



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS GÓNADAS EN EL
POLLO
(*Gallus domesticus*)”**

MARTA ORIANA ARAYA RIVAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: DRA. MARIANA ROJAS RAUCO

SANTIAGO, CHILE

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS GÓNADAS EN EL POLLO
(*Gallus domesticus*) ”

MARTA ORIANA ARAYA RIVAS

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Ciencias Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
Profesora Guía: Mariana Rojas Rauco	
Profesora Consejera: Soledad Fernández Garay	
Profesora Consejera: Bessie Urquieta Mangiola	

SANTIAGO, CHILE
2010

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a la Doctora Mariana Rojas, por haber creído en mí hasta el final, a pesar de todos los inconvenientes.

A ella todo mi respeto y admiración.

A mi esposo Alejandro, a mis hijos, Emilio y Pablo, por su amor incondicional.

Finalmente a todos los amigos que conocí en este camino, por su ayuda constante y desinteresada, como a la Doctora Susana Domínguez, Don Francisco Cortés, entre otros.

Muchas Gracias

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	i
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
SUMMARY	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
Línea germinal	2
Línea gonadal	4
Formación de la gónada	5
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIAL Y METODO	11
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXO 1	37
ANEXO 2	38

INDICE DE TABLAS, GRAFICOS Y FIGURAS

TABLA 1 GRUPOS DE TRABAJO Y SUS CARACTERÍSTICAS	12
TABLA 2 Promedio de gonocitos por gónada izquierda y derecha, en hembras y machos en los Grupos 2 ,3 y 4.	39
GRAFICO 1 y 2 : Número de CGPs en gónadas de machos y hembras.	28
Figura 1: Incubadora de huevos	13
Figura 2: Extracción del embrión	13
Figura 3: Embrión del grupo 1 dentro del huevo	17
Figura 4: Embrión del grupo 1 disecado	17
Figura 5: Corte transversal de embrión del grupo 1, técnica H-E.	17
Figura 6: Corte transversal de embrión del grupo 2, técnica H-E	18
Figura 7: embrión del grupo 2, vista de mesonefros y gónadas incipientes	19
Figura 8: Corte transversal de embrión del grupo 2, técnica PAS	20
Figura 9: Corte transversal de embrión del grupo 3, técnica PAS	21
Figura 10: Corte transversal de embrión del grupo 3, vista de la asimetría gonadal	22
Figura 11: diferentes vistas de embrión del grupo 4	23
Figura 11 a: Embrión dentro del huevo	
Figura 11 b: Embrión disecado	
Figura 11 c: Corte transversal, vista de la asimetría gonadal, técnica PAS	
Figura 12: embrión del grupo 4, macho, epitelio celómico.	24
Figura 13: embrión del grupo 5, gónada femenina disecada	26
Figura 14: embrión del grupo 5, gónada masculina disecada	26
Figura 15: embrión del grupo 5, corte transversal testículos, H-E	27
Figura 16: embrión del grupo 5, corte transversal ovarios, H-E	27

RESUMEN

El pollo (*Gallus domesticus*) es muy utilizado para el estudio de la embriología. La línea germinal compuesta por las células germinales primordiales (CGP) aparece en el embrión desde las 18 horas de incubación, las cuales comienzan a migrar dirigiéndose hacia el área ventromedial de la superficie del mesonefros, por medio de los vasos sanguíneos incipientes, pasando a ser parte fundamental del desarrollo de esta. Las hembras solo desarrollan la gónada izquierda mientras que la derecha degenera en el proceso de la embriogénesis, los machos desarrollan un par de gónadas igualmente funcionales, esto ocurre desde temprano en el desarrollo, (día 5). El proceso por el cual ocurre este fenómeno aun no está claro, existiendo diversas teorías que lo explican, como hormonales, factores del crecimiento, entre otras, algunas muestran que el retroceso de la gónada derecha ocurre tempranamente en el desarrollo y otras de forma tardía como a los 17 días de incubación.

El objetivo del presente trabajo fue conocer y describir etapas del desarrollo gonádico relacionadas a horas de incubación demostrativas de este proceso. Además de tratar de establecer una relación entre la llegada de células germinales a la futura gónada y su posterior desarrollo. El modelo experimental utilizado consistió en 30 huevos fértiles de pollo (*Gallus domesticus*), separados en 5 grupos de 6 huevos cada uno de acuerdo a horas de incubación, serán de 96 (grupo1) 120 (grupo2), 160 (grupo 3), 192 (grupo 4) y 208 horas de incubación (grupo5), de acuerdo a la tabla de Hamilton y Hamburger, a cada grupo se le realizaron dos tinciones: técnica histológica de hematoxilina eosina para identificar estructuras y la técnica histoquímica de PAS para identificar las CGP.

Los resultados obtenidos indican que ya desde temprano en el desarrollo (Día 4) existe la tendencia de las células germinales de dirigirse hacia la cresta genital izquierda, independiente del futuro sexo del embrión, tendencia que se ve claramente hasta el establecimiento de la gónada ya diferenciada a partir del día 7 del desarrollo, donde en la gónada derecha de la hembra se encuentran una menor cantidad de células germinales y esta comienza a desaparecer. Además se observan asimetrías en otras estructuras como el mesogastrio que presenta un

tejido mesenquimático muy laxo y con muchos espacios intercelulares al lado derecho y más denso al lado izquierdo. También el epitelio celómico presenta asimetrías en la altura de sus células, donde el esbozo gonádico derecho está revestido por epitelio cúbico, mientras que el lado izquierdo presenta un epitelio cilíndrico.

Esta tesis constituye un aporte al conocimiento de las asimetrías corporales de los cordados, y permite conocer el momento propicio (el día 6 de incubación) y el lugar adecuado (mesenterio dorsal) para el aislamiento de CGP y su posterior cultivo *in Vitro*, con los fines de obtener células pluripotenciales las cuáles presentan un interés para la investigación con fines productivos.

SUMMARY

Chicken (*Gallus domesticus*) is widely used for the study of embryology. Germline composed of primordial germ cells (PGC) appears in the embryo from 18 hours of incubation, which begin to migrate by going to the ventromedial area of the surface of the mesonephros, through blood vessels emerging, becoming fundamental part of this development. Females only the left gonad develops while the right degenerates in the process of embryogenesis, the males develop a pair of equally functional gonads, this occurs early in development (day 5). The process by which this phenomenon occurs is still unclear, there are various theories that explain it, as hormone, growth factors, among others, some show that the decrease of right gonad occurs early in development and others as late as at 17 days of incubation.

The aim of this study was to determine and describe stages of gonadal development related to hours of incubation demonstration of this process. Besides trying to establish a relationship between the arrival of the future germ cells and subsequent gonad development. The experimental model consisted of 30 fertile chicken eggs (*Gallus domesticus*), separated into 5 groups of 6 eggs each according to hours of incubation, will be 96 (Group 1) 120 (group2), 160 (group 3), 192 (group 4) and 208 hours of incubation (grupo5), according to Hamilton and Hamburger table, each group was subject to two stains: hematoxylin-eosin histology to identify structures and histochemical technique to identify CGP PAS .

The results show that, even early in development (day 4) there is a tendency of the germ cells move towards the left genital ridge, irrespective of the future sex of the embryo, and this trend is clearly up to the establishment of the gonad and differentiated from day 7 of development, where in the right gonad of the female are fewer germ cells, and this begins to disappear. You asymmetries observed in other structures such as the mesogastrio presenting a very loose mesenchymal tissue with many intercellular spaces to the right and left side heavier. Coelomic epithelium also shows asymmetries in the height of their cells, where the outline right gonad is lined by cuboidal epithelium,

while the left side has a columnar epithelium.

This thesis is a contribution to knowledge of bodily asymmetries of chordates, and reveals the right time (on day 6 of incubation) and place (dorsal mesentery) for the isolation of CGP and subsequent culture in vitro, with purpose of obtaining stem cells which have a research interest for productive purposes.

INTRODUCCIÓN

Las aves domésticas han sido muy utilizadas para el estudio de la embriología desde la antigüedad hasta nuestros días. Sus huevos, están disponibles a lo largo de todo el año y son fáciles de incubar en toda época. Además el embrión es fácilmente manipulable, frecuentemente utilizado para el estudio de órganos, por su desarrollo común a todos los vertebrados. La fertilización del ovocito ocurre en el oviducto antes de que se depositen la albúmina y la cáscara. El huevo es telolecítico, con un pequeño disco embrionario situado sobre una yema.

El desarrollo de sólo una gónada funcional es un fenómeno poco común entre los vertebrados superiores, a diferencia de las aves donde ocurre frecuentemente. Actualmente existen estudios controversiales sobre los factores que intervienen en el desarrollo de esta particular estrategia reproductiva de algunas hembras ovíparas lo cual justifica que se realicen nuevos estudios sobre la organogénesis de la gónada, que permitan reconocer en que momento se inician y como evolucionan estas asimetrías del desarrollo embrionario.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las gónadas se originan en una región alargada de mesodermo esteroideogénico situado a lo largo del borde ventromedial del mesonefros (estado 10 de Hamilton y Hamburger,). Las células de la parte craneal de esta zona se condensan para formar los primordios adrenocorticales, y las de la parte caudal se convierten en las crestas genitales. Las crestas genitales incipientes se componen de dos poblaciones principales de células: una derivada del epitelio celómico y otra procedente de la cresta mesonéfrica. (Carlson 2000).

El mesonefros deriva del mesodermo intermedio, apareciendo a las 55 horas de incubación en el pollo, terminando su diferenciación al 4º día de incubación (Patten, 1997). La formación de las crestas genitales requiere de la expresión de, al menos, dos genes: el WT-1, que también es importante al comienzo de la formación de los riñones, y el SF-1 (factor esteroideogénico 1), necesario para el desarrollo tanto de las gónadas como de las glándulas suprarrenales (Carlson, 2000).

