

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Subárea: Ciencias Fisiológicas
PEDECIBA

“Caracterización de los patrones de expresión de *foxl3* y su regulación por andrógenos durante el período de diferenciación del sexo en el esturión siberiano *Acipenser baerii*.”

Estudiante: Lic. Santiago Daniel Di Landro Francis



Orientadora: Dra. Denise Vizziano-Cantonnet

Laboratorio de trabajo: Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces. Facultad de Ciencias. UdelaR.

2019

Trabajos en los cuales se participó como co-autor y que se relacionan con esta tesis por ser antecedentes para ella:

Vizziano-Cantonnet D, **Di Landro S**, Lasalle A, Martínez A, Mazzoni TS, Quagio-Grassiotto I. Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular reproduction and development*. 2016 Jan;83(1):19-36.

Vizziano-Cantonnet D, **Di Landro S**, Lasalle A. Sex Determination and Differentiation of the Siberian Sturgeon. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology* 2018 (pp. 93-113). Springer, Cham.

Vizziano-Cantonnet D, Lasalle A, **Di Landro S**, Klopp C, Genthon C. *De novo* transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and comparative endocrinology*. 2018 Nov 1; 268:96-109.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Denise Vizziano quien en el año 2012 me ha recibido en su laboratorio y junto a la cual he transitado el camino de la Licenciatura y Maestría, enseñándome a investigar un tema tan apasionante como lo es la determinación y diferenciación del sexo en peces. También agradecer a André Lasalle quien posteriormente se ha incorporado al laboratorio FREP, compartiendo juntos horas de trabajo y dedicación. En segundo lugar, al PEDECIBA y al conjunto de docentes que han dictado los distintos cursos que he tomado. En tercer lugar, pero no menos importante al laboratorio de Biología Molecular de Facultad de Ciencias, particularmente a la Dra. Estela Castillo por recibirme y al Dr. Uriel Koziol y al Lic. Matías Preza por orientarme en la pasantía desarrollada en el marco del PEDECIBA. Al Dr. Walter Norbis por su asesoramiento en la parte estadística, a la Dra. Gabriela Bedó por su asistencia en técnicas de biología molecular cuando se le consultó. Agradezco a la ANII por el sustento económico a través de la beca de Maestría y a todos los que me apoyaron desde lo emocional o facilitaron su ayuda y conocimiento técnico. Agradezco también a la empresa Estuario del Plata, especialmente al Dr. Vet Andrés Rynkowski y al Sr. Eduardo Olivera por facilitarnos ejemplares de esturión Siberiano para desarrollar esta tesis.

Indice

Resumen.....	5
I.- Introducción	6
I.1.- Determinación y diferenciación del sexo en peces.....	7
I.2.- Determinación y diferenciación del sexo en esturiones	9
Hipótesis de trabajo:	13
Objetivo general de la propuesta:	13
Objetivos específicos de la propuesta:.....	13
II.- Materiales y Métodos	14
II.1- Muestreos biológicos	14
Desarrollo gonadal	14
.....	15
II.2- Animales experimentales	15
II.3- Procesamiento de material biológico para cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa.	16
II.3.1- Extracción de ARN	16
II.4- Cuantificación de la expresión de genes de estudio mediante PCR cuantitativa	19
II.4.1 Puesta a punto de la reacción	19
II.4.2 Metodología empleada para la cuantificación de la expresión génica.	20
II.5- Ensayos de regulación <i>in vivo</i> de la expresión génica de <i>foxl3</i> por el andrógeno 11KT...21	
II.6- Hibridaciones <i>in toto</i>	23
II.6.1 Diseño de cebadores para síntesis de molde de sonda	23
II.6.2 Síntesis de sonda marcada	25
II.6.3 Selección del material biológico	26
II:7. Filogenias <i>Foxl3</i> y <i>Cyp11c</i>	27
II.8- Análisis estadístico de datos de la expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> durante el desarrollo gonadal.....	28
II.8.1 Para establecer si hay diferencias significativas en los niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> durante los diferentes estadios de desarrollo analizados	28
II.8.2 Análisis de agrupamiento.....	28
II.8.3 Análisis estadístico de datos de expresión génica obtenidos del ensayo de regulación por 11KT.	29
III.- Resultados.....	29
III.1- Caracterización mediante filogenia de <i>foxl3</i> y de <i>cyp11c</i>	29
III.2- Cambios en la expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i> durante el período indiferenciado	31

