenómenos concluyentes.

#### EFFECTOS DEL $17\beta$ -ESTRADIOL SOBRE LOS OVARIOS.

Los valores obtenidos del peso y el contenido total de proteínas del ovario en animales tratados con 200 ng. de estradiol en comparación con los valores obtenidos de los testigos resultan ser significativos, ya que tanto en el peso como en las proteínas totales existe una tendencia a aumentar progresivamente conforme aumenta la dosis de estradiol ( Figura 10 ).

Estos resultados fueron procesados estadísticamente, y el análisis de varianza para el peso del oviducto nos muestra un valor de  $F = 2.553$  y  $P < 0.041$ , presentando el grupo tratado un mayor pe-

so con relación al grupo testigo. Con respecto a las proteínas totales de ambos grupos ( Tratados con 200 ng. y testigos ), el análisis de varianza revela una  $F = 3.735$  y  $P < 0.0071$ . Siendo el valor de las proteínas totales de los tratados, más alto que aquel de los testigos. La prueba de Scheffé nos indica que la comparación entre ambos grupos es significativa. Los resultados antes descritos se encuentran registrados en la Tabla 3.

#### EFFECTOS DE LA TESTOSTERONA SOBRE EL OVIDUCTO.

De acuerdo a los resultados registrados en la Tabla 4, podemos observar que las cifras obtenidas para el grupo testigo así - como para el grupo tratado con 200 ng. de Testosterona en peso corporal, peso del oviducto, proteínas totales y corregidas del mismo órgano; nos indican una carencia de efecto por parte de esta hormona en el oviducto de pollos tratados prenatalmente a los 15 y 17 días de desarrollo embrionario ( Figuras 11 y 12 ). Las pruebas estadísticas ( Análisis de Varianza y Scheffé ) nos indican que no hay una diferencia significativa en estos resultados.

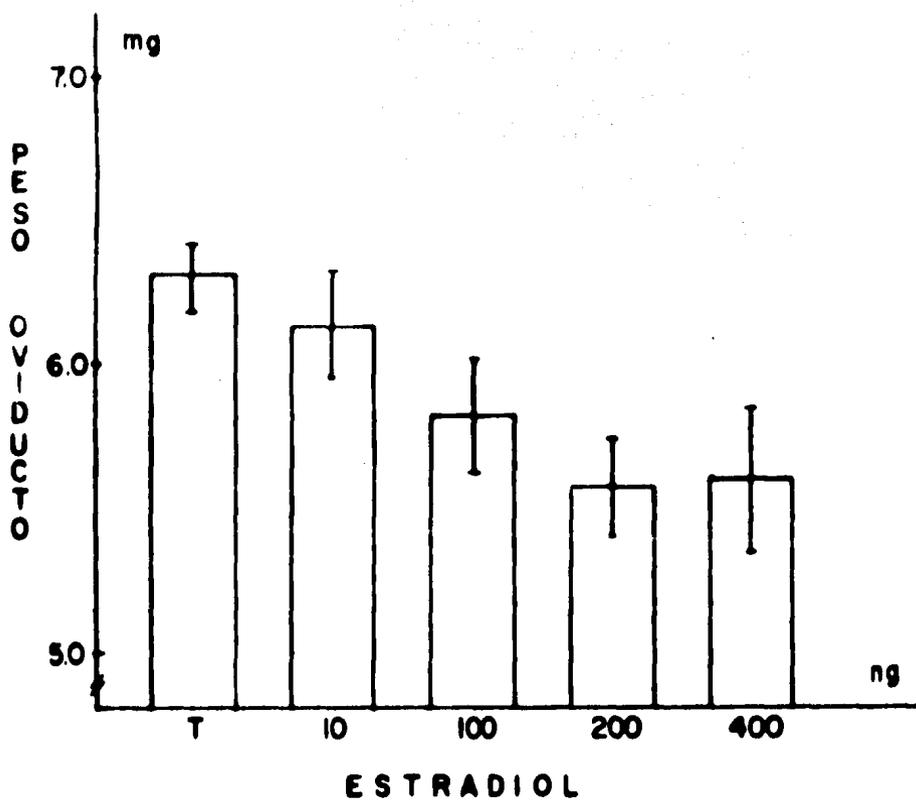


Figura 2. Efecto del 17 β-estradiol en el peso del oviducto de pollos recién nacidos tratados prenatalmente con esta hormona.