En la diferenciación del ovario de mamífero, en contraste con el testículo, la presencia de células germinales viables es esencial para su diferenciación; si tales células no colonizan las crestas genitales o si son anómalas (por ejemplo XO) y se degeneran, la gónada se retrae y el resultado son cintillas ováricas (ovarios vestigiales) (Carlson, 2000). Este tema no ha sido estudiado con el mismo énfasis en las aves.

Línea germinal

La evolución de la línea germinal, ha sido muy estudiada en las primeras etapas del desarrollo del pollo, no así en las etapas de la organogénesis avanzada, es así como se ha descrito la presencia de CGP a las 18 horas de incubación, como células grandes, ricas en glucógeno originadas en el epiblasto durante la gastrulación, ellas se sitúan entre el endodermo y ectodermo en el área del creciente germinal, en el borde entre la región del área pelucida y el área opaca anterior del embrión, midiendo aproximadamente 14 µm de diámetro (Fujimoto *et al*, 1975). Cuando se forman los

vasos en el área vascular, las células germinales se introducen en ellos y durante el tercer día de incubación alcanzan los vasos mesonéfricos y colonizan el esbozo gonadal (Mathews, 1972). Con la llegada de las CGP y el crecimiento del esbozo, se conforma la gónada indiferenciada, diferenciándose esta a, oogonia en el embrión femenino y espermatogonia en el masculino (Natio *et al*, 2001).

Después de aparecer en la región del creciente germinal las CGP migran hacia la gónada presuntiva en el estado 19 de H y H. unos de los mecanismos de migración de las CGP hacia la gónada es una atracción pasiva de esta sobre las CGP, a través de movimientos morfogenéticos, realizado por la red de capilares que comienzan a desarrollarse alrededor de la gónada en formación, próximo al epitelio germinal. Secundariamente existen factores que contribuyen a la atracción de estas células hacia la gónada inicial, factores que no son específicos pudiendo atraer a otros tipos de CGP como de codorniz, o algunos fibroblastos hacia la senda, al ser cultivados in Vitro. (Kuwana, 1999). Otros estudios también lo confirman, ya que las CGP muestran movimientos direccionales hacia la línea germinal debido a factores emitidos por esta, demostrado al cultivar in vitro CGP sobre colágeno en estado 13 junto a otros tejidos (tubo neural, corazón alantoides e hígado), moviéndose siempre las CGP hacia la línea germinal de la futura gónada.(Kuwana , 1986).

A medida que circulan las CGP pueden perderse en su camino hacia las gónadas, quedando en lo denominado sitios ectópicos. Después de la separación del endodermo en el embrión temprano circulan temporalmente por la sangre del sistema vascular y finalmente al dirigirse hacia la gónada temprana, aproximadamente un 20% entre los estados 20-24 llegan a localizarse en sitios extragonadales; donde un 90% de estas células ectópicas son encontradas en la cabeza, principalmente en el mesenquima alrededor del tubo neural, lo que es atribuido a una disminución en la velocidad de la circulación sanguínea en esta región, cuando comienzan a migrar. (Nakamura, 1988).

Se ha visto que al remover la región de la futura gónada en un estado embrionario temprano (10 h and H), las CGP comienzan a migrar de forma ectópica quedándose al estado 14, el 80% en los capilares del saco vitelino, otras en la región de la cabeza, principalmente en el mesenquima y unas pocas en los vasos alrededor del cierre del

tubo neural. Desde el estado 18 en adelante, muchas se acumulan, cerca del 90%, alrededor de la región de la cabeza del tubo neural, migrando en gran cantidad desde los capilares hacia el mesenquima adyacente adonde estaría la gónada extraída. (Nakamura, 1991).

Clásicamente existen dos factores que están implicados en el traspaso de las CGP desde la vía vascular a la gónada inicial, factores quimiotácticos y mecánicos, proceso muy activo en el estado 18. Un factor histoquímico es el denominado SDF-1/CXCL12 que guía a las células hacia la gónada a través de los vasos sanguíneos. La expresión ectópica de esta molécula produce la acumulación ectópica de las CGP, esta molécula solo actúa en la segunda fase de migración, no en una fase temprana de migración, sino cuando las células están próximas a la gónada y son atraídas por esta. (Stebler, *et al*, 2004). Dos tipos de rutas vasculares toman las cgp hacia la gónada inicial, el endotelio aórtico y la arteria mesonéfrica. . (Pérez-Aparicio, 1998).

Línea gonadal

La línea gonadal esta irrigada por la aorta dorsal y el primordio de la arteria mesonéfrica, donde numerosos espacios interendoteliales van desde la aorta dorsal hacia la línea genital. Los espacios interendoteliales son importantes en el intercambio de sustancias entre el espacio avascular de la línea germinal y el endotelio aórtico (estado 18). Mientras que factores mecánicos pudieran ser importantes para la migración por arteria mesonéfrica como mayor presión de flujo, no se han encontrado razones morfológicas que expliquen la lentitud de movimiento que existe al pasar por la aorta dorsal a nivel de la línea germinal lo que facilitaría la extravasación hacia la línea germinal en la gónada inicial. (Pérez-Aparicio, 1998).

Se ha identificado a las CGP del pollo, en la sangre, en el esbozo gonádico y en los cultivos celulares, mediante la técnica de Schiff (PAS), considerándose las células PAS positivas (Gyoung-Jung *et al*, 2005). Actualmente, se usan los anticuerpos anti SSEA-1 (antígeno embrionario específico de estado 1) como marcadores inmunológicos para identificar temporal y espacialmente el desarrollo de las CGP en el blastodermo

temprano. El anticuerpo anti SSEA-1 reconoce el epítipo de CGP al encontrarse en el mesenterio dorsal y en la cresta genital, no obstante en etapas posteriores este epítipo ya no se expresa (D'Costa y Petite, 1999).

Formación de la gónada

El origen del componente somático de la gónada esta aun en debate, aunque se ha sugerido que estas células derivan del epitelio celómico desde el mesenquima subyacente o desde el mesonefros. Histológicamente los ovarios y testículos pueden comenzar a diferenciarse desde el día 6,5. En las gónadas masculinas los cordones testiculares consisten en células de sertoli y células germinales, los cuales son delimitados por una membrana basal la cual nace temprano en el desarrollo. En contraste el desarrollo del ovario es solo completado después del periodo de incubación con la formación de los folículos en el córtex. (Anshin, *et al*, 2005)

Las gónadas surgen en el área ventromedial de la superficie del mesonefros, las hembras solo desarrollan la gónada izquierda mientras que la derecha degenera en el proceso de la embriogénesis, los machos desarrollan un par de gónadas igualmente funcionales. Las gónadas derecha e izquierda de ambos sexos, sin embargo, muestran diferencias morfológicas y moleculares, desde un inicio en la línea germinal, diferencias que persisten, favoreciendo en parte la diferenciación posterior en la determinación sexual, no afectando el desarrollo normal de ambos testículos en el macho. Esta asimetría responde a factores que controlan asimetrías tanto en el desarrollo de otros órganos, como el corazón y los intestinos. (Guioli, 2007).

La asimetría gonadal izquierda-derecha, en las aves hembras, es un proceso complejo dentro del proceso de la diferenciación gonadal. La asimetría se manifiesta desde el día 3, en ambos sexos, donde un gran numero de CGP coloniza a la gónada izquierda, siendo mas evidente la diferencia en las hembras, constituyendo una diferencia temprana en el desarrollo. También el volumen y el espesor de la superficie del epitelio, es más grande en la gónada izquierda de ambos sexos. Estas diferencias desaparecen en los machos persistiendo solo en las hembras, donde solo el ovario y ducto mulleriano izquierdos se desarrollan hasta el final. . (Anshin, *et al*, 2005)

Aun no están claros los mecanismos por los cuales evolutivamente hablando, surge esta estrategia de desarrollo. Se han postulado distintas teorías que tienen que ver con factores que inducen el desarrollo gonadal y de otros tejidos en distintas especies de animales. Existe una proteína denominada Proteína Morfogenética del Hueso (BMP), perteneciente a la superfamilia de decapeptidos con más de 60 proteínas identificadas. BMP es expresada durante el desarrollo de los vertebrados en el epitelio y/o mesenquima en muchos lugares de interacción epitelio-mesenquimática, como órganos digestivos, pulmones, cabeza y cola, siendo importantes mediadores en eventos morfogenéticos. Pero el rol que realizan en la gónada aun no está claro, siendo importante en el desarrollo del sistema urogenital, aparentemente también, en el desarrollo de la asimetría de los ovarios y en la diferenciación sexual de forma tardía en el desarrollo gonadal, (Anshin, *et al*, 2005); debido que al comenzar la diferenciación sexual ocurre una expresión asimétrica de Bmp7 en el mesenquima ovárico de ambos ovarios. (Hoshino, *et al*, 2005).

También el escaso desarrollo de la gónada derecha en la hembra se ha relacionado con otros factores, como por ejemplo, influencia hormonal o de factores de crecimiento. (Yoshioka *et al* 2005) observando que el factor de crecimiento fibroblástico 9 (FGF9), es expresado en mayor cantidad en la gónada indiferenciada del macho en comparación con la hembra, y también que en esta última el FGF9 se expresa notoriamente en el ovario izquierdo y muy poco en el derecho, concluyendo que este factor podría ser determinante en la ausencia de desarrollo del ovario derecho.

Otros autores, por el contrario, han descrito un desarrollo relativamente simétrico entre ambas gónadas en la gallina hasta el día 18, donde involuciona la gónada derecha debido a la expresión asimétrica del producto génico de la P450-aromatasa, lo que es considerado un mecanismo tardío determinante de involución (Villalpando *et al*, 2000).