III.3- Niveles de expresión individual de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i> durante el desarrollo.....	33
III.4- Análisis de agrupamiento	34
III.5- Comparación entre niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i> entre los grupos establecidos el análisis de agrupamiento.....	35
III.6- Efecto del tratamiento in vivo con 11KT sobre la expresión de <i>foxl3</i>	36
Tratamiento 1. AGUDO. Una sola inyección de 10µg/g de pez. 6 horas	36
Tratamiento 2. AGUDO, inyecciones de 11KT de 5 µg/g y 10 µg/g – 24 horas	37
Tratamiento 3. CRONICO. Inyecciones diarias. Dosis total: 10µg/g. 6 días	37
III.7- Niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i> durante la gametogénesis temprana	37
III.8- Comparación entre niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i> entre testículos inmaduros y ovarios inmaduros (pre-vitelogénicos)	38
IV.- Discusión.....	39
IV.1- Potencialidad de producción temprana de andrógenos.....	40
IV.2- <i>foxl3</i> durante el desarrollo gonadal.....	41
IV.3- <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i> durante la gametogénesis temprana	44
V.- Conclusiones	46
VI.- Bibliografía consultada.....	47
Anexo I Resultados estadísticos	52
Niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> en gónadas de individuos indiferenciados de 3, 4, 5 y 6 meses de edad.....	52
Niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> durante diferentes estadíos de desarrollo posteriores a la diferenciación morfológica del sexo.	53
Comparativa expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> entre ovocito previtelogénico y testículo inmaduro.	55
Validación mediante análisis discriminante de los grupos formados por clustering a partir de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> para 3, 4, 5 y 6 meses de edad.	56
Comparación niveles de expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c1</i> entre grupos formados por clustering a partir de expresión para 3, 4, 5 y 6 meses de edad.	57
Ensayos de regulación hormonal.....	59
Ensayo de regulación hormonal de <i>foxl3</i> por 11-KT	59
Ensayo de regulación hormonal de <i>foxl2</i> por 11-KT	60
Anexo II Figuras suplementarias.....	62
Estructura de cajas qPCR plataforma ABI 7500.	62
- Búsqueda de la localización celular de la expresión de <i>foxl3</i> y <i>cyp11c</i>	62

Resumen

El *foxl3* está involucrado en la regulación del proceso de diferenciación sexual de los peces y su deleción y/o represión por el tratamiento con andrógenos resulta en una masculinización fenotípica. En el esturión Siberiano el mecanismo de masculinización es desconocido. La hipótesis del presente trabajo propone que la represión del *foxl3* por andrógenos 11-oxygenados (los principales de los peces) podría ser un camino de inducción de la vía masculina. La diferenciación molecular del sexo en el que precede la diferenciación morfológica del sexo ocurre entre los 3 y 6 meses de edad. Para verificar nuestra hipótesis se estudió la expresión de *foxl3* (caracterizada a nivel filogenético) y del *cyp11c* (involucrados en la producción de los andrógenos 11-oxygenados) durante el período de indiferenciación sexual usando 30 peces de 3, 4, 5 y 6 meses de edad. Además, se aplicaron inyecciones de 11-ketotestosterona (11KT) en peces indiferenciados sexualmente de 4 meses de edad con el fin de estudiar su efecto sobre la expresión gonadal de *foxl3*.

El análisis de la expresión del *foxl3* y del *cyp11c* durante el período indiferenciado permitió obtener para cada edad, dos grupos de peces (coeficiente de correlación co-fenética =1). Sólo se observaron diferencias significativas entre grupos a los 3 y 5 meses de edad con una activación significativa del *foxl3* en uno de los grupos sugiriendo un potencial camino femenino. Respecto del *cyp11c*, el mismo fue activado en uno de los dos grupos a los 3, 5 y 6 meses, y se mantuvo reprimido en el otro grupo. A los 3 y a los 5 meses, el *foxl3* mostró un patrón opuesto de expresión al *cyp11c* sugiriendo que una alta producción de andrógenos puede reprimir al *foxl3*, y que los animales con *foxl3* altos podrían corresponder a futuras hembras, mientras que aquellos con niveles altos de *cyp11c* podrían corresponder a futuros machos. Sin embargo, los andrógenos no regularon el *foxl3* después de los tratamientos *in vivo* en las condiciones experimentales utilizadas. Dado que las hibridaciones *in situ* fueron muy preliminares, no se pudo confirmar la localización celular del *foxl3* esperada en las células germinales, ni la del *cyp11c* esperada en las células somáticas esteroideogénicas.

