



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

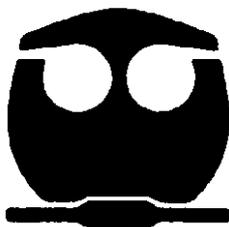
---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Expresión del Receptor Transmembranal a Estrógenos  
GPER1/GPR30 Durante la Histogénesis Gonadal  
del Embrión de Pollo**

**T E S I S**  
Que para obtener el título de  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
Presenta

**ARACELI PONCE ORTIZ**



México, D. F.

AÑO 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dr. Jesús Montiel Aguirre

**VOCAL:** Profesor: Dra. Martha Menjivar Iraheta

**SECRETARIO:** Profesor: Dra. Ma. Carmen Méndez Herrera

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MC. Ma. Elena Ibarra Rubio

**2° SUPLENTE:** Profesor: MC. José Ignacio Páramo Ramírez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA,  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ASESORA DEL TEMA:** DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA

**SUSTENTANTE:** ARACELI PONCE ORTIZ

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de Dra. María del Carmen Méndez Herrera, en el Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM.

La parte metodológica de este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Dr. Horacio Merchant Larios, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este trabajo de investigación se realizó bajo la coasesoría de la Dra. en C. Verónica Díaz Hernández, del Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM.

La presente tesis se realizó como parte de los proyectos de investigación: “Regulación del desarrollo epitelial superficial del ovario por factores de crecimiento y hormonas” con No. proyecto IN216807-3 y “Determinación de los receptores a hormonas esteroides y GPR-30 en cáncer epitelial del ovario y su asociación con la respuesta al tratamiento” con No. proyecto IN206810, a cargo de la Dra. María del Carmen Méndez Herrera apoyados por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT).

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto de investigación: Regulación del desarrollo epitelial superficial del ovario por factores de crecimiento y hormonas, con No. proyecto 60346X.

Parte de este trabajo se realizó utilizando el Microscopio Confocal. Leica TC5-SP5.con adquirido con financiamiento del Macroproyecto Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública. SDI-PTID.05.01.

---

---

## **Agradecimientos**

A la Dra. María del Carmen Méndez Herrera por su asesoría y gran apoyo durante el proceso de elaboración de esta tesis.

Al Dr. Enrique Pedernera Astegiano, por su gran apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. en C. Verónica Díaz Hernández, por su invaluable coasesoría, orientación, enseñanza y apoyo para la realización en todas las técnicas empleadas para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por permitirme realizar gran parte del proyecto de investigación en su laboratorio.

A la Q.F.B. Carmen G. Mondragón Huerta, por el apoyo técnico y ayuda para el sexado, disección y procesamiento de las muestras biológicas.

A la C.D. María José Gómora Herrera, por el apoyo técnico y ayuda en la recolección de muestras biológicas.

A la M. en C. y Esp. en Microscopía Electrónica Silvia Reyes Maya, por su ayuda en el manejo del Microscopio Confocal Leica TC5-SP5.

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, por su asesoría en el procesamiento de muestras para biología molecular e histología.

Al Técnico José Guadalupe Baltazar García, por la obtención de los cortes semifinos de gónadas de embrión de pollo para Microscopía de luz.

A la Dra. Jeannette Günther, por su asesoría y apoyo técnico en técnicas histológicas.

---

---

---

---

## **Agradecimientos**

A Dios por darme la oportunidad de haber existido y de poder seguir aquí.

A todos los miembros de mi familia que me han apoyado en todos mis años como estudiante, ya fuera con consejos o explicándome cosas que no entendía.

A mis padres, hermano, abuela y tío Víctor por haber aguantado mis abruptos cambios de humor durante toda la carrera y especialmente durante esta última etapa.

A la vida quien me dio uno de los mejores regalos, a Emm's.

A los pilares de mi vida, simplemente gracias por existir.

A mis amigos de la carrera de primer semestre, el "poke-rancho" (Ale, Dany, Lili, Lupita, Fer, Gus, Pepe, AC), y los que se fueron anexando con el paso de los semestres (Mau, Guadalupe, Chio), con quienes compartí una gran cantidad de momentos alegres, exámenes, finales, comidas, gracias por su amistad, tiempo, ayuda y apoyo.

A mis amigos del CELE (Eric, Juanito y Oscar) con quienes a pesar de solo haber compartido un semestre de inglés hemos seguido unidos, gracias por todo.

A Rob quien desde primer semestre me brindara su amistad y apoyo.

A mis amigos deportistas con quienes pasé uno de los mejores laboratorios de la carrera, gracias por haberme escuchado, animado y en algunas ocasiones llegado a ser mis confidentes.

A todos los miembros del laboratorio de biología molecular con quienes compartí varios momentos inigualables.

A Silvia, Mary, Carmen y Vero por todas sus enseñanzas, su apoyo, por escucharme y los ánimos que me brindaron sobretodo al final.

A Patcha por el tiempo que me ha brindado desde la prepa y a esas largas charlas por teléfono que me ayudaron mucho.

---

---

---

Al aquel que estuviera conmigo, fuera mi amigo toda la carrera; y que fuera mi pareja durante casi toda la carrera; gracias por haberme brindado tu apoyo, por todo el tiempo que me brindaste, por haberme aguantado, por tu cariño, compañía, amistad. Por haber sido como fuiste conmigo. Y especialmente gracias por darme la oportunidad de demostrarme a mi misma que la clase de amor en el que siempre he creído **si existe**.  
Simplymente **GRACIAS POR TODO**.

---

---

---

## Dedicatorias

*A esa parte de mí que pesé a todas las dificultades que se presentaron (durante la realización de la tesis) nunca se rindió aún cuando me quede sin fuerzas y ya no podía más, y que me permitió poder terminar la tesis.*

*A los pilares de mi vida, quienes han sido para mí una de las razones más fuertes para seguir caminando pese a todos los obstáculos y lo doloroso que pueda ser el camino.*

*A Emm's quien llegó a mi vida en una de las épocas más difíciles y me salvó. Quien es para mí más que solo mi hermano.*

*A ti que te convertiste en una parte fundamental de mi vida y me cambiaste para siempre. Y aunque ahora hallas emprendido un nuevo camino lejos del mío, sin importar lo que pase siempre serás una de las personas más importantes en mi vida y que siempre amaré (pues así lo he decidido).*

---

---

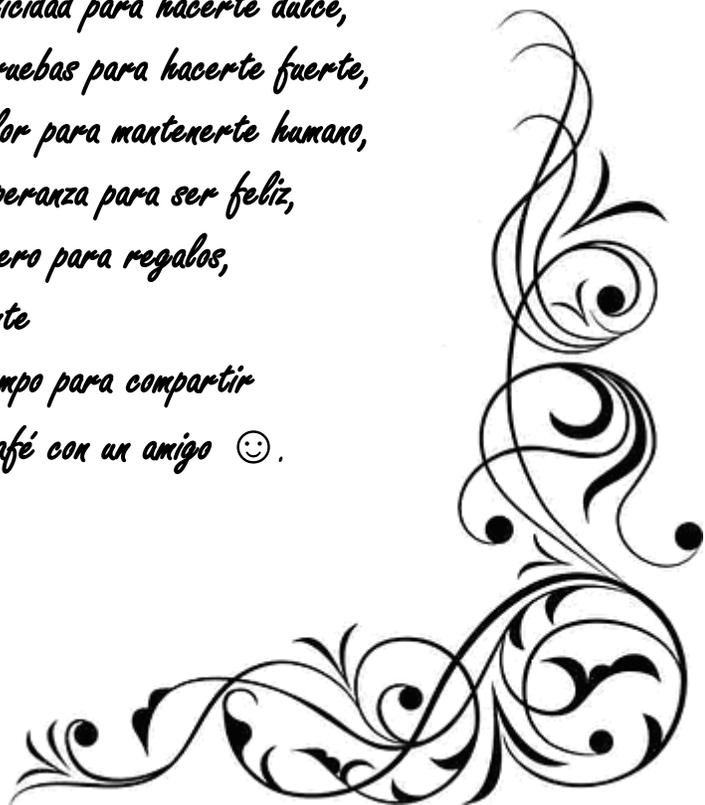


...

*Sueña lo que quieras soñar,  
Ve a donde quieras ir,  
Se lo que quieras ser,  
Porque solo tienes ésta vida y  
una oportunidad para hacer  
todo lo que quieras hacer.*

*Y Espero que tengas:*

*Suficiente felicidad para hacerte dulce,  
Suficientes pruebas para hacerte fuerte,  
Suficiente dolor para mantenerte humano,  
Suficiente esperanza para ser feliz,  
Suficiente dinero para regalos,  
Y especialmente  
Suficiente tiempo para compartir  
una taza de café con un amigo ☺.*



---

---

## ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS .....	III
ABREVIATURAS .....	V
RESUMEN .....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
Establecimiento de la cresta gonadal y diferenciación sexual en mamíferos .....	1
Determinación y diferenciación sexual gonadal en mamíferos .....	2
Determinación y diferenciación sexual en aves .....	4
Diferenciación sexual de las células germinales en pollo .....	6
Fisiología del ovario en aves .....	7
Fisiología del testículo en aves .....	8
Estrógenos .....	9
Papel de los estrógenos en la regulación de la función ovárica y testicular .....	12
Biosíntesis de hormonas esteroides en la gónada de pollo .....	13
Receptores para hormonas esteroides .....	14
El receptor transmembranal a estrógenos acoplado a proteína G1 (GPER1) .....	16
ANTECEDENTES .....	19
HIPOTESIS .....	21
OBJETIVOS .....	21
METODOLOGÍA .....	23
Material biológico .....	23
Obtención de la muestra .....	23
Microscopía de luz .....	23
Obtención del RNA total .....	23
Integridad de RNA .....	24
Transcripción reversa .....	24
PCR punto final para GPER1/GPR30 .....	25



---

---

Doble inmunofluorescencia para GPR30-Hormona antimülleriana y GPR30-citoqueratina .....	25
RESULTADOS .....	27
Histogénesis gonadal del embrión de pollo.....	27
Expresión del RNAm de GPER1 en ovarios y testículos de embrión de pollo por PCR de punto final .....	33
Detección de GPR30 en ovarios y testículos pollo .....	34
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
El embrión de pollo como modelo de estudio.....	43
Metodología utilizada.....	43
GPER1/GPR30 en la función gonadal .....	44
CONCLUSIONES .....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	50
APENDICE 1 .....	57
APENDICE 2.....	58



---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del testículo y ovario del embrión de pollo .....	5
Figura 2. Representación esquemática del aparato reproductor masculino y femenino en la mayoría de las aves .....	8
Figura 3. Estructura química de los esteroides .....	10
Figura 4. Esquema general de la biosíntesis de hormonas esteroides .....	11
Figura 5. Representación esquemática de los dominios funcionales de los receptores a estrógenos $\alpha$ y $\beta$ .....	15
Figura 6. Esquema general del receptores acoplado a proteína G 30 (GPER1/GPR30). .....	17
Figura 7. Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 9 días de incubación .....	28
Figura 8. Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 10 días de incubación .....	29
Figura 9. Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 11 días de incubación .....	30
Figura 10. Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 15 días de incubación .....	31
Figura 11. Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 21 días de incubación .....	32
Figura 12. Expresión del RNAm de GPER1 en gónadas de embrión de pollo .....	33
Figura 13. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 y CK en ovarios de pollo de 9 días de incubación .....	35
Figura 14. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 9 días de incubación .....	35



---

Figura 15. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 y CK en ovarios de pollo de 10 días de incubación .....	36
Figura 16. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 10 días de incubación.....	36
Figura 17. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 en ovarios de pollo de 11 días de incubación .....	37
Figura 18. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 11 días de incubación.....	37
Figura 19. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 y CK en ovarios de pollo de 15 días de incubación .....	38
Figura 20. Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 15 días de incubación.....	38
Figura 21. Inmunofluorescencia doble para GPER1/GPR30 y CK en ovario y testículo de embrión de pollo de 17 días de incubación .....	39
Figura 22. Inmunofluorescencia doble GPER1-AMH en testículo de 17 días de incubación .....	40
Figura 23. Inmunofluorescencia para GPER1/GPR30 y hormona antimülleriana en el testículo de embrión de pollo recién nacido .....	41
Figura 24. Inmunofluorescencia doble GPER1-AMH en testículo recién nacido.....	42
Figura 25. Inmunofluorescencia doble de GPER1/GPR30 y citoqueratinas en ovario de embrión de pollo recién nacido.....	42
Electroferograma de secuenciación del amplicón GPER1 de pollo. ....	57
Alineamiento del amplicón GPER1 en BLAST .....	58

---

## ABREVIATURAS

AMH	Hormona anti-Mülleriana
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
C	Corteza
cDNA	DNA complementario
CGPs	Células germinales primordiales
CK	Citoqueratinas
Co	Cordón(es) ovífero(s)
CS	Cordón(es) seminífero(s)
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
di	Días de incubación
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatados
dpc	días post-coito
E	Epitelio
E <sub>2</sub>	Estradiol
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógenos beta
ES	Epitelio superficial
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona folículo estimulante
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GP1R	Receptor a estrógenos acoplado a proteína G 1
GPR30	Receptor acoplado a proteína G 30. En este trabajo se emplearan ambas abreviaturas de manera indistinta.
HH	Estadios de desarrollo del embrión de pollo según los criterios de Hamburger y Hamilton (1951)
Kb	Kilobases



---

---

LH	Hormona luteinizante
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrometros (micras)
M	medula
ml	mililitro
mM	milimolar
OCT	Optimal Cutting Temperature
OsO <sub>4</sub>	Tetraóxido de osmio
pc	post-coito
pb	Pares de bases
RA	Ácido retinoico
PBS	Buffer de fosfatos salino pH 7.4
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RM	Región medular
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reverso transcriptasa y reacción en cadena de la polimerasa



---

---

## Resumen

Los estrógenos son hormonas esteroides que regulan aspectos fisiológicos relacionados en el metabolismo óseo, la adquisición de caracteres sexuales secundarios, y la reproducción en general. Se sintetizan en la glándula suprarrenal, el tejido adiposo, pero su mayor producción es en las gónadas.

Los receptores a estrógenos median la acción de éstas hormonas y pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares; se han identificado dos receptores a estrógenos: ER $\alpha$  y ER $\beta$ , que actúan a través de la vía clásica, y regulan los efectos genómicos de los estrógenos.

En los últimos años se ha propuesto a un receptor transmembranal a estrógenos acoplado a proteína G (GPER1/GPR30) que activa una vía de señalización rápida (no genómica) de forma independiente a como lo hacen los receptores a estrógenos (ER) clásicos. Esta molécula pertenece a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G (7TM-GPCRs).

En las aves, los estrógenos son fundamentales en la diferenciación sexual gonadal y fenotípica de la hembra así como en la reproducción. Entre los procesos más importantes se encuentra el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios de la hembra, la diferenciación sexual del sistema nervioso y la vitelogénesis. El desarrollo gonadal de las aves depende de hormonas esteroides sexuales, las cuales se sintetizan muy temprano en el desarrollo, desde que se está llevando a cabo la diferenciación sexual gonadal (5 - 6 di). El propósito de este trabajo fue determinar la expresión de GPR30/GPER1 durante la histogénesis del ovario y testículo del embrión de pollo desde el día 9 de incubación y hasta la eclosión mediante PCR punto final e inmunofluorescencia.

Los resultados muestran que el RNAm de GPR30/GPER1 está presente en los ovarios y testículos del embrión de pollo en todas las edades analizadas. Durante los 9-10 di la expresión de GPER1/ GPR30 se observa en las células epiteliales derivadas de la proliferación del epitelio celómico, lo cual correlaciona con el incremento de la tasa proliferativa de las células germinales (Hughes, 1963). Posteriormente la expresión de GPER1/ GPER30 se restringe a los cordones ovígeros de la corteza del ovario periodo en el cual las células germinales inician la meiosis I (Smith et al., 2008). En el caso del



---

testículo, la expresión de GPER1/GPR30 se observa tanto en las células germinales como en las células de Sertoli en los cordones seminíferos. Estos datos muestran que tanto el RNAm como la proteína para el receptor transmembranal de estrógenos GPR30 se expresan durante la histogénesis gonadal de embriones de pollo de ambos sexos.



---

---

## INTRODUCCIÓN

### Establecimiento de la Cresta Gonadal y Diferenciación Sexual en Mamíferos

En los mamíferos la gónada se desarrolla a partir de la cresta urogenital en la zona ventral del mesonefros, con la proliferación del epitelio celómico y del mesénquima que se encuentra por debajo de éste y por las células germinales. La gónada bipotencial puede diferenciarse hacia un ovario o un testículo.

En los humanos, las gónadas inician su desarrollo como un par de crestas urogenitales durante la cuarta semana de gestación; derivan del mesodermo intermedio y del epitelio celómico, para la quinta semana la cresta gonadal comienza a ser invadida por las células germinales primordiales (CGPs).

En el caso del ratón la gónada se origina a partir de la cresta genital, ubicada en la región ventral del mesonefros. Entre los 9.5 y 10.5 dpc, la proliferación de células del epitelio celómico coincide con la llegada de las primeras células germinales primordiales (CGPs), y se delimita la extensión donde se establecerá la cresta genital. A los 11.5 dpc, la cresta genital sobresale hacia la cavidad celómica como una formación alargada de color y textura diferente del mesonefros adyacente. Hasta este estadio del desarrollo, la integración histológica de la gónada es similar en ambos sexos. Dos compartimentos titulares iniciales forman la gónada indiferenciada: el compartimento epitelial y el compartimento estromático. El compartimento epitelial se forma por la proliferación de células del epitelio celómico asociadas entre sí y con las CGPs, las células epiteliales gradualmente inician el depósito de una lámina basal que llevará al establecimiento del compartimento epitelial de la gónada. En los machos, las células epiteliales son precursoras de las células de Sertoli, en tanto que en las hembras son precursoras de las células foliculares. Las CGPs incluidas en este compartimento, darán origen a las espermatogonias o a los ovocitos en los embriones XY o XX, respectivamente. Por otra parte, el compartimento estromático lo forman vasos sanguíneos, células



---

---

mesenquimáticas, fibroblastos y una matriz extracelular que incluye fibras de colágena y fibronectina. Inicialmente (9.5 - 10.5 dpc), en el ratón, el compartimento estromático se distribuye a lo largo de la cresta genital entre el mesonefros y el engrosamiento del epitelio celómico. Al día 11.5 pc, los vasos sanguíneos penetran y se distribuyen entre las células epiteliales, de manera que simultáneamente al depósito de una lámina basal, los vasos hacen evidente la presencia de tejido epitelial. A partir de esta etapa, se inicia la transformación de la gónada indiferenciada que llevará al dimorfismo sexual de la misma a los 12.5 dpc (revisado en: Díaz-Hernández, 2008).

Dos procesos morfogenéticos ocurren en los embriones XY que denotan la formación de un testículo: la separación del compartimento epitelial del epitelio celómico y la penetración de abundante tejido estromático desde la región mesonéfrica. Ambos eventos resaltan la presencia de un transitorio retículo epitelial que dará origen a los cordones seminíferos precursores de los cordones testiculares.

### Determinación y Diferenciación Sexual Gonadal en Mamíferos

Durante el desarrollo embrionario, tienen lugar dos procesos en la gónada: la determinación y la diferenciación sexual. La determinación sexual es un proceso mediante el cual las células somáticas de la gónada bipotencial del embrión se comprometen a seguir una de las dos vías alternativas de diferenciación: vía femenina o vía masculina. Mientras que la diferenciación sexual involucra los eventos subsecuentes como son la secreción de hormonas gonadales específicas que llevan al establecimiento del sexo fenotípico. El testículo fetal secreta andrógenos (testosterona y androstenediona) y la hormona anti-Mulleriana (AMH, por sus siglas en inglés) también conocida como sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS) las cuales dirigen la diferenciación fenotípica del macho (revisado en Polanco and Koopman, 2007).