Smith *et al.*, 1999., indican que el receptor nuclear del factor esteroideogénico 1, (SF-1) regula la expresión de enzimas esteroideogénicas y es esencial para el desarrollo de las gónadas y de las glándulas adrenales en mamíferos. En el pollo existe el homólogo cSF-1. A los 3,5 días (estados 21-22) del desarrollo embrionario del pollo, la cSF-1 fue detectable por hibridación "in situ" en la cresta genital de ambos sexos. Al ocurrir la

diferenciación sexual el día 5,5-6,5 (estado 28-30), la expresión de cSF-1 es igual en ambos sexos. Desde el día 6,5 a 8,5 (estados 30-35) la expresión es mayor en el ovario comparado con el testículo. A los 13,5 días (estado 40), tanto ovarios como testículos muestran expresión de cSF-1, En el ovario izquierdo se observan altos niveles de expresión en comparación con el derecho que se encuentra en regresión. Por otra parte, al analizar las gónadas aisladas se confirma una evidente mayor expresión de cSF-1 en la diferenciación de los ovarios en relación con los testículos. En cortes histológicos de gónadas de 8,5 días, la expresión de cSF-1 fue localizada en la médula del ovario y fue débilmente detectado en los testículos. Estas observaciones indican que el cSF-1 tiene un rol en el desarrollo temprano de la gónada en los vertebrados.

Se observó también, que existen distintos patrones genéticos que llevan a la formación de un macho o a una hembra, como por ejemplo en el período que va desde los días 5,5 a 8,5 actúa, exclusivamente en la formación del testículo, el Sry relacionado al HMG box gen 9 (sox 9), no encontrándose en las hembras.(Yamamoto *et al*, 2003). Desde el descubrimiento del gen Sry como determinante testicular en el cromosoma Y en los mamíferos, diversos estudios se han realizado para describirlos también en otros vertebrados no mamíferos como las aves, en estas no se ha encontrado Sry como tal, sino un factor relacionado a un conjunto de genes denominados Sox 9, este gen se cree que es el comienzo de una cascada de reacciones que llevan a la diferenciación gonadal en las aves, no sabiéndose aún si se encuentra ubicado en el cromosoma W o Z. (Mizuno, *et al*, 2002).

Se ha descrito la posibilidad de diferenciar las CGP que contengan cromosoma W o no, realizando estudios con pollos híbridos que contenían CGP provenientes de hembras en pollos cromosómicamente machos (WW), pudiendo establecer que las CGP provenientes de hembras producen espermatogonias, pero en una cantidad muy baja, no pareciéndose a la espermatogénesis de un macho normal. (Tagami, *et al*, 1997).

Las CGP en el testículo comienzan a dividirse activamente después de los 13 días de incubación (estado 39, H and H) diferenciándose a espermatogonia. En el ovario izquierdo la diferenciación comienza a los 8 días de incubación (estado 34) desde

oogonia a ovocito primario, este a su vez, entra a la profase meiótica a los 16 días de incubación (estado 42), el peak de ovocitos primarios es a los 17 días los que rápidamente decrecen cesando la profase meiótica en esta fase. En el ovario derecho el escaso desarrollo de este cesa a los 7 días de incubación degenerando completamente. (Natio, *et al*, 2007)

Por ultimo, Las EG (células germinales embrionarias) de pollo derivadas de CGP, han demostrado al igual que las CGP de mamíferos, ser indiferenciadas y pluripotentes donde al cabo de varios pasajes y cultivos sobre una capa de blastoderma en estado 10 de H and H fueron capaces de formar quimeras con cuerpos embrioides y una variedad de tipos celulares distintos. (Park y Han, 2000)

En un embrión de temprana edad puede distinguirse los lados derecho e izquierdo de este ya que a partir del estado 19 de H and H existen diferencias en la morfología celular del mesenterio dorsal derecho e izquierdo, el que coincide con el cierre del tubo digestivo. En esta etapa temprana las células mesenquimáticas del mesenterio dorsal son mas condensadas hacia el lado izquierdo que sobre el derecho, además el epitelio que esta sobre el lado izquierdo exhibe una morfología columnar, en contraste a la morfología cuboidal del derecho. Estas propiedades provienen de la señal de distintos factores: Pitx2 y isl1, expresados específicamente sobre el lado izquierdo., y Tbx18 expresado sobre el derecho. Factores que están regulados por proteínas nodales presentes exclusivamente sobre el lado izquierdo. Esto da como resultado en que las células del mesenterio asumen una forma trapezoidal, inclinándose el intestino primitivo hacia la izquierda sobre el lado derecho. (Davis, *et al*, 2009)

Una vez ya formada la gónada en la hembra, podemos identificar diversas estructuras como: células intersticiales del ovario que secretan estrógeno, donde en el izquierdo, son claramente identificadas y los cordones medulares alrededor del tejido conectivo, desde los 11 días de incubación. Estas células presentan un citoplasma de aspecto espumoso con vacuolas claras de distinto tamaño. Al avanzar en la incubación estas células comienzan a anidarse y a aumentar en número y la actividad enzimática esteroidea. (Ávila *et al*, 1989).

El ovario izquierdo presenta córtex y medula, mientras que el derecho no posee córtex. Las células epiteliales del córtex se encuentran alrededor de los ovocitos, los cuales poseen cuerpos de Balbiani formados por mitocondrias, aparato de golgi y centríolo. Algunos núcleos se observan en profase meiótica (Ávila, *et al*, 1987).

De lo anteriormente señalado, se observa que hay informaciones contradictorias relacionadas con la organogénesis gonadal media y tardía. Faltan estudios morfológicos que describan la cronología y génesis de testículos y ovarios derecho e izquierdo. El presente trabajo se describen las características morfológicas de la gónada indiferenciada y su diferenciación posterior como testículo u ovario, también se desarrolló un estudio comparativo cronológico de las asimetrías de la gónada derecha e izquierda en la hembra.

OBJETIVO GENERAL

Describir las etapas del desarrollo gonádico y su relación con horas de incubación reconociendo asimetrías entre los lados derecho e izquierdo tanto en la línea germinal como somática por sexos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir la morfología de la gónada del pollo hembra y macho durante distintas etapas del desarrollo, describiendo corteza, médula y la presencia o ausencia de cordones sexuales.
2. Analizar tamaño de la gónada y número de células de la línea germinal del pollo hembra y macho en las distintas etapas del desarrollo,

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Embriología Comparada, perteneciente al Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile.

Para este estudio se utilizaron 30 huevos fértiles de pollo (*Gallus domesticus*), obtenidos en el ISP, pertenecientes a la raza "White Leghorn", los huevos fueron lavados en agua corriente, limpiados con una solución de alcohol-éter 1:1, posteriormente ubicados en una bandeja para huevos en forma horizontal, e incubados bajo condiciones de humedad (vaso lleno con agua corriente puesto permanentemente dentro de la incubadora) a 38°C en una incubadora Forma Scientific. (Figura 1).

Extracción y preparación histológica

Los embriones de cada uno de los grupos se extrajeron bajo el siguiente procedimiento: Se realizó un orificio en ambos polos para eliminar albúmina y bajar el disco embrionario. Se cortó la cáscara por la línea que pasa por ambos polos (Figura 2). Se corta y separa el embrión del vitelo y este es depositado en una cápsula petri. Se enjuagó con buffer fosfato (PBS), eliminando la membrana corioalantoidea de la superficie y se fijaron a los embriones en formalina tamponada al 10% por tres horas hasta la inclusión definitiva en bloques de parafina Se constituyeron cinco grupos de 6 huevos cada uno. Los grupos fueron sacados de la incubadora a las siguientes horas de incubación:

TABLA 1: GRUPOS DE TRABAJO Y SUS CARACTERÍSTICAS

Nro de grupo	Horas de Incubación	Estado según tabla de Hamilton y Hamburger	N	Características generales
Grupo 1	96 horas 4 días	24	6	CGP aún en vasos vitelinos, pero mayormente en la cresta germinal (PAS+)
Grupo 2	120 horas 5 días	27	6	CGP mayormente en la cresta germinal(PAS+) Aparece el pico.
Grupo 3	160 horas 6 días	30	6	Aparece la pluma y el "diente del huevo"
Grupo 4	192 horas 7 días	34	6	Membrana nictitante.
Grupo 5	288 horas 12 días	43	6	Pollo ya desarrollado



Fig 1.- Incubadora de huevos

Fig. 2 Extracción del Embrión

Determinación de gónadas derecha e izquierda

Se reconoció el lado izquierdo y derecho, utilizando las diferencias histológicas del mesenterio dorsal. El mesenterio presenta un epitelio de revestimiento cilíndrico y un tejido mesenquimático muy denso al lado izquierdo, en cambio el lado derecho se caracteriza por un epitelio cúbico bajo y un mesénquima laxo. En el último grupo (12 días) se observó dicha característica al diseccionar el espécimen.

Determinación del sexo

El sexaje embrionario se realizó mediante criterios morfológicos en los periodos de 160 horas en adelante (gónada ya diferenciada), los cuales incluyen desarrollo y cantidad de epitelio celómico, túnica albugínea, rete testis, organización de cordones sexuales y diferencia de volúmenes gonadales en etapas avanzadas. En los embriones de 96 y 120 horas, no se realizó sexaje morfológico, ya que en estos estadios de desarrollo, la gónada en formación es aún indiferenciada. Con los mismos criterios fueron descritas morfológicamente las gónadas en desarrollo y sus relaciones con los otros órganos cercanos a ellas (mesonéfricos, glándula adrenal, mesogástrico y pared abdominal posterior).

Descripción morfológica del desarrollo de las gónadas

Para este procedimiento se seccionó completamente al embrión incluido en parafina, mediante cortes seriados transversales, Se utilizó la técnica Hematoxilina-eosina (anexo 1), describiéndose la morfología general y estructuras internas (corteza, médula y cordones sexuales).Procediendo a fotografiar las etapas del desarrollo gonádico de acuerdo a horas de incubación.