Es interesante destacar que los animales en gametogénesis, que inicialmente fueron utilizados como referencia de expresión de *foxl3* y *cyp11c*, sirvieron para identificar un potencial rol femenino del *foxl3* en etapas tempranas de la gametogénesis, ya que hubo un dimorfismo sexual con mayor expresión ($p < 0,05$) en los ovarios inmaduros respecto de los testículos inmaduros.

La identificación de un marcador del sexo, es decir de un gen que sea diferente en los genomas masculino y femenino ayudaría a resolver si los animales con elevados niveles de *foxl3* corresponden a hembras, y si aquellos con niveles reprimidos de *foxl3* y niveles activados de *cyp11c* corresponden a futuros machos. A su vez nuevas concentraciones, tiempos y formas de aplicación de los andrógenos podrían revelar el efecto represivo de los mismos sobre el *foxl3*, como se ha visto en peces ciertos peces teleósteos.

Palabras clave: esturión Siberiano, *Acipenser baerii*, diferenciación del sexo, gónada, *foxl3*, *cyp11c1*

I.- Introducción

En peces existen dos parálogos de la familia de genes fox involucrados en el desarrollo gonadal: el *forkhead box L2* (*foxl2*) y el *forkhead box L3* (*foxl3*) (Crespo et al., 2013). En un trabajo realizado comparando los peces teleósteos actuales con peces antiguos se demostró que la aparición de los dos parálogos (*foxl2* y *foxl3*) ocurrió antes de la duplicación completa del genoma que ocurrió en la base de los teleósteos llamada 3R (Geraldo et al., 2013). Siendo el esturión Siberiano un Actinoptergio no-teléosteo muy antiguo que apareció previamente a los teleósteos y a la 3R el Laboratorio se propuso identificar si había dos parálogos presentes en las gónadas como se había descrito en peces antiguos (Geraldo et al., 2013). Para ello se realizó un estudio filogenético de las secuencias proteicas de *foxl2* y *foxl3* de tetrápodos y peces en cooperación con colegas de Francia, para poder iniciar esta tesis con la certeza de

utilizar la secuencia génica correcta. Respecto del *cyp11c*, en el contexto de esta tesis se validó su identidad realizando una filogenia en la que se incluyen tanto peces teleósteos como peces antiguos.

I.1.- Determinación y diferenciación del sexo en peces

Los peces presentan una gran variedad de estrategias reproductivas, incluido los mecanismos subyacentes a la determinación y expresión de su sexualidad (Devlin et al., 2002; Kobayashi et al., 2013; Heule et al., 2014). Dentro de esta diversidad se han descrito y demostrado los mecanismos de determinación del sexo para varias especies de teleósteos, encontrándose sistemas de determinación ambiental (Conover et al., 1986; Römer et al., 1996; Hobbs et al., 2004), diferentes modalidades de determinación genética del sexo (Matsuda et al., 2002; Kamiya et al., 2012; Liew et al., 2012; Cui et al., 2017) y combinación de ambos (Jean-François Baroiller et al., 2009; Navarro-Martín et al., 2011; Y. Yamamoto et al., 2014; Dai et al., 2015). En cuanto al proceso de diferenciación de la gónada, una vez determinado el sexo una cascada de eventos moleculares masculiniza o feminiza la gónada (Brennan et al., 2004). Los estudios realizados muestran que muchos genes que subyacen a dicho proceso se encuentran conservados en vertebrados en general (Piferrer et al., 2008; Herpin et al., 2011b, 2011a, 2011c; Cutting et al., 2013) y que los estrógenos juegan un papel fundamental en la diferenciación del ovario (J-F Baroiller et al., 1999; Piferrer et al., 2008; Guiguen et al., 2010). Los andrógenos sin embargo, no se consideran los reguladores universales de la diferenciación masculina de peces ya que si bien son los principales masculinizantes en tratamientos de reversión del sexo de hembras genéticas (T. O. Yamamoto et al., 1968; Nagy et al., 1981; Baker et al., 1988; Piferrer et al., 1989; Feist et al., 1995; Pandian et al., 1995; J-F Baroiller et al., 1999) su producción natural previo a la diferenciación sexual no ocurre en todos los peces estudiados (Nakamura et al., 1998a; Liu et al., 2000; Vizziano et al., 2007a; Ijiri et al., 2008b; Blasco et al., 2013). Un aspecto clave del proceso de diferenciación que no está bien dilucidado