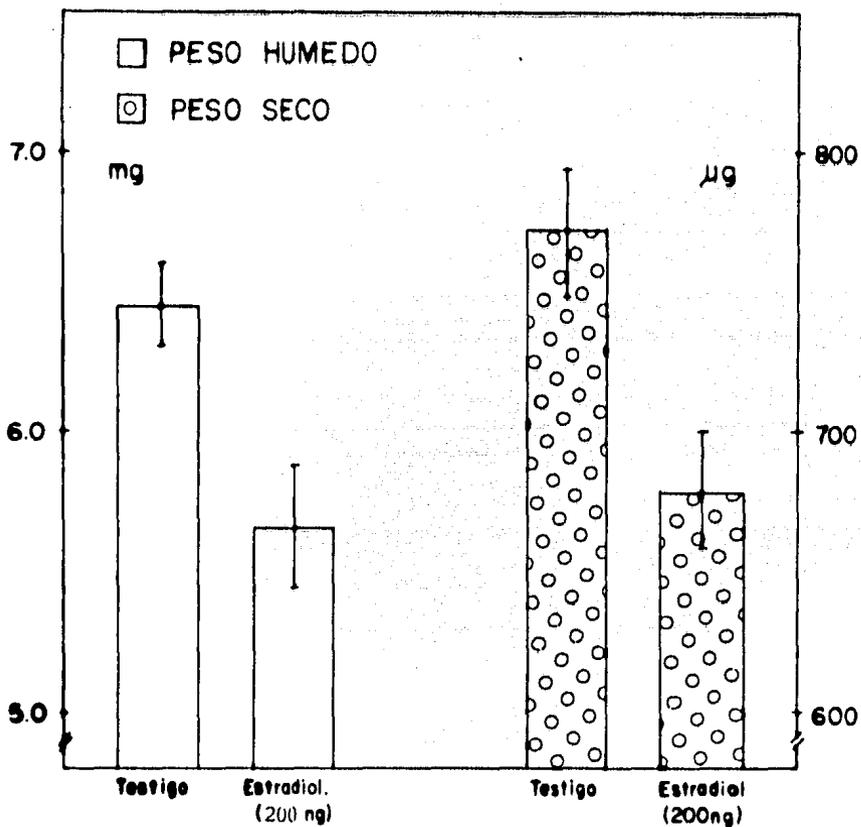


Figura 3. Comparación del tratamiento prenatal con 17  $\beta$ -estradiol sobre el peso húmedo y peso seco de los oviductos de pollos recién nacidos tratados prenatalmente.

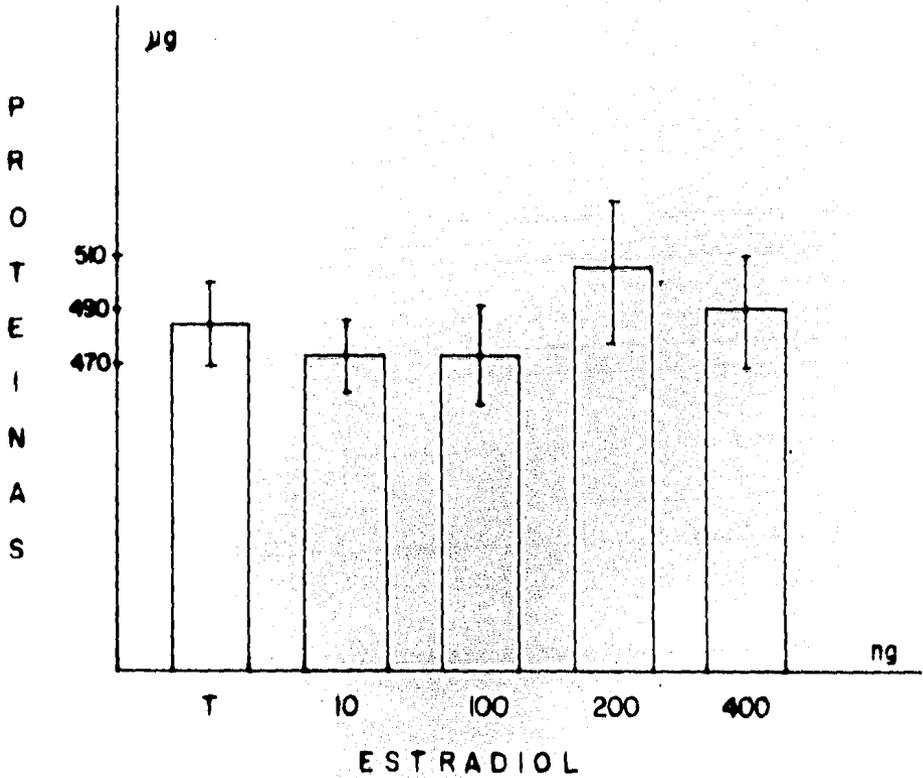


Figura 4. Proteínas totales de los oviductos de pollitos recién nacidos tratados prenatalmente con 17- $\beta$ -estradiol. El método para cuantificación fue el Lowry (1951).

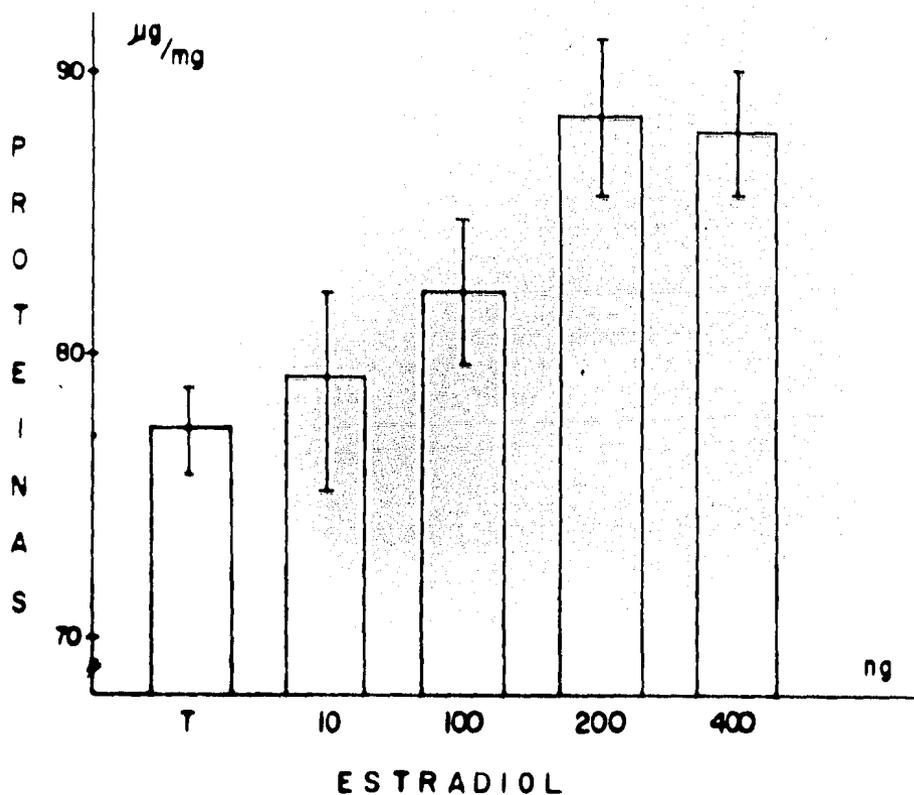


Figura 5. Representación gráfica que muestra las proteínas totales por mg. de tejido húmedo en los oviductos tanto tratados con  $17\beta$ -estradiol así como los testigos.