Reconocimiento y descripción de la línea germinal

Para el reconocimiento de la línea germinal (CGP) en los diferentes estados evolutivos del desarrollo de los embriones estudiados, desde la llegada de las primeras CGP por el mesenterio dorsal, hasta la colonización y los cambios morfológicos que experimentan en su organogénesis, se realizó la técnica histoquímica PAS (anexo2), que identifica glicógeno y GAGs (glicosaminoglicanos), fueron consideradas células germinales primordiales, aquellas células PAS positivas ubicadas en esbozos gonadales y mesogástrico adyacente, Son de mayor tamaño que las células del mesénquima que las rodean, con núcleos prominente, relación citoplasma/núcleo pequeña, de aspecto globoso, con o sin presencia de filopodios.

Se realizó un conteo corte por corte de los embriones de pollo de 5, 6 y 7 días, los cuales mostraban el número de CGPs más significativo. El número de CGPs por gónada en cada pollo, fue ingresado a una tabla para calcular el número promedio de células por gónada en cada grupo (Tabla 2). Las CGP del grupo 1 no fueron contadas debido a que la mayoría de estas células en este periodo embrionario se encuentran migrando a través de los vasos sanguíneos y muy pocas ya han colonizado la gónada, tampoco las del grupo 5 ya que en la gónada diferenciada no existen CGP porque estas son consideradas ovogonias o espermatogonias respectivamente.

Para evitar contar una misma célula dos o mas veces, se procedió a cortar el bloque cada 5um, una vez obtenida la cinta de muestras, se montaba en el portaobjetos cada 4 muestras, es decir se toma la primera y luego la quinta y así sucesivamente.

Se analizaron y fotografiaron las secciones histológicas de cada muestra utilizando un microscopio marca Zeiss® Las imágenes fueron almacenadas en formato JPG.

RESULTADOS

En el grupo 1 (96 horas), se observaron embriones con formación de miembros, vesículas encefálicas prominentes, un alantoides en crecimiento y se observa gran desarrollo del alantocorion con abundante cantidad de vasos sanguíneos (figuras 3 y 4). Histológicamente se evidenció mesonefros constituido por túbulos, glomérulos y un conducto mesonéfrico. En la región ventromedial se encuentra la cresta genital formada por epitelio celómico y mesénquima subyacente (figura 5), la gónada se encuentra indiferenciada, observando en todas ellas gran actividad celular. Ya se observan CGP las cuales se encuentran mayoritariamente migrando a través de los vasos sanguíneos, encontrándose también una temprana tendencia de estas de dirigirse hacia el lado izquierdo del embrión, visto en todos los embriones, independiente del futuro sexo de este.

Los embriones del grupo 2 (120hrs), 3 (160hrs) y 4 (192hrs), presentan un meso intestinal que ha iniciado la incurvaciones. El lado derecho se caracteriza por epitelio cúbico simple y tejido mesenquimático laxo, prácticamente sin CGP, en cambio el lado izquierdo presenta epitelio cilíndrico y un tejido mesenquimático subyacente donde se puede visualizar una matriz rica en glicosaminoglicano y una mayor densidad celular, se ven además muchas CGP. El glicosaminoglicano se identifica gracias al azul de Alcian.

En los grupos 1, 2 y 3, se observaron Células germinales primordiales (CGP) esféricas, con un núcleo muy grande de 8 μm de diámetro y un citoplasma de 14 μm aproximadamente. En el citoplasma se evidenció gránulos de glicógeno PAS positivo. Estas CGP no se encuentran sólo en los vasos sanguíneos, sino que migrando a través del mesenquima del mesogastrio intestinal. En ocasiones se encuentran en forma individual y otras veces formando grupos. También fue posible observar estas células en mitosis. El mesogastrio se caracteriza por presentar un tejido mesenquimático muy laxo y con muchos espacios intercelulares al lado derecho y

más denso al lado izquierdo. El epitelio celómico que reviste los esbozos gonadales derecho e izquierdo, también presentan asimetrías con clara diferencias en la altura de sus células, de esta manera el esbozo gonádico derecho esta revestido por epitelio cúbico, mientras que el lado izquierdo presenta un epitelio cilíndrico. Un mayor número de CGP se identifica migrando hacia la gónada izquierda en comparación con la derecha (figuras 6, 7 y 8)

Las CGPs se mantuvieron migrando hasta el día 7 (grupo 4), día hasta el cual también podían ser encontradas en el mesogastrio cercanas a los esbozos gonadales (figuras 6, 7 y 8). Estas células colonizaron las crestas genitales a los cinco días (grupo 2) (Figura 8). Se pudo reconocer diferencias entre sexos gonadales desde los 6 días, según criterios morfológicos. Los principales fueron la asimetría de volumen entre las gónadas y la altura del epitelio gonadal (figuras 9, 10 y 11c). También, se encontraron diferencias en la composición del mesogastrio dorsal, el cual se mostró más laxo hacia la gónada izquierda. En cuanto al epitelio celómico, el izquierdo se encontró más alto que el derecho hacia la cavidad peritoneal.



Figura 3. Huevo incubado por 96 horas (grupo 1)
Se observa gran desarrollo del alantocorion y gran cantidad de vasos sanguíneos.

Fig 4 Embrión de pollo de 96 horas (grupo 1) Se observan: Vesículas encefálicas (v), esbozos de miembros (m) y Alantoides (a)



Fig 5 Corte transversal de embrión de 96 horas de incubación (grupo 1). Se observa conducto mesonefrico (m), Túbulos mesonèfricos (t), Las CGP han iniciado la colonización del esbozo gonádico.

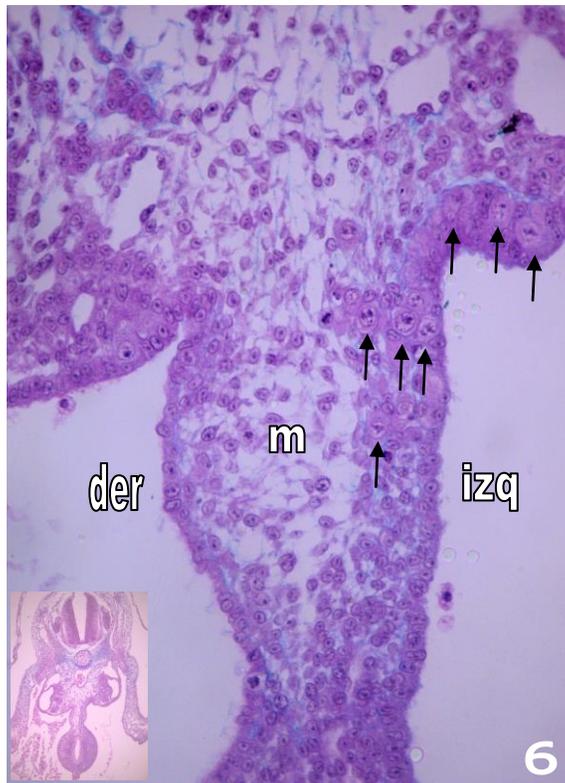


Fig 6. Corte transversal de embrión de 5 días (grupo 2) a nivel de mesonefros y gónada. Se observa el meso intestinal (m). El mesénquima izquierdo de este meso es más denso y contiene un gran número de CGP (flechas). La cresta gonadal izquierda tiene epitelio cilíndrico con varias CGP (flechas), en cambio la cresta gonadal derecha es cúbica y no contiene CGP. En el recuadro se ve el corte transversal en una visión panorámica. Hematoxilina-eosina, 100X

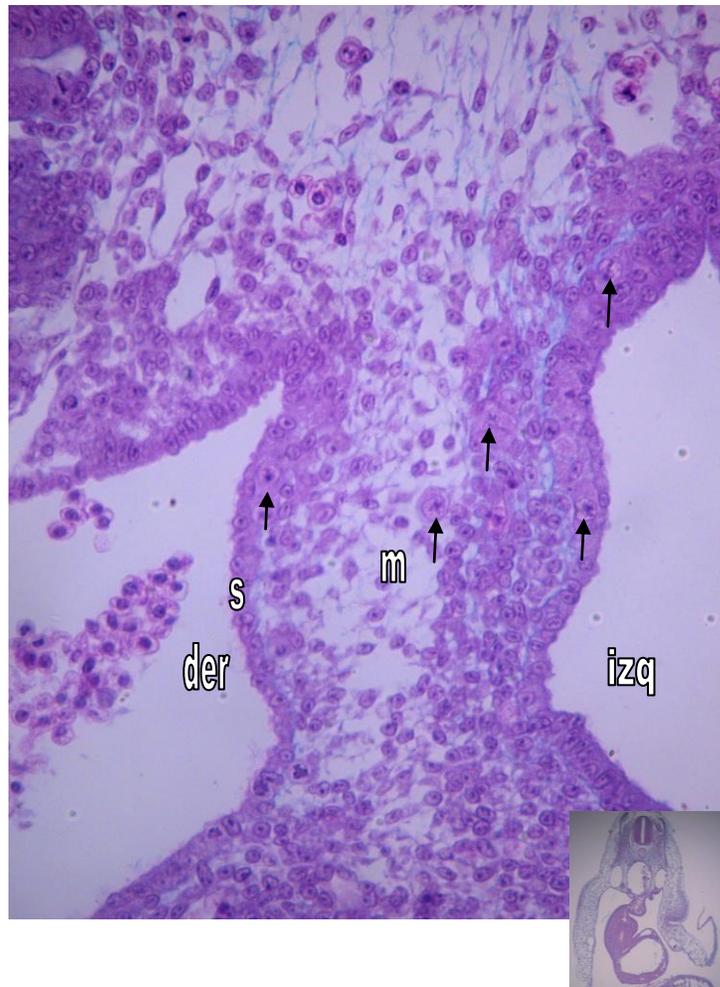


Fig 7. Corte transversal de embrión de 5 días (grupo 2) a nivel de mesonefros y gónada. Se observa el meso intestinal (m).que ha iniciado la incurvaciones. El lado derecho (der) presenta epitelio cúbico simple (s), en cambio el izquierdo (izq) se identifica por epitelio cilíndrico y un tejido mesenquimático subyacente rico en glicosaminoglicano y mayor densidad celular. La cresta gonadal derecha es cúbica y no contiene CGP. En el recuadro se ve una visión panorámica. Hematoxilina-eosina.400x