La determinación testicular en los mamíferos requiere de la expresión de los genes *Sry* (**S**ex determining **R**egion of the **Y** chromosome) y *Sox9* (**S**ry-like HMG box



---

9). El gen *Sry* se expresa en el testículo durante el periodo crítico de la determinación sexual. En el modelo murino los transcritos de *Sry* se detectan a los 10.5 dpc, observándose el pico de expresión a los 11.5 dpc y la expresión es abatida a los 12.5 dpc (Hacker et al., 1995). En ratones transgénicos, fragmentos de 14 Kbs de DNA genómico conteniendo la secuencia de *Sry*, fueron suficientes para dirigir la diferenciación testicular generando la reversión sexual en ratones XX (Koopman et al., 1991). Este experimento demostró de manera concluyente que el gen *Sry* correspondía al factor determinante de testículo (FDT) previamente postulado.

El *Sox9* (**Sry-like HMG box 9**) es un gen autosómico de la familia de *Sry*. En embriones de ratón de 10.5 dpc, se detectan bajos niveles de *Sox9* a lo largo de la cresta urogenital en ambos sexos. Sin embargo, la expresión es difusa a lo largo de las crestas urogenitales, ya que no se localiza de manera específica en las células de preSertoli del testículo o bien, en las células equivalentes en el ovario, las células de la granulosa. A los 11.5 dpc el dimorfismo de expresión es evidente ya que se observa una fuerte expresión en la cresta urogenital del macho, la cual no es detectada en el ovario de la misma edad. A los 12.5 y 13.5 dpc la expresión de *Sox9* en el testículo se restringe a los cordones seminíferos (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996; Wilhelm et al., 2005).

Por mucho tiempo se propuso a SRY como un regulador positivo de la expresión de *Sox9* debido al patrón espacio temporal que presentan ambos genes, sin embargo esta propuesta no había sido demostrada (Kent et al., 1996; Bullejos and Koopman, 2001; Kidokoro et al., 2005 y Wilhelm et al., 2005). Recientemente, Sekido y Lovell-Badge (2008) encontraron un elemento que actúa como un “enhancer” involucrado en la regulación de la expresión de *Sox9* en la gónada del ratón. Se trata de una secuencia de 1.4 Kb conservada en mamíferos placentados incluido el humano que denominaron “TESCO” (**testis-specific enhancer of Sox9 core**). Encontraron además, que SRY interactúa de manera sinérgica con SF1 activando TESCO y regulando positivamente la expresión de *Sox9*.



---

---

## Determinación y Diferenciación Sexual en Aves

En las aves los cromosomas sexuales son heteromórficos caracterizados por un cromosoma Z grande y un cromosoma W pequeño. A diferencia de los mamíferos, la carga sexual homogamética para un macho es ZZ, mientras que para una hembra es ZW. Se ha sugerido que el cromosoma W contiene el determinante femenino. Se han propuesto a dos candidatos involucrados en la determinación sexual, los cuales son DMRT1 (Double sex and Mab-3 Related Transcription Factor1) ligado al cromosoma Z y HINTW (**H**istidine triad **N**ucleo**T**ide binding proteína, **W**-linked) que está ligado al cromosoma W, los cuales se expresan en las gónadas antes de la diferenciación sexual morfológica. DMRT1 codifica para un factor de transcripción nuclear que tiene un dominio de unión a DNA y se expresa en el sistema urogenital embrionario de todos los vertebrados (Smith et al., 2007). En el pollo la diferenciación morfológica gonadal inicia al mismo tiempo en ambos sexos, a diferencia de los mamíferos en donde primero ocurre la diferenciación testicular (Smith et al., 2007).

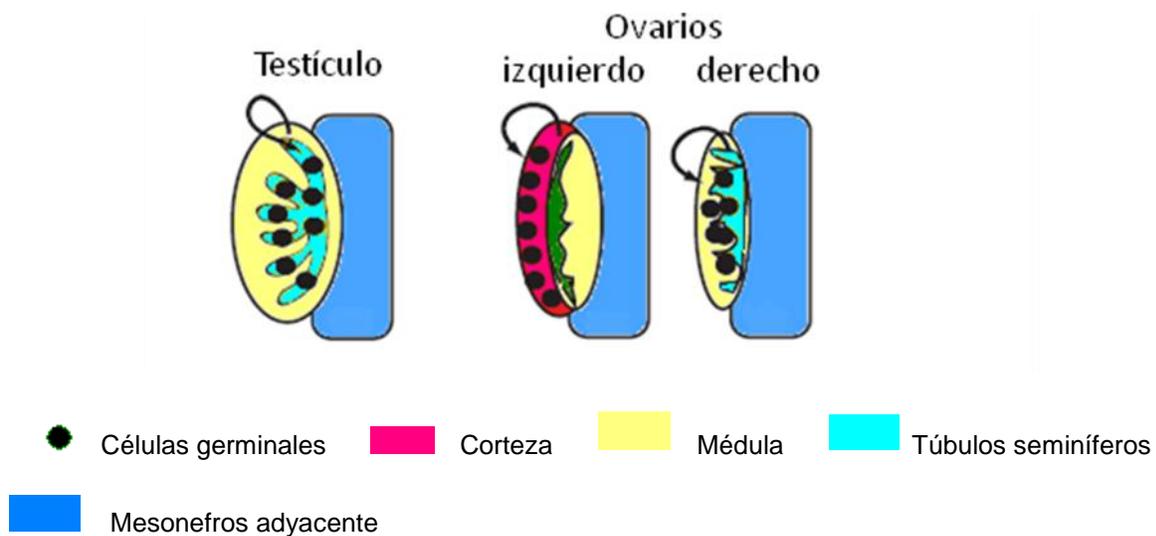
El desarrollo gonadal de los pollos, como en otros vertebrados, incluye un estado indiferenciado seguido por una fase de diferenciación divergente entre testículo y ovario. La principal diferencia en el desarrollo gonadal de la mayoría de las aves y otras clases de vertebrados es la asimetría derecha-izquierda que está impuesta en el desarrollo del ovario (Fig. 1). En las hembras solo el ovario izquierdo está completamente desarrollado, mientras que en los machos el testículo izquierdo es ligeramente más grande que el derecho (Clinton, 1998). Este desarrollo asimétrico de las gónadas es regulado por el factor de transcripción Pitx2 (Paired-like homeodomain 2, miembro de la familia homeobox), que se encuentra asimétricamente localizado en la gónada izquierda y cuya expresión es suficiente para evitar la degeneración de la gónada derecha; este mecanismo de asimetría es mediado vía la señalización del ácido retinoico (RA), que es únicamente producido en la gónada derecha en donde suprime la expresión de SF-1 y al receptor de estrógenos alfa (Ishimaru et al., 2008, Rodríguez-Leon et al., 2008).



---

En las aves, en el momento de la diferenciación sexual gonadal es posible detectar la expresión diferencial de los genes *Sox9* y *Cyp19a1* (p450 aromatasa) en testículos y ovarios respectivamente. La expresión de *Sox9* es detectada en los testículos recién diferenciados mientras que la expresión aromatasa se restringe a los ovarios (Smith et al., 2007; Villalpando et al., 2000). *CYP19A1* codifica para la enzima responsable de la síntesis de estrógenos la cual es requerida en las aves para la diferenciación del ovario (Smith et al., 2007).

La diferenciación sexual en aves es distinguible a nivel histológico al día 6.5 (estadio 30 HH), cuando los cordones seminíferos se localizan en la médula del testículo, mientras que en las hembras la corteza comienza a proliferar. El ovario derecho crece continuamente hasta el día 9 del desarrollo embrionario, después involuciona y queda como órgano rudimentario desde antes de la eclosión (Smith et al., 2007).



**Figura 1.** Representación esquemática del testículo y ovario del embrión de pollo después de la diferenciación sexual (Modificada de Smith et al., 2008).

---

---

## Diferenciación Sexual de las Células Germinales en Pollo

Al igual que en otras especies, las células germinales de pollo tienen un origen extragonadal. Las células germinales derivan de las células del epiblasto que migran hacia la región central de la zona pelúcida del embrión hacia la creiente germinal, donde proliferan y posteriormente entran al torrente sanguíneo. Las células germinales atraviesan la pared de los vasos sanguíneos (diapedesis) y migran hacia el intestino primitivo y a través de movimientos activos migran por el mesenterio hasta llegar a la cresta genital, estableciéndose en la gónada con una mayor población en la gónada izquierda que en la derecha en ambos sexos. Las células germinales del macho no proliferan significativamente a partir del periodo de organización testicular (6.5 di en adelante), mientras que en la hembra proliferan considerablemente a partir del día 9 (Smith et al., 2008).

El inicio de la meiosis de las células germinales en los vertebrados superiores es diferente: en los ovarios, las células germinales inician la meiosis durante la vida fetal y se arrestan en la profase I durante la embriogénesis, mientras que en el macho las células germinales entran en arresto mitótico e inician la meiosis después del nacimiento. En el ovario izquierdo de pollo la meiosis inicia a los 15.5 di por acción del ácido retinoico que induce la expresión de Stra8, la cual está implicada en el inicio de la meiosis en mamíferos (Smith et al., 2008).

En los vertebrados el proceso de ovogénesis se inicia cuando las ovogonias entran en meiosis y originan a los ovocitos primarios; estos aparecen en la zona central de la corteza y luego hacia el exterior de la misma, solo aquellas células germinales ubicadas en la corteza del ovario izquierdo entrarán a meiosis. En el embrión de pollo, la ovogénesis se inicia entre los días 13 y 14 de incubación, la máxima conversión de ovogonias a ovocitos sucede al día 17 y termina alrededor del día 20 de incubación. En el ovario, la proliferación de las ovogonias ocurre lo largo de la corteza. Tras la proliferación de ovogonias, ocurre una muerte masiva de



---

ovogonias llamada atresia ovogonial la cual ocurre previa al inicio de la meiosis (Gondos, 1978).

### Fisiología del Ovario en Aves

Durante la embriogénesis de reptiles, aves y mamíferos se forman dos ovarios y dos oviductos, pero una característica distintiva de las aves es la supresión del desarrollo posterior de estos órganos en el lado derecho. El ovario inmaduro en aves, que tiene forma de pera, mide aproximadamente 15 mm de largo y 5 mm de ancho, y se encuentra en la cavidad corporal en posición ventral a la aorta y craneal al riñón, cerca de las dos glándulas suprarrenales. El ovario está irrigado por la arteria gonado-renal y drenado por dos venas. El principal suministro sanguíneo para el ovario se origina desde la arteria craneal-renal, la cual tiene una arteria que irriga tanto al ovario como al oviducto (Pollock et al., 2002). Debido a su cercano contacto con el peritoneo, su ligamento suspensor, el mesovario, mide solo unos cuantos milímetros (Crosta et al., 2003) (Fig. 2B).

El ovario es un órgano multicompartamental con dos funciones principales:

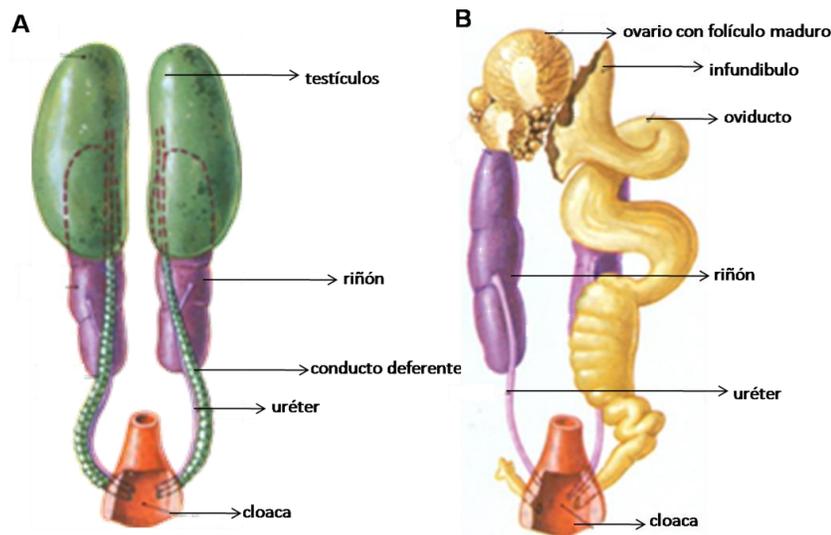
- producción de ovocitos fertilizables competentes para el inicio del desarrollo del embrión
- secreción de hormonas esteroides

En el ovario adulto de las aves se distinguen una zona externa llamada corteza y una zona interna, la médula. La corteza está compuesta de estroma especializado que contiene una franja externa de tejido conectivo, la túnica albugínea falsa, y una zona interna que contiene los folículos en varios estadios de desarrollo y regresión (Bereck, 2008). La médula ocupa una pequeña porción del ovario en su región hiliar, y está compuesta principalmente por tejido fibromuscular y vasos sanguíneos. El ovario está recubierto por una capa simple de epitelio columnar aplanado que se continúa con el peritoneo del mesovario, llamado epitelio superficial, el cual ocupa alrededor del 1% del ovario normal (Bereck, 2008).



---

La unidad funcional del ovario es el folículo, que consta de un ovocito rodeado por una o más capas de células de la granulosa. Ambos están separados del tejido intersticial (estroma) por la lámina basal, y circunscritos por las células de la teca encargadas de la síntesis de andrógenos (Oktem et al., 2008). Las células germinales en los ovarios tanto de las aves como de mamíferos inician la meiosis durante la vida fetal, y son arrestados como ovocitos primarios en la profase I de la meiosis (Smith et al., 2008).



**Figura 2.** Representación esquemática del aparato reproductor masculino y femenino en la mayoría de las aves (Modificada de Hafez and Hafez, 2000).

### Fisiología del Testículo en Aves

Los testículos, son un par de glándulas involucradas en la producción de espermatozoides y de hormonas esteroideas sexuales. Su tamaño, color y forma puede variar con la edad. Los testículos están fijados a la pared del cuerpo por un mesorquio, cada uno se encuentra rodeado por dos capas fibrosas (túnicas); la túnica exterior que es la túnica *vaginalis* que deriva de la envoltura exterior del peritoneo y debajo de esta capa serosa está la túnica albugínea (González et al., 2008; Pollock et al., 2002).

---

Ambos testículos son ovoides o con forma de frijoles y se asientan dorsalmente a cada lado de la columna vertebral, entre la parte caudal de los pulmones y el margen craneal del riñón. A diferencia de los mamíferos los testículos de las aves no son lobulados, lo que les da una apariencia lisa a su superficie. Cada uno cuelga en la cavidad celómica gracias a un pequeño mesenterio. En las aves se encuentran parcialmente rodeados por el saco de aire abdominal (Fig. 2 A) (González et al., 2008; Pollock et al., 2002). La mayor parte de la sangre llega al testículo por la arteria testicular, que es una rama de la arteria renal-craneal; y es drenado por varias venas testiculares cortas en la vena cava caudal (Crosta et al., 2003).

Los testículos se encuentran formados por dos diferentes compartimentos: a) los túbulos seminíferos y b) el tejido intersticial. Los túbulos seminíferos se encuentran formados por las células de Sertoli y las células germinales. Mientras que el tejido intersticial contiene los vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, tejido conectivo, células mioideas y células de Leydig, las cuales producen esteroides androgénicos (principalmente llevan a cabo la biosíntesis de testosterona), los cuales son importantes en la estimulación del crecimiento y desarrollo de los túbulos seminíferos, los conductos deferentes y el establecimiento de las características sexuales secundarias (Pollock et al., 2002; González et al., 2008; Smith et al., 2008).

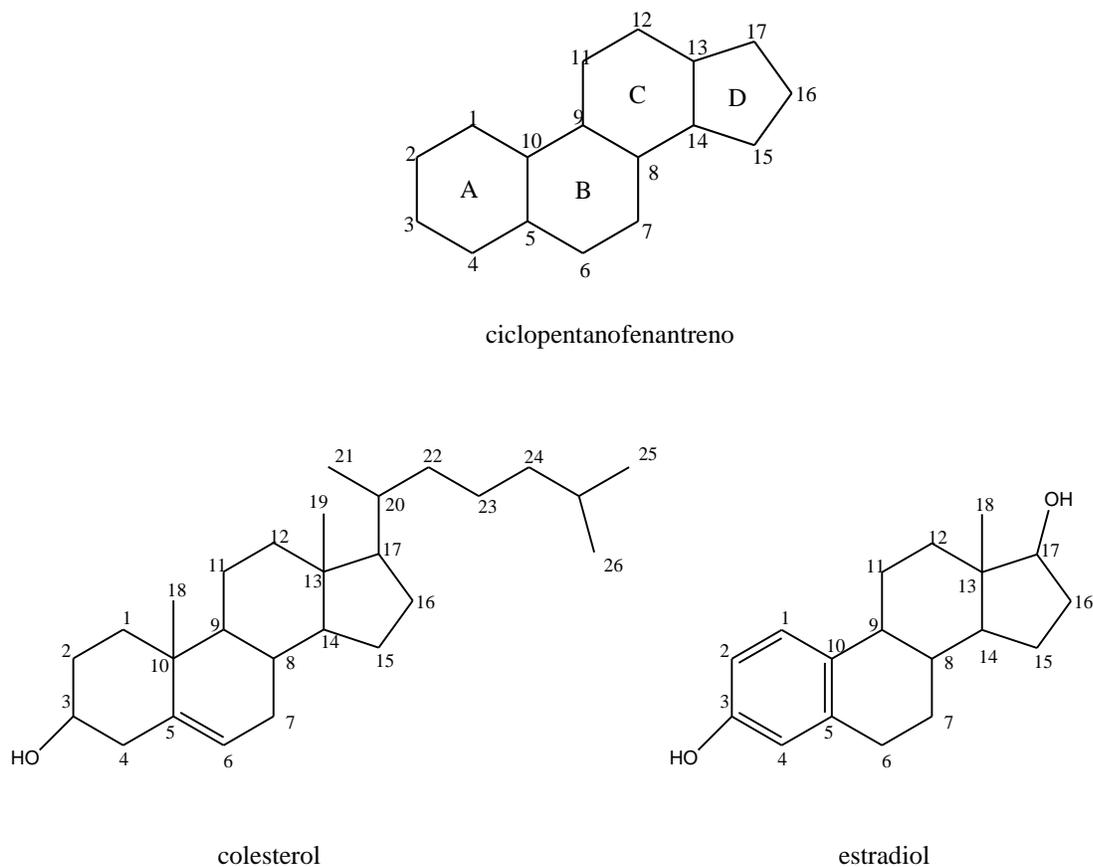
### Estrógenos

Los estrógenos son miembros de la familia de las hormonas esteroides, la cual incluye la progesterona, testosterona, cortisol/glucocorticoides y aldosterona/mineralocorticoides; son sintetizadas en varios órganos como ovarios (estrógenos, progesterona), testículos (andrógenos) y glándulas adrenales (cortisol, andrógenos y aldosterona) (Prossnitz et al., 2008).

Las hormonas esteroides sexuales derivan del colesterol, son apolares, insolubles en agua, pero solubles en lípidos lo que les permite atravesar la membrana plasmática fácilmente. Son sintetizadas por una serie de reacciones



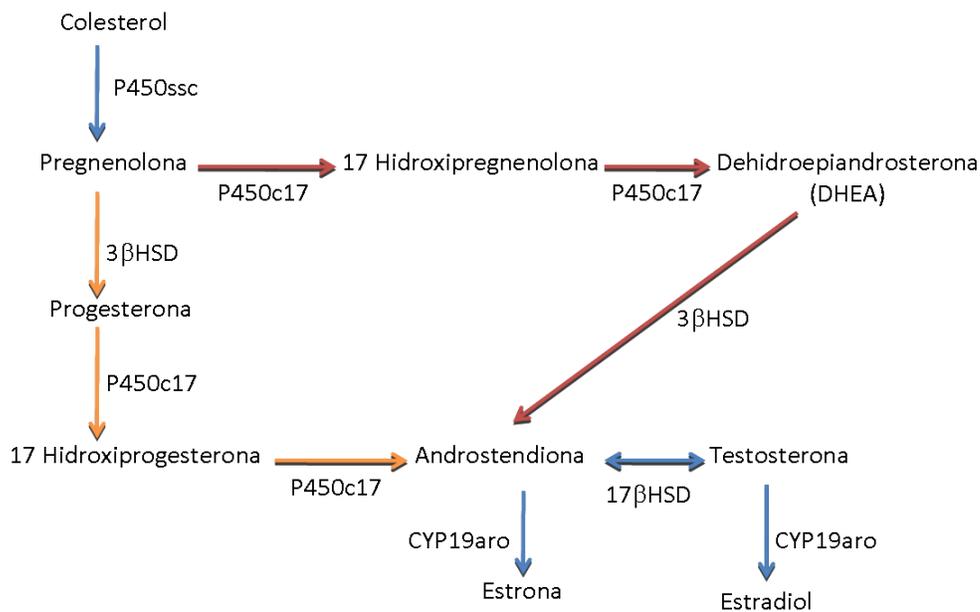
enzimáticas que progresivamente van reduciendo la longitud de la cadena de carbonos que va unida al carbono 17 del anillo de ciclopentanofenantreno (Fig. 3), el cual está formado por cuatro anillos fusionados (tres anillos de seis carbonos unidos a un anillo de cinco carbonos). Los diferentes tipos de esteroides presentan grupos funcionales distintos unidos a su estructura básica y varían en cuanto al número y la posición de los dobles enlaces entre los átomos de carbono que constituyen los anillos (Balthazart et al., 2009).