en vertebrados en general, es de qué manera la línea germinal que compone la gónada adopta un destino sexual. En todos los vertebrados las células germinales primordiales migran a través de los tejidos del embrión y colonizan las crestas genitales (Nieuwkoop et al., 1979). Una vez que ingresan a la gónada, las células germinales se multiplican (Godin et al., 1990; Nakamura et al., 1998b; Ohmura et al., 2004). Si bien hay evidencia clara de que el destino sexual de dichas células está determinado por las células somáticas gonadales del entorno (Hacker et al., 1995; Adams et al., 2002; Shinomiya et al., 2003; Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010; Wong et al., 2011; Goto et al., 2012), se desconocen cuáles son las señales determinantes que llevan a la célula germinal a adoptar un destino sexual (Tanaka, 2016). En mamíferos la entrada rápida en meiosis se reconoce como una señal de determinación femenina de la célula germinal (Adams et al., 2002) y factores como el ácido retinoico y nanos2 que promueven o reprimen la entrada en meiosis respectivamente estarían involucrados en el destino sexual adoptado (Bowles et al., 2007; Barrios et al., 2010; Jorgensen et al., 2014; Kato et al., 2016). En peces el dimorfismo sexual en la proliferación de las células germinales ha sido descrito en varias especies, encontrándose al igual que en mamíferos la entrada rápida en meiosis como característica de la vía femenina de la célula germinal (Nakamura et al., 1998b; Tanaka, 2016). En el pez medaka, donde la entrada rápida en meiosis caracteriza la vía femenina (Saito et al., 2007) se ha demostrado al *foxl3* como factor intrínseco de la célula germinal capaz de determinar su destino fenotípico dado que la delección del *foxl3* induce el desarrollo de la espermatogénesis (Nishimura et al., 2015a). Recientemente se comienza a desentrañar la vía corriente bajo de *foxl3* (Kikuchi et al., 2019), que lleva a la diferenciación de la célula germinal en ovogonia en un contexto somático femenino, es decir cuando *foxl3* no es inhibido pero se desconocen las señales corriente arriba (provenientes de las células somáticas) que inhiben su expresión desencadenando la diferenciación en espermatogonia (Nishimura et al., 2015a; Nishimura et al., 2016).

Los estudios de transdiferenciación inducida por andrógenos en trucha arcoíris muestran que para que una futura gónada femenina se transforme fenotípicamente en masculina se precisa reprimir genes femeninos por parte de los andrógenos, entre los cuales se encuentra *foxl3* (Vizziano et al., 2008). A esto se suma que el patrón de expresión natural del *foxl3* descrito en truchas y medaka muestra una represión durante el desarrollo temprano de los futuros machos y una estimulación marcada en las futuras hembras (Vizziano et al. 2007; Nishimura et al., 2015), coincidiendo dicha represión con el aumento de la enzima 11 β -hidroxilasa que convierte la androstenediona y la testosterona en andrógenos 11-oxygenados.

I.2.- Determinación y diferenciación del sexo en esturiones

El estudio de la determinación y diferenciación del sexo en los acipenseriformes, orden que involucra la familia Acipenseridae (esturiones) y Polyodontidae (peces espátula) surge principalmente de la necesidad del sector productivo de controlar el sexo de las cohortes de esturiones buscando mayor rédito económico en la producción de caviar (Wuertz et al., 2018). En la actualidad, las 25 especies de esturiones existentes (Familia Acipenseridae), están incluidas en la Lista Roja de especies en peligro de extinción y el comercio internacional de caviar está controlado por CITES (CITES Conf. 12.7 Rev. CoP13).

Los esturiones (Familia Acipenseridae), son especies gonocóricas (Rzepkowska, Ostaszewska, et al., 2014), sin dimorfismo sexual fiable (Hurvitz et al., 2007). Su sistema de determinación sexual no se conoce a ciencia cierta, pero se ha propuesto que presentan un sistema del tipo ZZ/ZW, donde cromosomas sexuales heterogaméticos determinan la hembra (Fopp-Bayat, 2010). Esto ha sido sugerido a partir de ginogénesis en donde se obtiene como resultado un cierto porcentaje de hembras (81%) y de machos (19%) (Fopp-Bayat, 2010) lo que permite descartar un sistema de determinación sexual del tipo XX/XY en donde la ginogénesis da como resultado un 100% de hembras.