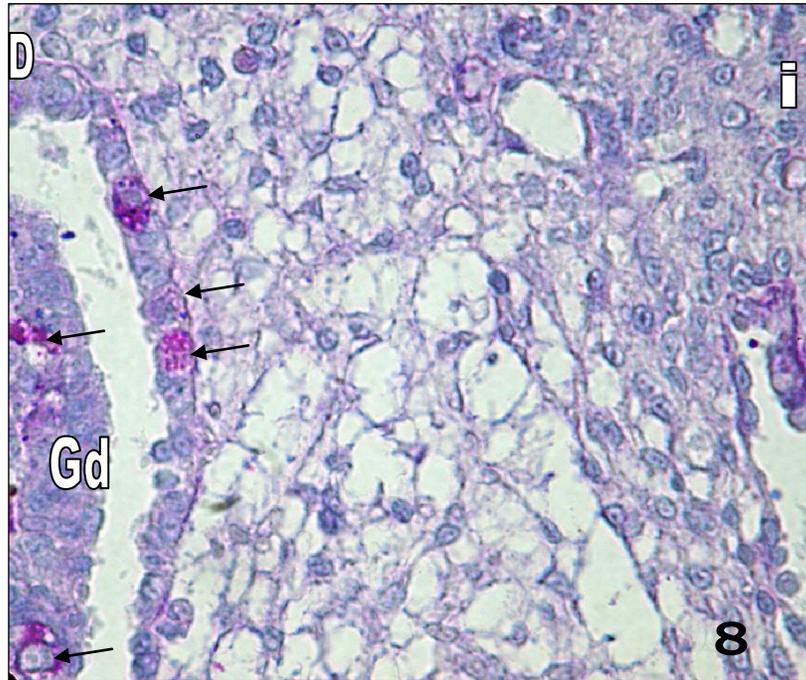


Figura 8.- Corte transversal de embrión de pollo 5 días (grupo 2), se observa CGP fuertemente PAS+ ubicadas en el epitelio de revestimiento de la mitad derecha del meso intestinal, también se encuentran en el epitelio del esbozo gonádico derecho (Gd). El mesenquima subyacente es muy laxo, una membrana basal PAS+ en la interfase entre ambas. Técnica PAS 400x

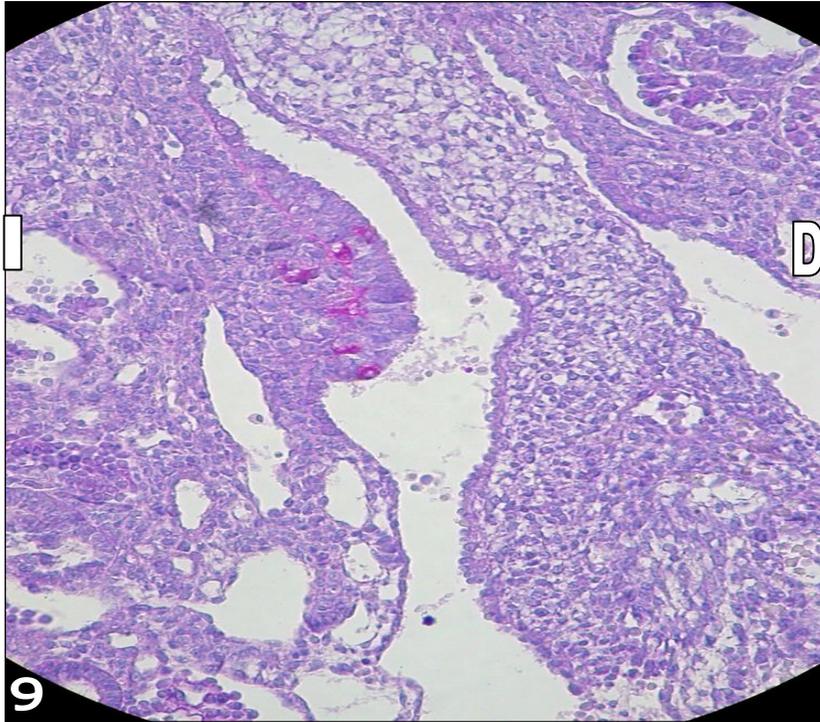


Figura 9. Embrión de pollo de 6 días (grupo 3). Se observa una diferencia de altura entre el epitelio celómico de la gónada derecha (cúbico bajo), y la izquierda (cilíndrico). La gónada del lado izquierdo es más prominente que la derecha y contiene un mayor número de gonocitos. No se identifican CGP en el mesenterio intestinal. PAS+, técnica PAS 100x

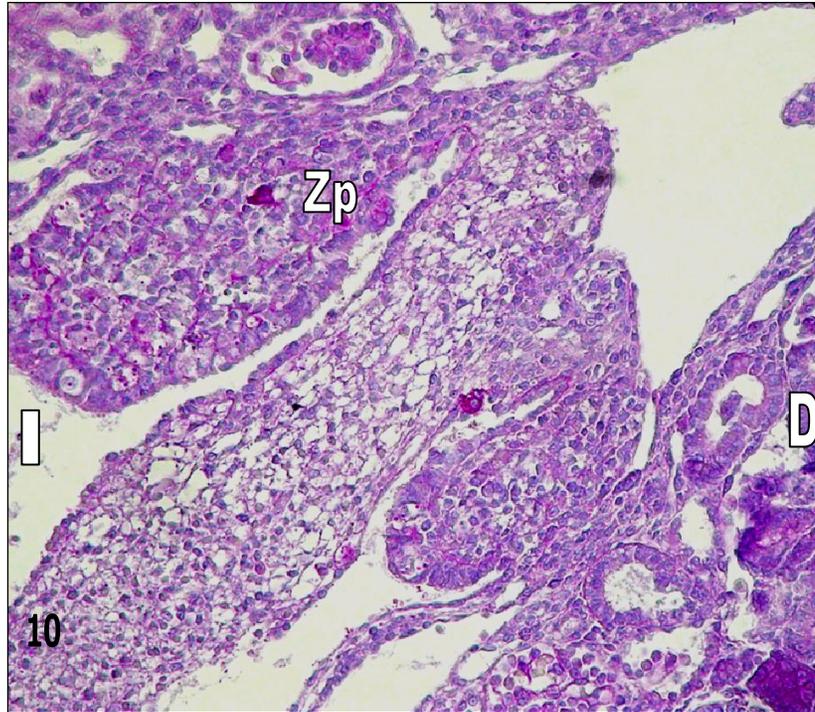
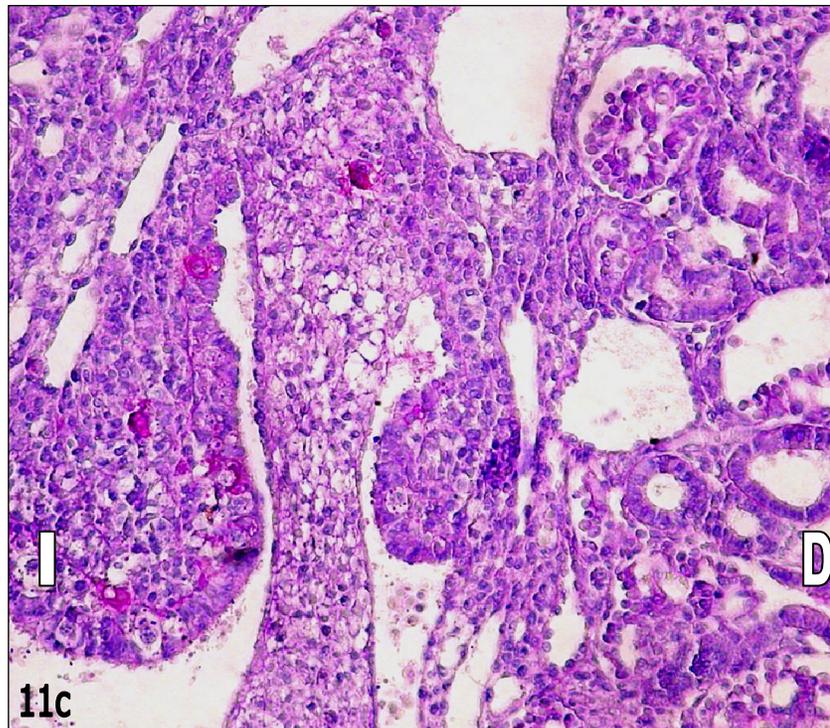
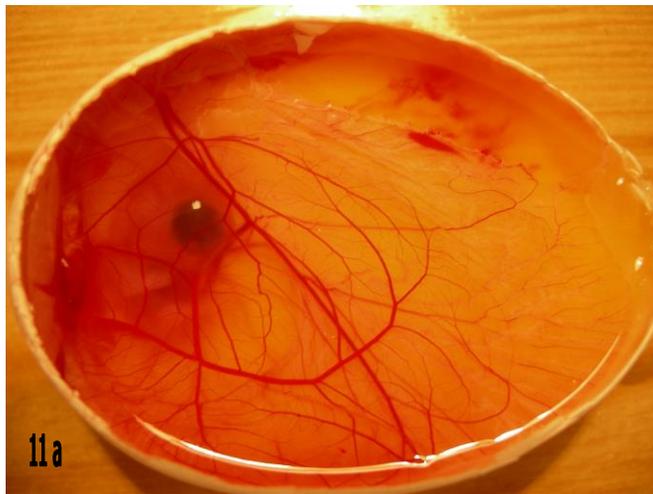


Figura 10: Embrión de pollo de 6 días (grupo 3) de incubación, técnica PAS (100x). Obsérvese la asimetría de colonización entre la gónada izquierda y derecha, así como la diferencia de tamaño entre ellas. Además se observa zona paracortical (Zp) de mayor volumen en la gónada izquierda.