**Figura 3.** Estructura química de los esteroides. Se muestra la estructura base de los esteroides, la del principal precursor de esteroides (colesterol), así como la del estrógenos biológicamente más activo (estradiol).

La síntesis de esteroides consiste en dos vías generales: vía de la pregnenolona (vía  $\Delta^5$ ) y vía de la progesterona (vía  $\Delta^4$ ). La letra  $\Delta$  junto con el subíndice indica la localización de la doble ligadura en la estructura. La etapa inicial

de la biosíntesis de los esteroides corresponde a la conversión del colesterol en el carbono C<sub>21</sub>, pregnenolona, y tras este paso se puede dar una u otra de las dos vías para la síntesis de esteroides. La conversión del colesterol a hormonas esteroides involucra una variedad de enzimas, la expresión de estas enzimas es regulada en el tiempo y difiere de machos a hembras. El proceso en general comprende hasta cinco hidroxilasas diferentes, dos deshidrogenasas, una reductasa y una aromatasas (revisado en Yen, et al. 2001).



**Figura 4.** Esquema general de la biosíntesis de hormonas esteroides. Existen dos vías de síntesis: la de la progesterona, vía  $\Delta^4$  (en naranja) y la de pregnenolona, vía  $\Delta^5$  (en rojo). La vía de síntesis preferente por el ovario es la  $\Delta^5$ .

En la vía  $\Delta^5$ , la pregnenolona es convertida en 17-hidroxipregnenolona, posteriormente en un andrógeno débil, la dehidroepiandrosterona (DHEA), y después en otro andrógeno débil, la androstendiona. Mientras que en la vía  $\Delta^4$ , la pregnenolona es convertida en progesterona, un progestágeno que no solo sirve como precursor de otros esteroides, sino que también está implicada en el ciclo menstrual así como en el mantenimiento del embarazo. La progesterona es convertida en 17-hidroxiprogesterona, la cual cambia a androstendiona, que es



---

---

convertida en testosterona (un potente andrógeno), que puede ser convertida en  $17\beta$ -estradiol que es el estrógeno biológicamente más activo (revisado en Johnson, 2003) (Fig. 4).

El paso limitante en la biosíntesis de las hormonas esteroides es la escisión en el tamaño de la cadena lateral para convertir la molécula de colesterol de 27 carbonos a la molécula de pregnenolona de 21 carbonos. La enzima que cataliza esta reacción es llamada P450<sub>scc</sub> (clivaje de la cadena lateral del colesterol) que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria, está hemoproteína hidroxila y puede cortar los enlaces C-C (revisado en Yen, et al. 2001).

### Papel de los Estrógenos en la Regulación de la Función Ovárica y Testicular

A pesar de que los estrógenos son considerados las hormonas femeninas y los andrógenos como las hormonas masculinas, ambas hormonas se encuentran presentes en ambos sexos y las diferencias sexuales radican en su concentración y lugar de acción.

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual una espermatogonia se transforma en un espermatozoide. Este proceso ocurre dentro de los túbulos seminíferos y se encuentra regulado por factores parácrinos y endócrinos. Las gonadotropinas y los andrógenos son reguladores de la espermatogénesis en diferentes especies incluida el humano. Parte de la información sobre la función de los estrógenos en el testículo ha sido obtenida a través del desarrollo de ratones knockout y el patrón de expresión de los receptores a estrógenos en el tejido reproductivo del macho, sin embargo; la función de los estrógenos en los órganos reproductivos del macho aún requiere de mayores estudios.

El ratón knockout para el receptor a estrógenos alfa (ERKO) mostró que los estrógenos regulan la reabsorción del fluido luminal en la cabeza del epidídimo, la alteración de la reabsorción del fluido lleva a una menor concentración de espermatozoides en el epidídimo lo que provoca infertilidad por oligospermia en el



---

---

ratón (revisado en Hess et al., 1997). El receptor de estrógenos alfa ha sido detectado en células de Leydig, pero no en células de Sertoli ni en células germinales, mientras que ER $\beta$  ha sido detectado en células de Sertoli y en algunas células germinales. Sin embargo, en el ratón knockout ERKO $\beta$  la espermatogénesis, esteroidogénesis y la fertilidad no se encuentran alteradas (revisado en Hess et al., 1997).

La ovogénesis es la maduración del ovocito hasta que sea apto para ser fecundado; la maduración nuclear implica la suspensión de la reactivación meiótica en dictioteno y la reactivación de la misma previo a la ovulación. (Albertini et al., 1998; Albertini et al., 2001). Las células germinales en el ovario inician la meiosis en la vida fetal y se arrestan en la profase I de la meiosis hasta que en la pubertad las hormonas gonadotrópicas FSH y LH reanudan la meiosis hasta la metafase II. Los ovocitos quedan arrestados nuevamente hasta el momento de la fertilización, hecho que permite completar la meiosis II. La inducción de la maduración del ovocito involucra diversas interacciones celulares a través de señales parácrinas, involucrando a diferentes factores como hormonas esteroides, factores de crecimiento, niveles de AMPc entre otros (revisado en Jamnongjit and Hammes, 2005). Es bien conocido que en vertebrados inferiores como son peces y anfibios las hormonas esteroides inducen la maduración de ovocitos, la cual es independiente de la transcripción y puede ser regulada por receptores a esteroides localizados en las membranas celulares (revisado en Jamnongjit and Hammes, 2005). Sin embargo el papel de los estrógenos en la maduración folicular aún no es claro; se ha propuesto que el estradiol inhibe la apoptosis de los folículos en embriones. Los trabajos que apoyan esta idea dicen que la supresión de estradiol durante la segunda mitad de gestación en babuinos lleva a un decremento en el número de folículos primordiales en los ovarios fetales (Zachos et al., 2003).

### Biosíntesis de Hormonas Esteroides en la Gónada de Pollo

Los estrógenos juegan un papel fundamental en la regulación de la diferenciación sexual fenotípica de la hembra y la reproducción. Entre los procesos



---

---

más importantes se encuentra el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios de la hembra, la diferenciación sexual del sistema nervioso y la vitelogénesis. Los estrógenos presentan un efecto parácrino sobre el mismo ovario regulando la maduración de las células germinales y la foliculogénesis (George and Wilson, 1988).

La gónada de pollo comienza a sintetizar estrógenos, incluido el estradiol en el momento de la diferenciación sexual gonadal (5 - 6 di). El ovario presenta mayor actividad esteroidogénica comparada con la del testículo. La expresión de los receptores a estrógenos es detectada en las gónadas de ambos sexos antes y durante el inicio de la diferenciación sexual morfológica (4.5 - 6.6 di). En contraste, la expresión de la enzima aromatasa citocromo P450 (CYP450) es sexo específica, restringiéndose a los ovarios de 6.5 di. La enzima aromatasa como ya se mencionó es la encargada de catalizar la transformación de andrógenos como la testosterona o androstenediona en estrógenos (17 $\beta$ -estradiol o estrona) (Smith et al., 1997).

### Receptores para Hormonas Esteroides

Los efectos de las hormonas esteroides, como los estrógenos, son mediados por receptores específicos los cuales reconocen a las hormonas esteroides (revisado en Prossnitz et al., 2007). Las respuestas fisiológicas de estrógenos son iniciadas por receptores nucleares que cambian su conformación una vez que han unido al ligando, resultando en la activación de las vías de señalización de la célula. Se reconocen dos acciones de los estrógenos, las rápidas o no genómicas y las genómicas. Las vías de señalización rápidas se caracterizan por ocurrir dentro de unos minutos tras la estimulación de la célula, mientras que las vías lentas llevan a cambios en la transcripción de genes después de unas horas de la interacción (Prossnitz et al., 2008).

Los receptores de estrógenos (ER) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NR). Esta superfamilia de receptores está formada por 18 miembros, los

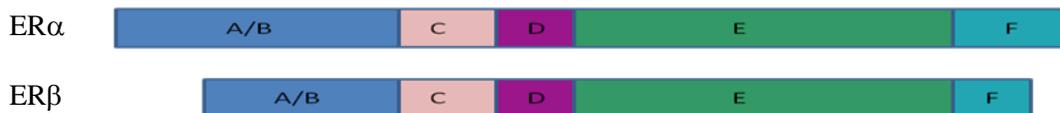


---

cuales se dividen en: clase I y clase II. Los ER  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran dentro de la clase I, que incluye a los receptores de hormonas esteroides (Ellmann et al., 2009).

Hasta el momento se han identificado dos receptores nucleares a estrógenos: ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los cuales regulan la acción biológica de los estrógenos. ER $\alpha$  fue caracterizado en 1960 (Green et al., 1986), mientras que ER $\beta$  en 1996 (Kuiper et al., 1996). Estos receptores son productos de genes distintos localizados en diferentes cromosomas. ER $\alpha$  se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 en la posición 6q25.1, y ER $\beta$  se localiza en el cromosoma 14 en la posición 14q23.2; contienen dominios estructurales y funcionales evolutivamente conservados típicos en los miembros de la familia de los receptores nucleares (Ellmann et al., 2009).

Las proteínas para ER $\alpha$  y ER $\beta$  se organizan en dominios de unión al ligando, dominio de unión a DNA, dos dominios de función de activación transcripcional. La función de activación 1 (AF1) es independiente de la unión del ligando y se ubica en la región de los dominios A/B, el dominio de unión a DNA presenta dos dedos de zinc que además participa en la dimerización de los receptores para formar homodímeros o heterodímeros. El dominio D conocido como región visagra se ubica en la región carboxilo terminal y la función de activación 2 (AF2) representa el dominio de unión al ligando y el sitio donde interacturan coactivadores y correpresores de la transcripción; el dominio F también ubicado en la región carboxilo terminal es el que representa una mayor variación en su tamaño (Fig. 5) (revisado en Ellmann et al., 2009).



**Figura 5.** Representación esquemática de los dominios funcionales de los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ . Ambos receptores presentan la misma organización pero difieren en el número de aminoácidos y el tamaño de los dominios A/B y F (Modificado de Ellmann, et al., 2009).

---

El mecanismo de acción de los estrógenos se da una vez que el ligando (de naturaleza lipofílica) ha atravesado la membrana plasmática, y este se puede unir al ER dando lugar a la liberación del receptor de un complejo inhibitorio que forma con proteínas de choque térmico, lo que permite al receptor hacer un cambio conformacional, dimerizarse, traslocarse al núcleo y asociarse con factores transcripcionales coactivadores, regulando así la expresión de genes específicos (Prossnitz et al., 2008; Otto et al., 2008; Prossnitz et al., 2008).

En los últimos años se ha propuesto al receptor transmembranal acoplado a proteína G 30 (GPR30) como un receptor a estrógenos, el cual activa una vía de señalización rápida no genómica de forma independiente a los receptores a estrógenos tradicionales (Prossnitz et al., 2009).

#### El receptor transmembranal a Estrógenos acoplado a proteína G 1 (GPER1)

El hallazgo de GPR30 como un receptor a estrógenos deriva de la observación de que los estrógenos pueden estimular la actividad de adenilato ciclasa y la producción de AMPc en la línea celular MCF7 (ER $\alpha$ +) de cáncer de mama (Aronica et al., 1994), mientras que la línea celular MDA-MB-231 (ER $\alpha$ - ER $\beta$ +) de cáncer de mama no desarrolla esta respuesta, los autores concluyeron que la diferencia de respuesta se debía a la presencia o ausencia de ER $\alpha$ . Un screening de RNAm en ambas líneas celulares mostró que GPR30 se expresa en la línea celular MCF7 y no en la línea MDA-MB-231 (Carcemi et al., 1997). Los experimentos que contribuyeron para asignar a GPR30 como un nuevo receptor a estrógenos fue la transfección de un vector de expresión para GPR30 a la línea celular MDA-MB-23, que al ser estimulada con estrógenos induce la actividad de adenilato ciclasa vía GPR30 (Filardo et al., 2002).

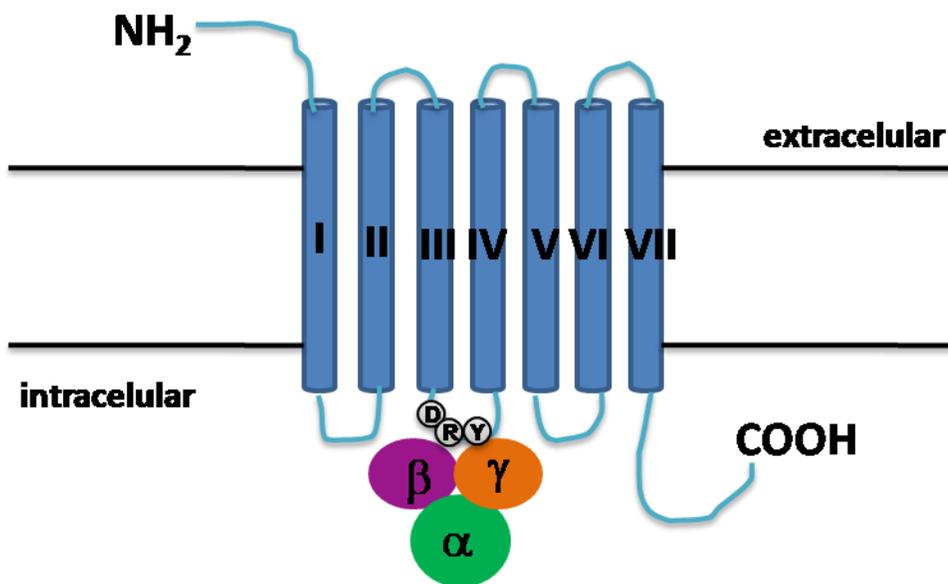
A partir del 2007, GPR30 es reconocido como un receptor transmembranal a estrógenos, por lo que ha recibido por parte de la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR, por su nombre en inglés) el nombre oficial



---

de Receptor a Estrógenos acoplado a proteína G 1 (GPER1) (revisado en: Maggiolini et al., 2010).

La clonación y análisis de la secuencia de GPR30 mostró que pertenece a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G (7TM-GPCRs). Los miembros de esta súper familia contienen siete dominios transmembranales (7TM)  $\alpha$ -hélice, separados por regiones alternadas de asas intracelulares y extracelulares; con su dominio N-terminal de forma extracelular. Mientras que el dominio C-terminal es intracelular (Fig. 6). En vertebrados, los receptores 7TM-GPCRs están divididos en cinco familias: rodopsina (familia A), secretina (familia B), glutamato (familia C), adhesión, y Frizzled/Smoothened, clasificadas según sus similitudes estructurales y de secuencia (Rosenbaum et al., 2009).



**Figura 6.** Esquema general del receptor acoplado a proteína G 30 (GPER1/GPR30). La secuencia DRY (aspartato, arginina y tirosina) interviene en la activación del receptor y se ubica en la segunda asa intracelular.

Los receptores 7TM-GPCRs clásicos responden a una gran variedad de ligandos como son hormonas, proteínas, iones, lípidos entre otros. La señalización ocurre a través de la proteína G heterotrimérica que se une a una gran cantidad de



---

moléculas efectoras, incluyendo adenilato ciclasa, fosfolipasas, fosfodiesterasas y canales iónicos (Prossnitz et al., 2008). Estos receptores tras el reconocimiento de su ligando llevan a cabo la disociación de la subunidad  $G\alpha$ -GTPasa del complejo heterotrimérico  $G\alpha\beta\gamma$ . La actividad de ésta subunidad regula los canales iónicos y a las enzimas asociadas a membrana (p. ej. Adenilato ciclasa y fosfolipasa C) los cuales forman a los clásicos segundos mensajeros como el AMPc, inositol trifosfato y  $Ca^{2+}$ . Por su parte la disociación del complejo  $G\beta\gamma$  actúa como una señal efectora que activa cascadas de proteínas cinasas (Filardo et al., 2005).

GPER1/GPR30 presenta la estructura clásica de los GPCRs, de siete dominios transmembranales (7TM) y una secuencia DRY (aspartato, arginina y tirosina) que es importante para su activación, presente en la segunda asa intracelular del receptor. Además de encontrarse acoplado a una proteína G, en este caso la estimuladora (Gs) (Prossnitz et al., 2009; Pang et al., 2008). Dentro de la clasificación de los GPCRs pertenece a la clase A, de los receptores parecidos a rodopsina y dentro de esta se encuentra en la subfamilia 2 de los receptores tipo quimocina, ya que tiene cierta homología con estos (Thomas et al., 2010; Maggionlini, 2010).

Aunque la mayoría de los GPCRs se expresan en la membrana plasmática, cada vez hay más información sobre que los GPCRs pueden estar localizados funcionalmente intracelularmente en organelos membranosos; esto es particularmente cierto para aquellos GPCRs con ligandos lipofílicos, como en el caso de GPER1/GPR30 cuyo ligando ( $E_2$ ) puede atravesar la membrana celular, lo que hace que la localización intracelular de este receptor sea consistente con su función (Prossnitz et al., 2008).

Se ha demostrado que GPER1/GPR30 regula respuestas rápidas por efecto de estrógenos en una gran variedad de tipos celulares y cuyas funciones son distintas de los receptores de estrógeno clásicos. Se ha detectado la expresión GPER1/GPR30 en corazón, pulmón, hígado, intestino, ovario y cerebro de



---

vertebrados, además de presentarse en tejido humano normal y tejido tumoral de humano (Prossnitz et al., 2008; Thomas et al., 2010).

## ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, el  $17\beta$ -estradiol es importante en la regulación de la función gonadal, sin embargo; los mecanismos por los cuales actúan requieren más estudios. Con el hallazgo del receptor transmembranal a estrógenos varios grupos de investigación han iniciado el abordaje del papel de GPER1/GPR30 en la fisiología gonadal. Hasta el momento se ha reportado que la expresión de GPER1/GPR30 se encuentra conservada en los ovarios de dos grupos de vertebrados evolutivamente separados como son los peces y mamíferos. Se ha demostrado que en peces teleósteos los estrógenos se unen a GPR30 e incrementan de la producción de AMPc mediante la activación de proteínas G. Pang y cols. (2008, 2009) proponen que en el teleósteo corvina Atlántica (*Micropogonias undulatus*) los estrógenos ejercen un efecto inhibitorio sobre la maduración de los ovocitos, lo que permite sincronizar la maduración de la próxima cohorte de ovocitos maduros que serán ovulados y desovados, esta inhibición se propone podría estar mediada por GPER1/GPR30.

Así mismo, Pang y cols. (2010) observaron que GPER1/GPR30 se expresa en los ovocitos del pez cebra, exclusivamente en la membrana plasmática. La expresión tanto de RNAm como de proteína de GPER1 aumentan en los ovocitos durante la ovogénesis alcanzando niveles máximos en ovocitos vitelogénicos tardíos. Sin embargo, la transcripción y los niveles de proteínas de GPER1 comienzan a disminuir en los ovocitos que serán sometidos a madurar en pocas horas y apenas perceptible para el momento en que los ovocitos han completado la ruptura de la vesícula germinal, lo cual es compatible con una función de los estrógenos a través de GPER1 y la maduración nuclear de los ovocitos. Estos trabajos proporcionan la primera evidencia de que la acción de los estrógenos sobre la maduración folicular podría ser mediada por el receptor transmembranal a estrógenos GPER1 en los ovarios de vertebrados.