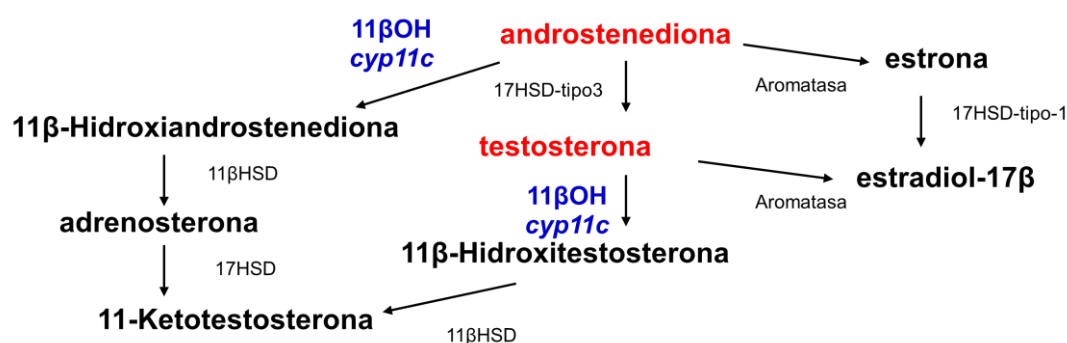
Independientemente que, la proporción de sexos obtenidos en la ginogénesis de especies con sistema de determinación ZZ/ZW es variable debido a que depende de la tasa de recombinación entre el elemento que determina el sexo y el centrómero durante la profase meiótica (Nace et al., 1970), de todas las experiencias de ginogénesis en esturión surgen machos, lo cual es consistente con un sistema de determinación ZZ/ZW (Van Eenennaam et al., 1999; Omoto et al., 2005; Flynn et al., 2006) aunque no elimina la posibilidad de que otros factores autosómicos o factores ambientales sean parte del sistema de determinación del sexo del esturión. Solamente un estudio formal puede aclarar este problema. Esto implicaría invertir el sexo y hacer cruzamientos para identificar el tipo de determinación.

Hasta el presente no se ha identificado el gen determinante del sexo en esturiones, pero se ha comenzado a estudiar los potenciales genes involucrados en la diferenciación sexual, es decir una vez que el gen determinante del sexo comenzó a actuar. Tampoco se han podido identificar marcadores sexo específico para ninguna especie de esturión (Wuertz et al., 2006; McCormick et al., 2008; Keyvanshokoo et al., 2010; Simide et al., 2018). Todo esto limita mucho el estudio de la diferenciación molecular del sexo, que ocurre en el período indiferenciado cuando aún no se pueden reconocer rasgos masculinos o femeninos en las gónadas a nivel morfológico. Lo que se ha estudiado bien y en distintas especies de esturiones es la diferenciación morfológica de la gónada (Chen et al., 2006; Flynn et al., 2007; Grandi et al., 2007; Rzepkowska & Ostaszewska, 2014), que es un elemento clave en el estudio de la diferenciación sexual, ya que permite marcar el inicio de la misma. Previo a la diferenciación morfológica, ocurre la diferenciación molecular del sexo caracterizado por la expresión temprana de genes de expresión dismórfica involucrados en la vía masculina y femenina de determinación (Vizziano et al., 2007a). Ampliamente documentado en peces teleósteos es la activación de los niveles de aromatasa y *foxl2* en las futuras gónadas femeninas durante la diferenciación molecular del sexo (revisiones de Baroiller et al., 1999; Piferrer et al. 2008; Guiguen et al., 2010).