Figuras 11a, 11b y 11c embriones del grupo 4 (7 días). Embrión de pollo hembra de 7 días “in ovo” Figura 11b, vista anatómica Figura 11c Sección histológica. Obsérvese la diferencia de colonización de CGPs entre la gónada izquierda y la derecha, la cual presenta pocos gonocitos PAS+. En el extremo superior del mesogastrio, se encuentra una CGP migrando. Técnica PAS (100x)

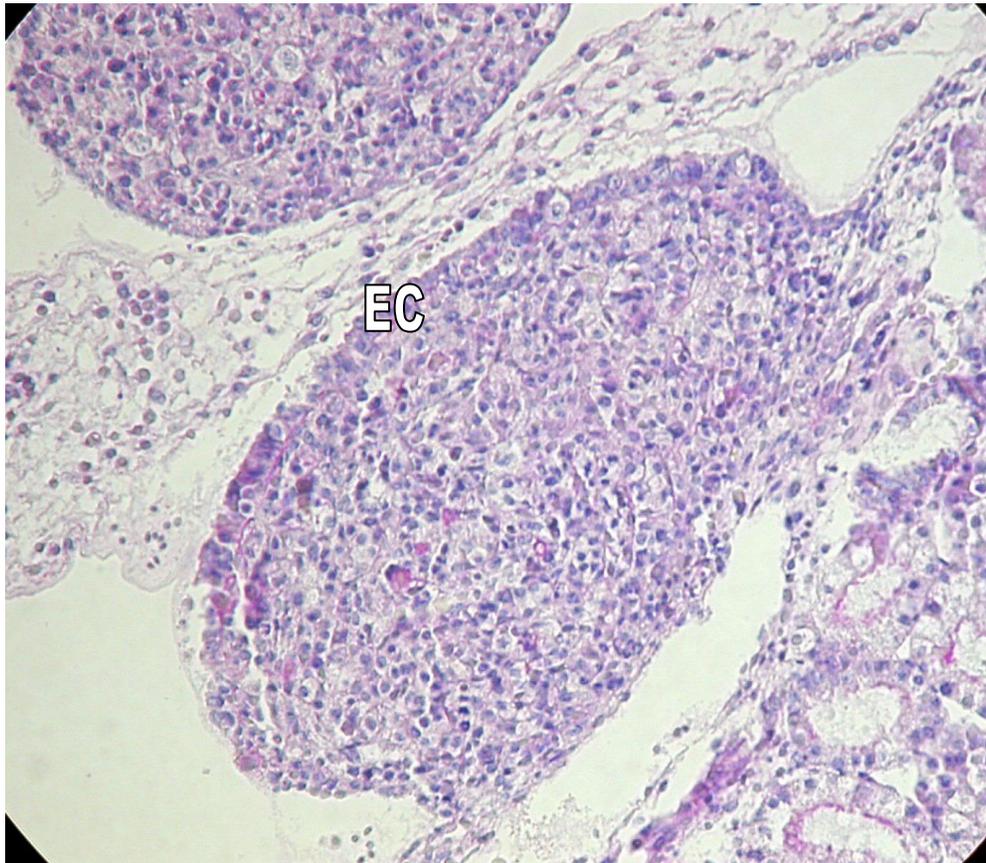


Figura 12. Gónada de embrión de pollo macho del grupo 4 (7 días), Las células germinales primordiales han colonizado el epitelio celómico (EC) que se observa cilíndrico.400X

A partir de los 7 días (grupo 4) se observaron embriones con miembros anteriores y posteriores claramente diferenciados, ojos prominentes con todas sus estructuras internas, cabeza muy grande en relación al cuerpo, cara ya diferenciada con un pequeño pico. Grandes vasos sanguíneos rodean al embrión (figuras 11a y 11b). Histológicamente se observa ya una clara diferencia entre sexos gonadales y entre tamaño de gónadas izquierda y derecha en la hembra (figura 11c).

Desde los 7 días, la gónada derecha de las hembras se encuentra desorganizada, con conductos en todo el espesor de la gónada y con una clara diferencia de tamaño con respecto a la contra lateral izquierda. (Figura 11c). En el ovario izquierdo se observan la corteza, paracorteza y medula de forma clara, mientras que en el derecho casi no

se observa corteza ni CGP en su interior, en cambio presenta mayormente medula.

En el macho ya desde los 7 días (grupo 4) se pudo encontrar la presencia de cordones testiculares (sin lumen), rodeadas de membrana basal (figura 12) y células germinales primordiales que han colonizado el epitelio celómico que se observa cilíndrico.

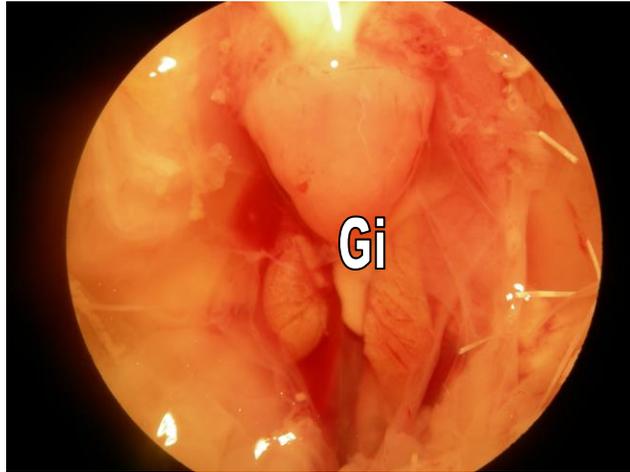


Figura 13. Abdomen de pollo hembra de grupo 5. (12 días) Se observa a la derecha de la imagen un cintilla ovárica y a la izquierda un ovario de mayor tamaño (Gi)



Figura 14. Abdomen de pollo macho del grupo 5. (12 días) Se observa ambos testículos de tamaño similar, gónada Deizquierda y (Gd Gi)

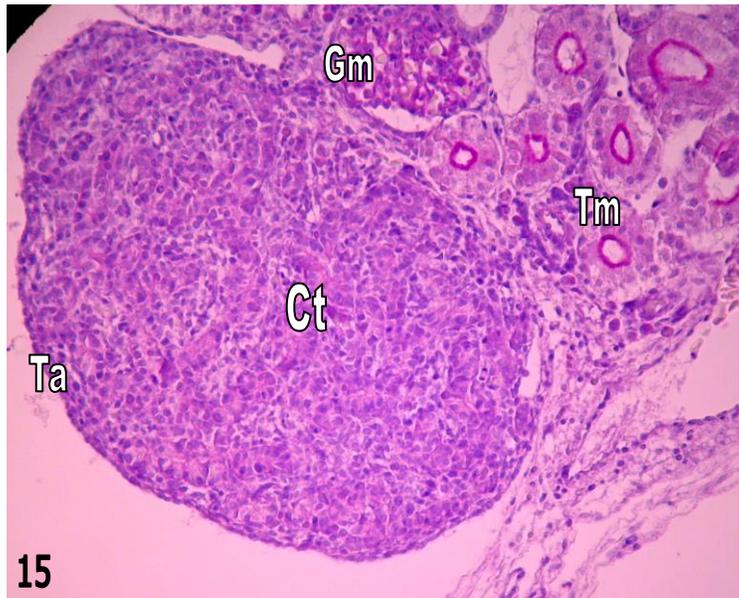


Figura 15: Gónada de embrión de pollo del grupo 5 (12 días) Se identifica una túnica albugínea incipiente (Ta), cordones testiculares (Ct) y tejidos intersticiales entre los cordones. Se observa además túbulos mesonéfricos (Tm) y glomérulos mesonéfricos (Gm) sobre la gónada.100x

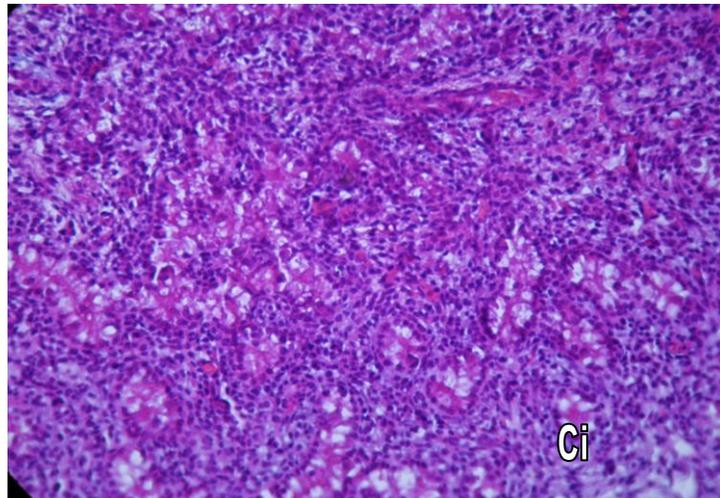
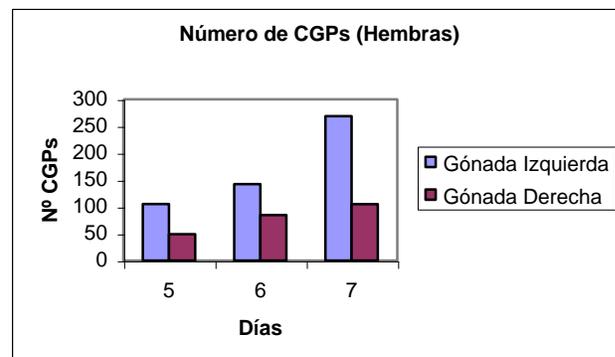
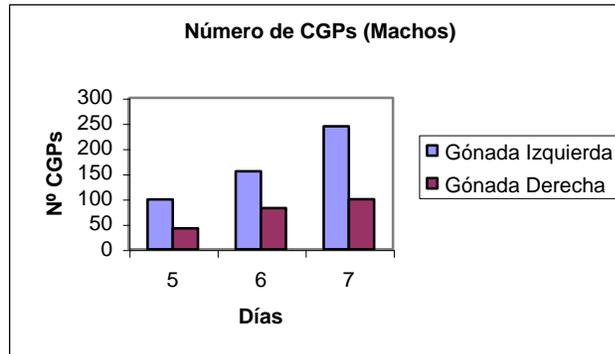