---

En el caso de los mamíferos, Wang y cols. (2008) determinaron que GPER1/GPR30 está localizado en los folículos y ovocitos, además en el ovario adulto de hámster se expresa en las células de la teca y células de la granulosa mediante la regulación de FSH y LH (Wang et al., 2007). Por lo que los autores proponen que la acción de los estrógenos sobre la maduración folicular en mamíferos podría también ser mediada por el receptor transmembranal a estrógenos GPER1 como sucede en peces.

La participación de los estrógenos vía GPER1/GPR30 no se restringe al ovario, sino que también participan en la maduración de las células germinales en el testículo. Trabajos *in vitro* de Sirianni y cols. (2008) muestran que en respuesta al estímulo de  $17\beta$ -estradiol, GPR30 y  $ER\alpha$  activan la vía rápida EGFR/ERK/fos para inducir la proliferación de la línea celular GC-1 de espermatogonias de ratón. Recientemente Chimento y cols. (2010) observaron la expresión de GPR30 en el citoplasma de espermatoцитos de rata, y además proponen que a través de GPR30 y de  $ER\alpha$  los estrógenos activan una cascada de señalización rápida que se une a la vía mitocondrial de apoptosis, aumentando los niveles de la proteína Bax y llevando a los espermatoцитos a apoptosis.

En este estudio, se describe la expresión espacio temporal de GPER1/GPR30 durante la histogénesis gonadal de los embriones de pollo. Analizamos la expresión de los 9 a los 21 di, el cual es un periodo en el que los ovarios y testículos se encuentran morfológica y fisiológicamente diferenciados, el mayor número de células germinales en proliferación se encuentra entre los 9 a 12 de incubación, manteniéndose constante el número de células germinales de los 12 a los 18 di (Hughes, 1963), además las células germinales del ovario inician la meiosis entre los 15 – 20 di (Smith et al., 2008). De manera que la determinación del patrón espacio-temporal de GPER1/GPR30 durante la histogénesis gonadal es el primer abordaje para establecer las etapas del desarrollo embrionario en las que GPER1/GPR30 podría ser importante para la histogénesis del ovario y del testículo en el embrión de pollo.

---

## **HIPOTESIS**

La expresión del receptor transmembranal a estrógenos 1, GPER1/GPR30, es detectada durante la embriogénesis del ovario y el testículo de pollo.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General

Analizar el patrón de expresión espacio-temporal de GPER1/GPR30 durante la embriogénesis del ovario y del testículo del pollo.

### Objetivos Particulares

- Detectar el RNAm para el receptor transmembranal GPER1/GPR30 en ovarios y testículos de embrión de pollo de 9, 10, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20 y 21 di.
- Establecer la expresión espacio temporal de la proteína de GPER 1/GPR30 en criosecciones de ovario y testículo de embrión de pollo de 9, 10, 11, 15, 17 y 21 di.
- Identificar la expresión en células epiteliales de GPER1/GPR30 en criosecciones de ovario y testículo de embrión de pollo de 9, 10, 11, 15, 17 y 21 di.
- Discriminar la expresión de GPER1/GPR30 entre células germinales y Sertoli en el testículo de embriones de pollo de 9, 10, 11, 15, 17 y 21 di.
- Determinar los tipos celulares que expresan GPER1/GPR30 en embriones de pollo de 9, 10, 11, 15, 17 y 21 di.



- 
- Comparar los patrones de expresión espacio-temporal entre ovario y testículo de embrión de pollo de 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 di.

---

## **METODOLOGÍA**

### Material Biológico

Se utilizaron embriones de pollo, de la estirpe White Leghorn provenientes de la granja Aves Libres de Patógenos (ALPES, S.A.) en Tehuacán, Puebla. Los huevos se incubaron a 38°C con 80 % de humedad relativa. Se obtuvieron embriones en diferentes etapas del desarrollo, los cuales fueron sacrificados por decapitación. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### Obtención de la muestra

Se disecaron el testículo y el ovario izquierdo de embriones de pollo de 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 días de incubación. Las muestras asignadas para extracción de RNA total (9, 10, 11, 14, 16, 19, 20 y 21 di), fueron almacenadas en RNAlater a 4°C hasta su uso. Las muestras asignadas para inmunofluorescencia (9, 10, 11, 15, 17 y 21 di), se fijaron en 4% paraformaldehído/PBS durante cinco horas a 4°C.

### Microscopía de luz

Las gónadas fueron procesadas para microscopía de alta resolución como lo reporta Merchant, 1975. Brevemente, las muestras se fijaron en buffer de Karnovsky, se posfijaron en 1% de OsO<sub>4</sub> en buffer de Zetterqvist y se incluyeron en Epon 812. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de espesor los cuales se tiñeron con azul de toluidina. Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio óptico.

### Obtención del RNA Total

Se realizó la extracción del RNA total, homogenizando los tejidos con 1ml de Trizol reagent (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA). El homogenizado se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 200 µl de



---

cloroformo frío. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol frío mezclando por inversión. Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos, 4°C. La pastilla obtenido se lavó 2 veces con 1 ml de 80% etanol/agua libre de RNAsas. La pastilla obtenida, se resuspendió en 25 µl de RNAsecure (Ambion Inc.), precalentando a 60°C y se incubó a 60°C por 10 minutos. Para evitar la contaminación con DNA genómico, el RNA fue tratado con 1.5 µl de DNaseI (DNA-free, Ambion Inc.) durante 30 min a 37°C. La concentración de RNA fue cuantificada en un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. La calidad del RNA fue analizada con la relación de absorbancia  $^{260}/_{280} = 2.0 \pm .15$ . Las muestras con una pureza menor a la mencionada fueron descartadas.

### Integridad de RNA

Para verificar la integridad del RNA total, se tomó el equivalente a 1 µg de RNA de cada muestra y se le añadieron 5 µl de formamida, 1µl de buffer de carga desnaturizante 5X y agua para obtener un volumen final de 10µl. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 55°C y se colocaron en hielo. El RNA total fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Los geles fueron visualizados en un transiluminador (VWR International).

### Transcripción reversa

Las reacciones de transcripción reversa se realizaron a partir de 1 µg de RNA total, 1 µl de 10mM Oligo (dT)15, 1 µl de Random primer, agua libre de RNAsas en un volumen de 13 µl, la reacciones se incubaron por 10 minutos a 65°C y se colocaron en hielo. Se adicionaron 4 µl de 5X buffer de transcripción reversa, 2µl de 10mM dNTP's, 0.5 µl de inhibidor de RNAsas y 0.5 µl de enzima reverso transcriptasa (RT). Las muestras se incubaron durante 30 min a 55°C, 5 min a 85°C. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta su uso.



---

### PCR punto final para GPR30

Las reacciones de PCR punto final se realizaron con 1µl de cDNA, 3µl 10X de buffer de PCR, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de 10mM dNTP's, 1 µl de 10mM oligonucleótido sentido, 1µl de 10mM oligonucleótido antisentido, 0.3µl de la enzima amplificasa (Biogénica), en una reacción final de 30µl. Las condiciones de amplificación para GPR30 fueron: 94°C 2min, (94°C 45 seg, 58°C 45 seg, 72°C 45 seg) X 33 ciclos y 72°C 5 min en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf); para β- actina: 94°C 2min, (94°C 45 seg, 59°C 45 seg, 72°C 45 seg) X 23 ciclos y 72°C 5 min en un termociclador PTC-100. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de 1% agarosa teñido con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para GPR30 y β-actina (utilizado como gen de control de expresión endógena) fueron diseñadas de acuerdo a la secuencia reportada en Genbank NC\_006101.2 y NW\_001486319.1 respectivamente.

GPER1: Oligonucleótido sentido 5' – CGTGCCTTTACACAATATTTTC – 3',  
antisentido 5' – GGACGATTAACGAGTAACAG – 3'

β- actina: oligonucleótido sentido 5' – CAAAGCCAACAGAGAGAAGA – 3',  
antisentido 5' – TCACGCACAATTTCTCTCTC – 3'

### Doble Inmunofluorescencia para GPR30-AMH y GPR30-Citoqueratina

Las muestras obtenidas se fijaron en 4% paraformaldehido/PBS frío durante cinco horas, posteriormente se lavaron con PBS y se deshidrataron en series ascendentes de sacarosa 10 %, 20 % y 30% en PBS y 1:1 sacarosa 30%:OCT por cada uno. Las muestras se incluyeron en OCT y se congelaron en hielo seco. Se obtuvieron criosecciones de 10 µm las cuales se adhirieron a laminillas electrocargadas, y se guardaron a -20°C.



---

Las laminillas se colocaron en una cámara de vacío por 40 minutos y se lavaron 2 veces con PBS, se realizaron lavados ascendentes y descendentes de etanol de 7 min cada uno. La exposición de antígeno se realizó incubando las muestras en 10mM de citrato de sodio, pH 6 en baño de flotación a 85°C por 40 minutos. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se lavaron dos veces con PBS. Las muestras se permeabilizaron con 0.3% Triton/PBS durante 10 min. Se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con 5% suero de caballo y 2% albúmina por 2 h a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario conejo-anti-GPR30 (1:50) durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 4 lavados con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:200) acoplado a FITC durante 1 hr. Las muestras se lavaron 4 veces con 100 mM glicina/PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído/PBS durante 10 min. Posteriormente el tejido se lavó 5 veces con PBS y se permeabilizó con 0.1% Tritón/PBS durante 10 min. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario de cabra anti-AMH (1:200) o ratón anti-citoqueratina (1:100) durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 4 lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra o anti-ratón (1:100) acoplado a rodamina por 1 h y se lavaron 4 veces con PBS. Los núcleos se marcaron DAPI. Las laminillas se montaron con el medio de montaje Vectashield. Las laminillas se observaron y fotografiaron en un microscopio Confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de 40X.



---

## RESULTADOS

### Histogénesis gonadal del embrión de pollo

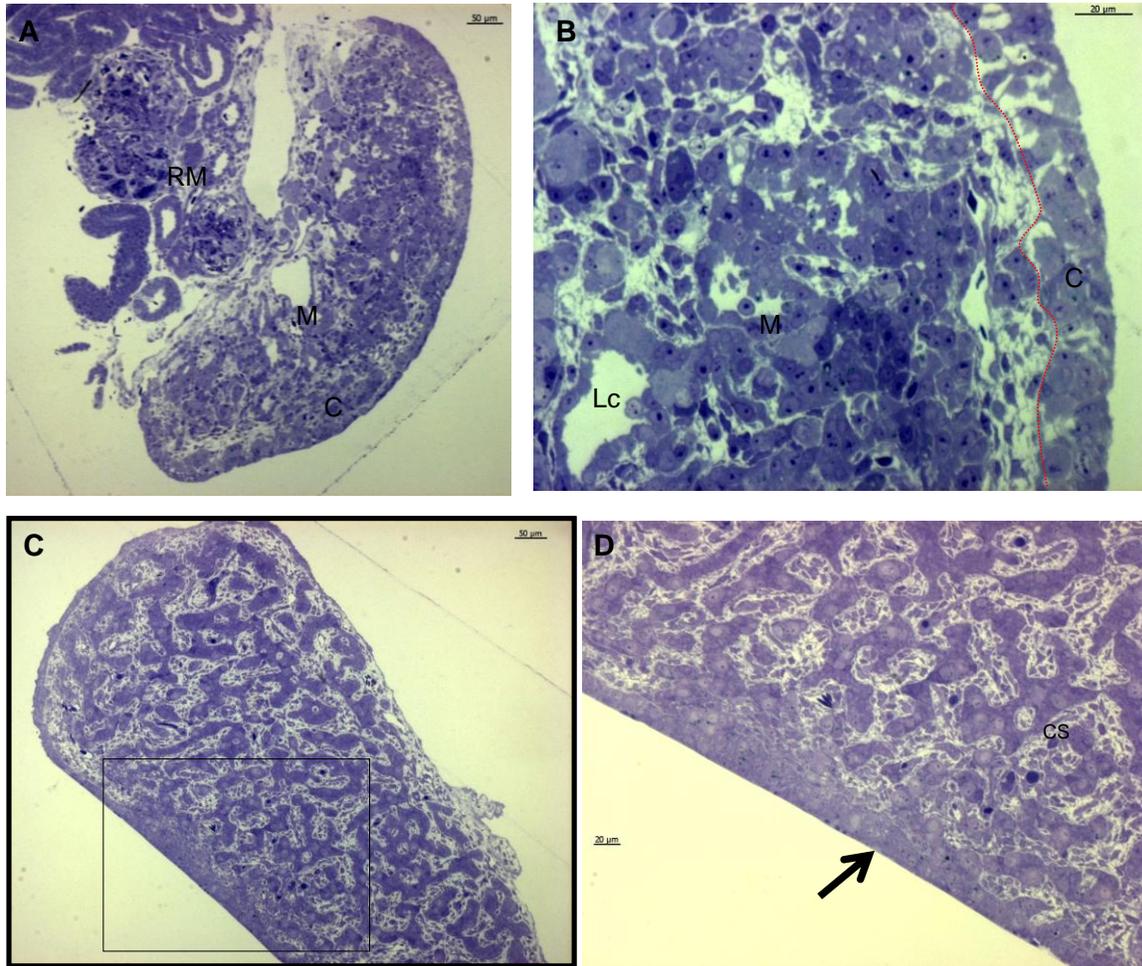
En el ovario del embrión de pollo de 9 días, se pueden distinguir claramente una zona externa, la corteza ovárica incipiente originada por proliferación del epitelio celómico y la localización de células germinales. En la zona interna, está la médula ovárica derivada de los cordones sexuales primarios de la gónada. Se puede observar en la zona del hilio una conexión con el mesonefros, órgano excretor embrionario (Fig. 7 A). A esta edad la corteza del ovario está formada por células epiteliales precursoras de las células de la granulosa y células germinales que en conjunto inician la formación de los cordones corticales. En la región medular se observan arreglos epiteliales precursores del sistema lacunar del ovario, originados por remanentes de los cordones sexuales primarios (Fig. 7 B). Se ha propuesto que este sistema funciona como cámara de difusión en el suministro de sustancias nutritivas y de eliminación de restos celulares procedentes de los folículos (Callebaut, 1979).

En el testículo de embriones de 9 días se observan los cordones seminíferos derivados de los cordones medulares formando una red epitelial. Estos están integrados por dos tipos celulares: las células de Sertoli y las células germinales, las cuales se distinguen por ser células más grandes, de núcleo redondo y citoplasma claro. En algunas regiones aún es posible observar la conexión de la red epitelial con el epitelio superficial del testículo. En el estroma se observan células laxas y vasos sanguíneos (Fig. 7 C y D).

En el ovario del embrión de pollo de 10 días, se observa un incremento en el grosor de la corteza por proliferación del epitelio celómico y las células germinales. En la región de la médula se observan los remanentes de los cordones primarios y el mesonefros, órgano excretor embrionario (Fig. 8 A y B).

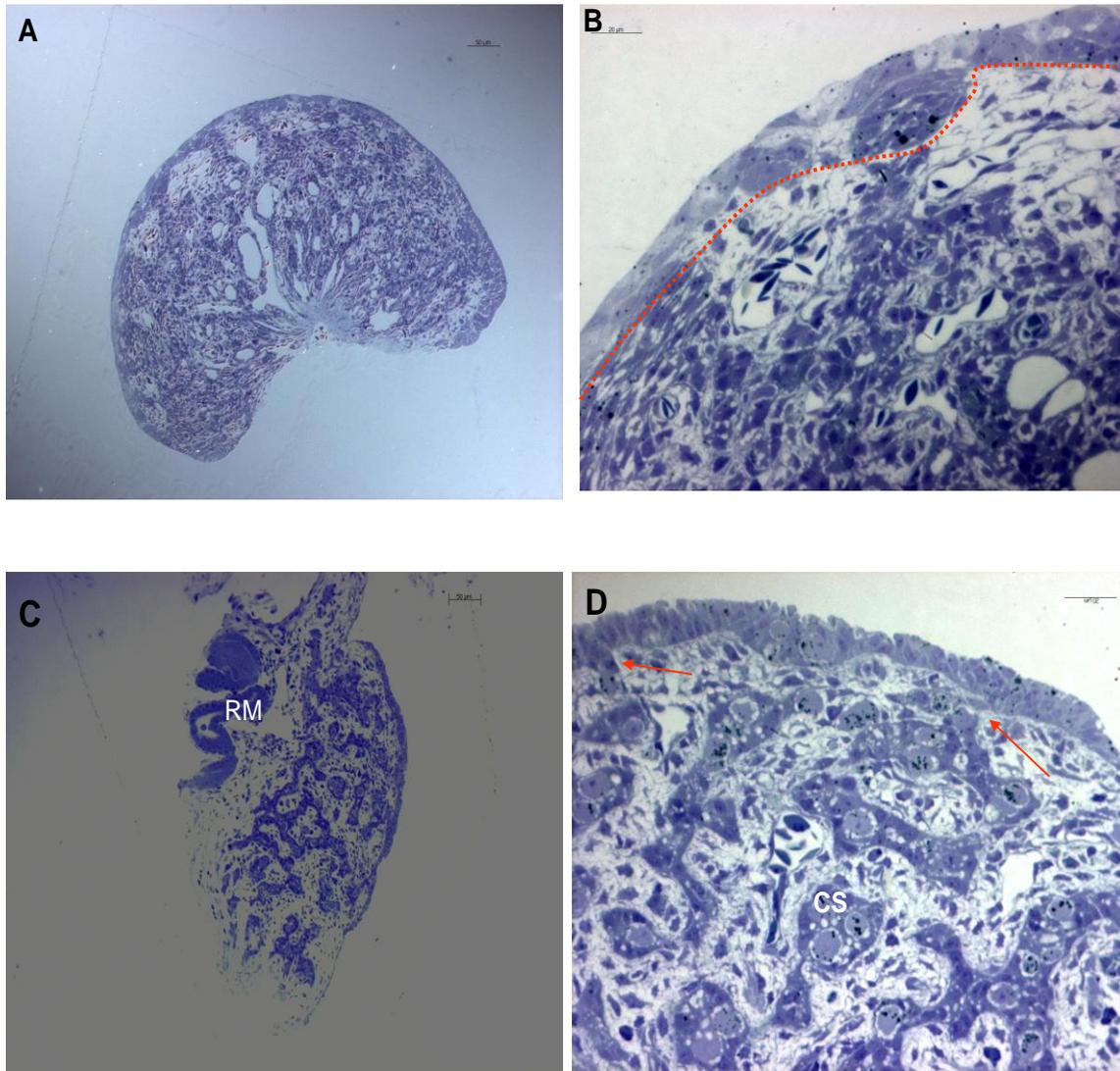
---

En el testículo de embriones de 10 di se observan algunas zonas donde los cordones seminíferos aún se encuentran conectados con el epitelio superficial. En el estroma se observan células laxas y vasos sanguíneos (Fig. 8 C y D).