Figura 6 . Histología del magnum de pollo recién nacido testigo. 866 X. Se observa el epitelio pseudoestratificado de revestimiento (E) así como las células mesenquimáticas del estroma (M). Es difícil observar células especializadas o gránulos de secreción ya que la citodiferenciación no se ha llevado a cabo.



Figura 6 A. Magnum de pollo recién nacido tratado - a los 15 y 17 días de desarrollo con 17  $\beta$ -estradiol, -- 866 X. Observe el aumento en la altura del epitelio (E) y la formación de pliegues más profundos (Flechas). Existe un aumento en el volumen citoplásmico de las células mesenquimáticas del estroma (M).



Figura 7. Sección transversal del útero testigo de -  
pollo recién nacido. 866X. Observe los no muy marcados -  
pliegues de la mucosa formados por el epitelio pseudoes--  
tratificado (E), así como las células mesenquimáticas del  
estroma. La tinción fué hecha con azul de Toluidina al 1%.



Figura 7 A. Microfotografía en el microscópio de luz - que muestra un corte transversal de útero de pollo recién nacido tratado prenatalmente con 200 ng. de estradiol. 866 X. Observe la altura del epitelio (E) y la formación de pliegues más profundos (Flechas). Los núcleos de las células del epitelio pseudoestratificado de revestimiento son más grandes (N) y la aparición de células ciliadas es evidente (C).



Figura 8. Sección transversal del magnum de pollos recién nacidos tratados prenatalmente con 200 ng. de estradiol. 866 X. Se observa el epitelio pseudoestratificado de revestimiento, cuyas células presentan signos de secreción (A), las células mesenquimáticas poseen volúmenes citoplásmicos mayores -- (B), además de la formación de pliegues más profundos (Fle---chas).

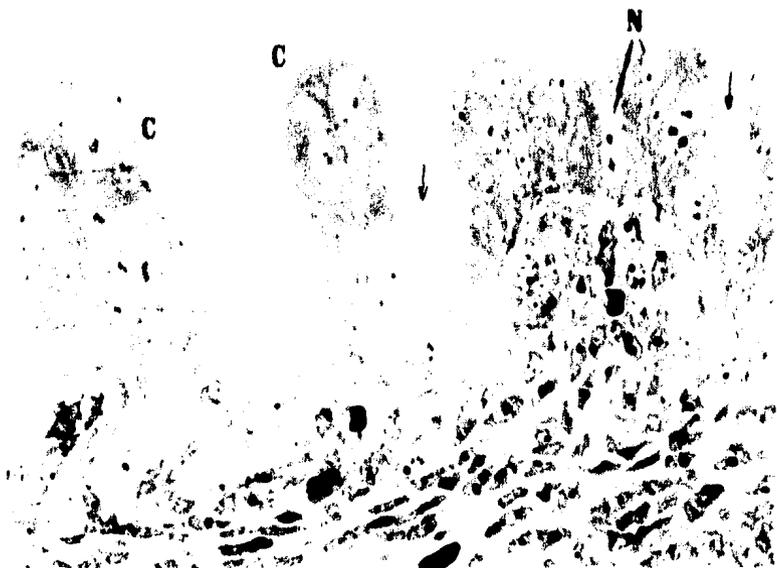


Figura 9. Histología del útero de pollos recién nacidos - tratados prenatalmente con estradiol. 866 X. Existe una tendencia a una mayor diferenciación, observe la frecuencia de las células ciliadas (C), así como la formación de pliegues más -- profundos (Flechas). Los núcleos de las células del epitelio - son más grandes (N) y las células mesenquimáticas presentan vo lumenes citoplasmicos mayores (B).