Figura 16. Corte de ovario izquierdo de embrión de pollo del grupo 5. (12 días) Se observa células intersticiales del ovario (Ci) los cuales presentan un citoplasma de aspecto espumoso con vacuolas.400x

Desde los 12 días de incubación (grupo 5), la gónada ya se encuentra claramente diferenciada anatómicamente, todos los fetos que muestran ambas gónadas igualmente desarrolladas resultaron en la histología ser machos (figuras 14 y 15). En cambio todos los que poseen solo una gónada y siempre la del lado izquierdo resultaron ser hembras (figuras 13 y 16). En estos se presentan diferencias sustanciales entre el ovario derecho y el izquierdo, el ovario derecho es una cintilla ovárica, en cambio el izquierdo esta bien desarrollado (figura 13), con una gran corteza con nidos de gonocitos.

El espesor de la superficie del epitelio, es más grande en la gónada izquierda de ambos sexos. Estas diferencias desaparecen en los machos persistiendo solo en las hembras.

Gráficos 1 y 2: Número de CGPs en gónadas de machos y hembras.



El número de gonocitos aumenta significativamente en el grupo 4 con respecto al grupo 2 tanto en hembras como en machos, En los embriones machos y hembras se encontró una mayor cantidad de gonocitos en el lado izquierdo, mostrando la misma tendencia. La diferencia entre el lado izquierdo y el derecho fue aproximadamente el doble, aunque en varios embriones fue del triple.

Discusión

En el grupo 1, no hay diferencia entre cresta genital derecha e izquierda, el epitelio celómico es cilíndrico y los túbulos mesonéfricos están cercanos a la cresta genital. En los grupos 1, 2 y 3, (4, 5 y 6 días) fue posible encontrar células germinales primordiales (CGP) PAS+ en los vasos sanguíneos y migrando a través del mesenquima del mesogastrio intestinal, esto es similar a lo encontrado por Gyoung-Jung et al, 2005 quien identificó a las CGP del pollo, en la sangre, en el esbozo gonádico y en los cultivos celulares, mediante la técnica de Schiff (PAS), Utilizando anticuerpos anti SSEA-1 (antígeno embrionario específico de estado 1) D'Costa y Petite, 1999, han encontrado similares resultados.

Desde el grupo 2 se evidenciaron diferencias en los esbozos gonadales derecho e izquierdo, y también asimetrías en la altura de sus células. Un mayor número de CGP se identificó migrando hacia la gónada izquierda en comparación con la derecha. Esto concuerda con el trabajo de Guioli 2007 que indica que las gónadas, derecha e izquierda de ambos sexos, muestran diferencias morfológicas y moleculares, desde un inicio en la línea germinal, diferencias que persisten en el posterior desarrollo. Por otra parte Anshin et al, 2005 al igual que en nuestro estudio, encontró que la asimetría se manifiesta desde el día 3, en ambos sexos, donde un gran número de CGP colonizan a la gónada izquierda, siendo más evidente la diferencia en las hembras, constituyendo una diferencia temprana en el desarrollo. Esto es diferente a lo encontrado por Villalpando et al, 2000 quienes han descrito un desarrollo relativamente simétrico entre ambas gónadas en la gallina hasta el día 18, donde involuciona la gónada derecha debido a la expresión asimétrica del producto génico de la P450-aromatasa, lo que es considerado un mecanismo tardío determinante de involución.

En nuestro estudio encontramos que el espesor de la superficie del epitelio, es más grande en la gónada izquierda de ambos sexos. Estas diferencias desaparecen en los machos persistiendo solo en las hembras, similar a lo encontrado por Anshin et al, 2005.

Los embriones del grupo 3 y 4, presentan un meso intestinal que ha iniciado la incurvaciones. El lado derecho esta prácticamente sin CGP, en cambio el lado izquierdo se pudo visualizar una matriz rica en glicosaminoglicano y muchas CGP. Davis et al, 2009 encontraron también que las células mesenquimáticas del mesenterio dorsal son mas condensadas hacia el lado izquierdo que sobre el derecho, además en el epitelio que esta sobre el lado izquierdo exhibe una morfología columnar, en contraste a la morfología cuboidal del derecho. Estas propiedades provienen de la señal de distintos factores: Pitx2 y Isl1, expresados específicamente sobre el lado izquierdo y Tbx18 expresado sobre el derecho. Regulados por proteínas nodales presentes exclusivamente sobre el lado izquierdo

El grupo 4, en los machos se identificó una túnica albugínea incipiente cordones testiculares y tejido intersticial entre los cordones. En cambio en la hembra se identificó un ovario con corteza y medula. Un epitelio cortical muy característico subyace sobre la membrana basal y presentó células germinales. Sobre los 7 días, la gónada derecha de las hembras se encuentra desorganizada, con conductos en todo el espesor de la gónada y con una clara diferencia de tamaño con respecto a la contra lateral izquierda.

Según Ishimaru y col., (2008), una expresión asimétrica de la proteína PITX2 sobre la gónada izquierda inicial, reprime la expresión de una enzima que bloquea el receptor alfa de estrógeno en el lado del primordio ovario derecho, evitando la proliferación celular de este. Además Guioli, y col., (2007) ha visto que la falta de expresión de Pitx2 sobre la gónada derecha es suficiente para que esta se desarrolle como la izquierda, permitiendo reiniciar la meiosis de células germinales en el córtex del ovario derecho, en machos esta señal es ignorada.

El grupo 5 presentó claras diferencias entre el ovario derecho y el izquierdo, El ovario derecho es una cintilla ovárica, en cambio el izquierdo esta bien desarrollado. A los 12 días se identificó diversas estructuras como: células intersticiales en el ovario izquierdo, y cordones medulares alrededor del tejido conectivo, comparable a lo encontrado por Ávila y col., (1989) desde los 11 días de incubación. Estas células presentaron un citoplasma de aspecto espumoso con vacuolas claras de distinto tamaño. Al avanzar en la incubación estas células comienzan a anidarse y a aumentar en Ávila y col., (1989).

El número de gonocitos aumenta significativamente en los grupos 4 con respecto al grupo 2 tanto en hembras como en machos. Además en estos se encontró una mayor cantidad de gonocitos en el lado izquierdo, mostrando la misma tendencia para ambos sexos. La diferencia entre el lado izquierdo y el derecho fue aproximadamente el doble, aunque en varios embriones fue del triple. En este caso, los valores de los machos fueron mayores que los de las hembras en la gónada izquierda, mientras que las hembras tuvieron valores similares en ambas gónadas. Esto es similar a lo descrito en forma cualitativa por Anshin *et al*, 2005 que manifiesta que desde el día 3, en ambos sexos, las CGP se dirigen en mayor número a colonizar la gónada izquierda, siendo más evidente la diferencia en las hembras, constituyendo una diferencia temprana en el desarrollo.

En síntesis el grupo 1 se encuentra en etapa de cresta genital, el grupo 2 está en etapa de gónada indiferenciada, las CGPs se mantuvieron migrando hasta el día 7, pero la colonización se observó desde el día 4. Se pudo reconocer diferencias entre sexos gonadales desde los 5 días, según criterios morfológicos. Los principales fueron la asimetría de volumen entre las gónadas y la altura del epitelio gonadal. A partir del día 7 se pudo encontrar la presencia de cordones testiculares (sin lumen) en las gónadas masculinas, rodeadas de membrana basal. El grupo 4 se caracteriza por diferenciación testicular y ovárica.

Los objetivos de esta tesis como los de describir las principales etapas del desarrollo gonádico del pollo hembra y macho se cumplieron completamente, como también aquellos de describir la histología de la corteza, médula y se relacionaron con la edad cronológica de los embriones. Igualmente se cumplió con analizar el número de células de la línea germinal del pollo hembra y macho en las etapas intermedias de este estudio reconociendo asimetrías entre los lados derecho e izquierdo tanto en la línea germinal como somática.

En síntesis, existe una clara asimetría gonadal derecha-izquierda en las hembras desde tempranas etapas del desarrollo, con lo cual se deduce que es determinante en el desarrollo de una sola gónada funcional

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, encontramos que en el momento en el cuál el meso intestinal inicia la incurvaciones (4 días) el lado derecho esta prácticamente sin CGP, en cambio en el lado izquierdo se puede visualizar muchas CGP, una matriz mucho más rica en glicosaminoglicanos, y las células mesenquimáticas están más condensadas, probablemente relacionado con distintos factores expresados específicamente sobre el lado izquierdo y otros en el derecho.

Debido a que existen en la literatura informaciones contradictorias relacionadas con la diferenciación de la gónada derecha e izquierda en las aves, este estudio aporta con una descripción de la cronología y génesis de testículos y ovarios como de la posterior involución del ovario derecho en el pollo.