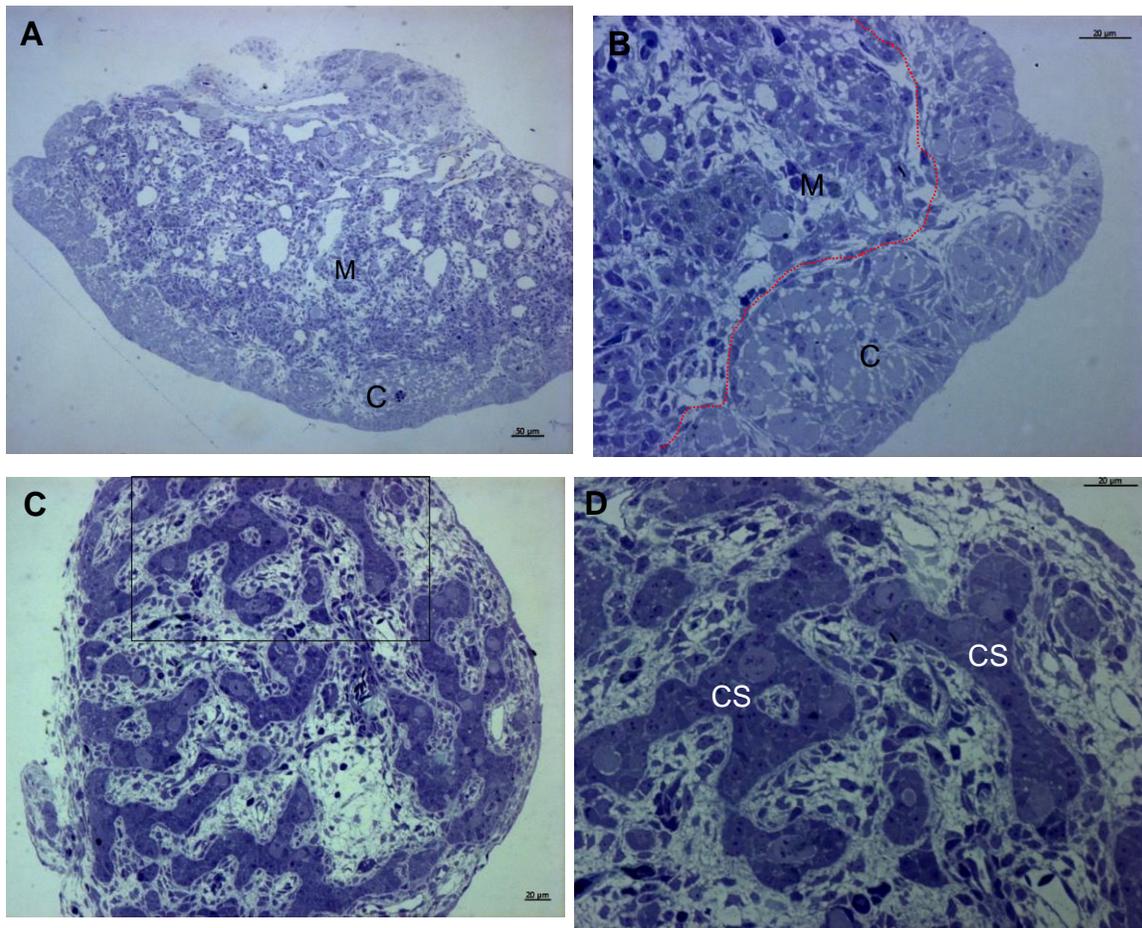


**Figura 7.** Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 9 di. **A)** La corteza del ovario es rudimentaria y hay mayor prominencia de la región medular. **B)** Amplificación de una zona del ovario, la línea roja delimita la corteza de la médula; donde se distingue una lacuna ovárica. **C)** En el testículo, la red epitelial precursora de los cordones seminíferos se encuentra conectada en algunos puntos con el epitelio que recubre la gónada. **D)** Amplificación del recuadro C, muestra la continuidad de la red epitelial con el epitelio (→). C=corteza, M= médula, Mn=mesonefros, Lc=lacuna ovárica, CS=cordones seminíferos.

En el ovario de embriones de 11 di, la corteza ha aumentado de grosor, tiene una mayor cantidad de células germinales. En la región medular se observan los espacios lacunares dilatados (Fig. 9 A y B). A esta misma edad los cordones seminíferos del testículo se encuentran completamente separados del epitelio superficial por células mesenquimatosas (Fig. 9 C y D).

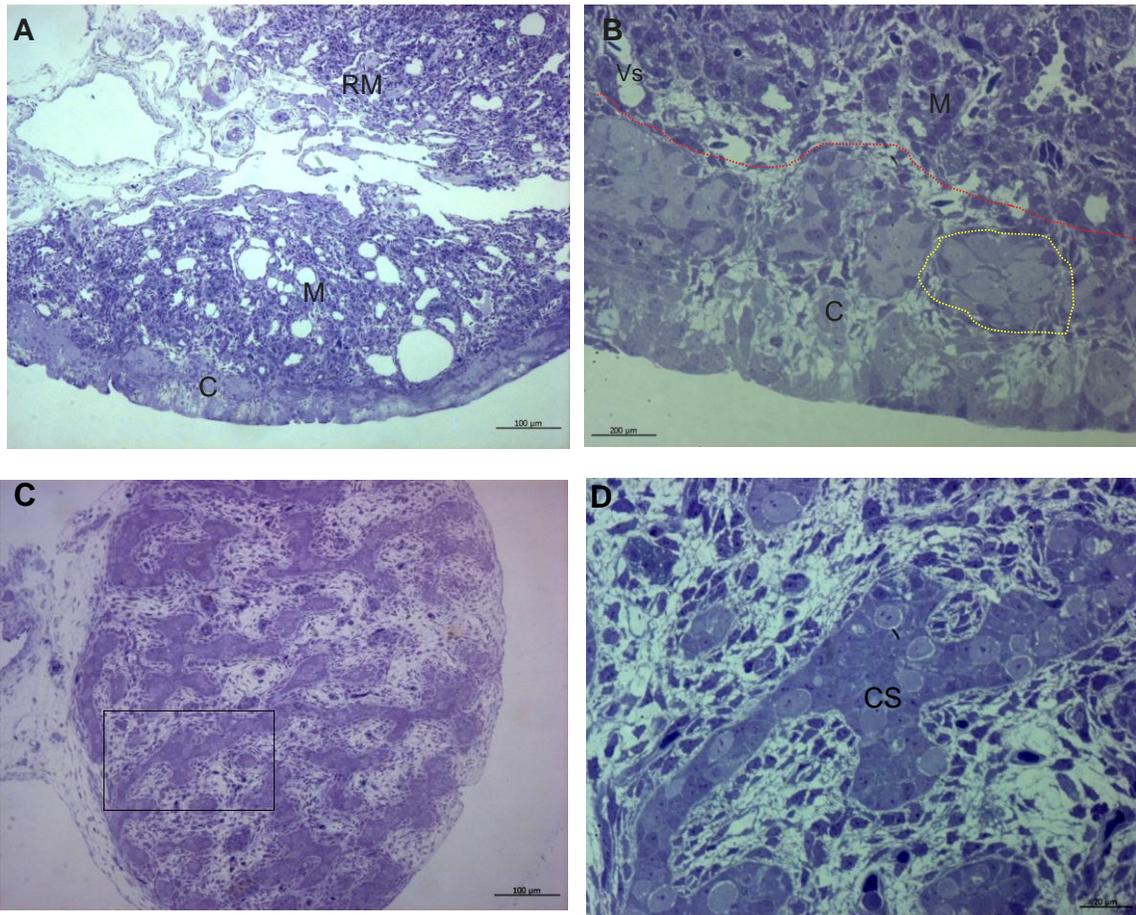


**Figura 8.** Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 10 di. **A)** Se observa el engrosamiento de la región cortical del ovario. **B)** Amplificación de una zona del ovario, la línea roja delimita la corteza (hacia la superficie) de la médula (hacia la región interna del ovario). Se observa la corteza engrosada formada por células pregranulosas (células densas) y células germinales (células redondas y claras). **C)** Corte semifino de un testículo de 10di. **D)** Amplificación de C, las flechas indican la zona donde la red epitelial aún se encuentra conectada al epitelio superficial. C=corteza, M= médula, CS=cordón seminífero RM= región mesonéfrica.



**Figura 9.** Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 11 di. **A)** Se observa el engrosamiento de la región cortical del ovario. Hacia la región medular se observa una expansión de los lacunares. **B)** Amplificación de una zona del ovario, la línea roja delimita la corteza (hacia la superficie) de la médula (hacia la región interna del ovario). Se observa la corteza engrosada formada por células pregranulosas (células densas) y células germinales (células redondas y claras). **C)** Los cordones seminíferos del testículo se encuentran separados del epitelio superficial. **D)** Amplificación del recuadro de C. Los cordones seminíferos (CS) están integrados por células de Sertoli (células densas) y células germinales (células claras y redondas). C=corteza, M= médula, CS=cordón seminífero.

En el ovario de embrión de pollo de 15di la corteza se ha vuelto más consistente, los cordones ovígeros son más grandes. Hacia la superficie de la corteza se observa tejido conectivo entre los cordones ovígeros formados por células pregranulosas que rodean a los ovocitos primarios (Fig. 10 A y B). En el testículo de 15 di, los cordones seminíferos se encuentran separados del tejido estromático (Fig. 10 C y D).

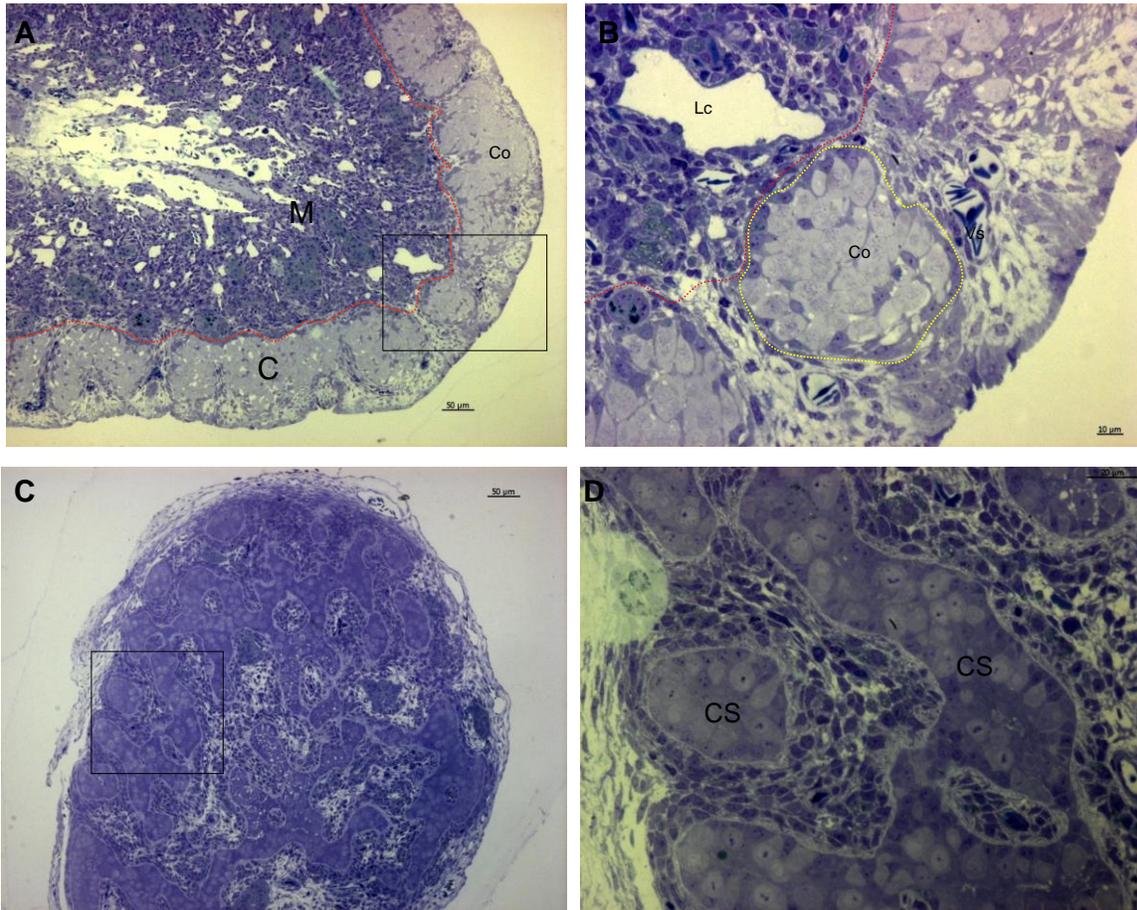


**Figura 10.** Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 15 di. **A)** Se observa el engrosamiento de la región cortical del ovario. **B)** Amplificación del ovario, la línea roja separa la región cortical de la región medular. En la corteza, se marca en amarillo un cordón ovígero formado por células somáticas y células germinales. En la región medular son muy evidentes los espacios lacunares. **C)** El testículo ha tomado una forma oval; en su interior se observan los cordones seminíferos y separados por abundante tejido intersticial. **D)** Amplificación del recuadro de C. En el interior de los CS se observan las espermatogonias con núcleos redondos y prominentes. En el intersticio se encuentran un grupo de células con abundante número de vacuolas de lípidos que podrían corresponder a células de Leydig. C=corteza, M= médula, CS=cordón seminífero, RM=región medular.

En el ovario de 21 di se observa una corteza más desarrollada que abarca aproximadamente una tercera parte de la gónada, ocupada casi en su totalidad por los cordones ovígeros que ahora se muestran bien delimitados, con forma redonda y de mayor tamaño. En su interior los ovocitos primarios están en meiosis, por lo que su núcleo presenta un puntillado más oscuro que corresponde a los cromosomas cortados transversalmente. En el estroma cortical se observan abundantes vasos

---

sanguíneos. Por debajo de la corteza, la medula presenta una zona de mayor vascularización, mientras que la medula profunda tiene menos celularidad y se observa más laxa. Los espacios lacunares son más abundantes aunque aparentemente de menor tamaño (Fig. 11 A y B).



**Figura 11.** Cortes semifinos de ovario y testículo de embriones de pollo de 21 di. **A)** La línea roja separa la región cortical formada por cordones ovígeros de la región medular. **B)** Amplificación de la región cortical del ovario, en amarillo se marca un cordón ovígero. **C)** Testículo de 21 di. **D)** Amplificación del recuadro de C. C=corteza, M= médula, CS=cordón seminífero, Co=cordón ovígero, Lc=lacunares.

En los cordones seminíferos de embriones de pollo de 21 di, son evidentes las células germinales que se encuentran distribuidas por todo el espacio interior del cordón con una tinción clara a diferencia de las células de Sertoli que muestran mayor afinidad al colorante. Los cordones se encuentran rodeados por dos capas de células peritubulares, las más internas con su citoplasma polarizado hacia la lámina

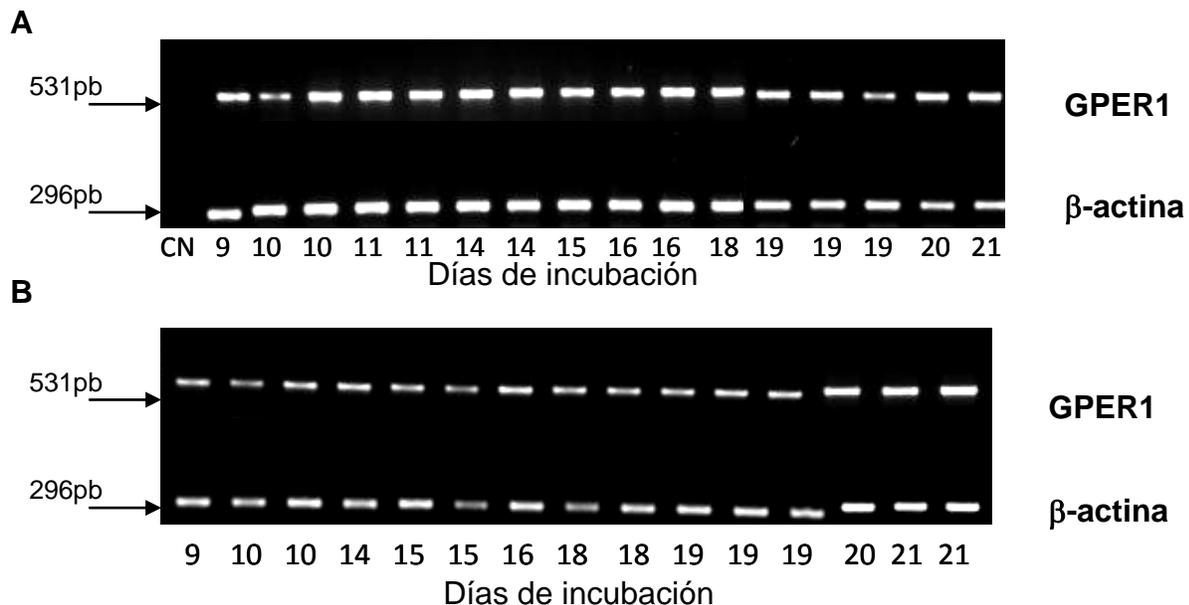
---

basal del túbulo mientras que las externas se encuentran en contacto con el estroma testicular (Fig. 11 C y D).

### Expresión del RNAm de GPER1 en ovarios y testículos de embrión de pollo por PCR de punto final

Se obtuvo un amplicón para GPER1 de 531 pares de bases (pb) a partir de cDNA de ovarios de 17 di. Con el fin de verificar la identidad del amplicón GPER1, el fragmento fue enviado a secuenciación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. La secuencia obtenida presentó un 100% de homología con la secuencia de GPER1 de *Gallus gallus* reportada en Genbank con número de acceso NM\_001162405 (ver Anexo 1 y 2).

Se determinó la expresión de GPER1 en ovarios y testículos de pollo de diferentes edades del desarrollo embrionario. Se amplificó un fragmento de 296 pb de  $\beta$ -actina, como control endógeno de expresión. Tanto los ovarios como los testículos en todas las edades analizadas expresan GPER1/GPR30 (Fig. 13).



**Figura 12.** Expresión del RNAm de GPER1 en gónadas de embrión de pollo. **A)** Expresión de GPER1 en ovarios de embrión de pollo de diferentes edades del desarrollo. **B)** Expresión de GPER1 en testículos de embrión de pollo de diferentes edades del desarrollo. CN=control negativo (agua como templado). La expresión del RNAm de  $\beta$ -actina fue empleado como control de expresión endógena.

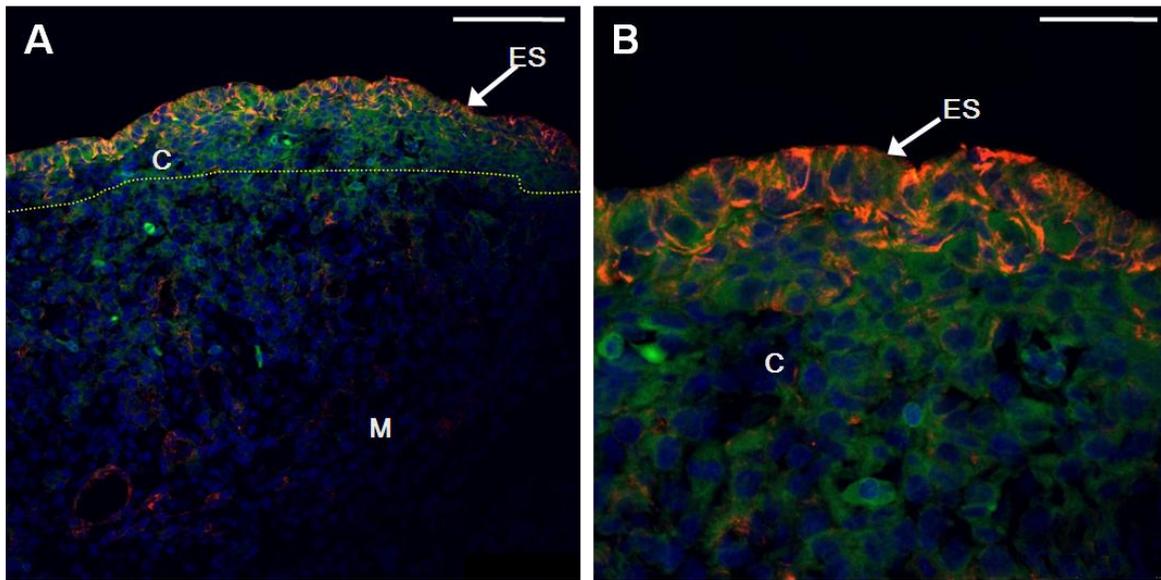
---

## Detección de GPR30 en ovarios y testículos pollo

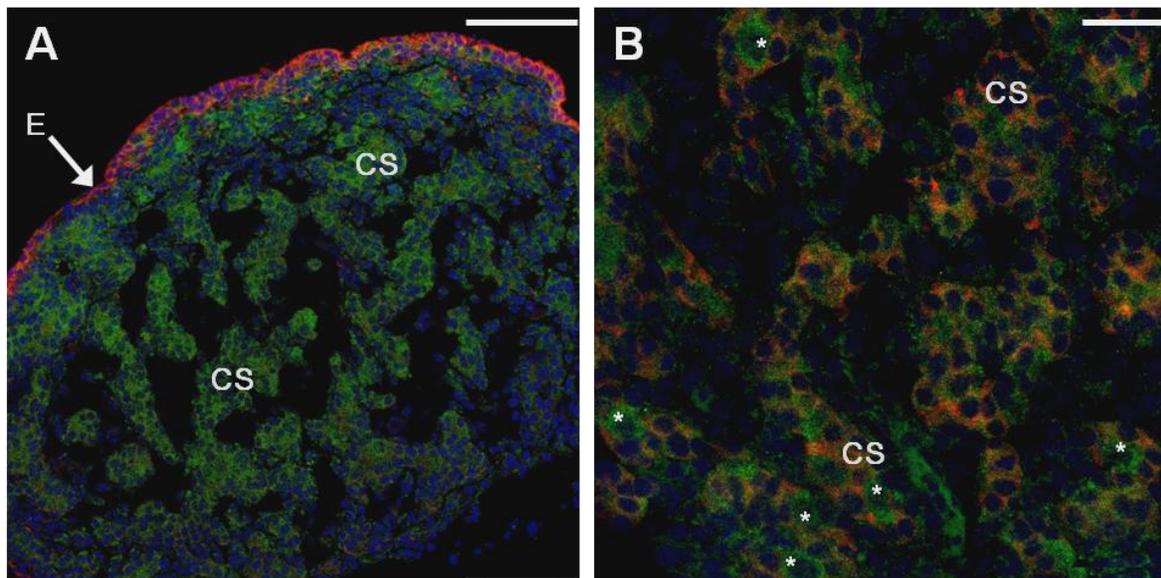
La proteína de GPER1/GPR30 se observó en todas las edades estudiadas en ovarios y testículos.