El estudio de los factores que regulan la diferenciación sexual es uno de los grandes objetivos del Laboratorio FREP ya que el tema está poco comprendido en estas especies antiguas y de importancia comercial como el esturión. El *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) es la especie de esturión en que más se ha avanzado en estudios de diferenciación del sexo. En un primer momento se consideró que genes clásicos masculinos (*sox9*, *amh*) y femeninos (*foxl2*, *cyp19a1a*) caracterizaban las vías de diferenciación molecular del sexo, ubicando el inicio de este proceso a los 3 meses de edad (Vizziano-Cantonnet et al., 2016). Sin embargo, los estudios de transcriptómica no validaron al *sox9* y a la *amh* como buenos marcadores masculinos tempranos (Vizziano-Cantonnet et al., 2018a). A su vez, el estudio de transcriptómica agrega *hsd17b1* a los genes implicados en la vía femenina de diferenciación, que junto a *cyp19a1a*, *foxl2* evidencian que la expresión de genes relacionados con la síntesis de estrógenos aparece como fundamental en la vía femenina de los esturiones Siberianos (Vizziano-Cantonnet et al., 2018 a, b). El papel fundamental de los estrógenos y de los factores que los producen y regulan (*aromatasa*, *foxl2*) están más que consolidado en los peces teleósteos (T.-O. Yamamoto, 1969; Guiguen et al., 1999; Guiguen et al., 2010). Sin embargo, su papel regulador en peces antiguos como los esturiones comienza a ser desentrañado en los últimos tiempos (Vizziano-Cantonnet et al., 2016, 2018a).

Dada la expresión en gónadas indiferenciadas de los genes que codifican las enzimas implicadas en la producción de andrógenos 11-oxigenados (*cyp11a*, *cyp17a1*, *cyp17a2*, *hsd3b*, *cyp11c1*, *hsd17b3*, *hsd11b*, *srd5a2*) (Vizziano-Cantonnet et al., 2018a) así como antecedentes en *Acipenser transmontanus* donde un aumento en los niveles de testosterona y 17 β -estradiol luego de la eclosión (análisis cuerpo completo) sugieren una capacidad precoz de producción de esteroides sexuales durante las primeras etapas de desarrollo (Simontacchi et al., 2009) y en *Acipenser ruthenus* donde se han detectado células esteroideogénicas en la gónada indiferenciada (Fedorov et al., 1990), los andrógenos-11-oxigenados podrían ser producidos previo a la diferenciación sexual de los esturiones. Entre todos los genes involucrados en la

producción de andrógenos 11-oxigenados, elegimos estudiar los cambios en el gen que codifica para la 11 β -hidroxilasa (*cyp11c1*), debido a que es el primer paso en la síntesis de andrógenos 11-oxigenados a partir de andrógenos aromatizables. De hecho, la androstenediona se transforma en 11 β -androstenediona y la testosterona en 11 β -testosterona bajo la acción de la 11 β -hidroxilasa, para luego transformarse en 11-ketotestosterona (Esquema 1).



Esquema 1.- Ruta de síntesis de andrógenos 11-oxigenados a partir de andrógenos aromatizables (transformables en estrógenos por la enzima aromatasa). La enzima 11 β -hidroxilasa que transforma androstenediona y testosterona en andrógenos 11-oxigenados está señalada en azul como 11BOH y el gen que la codifica como *cyp11c*.

Los datos obtenidos del transcriptoma gonadal muestran que en el esturión Siberiano, el *foxl3* se expresa muy tempranamente en gónadas indiferenciadas de esturiones de 2,5 y 3 meses coincidiendo con el inicio del período de diferenciación del sexo y en momentos donde la *cyp11c* también es expresada (Vizziano-Cantonnet et al., 2018a). Esto alentó el estudio del *foxl3* y su potencial relación con el *cyp11c*.

La falta de un marcador del sexo, impide que podamos saber cuáles individuos indiferenciados de 3, 4, 5 y 6 meses considerados para realizar trabajo tomarán un camino de diferenciación femenino y cuáles tomarán un camino masculino. De allí que se decidió buscar si existía en primer lugar diferentes grupos de expresión en esas clases de edad, para luego verificar si el *foxl3* presentaba un patrón del tipo sexo dimórfico, es decir activado en algunos peces y reprimidos en otros; y luego analizar lo mismo para el *cyp11c*. Se partió de la base de

que el *foxl3* podría ser un buen marcador femenino en los esturiones, y de que la 11 beta hidroxilasa (*cyp11c*) podría ser una buena marcadora masculina como ocurre en teleósteos (Vizziano et al., 2007). Por último, se buscó un patrón de diferenciación opuesto, es decir animales con alto *foxl3* (potenciales futuras hembras) y *cyp11c* reprimido, y otros con *cyp11c* activado (potenciales futuros machos) y *foxl3* reprimido, con el fin de interpretar los resultados relativos a la diferenciación sexual y a la hipótesis propuesta. También se realizaron estudios de regulación por parte del andrógeno 11KT y se comenzaron los estudios de localización celular del *foxl3* y de la *cyp11c*.