Esta tesis además constituye un aporte al conocimiento de las asimetrías corporales de los cordados, además nos permitió conocer el momento propicio (el día 6 de incubación) y el lugar adecuado (mesenterio dorsal) para el aislamiento de CGP y su posterior cultivo *in Vitro*, con los fines de obtener células pluripotenciales las cuáles presentan un interés para la investigación con fines productivos (Producción de quimeras e híbridos).

BIBLIOGRAFIA

1. **Anshin Hishino**, M. Koide, T. Ono, and S. Yasugi **(2005)**. Sex-specific and left-right asymmetric pattern of Bmp7 in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos. *Develop. Growth Differ* 47,65-74.
2. **Ávila Re**, Samar ME, de Fabro SP. **(1989)**. Structural, ultrastructural and cytochemical study of interstitial cells of the chick ovary during embryo development. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordova* 47(1-2): 9-12.
3. **Ávila Re**, Samar ME, de Fabro SP. **(1987)**. In Vitro development of the female gonads of chick embryos. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordova* 45(2):17-20.
4. **Carlson, B. (2000)**, *Embriología humana y Biología del Desarrollo*, segunda edición editorial Harcourt, pags, 368-389.
5. **Davis, N. M**, Kurpios N, Sun X, Gros J, Martin J, and Tabin C. **(2008)** .The chirality of gut rotation derives from left-rigth asymmetric changes in the architecture of the dorsal mesentery. *Dev Cell* 2008; 15 (1):134 145.
6. **D´Costa**, S. and J. N. Petite, **(1999)**. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) expression during early development of the turkey embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 349-356.
7. **Fujimoto**, T. Ukeshima, A y Kiyofuji, R **(1975)**. The origen, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick Embryo. *Anat Rec.*, 185:139-154.
8. **Guioli S**, Lovell-Badge R. **(2007)**.PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development* 134(23):4199-208.
9. **Gyoung** Jung, J. Kim, D.K. Park, T.S. Lee, S.D. Lim,J.M. y Han, J.Y. **(2005)**. Development of Novel markers for the characterization of the chicken primordial germ cells. *Stem cells*, 23: 689-698.
10. **Hamburger V.**, Hamilton H.L. **(1951)**. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*
11. **Hoshino A**, Koide M, Ono T, Yasugi S. **(2005)**. Sex-specific and left-right asymmetric expression pattern of Bmp7 in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos. *Dev Growth Differ.* 47(2):65-74
12. **Ishimaru Y**, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa

- M, Toshimori K, Chandraratna RA, Morohashi K, Yoshioka H. **(2008)**. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development*, 135(4):677-85.
13. **Klein S, Grossmann R. (2008)** Cell number and sex ratio in unfertilized chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*). *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol*. 309(1):47-54
 14. **Kuwana T, Rogulska T. (1999)** Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* ; 45(5):725-36.
 15. **Kuwana T, Maeda-Suga H, Fujimoto T. (1986)** Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro. *Anat Rec*. 215(4):403-6.
 16. **López, M.L., Graf, M.E., Leyton, C.** 1974. Formulario de técnica histológica. **In:** Laboratorios de técnica histológica. Depto de Biología celular y Genética, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. pp.1-88.
 17. **Mathews, W. W., (1972)**. Atlas of Descriptive Embryology, Canadá, Editorial Macmillan, págs. 36-88.
 18. **Mizuno S, Kunita R, Nakabayashi O, Kuroda Y, Arai N, Harata M, Ogawa A, Itoh Y, Teranishi M, Hori T., (2002)**, Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation. *Cytogenet Genome Res*, 99(1-4):236-44.
 19. **Nakamura M, Kuwana T, Miyayama Y, Yoshinaga K, Fujimoto T. (1991)**. Ectopic colonization of primordial germ cell in the chick embryo lacking the gonads. *Anat Rec* 229(1);109-15.
 20. **Nakamura M, Kuwana T, Miyayama Y, Fujimoto T. (1988)**. Extragonadal distribution of primordial germ cell in the early chick embryo. *Anat Rec*. 222(1); 90-4.
 21. **Natio. M, T. Minematsu, T. Harumi, and T. Kuwana (2007)**, Testicular and ovarian gonocytes from 20-day incubated chicken embryos contribute to germline lineage after transfer into bloodstream of recipient embryos. *Reproduction* 134, 577-584.
 22. **Natio. M, A. Sano, Y. Matsubara, T. Harumi, T. Tagami, M. Sakurai and T. Kuwana, (2001)**, Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chicken and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads. *Reproduction*, 121:547-552.
 23. **Nodem, D., (1990)**. Embriología de los animales domésticos, Editorial Acribia, págs, 353-354.
 24. **Park T, and Han J. (2000)**. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cell in chicken. *Mol. Rep and Dev*. 56:475-482.

25. **Patten, B (1991)**. Early embryology of the chick, 4^o ed., Mc Graw-Hill Book Company, Inc., pags 201-208.
26. **Perez-Aparicio Fj**, Carretero A, Navarro M, Ruberte J. **(1998)**. The lack of genital ridge vascularization in the early chick embryo: implication in the migration of the primordial germ cells. *Anat Rec* 251(3); 398-405.
27. **Smith, C. A., M. J. Smith and H.A. Sinclair, (1999)**. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation, *Gen Comp. Endocrinol.*; 113(2): 187-96.
28. **Stebler J**, Spieler D, Slanchev K, Molyneaux K, Richter U, Cojocar V, Tarabykin V, Wylie Ch, Kessel M, and Raz E. **(2004)**. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Developmental Biology* 272: 351-361.
29. **Tagami T**, Matsubara Y, Hanada H, and Naito M. **(1997)**. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Develop. Growth Differ* 39, 267-271.
30. **Toyoaki F**, Atsumi U, Ranko K. **(1976)**. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *The Anatomical Record* 185 (2):139 – 153.
31. **Villalpando, I., Sanchez-Bringas, G., Sanchez-Vargas, I., Pedernera, E., Villafan-Monroy, H., (2000)**, The P450 aromatase (P450 arom) Gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick, *General and Comparative Endocrinology*, 117(3): 325-334.
32. **Yamamoto I**, Tsukada A, Saito N, Shimada K., **(2003)**, Profiles of mRNA expression of genes related to sex differentiation of the gonads in the chicken embryo, *Poult Sci* 82(9): 1462-7.
33. **Yoshioka, H., Ishimaru, Y., Sugiyama, N., Tsunekawa, N., Noce, T., Kasahara, M., Morohashi, K., (2005)**, Mesonephric FGF signaling is associated with the development of sexually indifferent gonadal primordium in chick embryos, *Development Biology* 250: 150-161.

ANEXO 1

Método corriente con hematoxilina- eosina (López *et al.*, 1974)

Fijación: Formalina al 10%.

Procedimiento:

1. Desparafinar los cortes e hidratar hasta el agua mediante los siguientes pasos:

Xilol I 5 minutos

Xilol II 5 minutos

Alcohol 100° 5 minutos

Alcohol 95° 5 minutos

Alcohol 70° 5 minutos

Dejar escurrir al sacar de cada líquido para no arrastrar un exceso de él.

2. Lavado en agua corriente y luego en agua destilada 5 minutos.

3. Tinción nuclear con hemateína (de Mayer, Lillie-Mayer o Harris) por 4-6 minutos.

4. Lavado en agua corriente. Diferenciar en alcohol clorhídrico al 0.5% si es necesario, controlando al microscopio.

5. Lavado en agua corriente por 10 minutos.

6. Tinción de citoplasma con eosina o eritrocina al 1% por 1 a 2 minutos.

7. Lavado en agua destilada.

8. Deshidratación en alcohol de 70% 2-3 minutos

Alcohol de 95% 2-3 minutos

Alcohol de 95% 2-3 minutos

Alcohol de 100% I 5 minutos

Alcohol de 100% II 5 minutos

9. Aclarar en xilol I 5 minutos

Xilol II 10 minutos

10. Montar en bálsamo o resina sintética

ANEXO 2

Reacción del ácido peryódico schiff (PAS). (López *et al.*, 1974). Permite identificar el glicógeno.

Fijación: Bouin alcohólico, Gendre, Rossman a 4°C.

1. Desparafinar y llevar los cortes hasta el agua destilada.
2. Tratar por 10 minutos en una solución de ácido peryódico.
3. Lavar por 5 minutos en agua corriente y después en agua destilada.
4. Colocar en reactivo de schiff durante 30 minutos.
5. Lavar en agua sulfurosa recién preparada, tres baños de 5 minutos cada uno.
6. Lavar en agua corriente por 10 minutos.
7. Tinción nuclear con hematoxilina.
8. Deshidratar, aclarar en xilol y montar en resina sintética.

Resultados: Sustancias PAS + presentan un color rojo púrpura.

TABLA 2: Promedio de gonocitos por gónada izquierda y derecha, en hembras y machos en los Grupos 2 ,3 y 4.

Grupo 2: Pollos de 5 días de incubación	
<i>Gónada Izquierda</i>	<i>Gónada Derecha</i>
Hembra: 105.2 +/- 12.8 Macho: 98.7 +/- 9.4	Hembra: 49.1 +/- 11.7 Macho: 41.5 +/- 5.8
Grupo 3: Pollos de 6 días de incubación	
<i>Gónada Izquierda</i>	<i>Gónada Derecha</i>
Hembra: 142.1 +/-16.3 Macho: 154.6 +/- 13.2	Hembra: 84.7 +/- 8.7 Macho: 81.8 +/- 4.9
Grupo 4: Pollos de 6 días de incubación	
<i>Gónada Izquierda</i>	<i>Gónada Derecha</i>
Hembra: 268.7 +/- 9.7 Macho: 243.8 +/- 13.9	Hembra: 105 +/- 17.6 Macho: 99.2 +/- 11.3