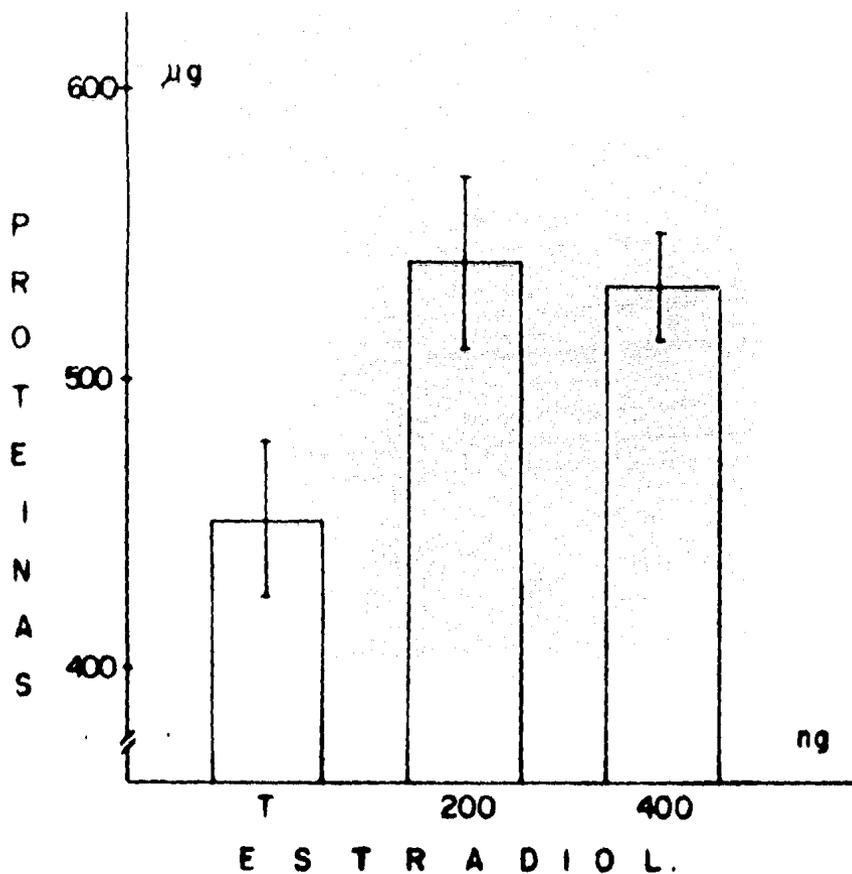


Figura 10. Proteínas totales de ovarios de pollos recién nacidos tratados prenatalmente con 200 y 400 ng. de  $17\beta$ -estradiol.

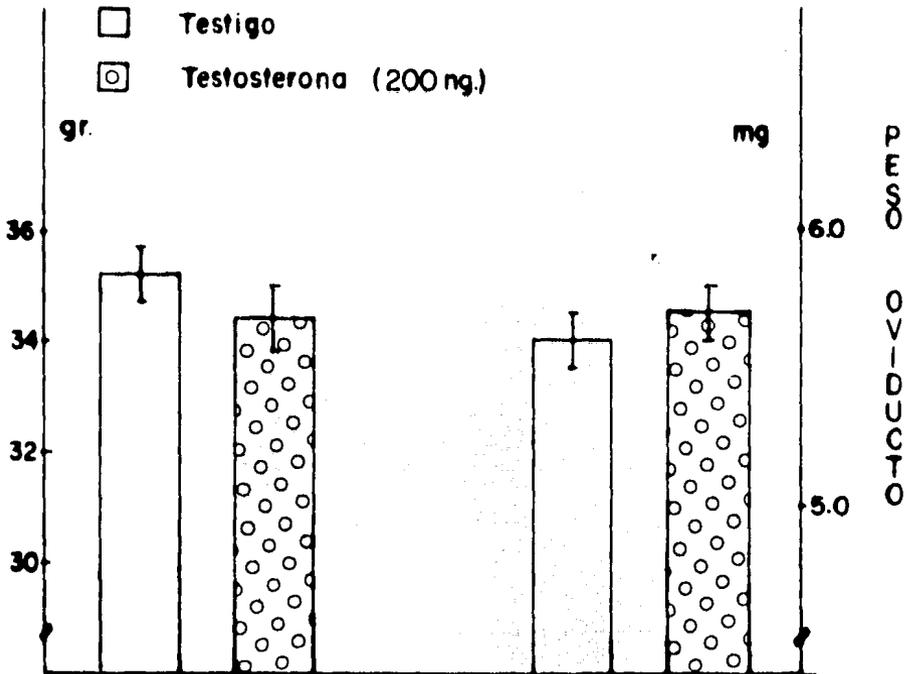


Figura 11. Comparación de los resultados obtenidos tanto de peso corporal como de peso del oviducto de pollos recién nacidos tratados prenatalmente con 200 ng. de testosterona.

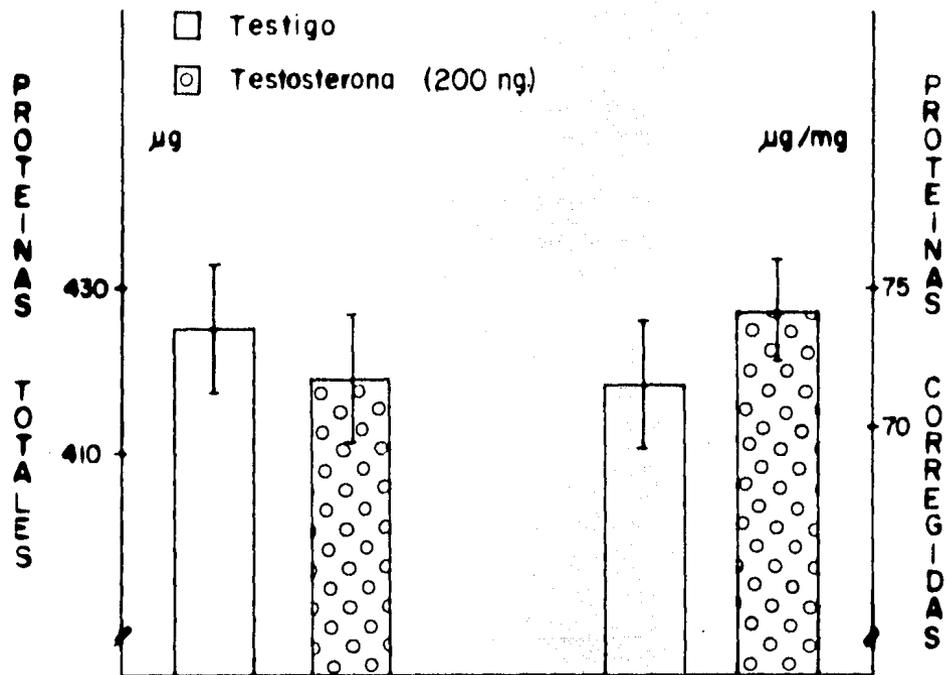


Figura 12. Comparación del tratamiento prenatal con 200 ng. de Testosterona sobre las proteínas totales y corregidas de los oviductos de pollos recién nacidos.