Hipótesis de trabajo:

En base a los antecedentes y a los resultados previos desarrollados en el laboratorio se hipotetizó que el *foxl3* podía estar involucrado en el proceso de diferenciación sexual del *Acipenser baerii* posiblemente determinando el destino de las células germinales masculinas cuando es reprimido. Esta represión proviene de los andrógenos 11-oxigenados producidos en futuros machos.

Objetivo general de la propuesta:

Caracterizar la expresión de *foxl3* y *cyp11c1* durante la diferenciación sexual de *A. baerii* y evaluar si la expresión de *foxl3* es regulada por los andrógenos-11-oxigenados.

Objetivos específicos de la propuesta:

- 1) Estudiar los cambios de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* durante el período de diferenciación molecular del sexo y ver si existen patrones inversos en sus niveles de expresión que den lugar a diferentes grupos de expresión en las clases de edades consideradas.
- 2) Determinar el o los tipos celulares en que *foxl3* y *cyp11c1* son expresados.

- 3) Evaluar si durante el período de diferenciación molecular del sexo la expresión de *foxl3* es regulada por el andrógeno 11-oxigenado 11-ketotestosterona (11KT).
- 4) Estudiar los cambios de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* durante la gametogénesis como referencia de una expresión detectable.

II.- Materiales y Métodos

II.1- Muestreos biológicos

Desarrollo gonadal

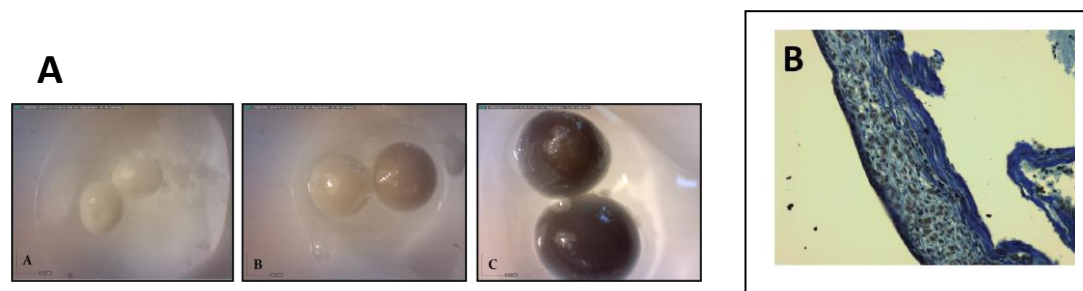
Basándonos en que el periodo de diferenciación molecular del sexo ocurre entre los 3 y meses de edad, una misma cohorte de esturiones siberianos (lote 9, eclosionado el 17 de mayo 2014) perteneciente a la granja piscícola Estuario del Plata, Tacuarembó, fue seguida en su desarrollo, obteniéndose gónadas de 30 individuos de 3, 4, 5, y 6 meses de edad (Tabla 1). Las gónadas fueron colectadas y almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción de ARN.

	3 M	4M	5M	6M
Largo total (cm)	11,95 ± 0,14	16,36 ± 0,32	23,97 ± 0,56	26,83 ± 0,70
Peso (g)	5,95 ± 0,19	15,32 ± 0,76	36,98 ± 2,18	47,14 ± 3,54
	n=30	n=30	n=30	n=30

Tabla 1. Promedio ± error estándar de largo total y peso de cada grupo de individuos.

Dada la gran variabilidad de expresión de *foxl3* en gónadas diferenciadas registradas en peces teleósteos, por lo que sin un a priori de lo que ocurriría en el esturión, se colectaron ovocitos correspondientes a folículos pre-vitelogénicos (E II, n=9); en vitelogénesis (E III, n=10); y post-vitelogénicos (E IV; n=10) y testículos inmaduros constituidos por células germinales que no iniciaron la meiosis de individuos de 10 (n=3), 11 (n=2), y 14 (n=5) meses que sirvieron para

evaluar el comportamiento de los genes objetivo en etapas posteriores a la diferenciación sexual.



Ovocitos II	Ovocitos III	Ovocitos IV	Testículo inmaduro
-------------	--------------	-------------	--------------------

Muestra	Estadio	Largo (cm)
977	Ovocitos pequeños (II)	103
980	Blanco y pequeños (II)	107
983	Blancas chicas (II)	112
984	Blancas chicas (II)	113
985	Blancos y grises (III)	114
986	Blancos y grises (III)	110
988	Blancos y grises (III)	101
996	Blancos y grises (III)	109
993	Grises 1 -2 mm (IV)	116
997	Grises (IV)	117
989	Grises (IV)	110
1000	Grises (IV)	103,5

A) Imagen ovocitos clasificados en estadios II, III y IV en base a coloración y tamaño según Conte (1988)
 B) Imagen de un corte testicular donde se observan las células germinales que aún no iniciaron la meiosis y que se disponen en forma homogénea en el interior del mismo.