En el ovario de 9 di se distinguen la médula y la corteza, aunque en forma incipiente, en la inmunofluorescencia se observa la marca de ésta proteína en la corteza y en algunas zonas correspondientes al epitelio superficial; el testículo de esta edad presenta cordones seminíferos bien organizados que dan reacción positiva a GPER1/GPR30 (Fig. 13 y 14).

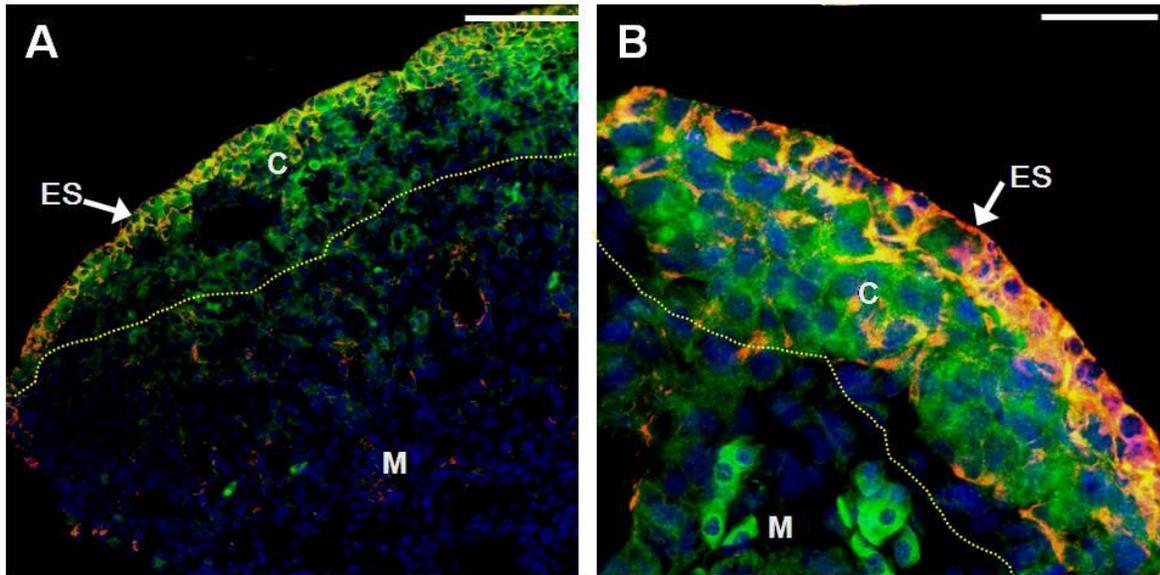
Detectamos la expresión de GPER1/GPR30 en ovarios y testículos de pollo de 10 di. En el ovario de 10 di la expresión de GPER1/GPR30 colocaliza con el marcador de células epiteliales citoqueratina (CK) en la corteza incipiente del ovario (Fig. 15 A y B). En los testículos de 10 di, GPER1/GPR30 colocaliza con la inmunodetección de la hormona antimülleriana (AMH) el cual es considerado un marcador citoplásmico de diferenciación de las células de Sertoli. (Fig. 16 A y B). En una amplificación de los cordones seminíferos del testículo, se señalan células germinales positivas a GPER1/GPR30, las cuales se pueden distinguir como células germinales gracias a la morfología característica de estas células: los núcleos marcados con DAPI (azul) son grandes y redondos, la marca de GPER1/GPR30 se localiza por fuera de los núcleos redondos. Por lo que la expresión de GPER1/GPR30 en los ovarios se restringe al citoplasma de células somáticas que forman la corteza del ovario, y en el caso del testículo la expresión de GPER1/GPR30 se localiza en células somáticas y germinales de los cordones seminíferos.



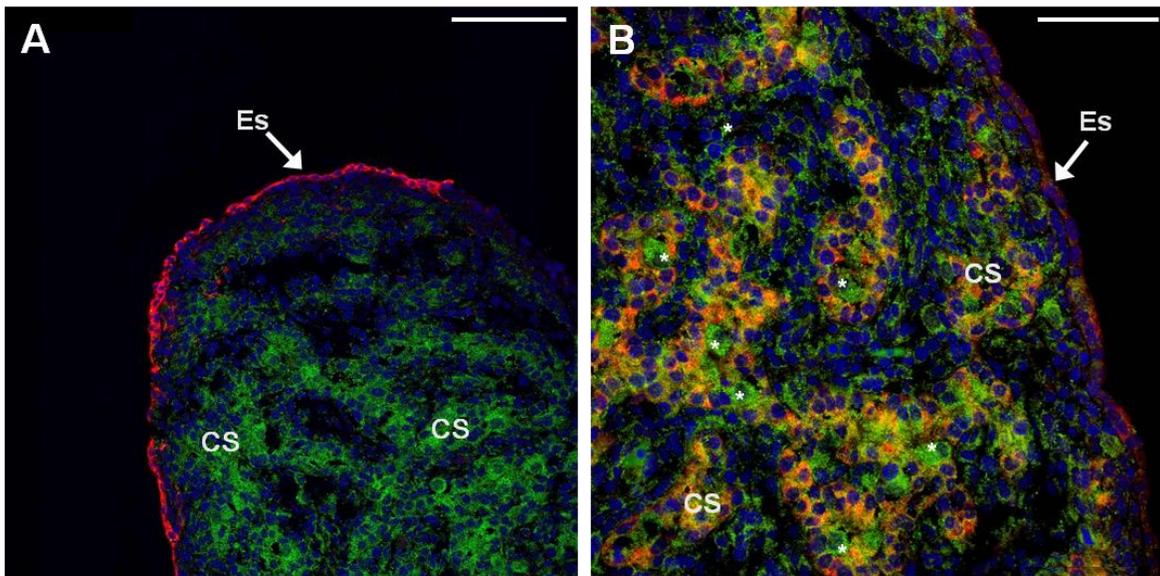
**Figura 13.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 y CK en ovarios de pollo de 9 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y CK (rojo) en ovario de pollo de 9 di. **B)** Amplificación de la corteza del ovario donde se observa la colocalización de GPR30 con CK en las primeras tres capas celulares de la corteza. Los núcleos se marcaron con DAPI



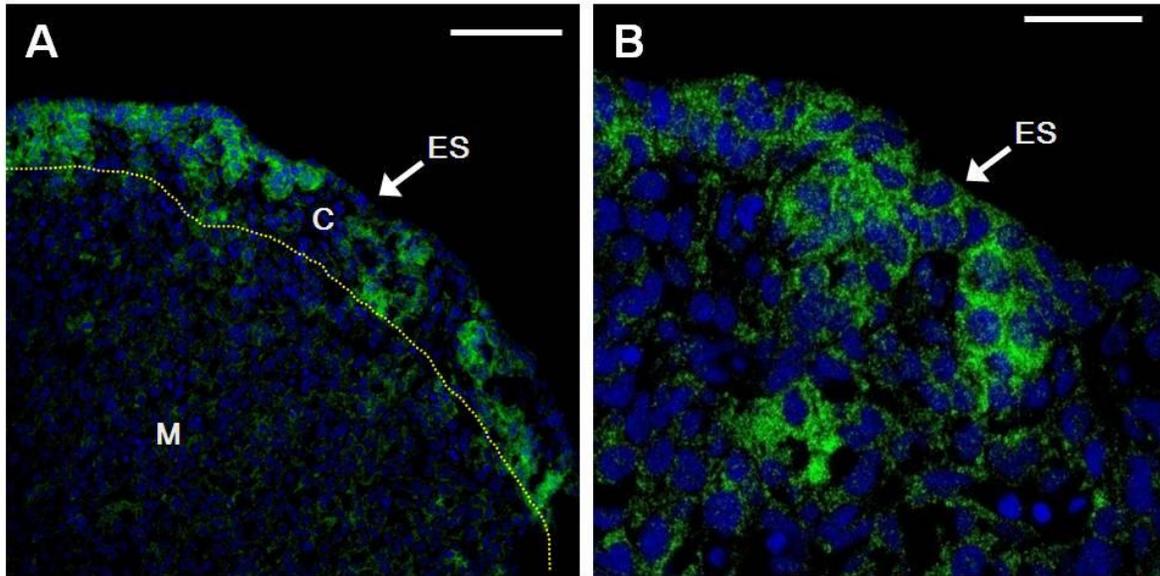
**Figura 14.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 9 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y CK (rojo). **B)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y AMH (rojo) en los cordones seminíferos del testículo (CS). Los asteriscos señalan células germinales con núcleos redondos marcados con DAPI (azul) y positivos a GPR30 (verde). Las células de Sertoli muestran colocalización de AMH (rojo) y GPR30 (verde) por lo que la marca que se observa es naranja.



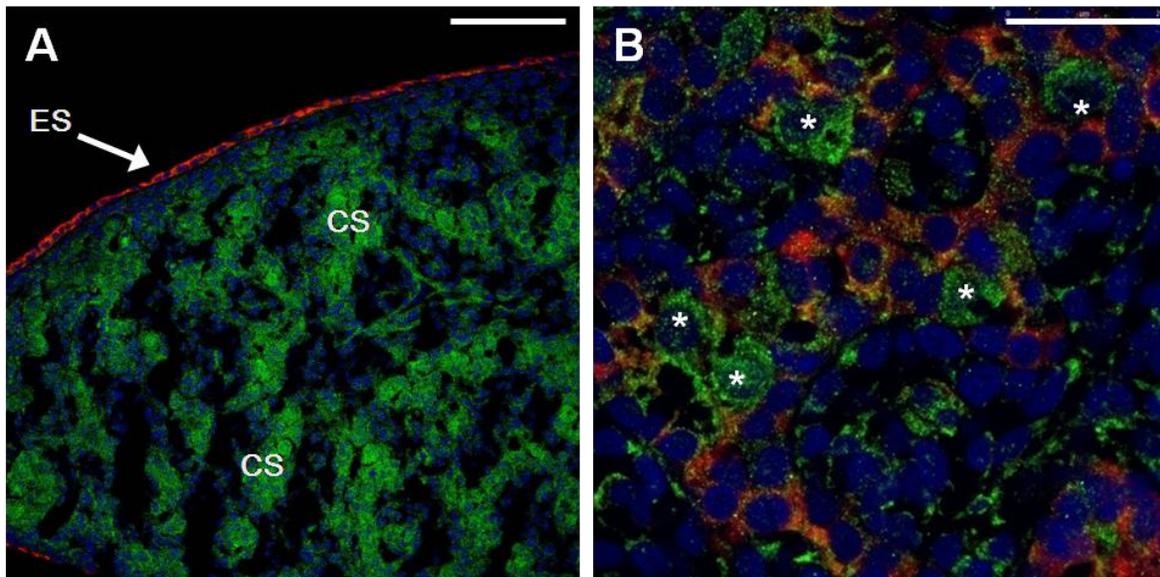
**Figura 15.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 y CK en ovarios de pollo de 10 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y CK (rojo) en ovario de pollo de 10di. **B)** Amplificación de la corteza del ovario donde se observa la colocalización de GPR30 con CK en las primeras tres capas de celulares de la corteza.



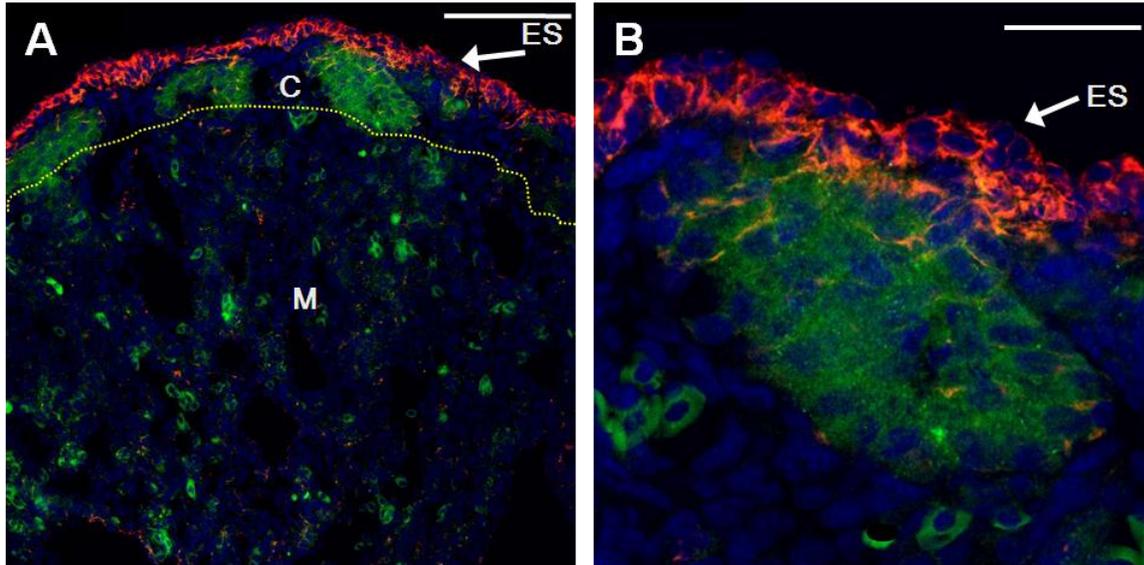
**Figura 16.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 10 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y CK (rojo). **B)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y AMH (rojo) en los cordones seminíferos del testículo (CS). Los asteriscos señalan células germinales con núcleos redondos marcados con DAPI (azul) y positivos a GPR30 (verde). Las células de Sertoli muestran colocalización de AMH (rojo) y GPR30 (verde) por lo que la marca que se observa es naranja.



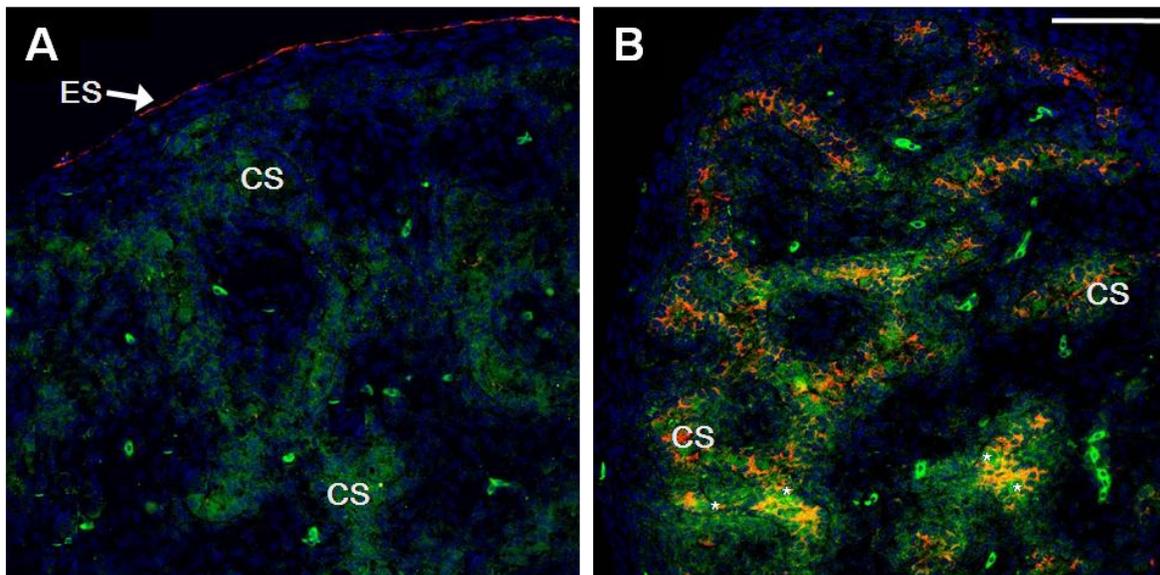
**Figura 17.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 en ovarios de pollo de 11 di. **A)** Inmunofluorescencia de GPR30 (verde) en ovario de pollo de 10di. **B)** Amplificación de A.



**Figura 18.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 11 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y CK (rojo), la marca de GPR30 se observa en los cordones seminíferos (CS). **B)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y AMH (rojo) en una amplificación de un cordón seminífero de testículo (CS). Los asteriscos señalan células germinales con núcleos redondos marcados con DAPI (azul) y positivos a GPR30, las células de Sertoli muestran colocalización de AMH y GPR30 por lo que la marca observada es naranja.



**Figura 19.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30 y CK en ovarios de pollo de 15 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 y CK (rojo) en un ovario de pollo de 15di. GPR30 (verde) se expresa en los cordones ovígeros de la corteza (C) del ovario. **B)** Amplificación de la corteza del ovario donde se observa que GPR30 ya no colocaliza con CK.