**Efecto del tratamiento con 17  $\beta$ -estradiol a los 15 y 17 días de desarrollo embrionario sobre el oviducto de pollos recién nacidos.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso Corporal (gr.)</b>	<b>Peso Oviducto (mg.)</b>	<b>Proteínas totales (g./oviducto).</b>	<b>Proteínas corre- gidas (qr/mgr.)</b>
Testigo	38.43 $\pm$ 0.56 n = 41	6.31 $\pm$ 0.12 n = 45	485.45 $\pm$ 15.4 n = 34	77.44 $\pm$ 1.7 n = 34
Estradiol 10 ng.	38.60 $\pm$ 0.84 n = 28	6.13 $\pm$ 0.18 n = 27	474.81 $\pm$ 13.8 n = 23	79.24 $\pm$ 4.0 n = 23
Estradiol 100 ng.	37.64 $\pm$ 0.64 n = 35	5.82 $\pm$ 0.20 n = 40	474.88 $\pm$ 18.3 n = 23	82.28 $\pm$ 2.7 n = 23
Estradiol 200 ng.	36.80 $\pm$ 0.41 n = 18	5.57 $\pm$ 0.16 n = 18	506.26 $\pm$ 24.0 n = 16	88.42 $\pm$ 2.9 n = 16
Estradiol 400 ng.	38.36 $\pm$ 0.68 n = 20	5.60 $\pm$ 0.15 n = 28	491.69 $\pm$ 23.4 n = 19	87.97 $\pm$ 2.2 n = 19

Valores expresados como la media  $\pm$  error standart.  
n = número de organismos estudiados.

T A B L A 2 ,

Cambios en la altura del epitelio de la mucosa del oviducto de pollos recién nacidos por el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol.

	Utero ( $\mu$ m).	Magnum ( $\mu$ m).
Testigos	$19.7 \pm 0.7$ n= 5	$22.9 \pm 0.6$ n= 5
	*	*
Estradiol 200 ng.	$29.1 \pm 1.8$ n= 6	$30.3 \pm 0.8$ n= 6

\*  $P < 0.05$

T A B L A 3.

Efectos del 17  $\beta$ -estradiol en ovarios de organismos recién nacidos tratados con 200 ng. y 400 ng., en comparación con los testigos.

Tratamiento	Peso Ovario (mg)	Proteínas Totales ( gr/ovario).
Testigo	5.52 $\pm$ 0.26 n = 17	451.76 $\pm$ 26.17 n = 17
Estradiol 200 ng.	6.26 $\pm$ 0.25 n = 17	540.76 $\pm$ 30.10 n = 17
Estradiol 400 ng.	6.08 $\pm$ 0.21 n = 19	532.72 $\pm$ 19.29 n = 20

Valores expresados como la media  $\pm$  error standart.

n = número de organismos estudiados.

Efectos del tratamiento con Testosterona a los 15 y 17 días de desarrollo embrionario sobre el oviducto de pollos recién nacidos.

Tratamiento	Peso Corporal (gr.)	Peso Oviducto (mg.)	Proteínas totales (g./oviducto)	Proteínas corregidas (gr./mgr).
Testigo	35,40 ± 0,51 n = 34	6,05 ± 0,18 n = 34	425,45 ± 13,32 n = 34	71,52 ± 2,37 n = 34
Testosterona 200 ng.	34,48 ± 0,62 n = 29	5,72 ± 0,18 n = 29	419,33 ± 13,83 n = 29	73,99 ± 1,79 n = 29

Valores expresados como media ± error standart.  
n = número de organismos estudiados.

## D I S C U S S I O N ,

La utilización de embriones de pollo en el presente estudio resultó ser apropiado ya que nos permitió tener un sencillo acceso a los embriones para aplicar las hormonas esteroides, ya que este modelo de trabajo evita la participación del Sistema Endocrino de la madre así como de la placenta, en el efecto obtenido. Este modelo nos permitió obtener efectos que, únicamente fueron el resultado de la acción hormonal de los esteroides aplicados en sus distintas concentraciones; situación que no podía haber sido obtenida en caso de haber utilizado embriones de mamíferos.

Las dosis de estradiol empleadas en el estudio fueron seleccionadas de acuerdo a resultados de otros autores (Norton y Wira, 1977), además de que estas dosis comprenden concentraciones de  $10^{-9}$  hasta  $2 \times 10^{-8}$  M y pueden considerarse dentro de los niveles fisiológicos. El efecto máximo en la curva dosis-respuesta fue obtenido con 200 ng. de  $17\beta$ -estradiol, siendo ésta la razón por la cual se analizó en forma más completa el efecto de esta dosis.

Si bien la castración no impide la diferenciación de los conductos de Muller (Wolff, 1951), existen evidencias de que la diferenciación normal de los conductos de Muller es influida por las hormonas esteroides y que el estradiol ayuda a prevenir la involución del conducto de Muller izquierdo en las aves (Hutson, 1981). En el 13avo día de desarrollo embrionario se conside

ra que el oviducto ya está diferenciado ( Romanoff, 1960 ). Nuestro estudio aporta información sobre el efecto de hormonas esteroides sobre el oviducto en la etapa inmediatamente posterior a la diferenciación morfológica.

Estudios de diversos autores han mostrado que la administración de estrógenos a pollos hembras inmaduras produce respuestas características en el oviducto, incluyendo la proliferación celular y la citodiferenciación, produce la síntesis de protefnas celulares específicas con un marcado aumento del peso húmedo del oviducto, produce un aumento en el contenido total de DNA y RNA así como la estimulación de la función celular ( Oka, 1969; Palmiter, -1971; y Laugier, 1983 ).

Nuestros resultados referidos al contenido de protefnas, tanto totales como corregidas por mg. de tejido, obtenidos en oviductos de animales tratados con distintas dosis de estradiol ( 10-ng., 100 ng., 200 ng., y 400 ng. ) están de acuerdo con las observaciones hechas por Oka ( 1969 ) y Laugier ( 1983 ) en organismos adultos tanto de pollos como de codornices. Estos investigadores reportaron que la administración de estrógenos provoca un aumento en la síntesis de protefnas en el oviducto, fenómeno similar al --que ocurre en nuestros animales tratados con estradiol.

Referente a los cambios morfológicos observados, encon--

tramos que existe una citodiferenciación en los oviductos de animales que recibieron el tratamiento con estradiol, dichas observaciones concuerdan con los hallazgos reportados para organismos adultos ( Oka, 1969; y Palmiter, 1971 ), así como en oviductos aislados en cultivo de órgano tratado previamente con estradiol (Kiehl y Fell, 1982).

Este último trabajo aísla los oviductos de embriones de pollos hembras de 13 y 16 días de desarrollo y los cultiva con -- distintas concentraciones de estradiol describiendo diversos grados de estímulo del magnum y aumento de la altura del epitelio de acuerdo a la concentración de estradiol utilizada.

Un fenómeno observado en el presente trabajo fue la disminución gradual del peso del oviducto ( Figura 2 ) conforme la dosis de estradiol aumenta, dichos resultados no fueron los esperados debido a que varios autores ( Oka, 1969; Palmiter, 1971 y Laugier, 1983 ), reportan un efecto contrario en organismos adultos. Descartamos la idea de que esta disminución sea debida a -- pérdida de agua ya que el mismo fenómeno se observó en el peso seco de los mismos oviductos ( Figura 3 ). La aparente contradicción entre la disminución del peso del oviducto y el incremento en la concentración de proteínas es en principio difícil de explicar; sin embargo, por tratarse de un órgano en etapa de activa proliferación celular consideramos que el tratamiento con estradiol al activar precozmente la diferenciación celular y la síntesis

sis proteica podría inhibir la proliferación celular y en consecuencia explicar la disminución en el peso de este órgano. Estamos conscientes de que esta explicación no es definitiva y se requieren estudios del índice de proliferación celular en el oviducto así como la cuantificación del DNA para confirmar esta hipótesis.

Si bien es cierto que el 17  $\beta$ -estradiol es una hormona que afecta la citodiferenciación del oviducto en las aves, es de interés mencionar que esta hormona también produce efectos en el ovario provocando un aumento en el peso así como el aumento en el número de folículos ( Kim et al., 1984; Pencharz, 1940 ). Nuestros resultados coinciden con los de estos autores ya que el aumento en el peso húmedo así como el aumento en la cantidad de proteínas totales fueron observados en nuestros animales tratados con estradiol ( Tabla 3 ). Es interesante destacar la diferencia que existe, ya que en el ovario no se observó una disminución en el peso a diferencia de lo que sucede en el oviducto, lo que indica que el ovario y el oviducto responden de forma distinta a la misma hormona en lo que a peso se refiere.

Con respecto a los resultados obtenidos de los embriones tratados prenatalmente con testosterona, observamos que no hay cambios en el peso ni en la cantidad de proteínas así como en la citodiferenciación como consecuencia del tratamiento con esta hormona; estos resultados coinciden con aquellos obtenidos

por Breneman (1956), Tokarz y Harrison (1979), Palmiter (1971 y 1972), Palmiter y Haines (1973), ya que dichos autores refieren que la administración de testosterona sola no induce la síntesis de proteínas ni afecta el crecimiento del oviducto. Es interesante comentar que esta hormona actúa solo cuando se administra junto con estrógenos, en ese caso se observa un efecto sinérgico (Tokarz y Harrison, 1979; Palmiter, 1971).

Algunos autores describen la presencia de receptores para el estradiol en el oviducto de embriones de pollo de 15 días de desarrollo (Gasc et al. 1981), y en etapas más tempranas (Teng y Teng 1975 a y b, 1976). Estos autores no encuentran receptores para testosterona en el oviducto de pollos en etapa prenatal (Gasc et al. 1981). Nuestros resultados confirman estos hallazgos ya que el oviducto de pollos responde al estradiol cuando es inyectado a los 15 y 17 días de desarrollo embrionario. La falta de respuesta a testosterona también confirma lo descrito con relación a receptores en el oviducto para esta hormona.

El hecho de que en este trabajo únicamente se hayan registrado resultados bioquímicos y morfológicos del útero y magnum de pollos recién nacidos tratados prenatalmente con 17 $\beta$ -estradiol y testosterona, es debido a la capacidad de respuesta tan evidente de estas zonas. Esto no quiere decir que las regiones correspondientes al istmo, infundíbulo y vagina del oviducto

no respondan al estímulo hormonal, sino que, por ser zonas de transición, los cambios producidos en ellas no son tan claros y evidentes como en el útero y magnum.

## C O N C L U S I O N E S .

- El oviducto de embriones de pollo hembras es un órgano efector del  $17\beta$  - estradiol.