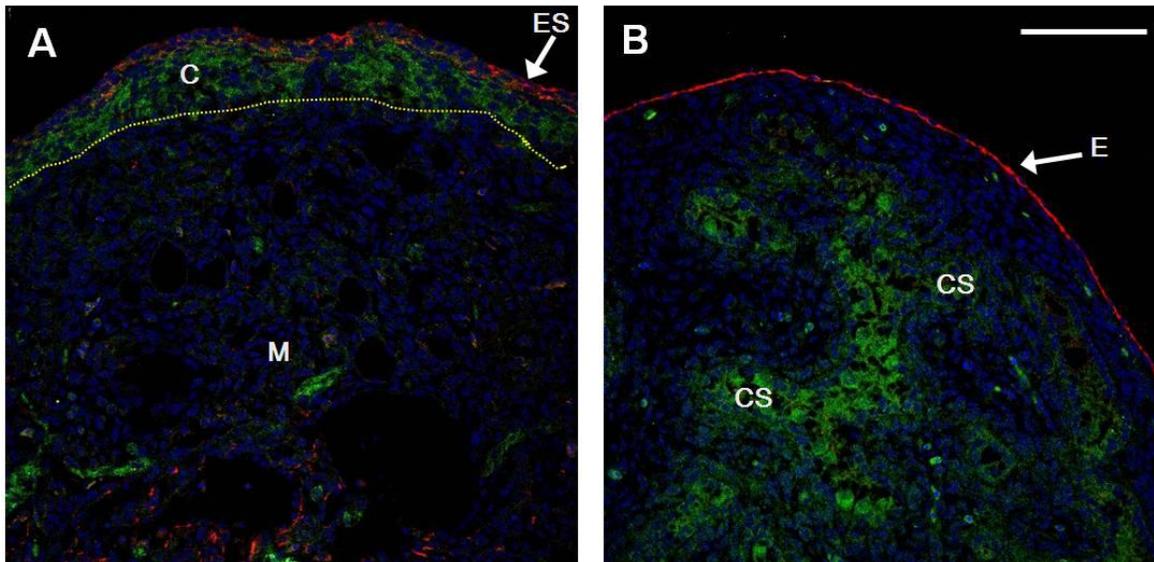


**Figura 20.** Inmunofluorescencia de GPER1/GPR30, CK y AMH en testículos de pollo de 15 di. **A)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y CK (rojo). La marca de GPR30 se observa en los cordones seminíferos del testículo (CS). **B)** Doble inmunofluorescencia de GPR30 (verde) y AMH (rojo). Los asteriscos señalan células germinales con núcleos redondos. Se observa la colocalización para AMH y GPR30. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

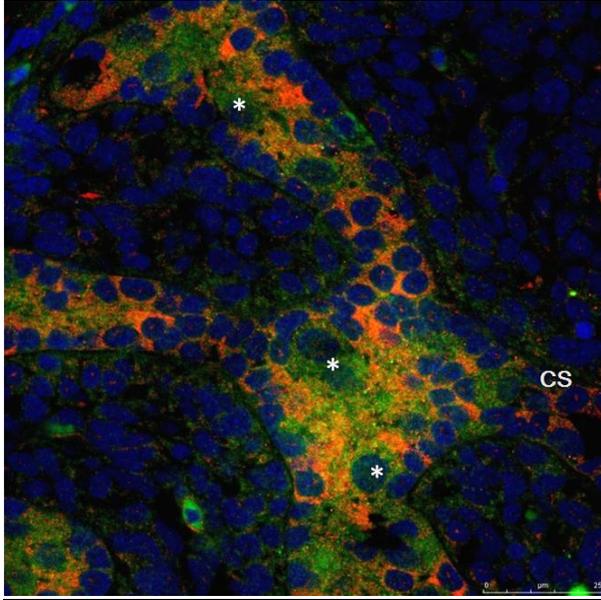
---

En el ovario de 15 di la expresión de GPER1/GPR30 se concentra en los cordones ovígeros de la corteza. Como se observa en la Figura 19 los cordones ovígeros están formados por células somáticas y células germinales siendo estas últimas las más abundantes, por lo que la expresión de GPER1/GPR30 es detectada en las células germinales, las cuales presentan núcleos redondos, rodeados por la marca citoplasmica de GPER1/GPR30. A diferencia de los ovarios de 9 y 10 di, GPER1/GPR30 no colocaliza con la marca de CK observada en el epitelio superficial y capas adyacentes (Fig. 19 B).

A los 17 di, la inmunolocalización de GPER1/GPR30 se observa en los cordones ovígeros de corteza y las células mesenquimatosas de la médula de los ovarios. En las células positivas para CK, como las del epitelio superficial y de las que recubren los espacios lacunares, no se observa marca para GPER1/GPR30 (Fig. 21 A).

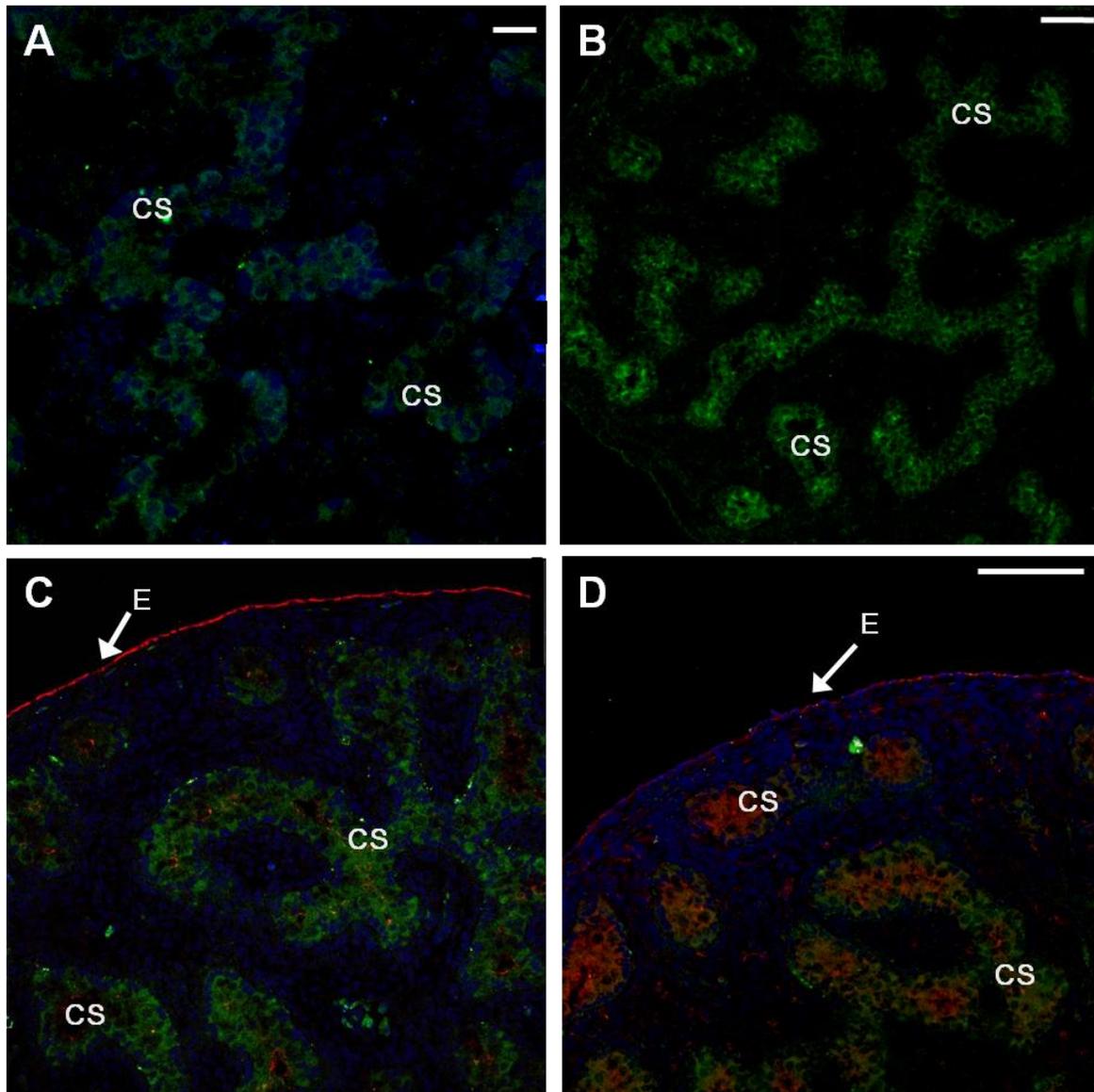


**Figura 21.** Inmunofluorescencia doble para GPER1/GPR30 y CK en ovario y testículo de embrión de pollo de 17 di. **A)** En verde se observa la marca de GPR30 en los cordones ovígeros de la corteza (C), en rojo se observa la marca de CK en el epitelio superficial (ES) y en las células de los espacios lacunares. **B)** En el testículo en los cordones seminíferos (CS) se expresa GPR30, mientras que CK en el epitelio superficial del testículo. Ambas muestras se marcaron con DAPI (azul) los núcleos.

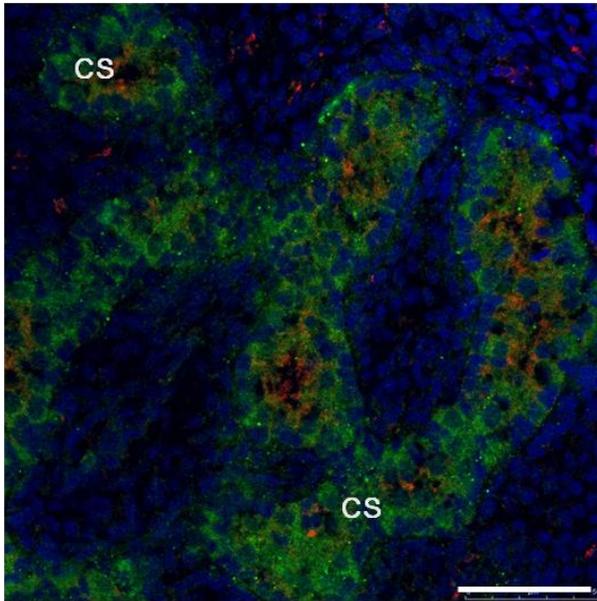


**Figura 22.** Inmunofluorescencia doble GPER1-AMH en testículo de 17 di. Los asteriscos señalan espermatogonias positivas a GPR30 (verde) con sus característicos núcleos grandes y redondos (azul). GPR30 colocalización con AMH (rojo) que es característico de las células de Sertoli, por lo que la suma de ambas marcas se observa en color naranja.

En el testículo de 17 y 21 di la expresión de GPER1/GPR30 se restringe a los cordones seminíferos localizados en la región medular (Fig. 21 B, 22, 23). En estas edades, los cordones seminíferos están formados por células de Sertoli y espermatogonias. En el testículo de 17 y 21 di se observa la colocalización de AMH y GPER1/GPR30 en el citoplasma de las células de Sertoli, mientras que en las espermatogonias (células con núcleos redondos) se observa únicamente la expresión de GPER1/ GPR30 (Fig. 22 y 23).

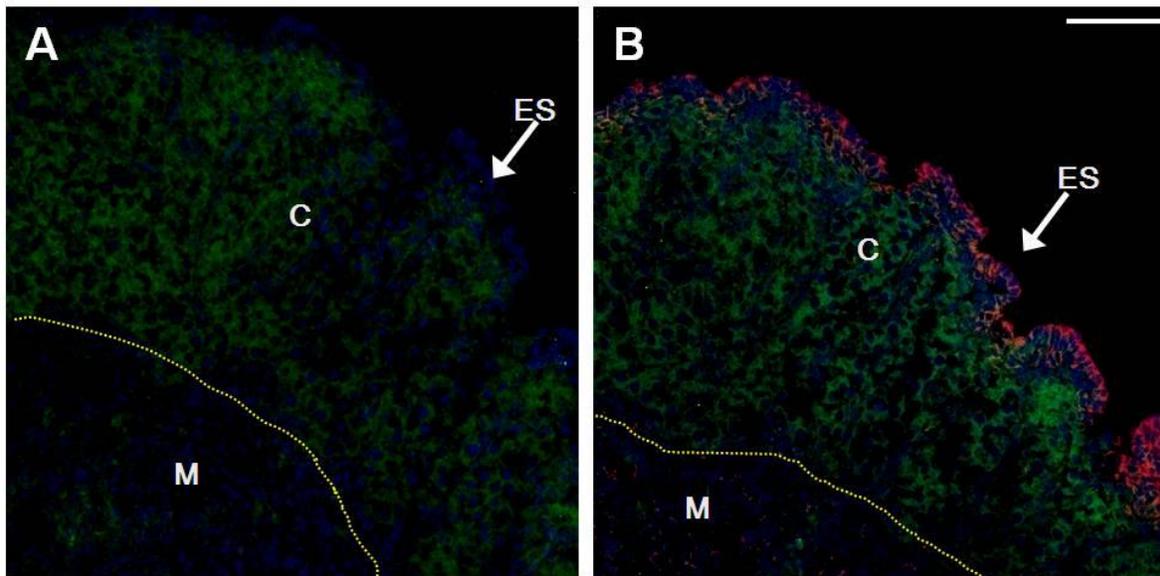


**Figura 23.** Inmunofluorescencia para GPER1/GPR30 y hormona antimülleriana en el testículo de embrión de pollo de 21 di. **A)** La localización de GPR30 (verde) se restringe a las células intra-cordonaes. Los núcleos están marcados en azul. **B)** Se observa un claro marcaje para AMH en el interior de los cordones seminíferos. **C)** La expresión de GPR30 se observa en los cordones seminíferos, mientras que CK (rojo) se ubica únicamente en el epitelio superficial, los núcleos se marcaron con DAPI (azul). **D)** La expresión de GPER1/GPR30 y de AMH (rojo) se restringe a los cordones seminíferos. En algunas zonas se observa la colocalización de GPR30 con AMH (naranja).



**Figura 24.** Inmunofluorescencia doble GPER1-AMH en testículo de 21 di.

En el ovario de 21 di la expresión de GPER1/GPR30 es detectada en la corteza, que es mucho más gruesa con respecto a los días 15 y 17 di (Fig. 19 y 21 A); mientras que en la zona del epitelio superficial donde se detecta la expresión de CK la marca de GPER1/GPR30 es negativa al contrario de lo observado a los 9 y 10 di (Fig. 25).



**Figura 25.** Inmunofluorescencia doble de GPER1/GPR30 y citoqueratinas en ovario de embrión de pollo de 21 di. **A)** Inmunolocalización de GPR30 (verde) en la corteza (C) del ovario, y en la médula (M) pero con un menor número de células positivas con respecto a las observadas en la corteza, los núcleos se marcaron con DAPI (azul). **B)** Expresión de GPR30 en los cordones ovígeros y de CK (rojo) en el epitelio superficial (ES).

---

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### El embrión de pollo como modelo de estudio

El embrión de pollo es una herramienta importante en la biología del desarrollo; debido a su accesibilidad, nos permite su manipulación *in vivo* y nos ofrece grandes ventajas para procedimientos relativamente rápidos y fáciles con una alta precisión de manera espacio-temporal, lo cual es muy difícil de lograr en modelos con mamíferos (Mozdziak et al., 2004). El embrión de pollo es de fácil manejo, se pueden controlar los estadios de su desarrollo, su manejo es individual, es de bajo costo, es un sistema cerrado por lo que no hay intervención de hormonas esteroides placentarias. La gónada de pollo presenta esteroidogénesis temprana, y a los 14 di ya está integrado el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en ambos sexos por lo que el aporte de gonadotropinas hipofisarias está presente en el embrión (Woods et al., 1981). Además, se ha demostrado que las gónadas del embrión de pollo llevan a cabo esteroidogénesis temprana (Galli y Wassermann, 1973). La secreción de testosterona y E<sub>2</sub> en las gónadas de embrión de pollo es detectada *in vitro* desde los 7 di mientras que en plasma se detecta a los 8 di, e incrementa gradualmente hasta el momento del nacimiento en donde bajan las concentraciones de ambas hormonas (Galli y Wassermann, 1973; Tanabe et al., 1986). Por lo que con base en ésta información se decidió emplear como modelo de estudio al embrión de pollo.

### Metodología utilizada

En este trabajo se empleo la técnica de RT-PCR para determinar la presencia del RNAm de GPER1/GPR30, para lo cual se empleó como gen endógeno  $\beta$ -actina que permite garantizar la presencia de la muestra en cada tubo, además en cada corrida se introdujo un control negativo, el cual carecía de cDNA para asegurar que no existiera alguna contaminación en los reactivos. Además se realizaron reacciones de PCR empleando el RNA extraído para verificar que no hubiera contaminación de DNA genómico.



---

En la técnica de inmunofluorescencia, pese a que no se empleó el péptido bloqueador para corroborar que la señal observada era debida a la presencia de GPER1/GPR30 y no a una unión inespecífica, en cada experimento se elaboraron simultáneamente controles negativos en los cuales se utilizaron únicamente los anticuerpos secundarios correspondientes para cada inmunodetección. Los cortes semifinos nos permitieron correlacionar la expresión de GPER1/GPR30 con la histogénesis gonadal.

### GPER1/GPR30 en la función gonadal

En este trabajo se hace una descripción espacio-temporal de la proteína GPER1/GPR30 durante la histogénesis del ovario izquierdo y del testículo del embrión de pollo. El interés por estudiar la presencia del RNA mensajero y la localización de esta proteína durante el desarrollo gonadal surge de los trabajos de Filardo y cols. (2000); Thomas y cols. (2005); Prossnitz y cols. (2007), entre otros, que muestran que GPER1/GPR30 actúa como un receptor transmembranal que presenta una alta selectividad para estradiol y baja para estrona y estriol (Thomas et al. 2005).

Es ampliamente aceptado que los estrógenos actúan a través de sus receptores nucleares el ER $\alpha$  y el ER $\beta$  que son factores de transcripción inducidos por ligando que actúan a través de elementos de respuesta a estrógenos presentes en el DNA. Sin embargo no todos los efectos que produce el estradiol se explican por vía genómica; también se han descrito efectos rápidos que no implican transcripción génica directa por estas hormonas. Algunos autores proponen que GPER1/GPR30 podría estar involucrada en la señalización no genómica del 17 $\beta$ -estradiol. Los estudios de Carmeci y cols. (1997) muestran una correlación positiva entre la expresión de GPR30 y ER $\alpha$  en líneas celulares, en tejidos normales y neoplásicos, sugiriendo una asociación entre ambas proteínas en tejidos que responden a estradiol.



---

Las hormonas esteroideas participan en el desarrollo gonadal de los vertebrados, lo que es especialmente importante para el caso de las aves. El 17- $\beta$  estradiol se ha detectado desde antes de la diferenciación gonadal (6.5 di) y se continúa produciendo tanto en ovario izquierdo como en el testículo durante todo el desarrollo “*in ovo*” (Tanabe et al., 1986).

Histológicamente el ovario tiene tres compartimientos celulares, el epitelio superficial, la corteza y la médula ovárica. La contribución de este epitelio a la integración de la gónada a través de la formación de los cordones sexuales requiere de la división celular de este tejido. La marca fluorescente de la proteína GPER1/GPR30 en el ovario izquierdo de embriones de pollo de 9, 10 y 11 di se restringe al epitelio superficial y a las células somáticas y germinales que se están organizando para formar la corteza del ovario. La presencia de GPER1/GPR30 coincide con el alto índice de proliferación del epitelio superficial que se observa a los 9 di (Sánchez, 1995) y que es significativamente mayor que el de las células de los demás compartimientos histológicos del ovario. En los embriones de 9, 10 y 11 di, la corteza ovárica se compone principalmente de ovogonias rodeadas de algunas células somáticas provenientes de los cordones corticales. Conforme avanza el desarrollo, la corteza se hace más prominente, debido en gran parte a la proliferación de las ovogonias que junto con las células epiteliales forman los cordones ovígeros. La distribución de la marca de GPER1/GPR30 es abundante en el citoplasma de las células germinales que son el principal componente celular de los cordones ovígeros, como se observa en la comparación con los cortes semifinos del ovario a las mismas edades.

En el segundo periodo de incubación (de 15 a 21 di) se observa que la proteína de GPER1/GPR30 no se expresa mas en el epitelio superficial y sólo se observa dentro de los cordones ovígeros como se observa en inmunofluorescencia de ovarios de embriones de pollo de 15, 17 y 21 di. La mayor parte de estos cordones están formados por ovocitos primarios que iniciaron la meiosis I alrededor del día 15 de incubación. La marca permanece también en las células precursoras de



---

---

las células pregranulosas que comienzan a individualizar a los ovocitos primarios para protegerlos de la atresia e iniciar la formación de los folículos primordiales que constituirán la reserva folicular del ovario. Cabe mencionar que en esta etapa del desarrollo ovárico la población de células germinales está llevando a cabo simultáneamente tres procesos celulares básicos: la división mitótica de las ovogonias, el paso de ovogonias a ovocitos y la atresia de gran número de ovogonias y ovocitos primarios que disminuyen drásticamente la población de células germinales en la eclosión. Entre los eventos que favorecen el mantenimiento adecuado de los ovocitos está el medio ambiente estrógeno y las comunicaciones que se establecen entre este y las células prefoliculares que lo rodean. La secreción de estrógenos por el ovario izquierdo del embrión de pollo se ve favorecida por el establecimiento de eje hipotálamo hipófisis ovario desde el día 13 di (Brugerman et al., 2002) y tanto el ovocito primario como las células pregranulosas expresan el receptor a estrógenos alfa (Méndez et al., 1999) por lo que con estos hallazgos se refuerza la participación de los estrógenos en el desarrollo del ovario y su posible papel en el mantenimiento de la reserva folicular como se ha descrito en el ovario fetal de baboon deprivado de estrógenos (Pepe et al., 2006).

En el compartimento medular del ovario la marca fluorescente de GPER1/GPR30 es negativa aún cuando en los ovarios de animales más grandes parece notarse alguna señal, esta parece encontrarse en los eritrocitos que tienen autofluorescencia.