- El  $17\beta$  - estradiol provoca un aumento en la cantidad de proteínas así como una citodiferenciación en oviductos de embriones de pollos tratados prenatalmente con esta hormona.

- El peso seco así como el peso húmedo de oviductos de embriones de pollos tratados prenatalmente con  $17\beta$  - estradiol, disminuye.

- El estradiol provoca un aumento en el peso del ovario así como un aumento en la cantidad de proteínas.

- La testosterona no tiene efecto alguno sobre el oviducto.

## B I B L I O G R A F I A .

- Aitken, R. N. C. (1971) The oviduct. In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl. (Ed. by D. J. Bell and B. M. Freeman), - pp. 1237-1289 London, Academic Press,
- Aitken, R. N. C. and H. S. Johnston (1963) Observations on the fine structure of the infundibulum of the avian oviduct. J. Anat. - 97: 87-99.
- Brachet, J.; M. Decroly-Briers and J. Hoyez (1958) Contribution a l'etude des lysosomes au cours du developpement embryonnaire. --- Bull. Soc. Chim. Biol. 40:2039,
- Bradley, O. C. and T. Grahame (1960) The structure of the fowl. - Oliver and Boyd Ed, Edinburgh.
- Bradley, O. C. (1928) Notes on the histology of the oviduct of -- the domestic hen. J. Anat. 62:339-345.
- Breen, P. C. and P. P. H. De Bruyn (1969) The fine structure of - the secretory cells of the uterus (shell gland) of the chicken. - J. Morph. 128:35-66.
- Breneman, W. R. (1956) Steroid hormones and the development of -- the reproductive system in the pullet. Endocrinol. 58:262-271.
- Burns, R. K. (1961) Role of hormones in the differentiation of -- sex. In: Sex and Internal Secretions. (Ed. W. C. Young), pp. 76-- 158 Baltimore, MD. Williams and Wilkins.
- Fujii, S. (1963) Histological and histochemical studies on the oviduct of the domestic fowl with special reference to the region of uterovaginal juncture. Arch. histol. jap. 23:447-459.

- Galli, E. F. and Wassermann, G. F. (1972) Steroid biosynthesis by gonads of 7 and 10 day old chick embryos. Gen. comp. Endocr., 21: 77-83.
- Gasc, J. M. (1980) Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation, J. Embryol. exp. Morph., -- 55: 331-343.
- Gasc, J. M. (1981) Autoradiographic studies of steroid receptor - sites in embryonic tissues, J. Histochem. Cytochem., 29: 181-189. No. 1 A.
- Gasc, J. M. and Walter, E.S. (1981) Sexual differentiation of the urogenital tract in the chicken embryo; autoradiographic localization of sex-steroid target cells during development, J. Embryol. exp. Morph., 63: 207-223.
- Gay, C. V. and Schraer, H. (1971) Autoradiographic localisation - of calcium in the mucosal cells of the avian oviduct, Calc. Tiss. Res., 7: 201-211.
- Groenendijk-Huijbers, M. M. (1962) The cranio-caudal regression - of the right Mullerian duct in the chick embryo as studied by castration experiments and estrogen treatment, Anat. Rec., 142: 9-20.
- Gruenwald, P. (1952) Development of the excretory system. Ann. N. Y. Acad. sci., 55: 142-146.
- Guichard, A.; Cedard, L.; Mignot, Th. M.; Scheib, D.; and Haffen, K. (1977) Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex and side. Gen. comp. Endocr., 32: 255-265.

- Hamilton, T. H. (1963) Hormonal control of Mullerian duct differentiation in the chick embryo. In: Proceedings of the XIII International Ornithology Congress. (Ed. C. G. Sibley), pp. 1004-1040 A. O. U. Baton Rouge, L. A.
- Hamilton T. H. and C. S. Teng (1965) Sexual stabilization of Mullerian ducts in the chick embryo, In: Organogenesis, (Ed. R. L. De Haan and H. Ursprung,) , pp. 681-700 New York, Rinehart and - Winston.
- Hodges, R. D. (1974) The histology of the fowl. London. Academic Press Inc. pp. 347-387.
- Huijbers, M. M. (1951) De invloed van de gonade op de ontwikkeling van het geslachtsapparaat bij het kippenembryo. Inaug. Diss. Univ. Amsterdam.
- Hutson, J.; H. Ikawa and P. K. Donahoe (1981) The ontogeny of - Mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. J. Ped. Surg. 16:(6)
- Johnston, H. S.; R. N. C. Aitken and G. M. Wyburn (1963) The fine structure of the uterus of the domestic fowl. J. Anat. 97:333-344.
- Josso, N.; J. Y. Picard and D. Tran (1977) The antimullerian -- hormone. Recent. Prog. Horm. Res. 33: 117-167.
- Kiell, CH.; I. T. Cohen and R. E. Fell (1982) Development of embryonic chick oviducts in organ culture under the influence of steroid hormones. J. exp. zool. 220:387-390.

- Kim, I.; CH. Shaha and G. S. Greenwald (1984) A species difference between hamster and rat in the effect of oestrogens on growth of large prenatal follicles. J. Reprod. Fert. 72:179-185.
- Laugier, Ch.; J. F. Pageaux; A. M. Soto and C. Sonnenschein (1983) Mechanism of estrogen action; Indirect effect of estradiol-17 $\beta$  on proliferation of quail oviduct cells. J. Cell. Biol. 80: 1621-1625,
- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Norton, J. M. and Ch. R. Wira (1977) Dose-related effects of the sex hormones and cortisol on the growth of the bursa of Fabricius in chick embryos. J. Steroid Biochem. 8:985-987.
- O'Grady, J. E. (1968) The determination of oestradiol and oestrone in the plasma of the domestic fowl by a method involving the use labeled derivatives. J. Biochem. 106:77-86,
- Oka, T. and R. T. Schimke (1969) Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. II.- Effects of estrogen and progesterone on tubular gland cell function. J. Cell. Biol. 43:123-137.
- O'Malley, B. W.; M. A. Kirschner and C. W. Bardin (1968) Estimation of plasma androgenic and progestational steroids in the laying hen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127:521-523.
- Palmiter, R. D. (1971) Interaction of estrogen progesterone and testosterone in the regulation of protein synthesis in chick oviduct. Biochem. 10:4399-4403.

- Palmiter, R. D. (1972) Regulation of protein synthesis in chick oviduct. J. Biol. Chem., 247(20);6450-6461.
- Palmiter, R. D. and M. E. Haines (1973) Regulation of protein - synthesis in chick oviduct. J. Biol. Chem., 248(6);2107-2116.
- Palmiter, R. D. and J. T. Wrenn (1971) Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development IV. - Tubular --- gland cell cytodifferentiation. J. Cell. Biol. 50;598-615.
- Richardson, K. C. (1935) The secretory phenomena in the ovi--- duct of the fowl, including the process of shell formation exa mined by microincineration technique. Phil. Trans. Roy. Soc. B. 225:149-196.
- Romanoff, A. L. (1960) The avian embryo. The McMillan Co. New York. pp. 816-856.
- Sandoz, D.; E. Ulrich and E. Brand (1971) Etude des ultrastruc tures du magnum des oiseaux. I. - Evolution au aorps du cycle - de ponte chez la poule Gallus domesticus. J. Microscopie. 11: 371-400.
- Schröcksnadel, H.; A. Bator and J. Frick (1971) Plasma testos- terone level in cocks and hens. Steroids. 18;359-365.
- Sjöquist, A. and T. Hultin (1967) Aminoacid incorporation by - Mullerian ducts isolated from chick embryos. Experientia. 23: 544.
- Surface, F. M. (1912) The histology of the oviduct of the do- mestic hen. Bull. Maine agric. Exp. Stn. 206:395-430.

- Teng, C. S. and C. T. Teng (1975 a) Studies on sex-organ development. Isolation and characterization of an oestrogen receptor -- from chick Mullerian duct. J. Biochem. 150:183-190.
- Teng, C. S. and C. T. Teng (1975 b) Ontogeny of cytoplasmic oestrogen receptor in chick Mullerian duct, J. Biochem. 150:191-194.
- Teng, C. S. and C. T. Teng (1976) Studies on sex organ development. Oestrogen receptor translocation in the developing chick - Mullerian duct. J. Biochem. 154:1.
- Teng, C. S. and C. T. Teng (1979) Prenatal effect of the estrogenic hormone on embryonic genital organ differentiation. In: Ontogeny of receptors and reproductive hormone action. (Ed. Hamilton, T. H.; Clark, J. H. and Sadler, W. A.) pp. 421-440 New York Raven Press.
- Tokarz, R. R.; R. W. Harrison and S. S. Seaver (1979) The mechanism of androgen and estrogen synergism in the chick oviduct, J. Biol. Chem. 254(18):9178-9184.
- Tran, D. and N. Josso (1977) Relationship between avian and mammalian antimullerian hormone. Biol. Reprod. 16:267-273.
- Willier, B. H. (1939) The embryonic development of sex. In: Sex and internal secretions. (Ed. Allen, Danforth and Doisy) pp. 64-144 Baltimore, MD, William and Wilkins.
- Willier, B. H. (1942) Hormonal control of embryonic differentiation in birds. Cold Spring Harbor Symposia. 10:135-144.

- Willier, B. H. (1952) Development of sex hormone activity of the avian gonad. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55:159-171,
- Wolff, E. (1959) Endocrine function of the gonad in developing - vertebrates. In: Comparative endocrinology. (Ed. Gorbman A.) pp. 569-573 New York, Wiley.
- Wolff, E. and A. Ginglinger (1935) Sur la transformation des poulets males en intersexues par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. Archs. Anat. Histol. Embryol. 20:219-278,
- Wolff, E. and Y. Ostertag (1950) Les processus histologiques de la regression des canaux de Muller chez l'embryon de poulet male. C. R. Acad. des Sci. 230:2120-2122,
- Wolff, Et. and Em. Wolff (1947) Sur les stades de receptivite -- aux hormones femelles des gonades et des voies genitales chez -- l'embryon de poulet male. C. R. Soc. Biol. 141:415-416.
- Wolff, Et. and Em. Wolff (1951) The effects of castration on -- bird embryos. J. exp. zool. 116:59-98,
- Woods, J. E. and L. H. Erton (1978) The synthesis of estrogens - in the gonads of the chick embryo. Gen. comp. Endocr. 36:360-370.
- Woods, J. E. and E. S. Podczaski (1974) Androgen synthesis in -- the gonads of the chick embryo. Gen. comp. Endocr. 24:413-423,
- Woods, J. E.; R. M. Simpson and P. L. Moore (1975) Plasma testosterone levels in the chick embryo. Gen. Comp. Endocr. 27:543-547.

- Woods, J. E. and R. L. Weeks (1969) Ontogenesis of the pituitary gonadal axis in the chick embryo, Gen. comp. Endocr. 13:242-254.
- Wyburn, G. M.; H. S. Johnston; M. H. Draper and M. F. Davidson (1970 b) The fine structure of the infundibulum and magnum of the oviduct of the *Gallus domesticus*, Q. J. exp. Physiol. 55:213-232.