El papel de los estrógenos en el aparato reproductor femenino es ampliamente conocido, sin embargo su papel en el aparato reproductor masculino ha sido poco estudiado, hasta el momento se sabe que los estrógenos son reguladores potenciales de la espermatogénesis, incluido el humano (O'Donnell et al., 2001). Sin embargo, el mecanismo por el cual los estrógenos regulan la espermatogénesis aún no es conocida. El descubrimiento del receptor transmembranal a estrógenos despertó el interés por estudiar el papel de los estrógenos en la función testicular, Isensee y cols. (2009) demostraron que GPER1/GPR30 se expresa en tejidos

---

---

endocrinos incluido el testículo. Mientras que Siriane y cols. (2008) demostraron que GPER1/GPR30 se expresa en una línea celular de espermatogonias de ratón y la función de este receptor es controlar la proliferación de estas células en respuesta al estradiol. Chimento y cols. (2010) demuestran que los espermatozoides de rata tienen la capacidad de inducir apoptosis en respuesta a los estrógenos a través de activar la vía de señalización de GPER1/GPR30. Por lo que GPER1/GPR30 podría tener un papel dual ya sea induciendo la apoptosis o la proliferación de células germinales. Siendo así que el papel de GPER1/GPR30 en la función testicular aún no es claro.

En los mamíferos mientras las células germinales del ovario fetal inician la meiosis I, las células germinales del testículo se mantienen en arresto mitótico hasta la pubertad. Nuestros resultados demuestran que GPER1/GPR30 se expresa en las células de Sertoli y en las células germinales del testículo de pollo durante el periodo de 15 – 21 días que abarcaría el periodo de arresto mitótico de las células germinales del testículo fetal, si este proceso ocurre al igual que en mamíferos. Hasta el momento no existen trabajos que demuestren el arresto mitótico de las células germinales en el testículo fetal de pollo por lo que es importante realizar experimentos que nos permitan determinar el papel de GPR30 en las células germinales del testículo del embrión de pollo y considerar si GPER1/GPR30 podría también estar involucrado en la inducción del arresto mitótico de las células germinales de manera directa o a través de la inducción de las células de Sertoli.

El presente trabajo, no permite dilucidar con precisión si GPER1/GPR30 se expresa únicamente en las células germinales del ovario fetal, o bien también en las células pre-granulosa, por lo que es necesario purificar las diferentes subpoblaciones celulares del ovario fetal y dilucidar con claridad los tipos celulares en los que se expresa GPR30.

Este trabajo aporta la primera descripción espacio-temporal de GPER1/GPR30 durante la histogénesis de ovarios y testículos del embrión de pollo. Sin embargo, aún queda por dilucidar el papel de GPER1/GPR30 en la diferenciación



---

de las células germinales. Así mismo, es importante determinar si el papel de GPER1/GPR30 en la maduración de los ovocitos se encuentra conservado en los ovarios de pollo como sucede en teleósteos y hámster.



---

---

## CONCLUSIONES

1. Durante los 9 – 10 di de la expresión de GPER1/GPR30 se observa en las células epiteliales provenientes del epitelio celómico del ovario.
2. Durante el periodo de inicio y arresto meiótico (15 – 21dpc) la expresión de GPER1/GPR30 se observa principalmente en los ovocitos del ovario.
3. GPER1/GPR30 se expresa en las células de Sertoli y espermatogonias del testículo de embrión de pollo en todas las edades estudiadas.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Albertini, D., Carabatsos, M. Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J. Mol. Med.* 1998. 76. 795 – 799.
2. Albertini, D., Combelles, C., Benecchi, E., Carabatsos, M. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* 2001. 121. 647 – 653.
3. Aronica, S., Kraus, W., Katzenellenbogen, B. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. 91. 8517 – 8521.
4. Balthazart, J., Cornil, C., Charlier, T., Taziaux, M., Ball, G. Estradiol, a key endocrine signal in the sexual differentiation and activation of reproductive behavior in quail. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 2009. 311. 323 – 345.
5. Berek, J. *Ginecología de Novak.* Ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 14<sup>a</sup> ed. España. 2008. p. 111.
6. Bullejos, M. and Koopman, P. Spatially dynamic expression Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn.* 2001 221:201-205.
7. Callebaut, M. The avian ovary is an open organ. A study of the lacunar system. *Anat. Embryol.* 1979. 158. 103 – 119.
8. Carmeci, C., Thompson, D., Ring, H., Francke, U., Weigel, R. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997. 45. 607 – 617.
9. Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Ando, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V. 17 $\beta$ -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010. 320. 136 – 144.
10. Clinton, M. Sex determination and gonadal development: A bird's eye view. *J. Exp. Zool.* 1998. 281. 457 – 465.



- 
11. Crosta, L., Gerlach, H., Bürkle, M., Timossi, L. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 2003. 6. 57 – 83.
  12. Díaz-Hernandez, V., Merchant, H. Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos. *Ciencia ergo sum.* 2008. 15. 287 – 296.
  13. Ellmann, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M., Strick, R., Strissel, P. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2009. 66. 2405 – 2426.
  14. Filardo, E., Quinn, J., Frackelton, A., Bland, K. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl ciclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 2002. 16. 70 – 84.
  15. Filardo, E., Thomas, P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that tiggers EGF release. *Treds. Endocrinol. Metab.* 2005. 16. 362 – 367.
  16. Filardo, E., Quinn, J., Bland, K., Frackelton, A Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 2000. 14. 1649 – 1660.
  17. Galli, F., Wassermann, G. Steroid biosynthesis by gonads of 7 – and 10 – day – old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1973. 21. 77 – 83.
  18. George, F., Wilson, J. Sex determination and differentiation. En: *The Physiology of Reproduction*. Edited Knobil, E., y Neill. Raven Press. New York. 1988. 3 – 23.
  19. Gondos, B. Oogonias and oocytes in mammals. En: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Edited Jones, R. Plenum Press. New York. 1978. 378.
  20. González, M., Guerra, C., Campos, M., Camacho, I. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature, and aged chickens. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2008. 35. 371 – 379.



- 
21. Greene, G., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J., Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986. 231. 1150 – 1154.
  22. Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. and Lovell-Badge. Expression of Sry the mouse sex determining gene in genital ridges. *Development* 1995. 121. 1603 – 1614.
  23. Hafez, E., Hafez., B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. McGraw-Hill. 7a ed. 2000.
  24. Hess, R., Bunick, D., Lee, K., Bahr, J., Taylor, J., Korach, K., Lubahn, D. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*. 1997. 390. 509 – 512.
  25. Hughes GC. The population of germ cells in the developing female chick. *J. Embryol. Exp Morph* 1963. 11. 513 – 536.
  26. Isensee, J., Meoli, L., Zazzu, V., Nabzdyk, C., Witt, H., Soewarto, D., Effertz, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Busch, D., Adler, T., de Angelis, M., Irgang, M., Otto, C., Noppinger, P. Expresión pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*. 2009. 150. 1722 – 1730.
  27. Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, et al. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development*. 2008. 135. 677 – 685.
  28. Jamnongjit, M., Hammes, S. Oocyte Maturation: The Coming of Age of a Germ Cell. *Semin Reprod Med*. 2005. 23. 234 – 224.
  29. Johnson, L. *Essential Medical Physiology*. Ed. Elsevier. 3ª ed. E. U. A. 2003
  30. Kuiper, G. Enmark, E., Peltö Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996. 93. 5925 – 5930.
  31. Kent, J., Wheatley, C.S., Andrews, E.J., Sinclair, H.A. y Koopman, P. A male-specific role for Sox9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996. 122. 2813 – 2822.
  32. Kidokoro, T., Matoba, S., Hiramatsu, R., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Taya, C., Kurohmaru, M., Kamakami, H., Hayashi, Y., Kanai, Y. and Yonekawa, H. Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by



- 
- ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev Biol* 2005. 278. 511 – 525.
33. Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991. 351. 117 – 121.
34. Maggiolini, M., Picard, D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.* 2010. 204. 105 – 114.
35. Méndez, M., Chávez, B., Echeverría, O., Vilchis, F., Vázquez Nin, G., Pedernera, E. Evidence for estrogen receptor expression in germ cell and somatic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Cell. Tissue. Res.* 1999. 298. 145 – 152.
36. Merchant, H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. *Dev Biol* 1975. 44. 1 – 21.
37. Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-Badge, R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet.* 1996. 14. 62 – 68.
38. Mozdziak, P., Petite, J. Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev. Dyn.* 2004. 229. 414 – 421.
39. O'Donnell, L., Robertson, K., Jones, M., Simpson, E. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 2001. 22. 289 – 318.
40. Oktem, O., Oktay, K. The Ovary. *Anatomy and Function throughout Human Life. Ann N Y Acad Sci* .2008, 1127, 1 – 9.
41. Otto, C. Rohde-Schulz, B., Schwarz, G., Fuchs, I., Klewer, M., Brittain, D., Langer, G., Bader, B., Prella, K., Nubbemeyer, R., Fritzemeier, K. G Protein-coupled receptor 30 localizes to endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology.* 2008. 149. 4846 – 4856.
42. Pang, Y., Dong, J., Thomas, P. Estrogen signaling characteristics of Atlantic Croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of Oocyte meiotic arrest. *Endocrinology.* 2008. 149. 3410 – 3426.



- 
43. Pang, Y., Thomas, P. Involvement of estradiol-17 $\beta$  and its membrane receptor, G protein coupled receptor 30 (GPR30) in regulation of oocyte maturation in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009. 161. 58 – 61.
  44. Pang, Y., Thomas, P. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish. *Dev. Biol.* 2010. 342. 194 – 206.
  45. Pepe, G., Billiar, R., Albrecht, E. Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006. 247. 41 – 46.
  46. Polanco, J., Koopman, P. *Sry* and the hesitant beginnings of male development. *Dev. Biol.* 2007. 302. 13 – 24.
  47. Pollock, C., Orosz, S. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 2002. 5. 441 – 474.
  48. Prossnitz, E., Maggiolini, M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009. 308. 32 – 38.
  49. Prossnitz, E., Oprea, T., Sklar, L., Arterburn, J. The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008. 109. 350 – 353.
  50. Prossnitz, E., Arterburn, J., Smith, H., Oprea, T., Sklar, L., Hathaway, H. Estrogen Signaling Through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.* 2008. 70. 165 – 190.
  51. Prossnitz, E., Arterburn, J., Sklar, L. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007. 138 – 142.
  52. Rodriguez-Leon J, Rodriguez Esteban C, Marti M, Santiago-Josefat B, Dubova I, Rubiralta, X., Izpisua Belmonte, J. Pitx2 regulates gonad morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. 105. 11242 – 11247.
  53. Rosenbaum, D., Rasmussen, S., Kobilka, B. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2009. 459. 356 – 363.
  54. Sánchez, M. Ontogenia de la expresión del ARNm a aromatasa P-450 en las gonadas embrionarias del pollo. 1995. Facultad de Ciencias. UNAM.
  55. Sirianni, R., Chimento, A., Ruffiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Maggiolini, M., Pezzi, V. The novel estrógeno receptor, G Protein-Coupled

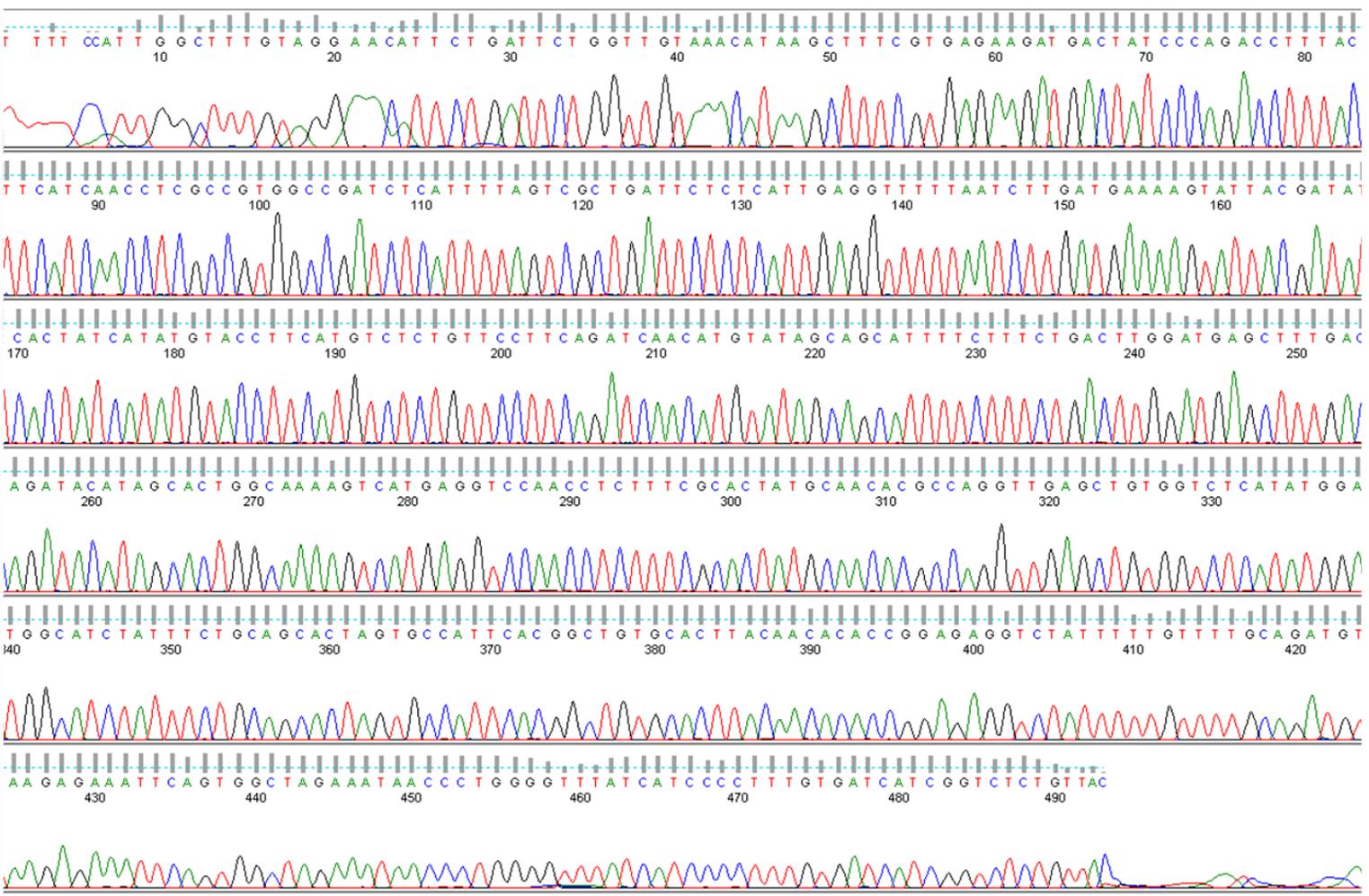


- 
- Receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 $\beta$ -Estradiol on Mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinol.* 2008. 149. 5043 – 5051.
56. Smith, C., Andrews, J., Sinclair, A. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1997. 60. 295 – 302.
57. Smith, C., Roeszler, K., Bowles, J., Koopman, P., Sinclair, A. Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. *BMC Dev. Biol.* 2008. 8. 85
58. Smith, C., Roeszler, K., Hudson, Q., Sinclair, A. Avian Sex Determination: What, When and Where? *Cytogenet. Genome. Res.* 2007. 117. 165 – 173.
59. Sekido, R. and Lovell-Badge, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008. 12. 930 – 934.
60. Tanabe, Y., Saito, N., Nakamura, T. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*) *Gen. Comp. Endocrinol.* 1986. 63. 456 – 463.
61. Thomas, P., Alyea, R., Pang, Y., Peyton, C., Dong, J., Berg, A. Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids.* 2010. 595 – 602.
62. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E., Dong, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cell. *Endocrinology.* 2005. 146. 624 – 632.
63. Villalpando, I., Sánchez-Bringas, G., Sánchez-Vargas, I., Pedernera, E., Villafán-Monroy, H. The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2000. 117. 325 – 334
64. Wang, C., Prossnitz, E., Roy, S. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones. *Endocrinology.* 2007. 148. 4853 – 4864.
65. Wang, C., Prossnitz, E., Roy, S. G Protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary. *Endocrinology.* 2008. 149. 4452 – 4461.

- 
66. Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson MJ, Combes AN, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H, Koopman P. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 2005. 287. 111 – 124.
67. Wilhelm, D. and Englert, C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes. Dev.* 2002.16. 1839 – 1851.
68. Woods, J., Mennella, J., Thommes, R. The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. I. LH sensitivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1981. 45. 66 – 73.
69. Yen, S., Jaffe, R., Barbieri, R. *Endocrinología en la reproducción.* Ed. Panamericana. 4<sup>a</sup> ed. Buenos Aires, Argentina. 2001.
70. Zachos, N., Billiar, R., Albrecht, E., Pepe, G. Developmental regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger RNA expression in the baboon fetal ovary. *Biol. Reprod.* 2003. 68. 1911 – 1917.

## APENDICE 1

Electroferograma de secuenciación del amplicón GPER1 de pollo.



---

## APENDICE 2

### Alineamiento del amplicón GPER1 en BLAST

GENE ID: 416457 GPER | G protein-coupled estrogen receptor 1 [Gallus gallus]

Score = 917 bits (496), Expect = 0.0  
Identities = 496/496 (100%), Gaps = 0/496 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      TTTTCCCATTTGGCTTTGTAGGAAACATTCTGATTCTGGTTGTAAACATAAGCTTTCGTGA 60
            |||
Sbjct 631    TTTTCCCATTTGGCTTTGTAGGAAACATTCTGATTCTGGTTGTAAACATAAGCTTTCGTGA 690

Query 61     GAAGATGACTATCCCAGACCTTTACTTCATCAACCTCGCCGTGGCCGATCTCATTTTAGT 120
            |||
Sbjct 691    GAAGATGACTATCCCAGACCTTTACTTCATCAACCTCGCCGTGGCCGATCTCATTTTAGT 750

Query 121    CGCTGATTCTCTCATTGAGGTTTTTAATCTTGATGAAAAGTATTACGATATCACTATCAT 180
            |||
Sbjct 751    CGCTGATTCTCTCATTGAGGTTTTTAATCTTGATGAAAAGTATTACGATATCACTATCAT 810

Query 181    ATGTACCTTCATGTCTCTGTTCCCTTCAGATCAACATGTATAGCAGCATTTCCTTTCTGAC 240
            |||
Sbjct 811    ATGTACCTTCATGTCTCTGTTCCCTTCAGATCAACATGTATAGCAGCATTTCCTTTCTGAC 870

Query 241    TTGGATGAGCTTTGACAGATACATAGCACTGGCAAAAGTCATGAGGTCCAACCTCTTTCG 300
            |||
Sbjct 871    TTGGATGAGCTTTGACAGATACATAGCACTGGCAAAAGTCATGAGGTCCAACCTCTTTCG 930

Query 301    CACTATGCAACACGCCAGGTTGAGCTGTGGTCTCATATGGATGGCATCTATTTCTGCAGC 360
            |||
Sbjct 931    CACTATGCAACACGCCAGGTTGAGCTGTGGTCTCATATGGATGGCATCTATTTCTGCAGC 990

Query 361    ACTAGTGCCATTCACGGCTGTGCACTTACAACACACCGGAGAGGTCTATTTTGTGTTTGC 420
            |||
Sbjct 991    ACTAGTGCCATTCACGGCTGTGCACTTACAACACACCGGAGAGGTCTATTTTGTGTTTGC 1050

Query 421    AGATGTAAGAGAAATTCAGTGGCTAGAAATAACCCTGGGGTTTATCATCCCCTTTGTGAT 480
            |||
Sbjct 1051   AGATGTAAGAGAAATTCAGTGGCTAGAAATAACCCTGGGGTTTATCATCCCCTTTGTGAT 1110

Query 481    CATCGGTCTCTGTTAC 496
            |||
Sbjct 1111   CATCGGTCTCTGTTAC 1126
```

La secuencia obtenida por PCR de GPR30 de ovarios de 17 di fue alineada con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) la secuencia muestra un 100% de homología con la secuencia de GPER1 *Gallus gallus*.