II.2- Animales experimentales

Los estudios de regulación de la expresión *in vivo* se realizaron con esturiones siberianos de 4 meses de edad, mantenidos en la instalación experimental del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces (FREPE) de Facultad de Ciencias. Dichos animales, Tabla 2, (lote 15, eclosionado 17 de julio 2017) fueron proporcionados por la empresa Estuario del Plata (Tacuarembó). De cada individuo se colectaron trozos de gónada mantenidos en nitrógeno líquido para estudios de cuantificación de la expresión génica mediante qPCR y en paraformaldehído 4% - PBS para estudios de localización celular (hibridación *in toto*). Para esta técnica se utilizaron individuos del grupo control (no tratados con hormona).

El protocolo de experimentación utilizado fue aprobado por la CEUA de Facultad de Ciencias (Exp.240011-000410-16).

Experimental I			
	Grupo I	Grupo II	
Largo total (cm)	17,31 ± 0,59	22,98± 0,87	
Peso (g)	15,05 ± 2,12	35,55 ± 2,94	
	n=7	n=7	
Experimental II			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Largo total (cm)	15,3 ± 0,33	13,21± 0,74	14,32± 0,66
Peso (g)	9,47 ± 0,77	7,9 ± 0,86	8,17 ± 1,37
	n=7	n=7	n=8
Experimental III			
	Grupo I	Grupo II	
Largo total (cm)	22,59 ± 0,36	24,4± 3,16	
Peso (g)	30,26 ± 1,56	36,96 ± 2,68	
	n=11	n=11	

	G I	G II	G III
EXP I	10ug/g	C	NA
EXP II	4ug/g	10ug/g	C
EXPIII	10ug/g	C	NA

Tabla 2. Promedio ± error estándar de largo total y peso de cada grupo de individuos por experimento. A la derecha referencia de tratamientos asignados a los grupos experimentales.

II.3- Procesamiento de material biológico para cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa.

II.3.1- Extracción de ARN

La mayor parte de las extracciones de ARN se realizaron siguiendo el protocolo del kit utilizado (RNAspin Mini RNA Isolation Kit, GE Healthcare). Particularmente la extracción de ARN de ovocitos debió ser realizada mediante técnica fenol-cloroformo (TRIzol) por brindar una mayor eficiencia que el kit en este tipo de muestra (con exceso de lípidos). La concentración y grado de pureza de todos los ARN fue evaluada mediante espectrofotometría (Nano Drop ND-1000 de sala de equipos comunes del Instituto Pasteur de Montevideo). Para las extracciones con fenol-cloroformo, se evaluó la calidad mediante electroforesis de 1 µg en gel de agarosa (100 V, 200mA durante 60 min; agente intercalante Gel Red™).

II.3.2- Detección de ADN en muestras de ARN

Pese a que durante la extracción de ARN se trató la muestra con DNasa, se empleó la técnica de PCR tiempo final para comprobar que el ADN fuese eliminado completamente. Las muestras con presencia de ADN fueron re-tratadas con DNasa y posteriormente analizadas mediante PCR tiempo final para verificar la completa eliminación del ADN.

Para los tratamientos se utilizó Deoxyribonuclease I, RNase-free a razón de 7 U/ μ g de ARN, siguiendo el protocolo del fabricante (Thermo Scientific). Las PCR en tiempo final se realizaron a partir de 1 μ l de ARN tratado; en un volumen final de reacción de 25 μ l; con 1,25 unidades de Taq polimerasa Roche; [dNTP's]_f = 0,2 mM y utilizando cebadores específicos ([cebadores]_f = 0,8 mM) para el gen 18S del esturión siberiano validados previamente por el laboratorio (Berbejillo et al., 2012). El termociclador utilizado fue marca Corbett Research Palm Gradient con un ciclado de 2' a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 40'' a 94 °C, 30'' a 60 °C y 1' a 72 °C. Por último 7' a 72°C. Las reacciones fueron reveladas mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (100 V, 200 mA durante 60 min) utilizando el agente intercalante Gel RedTM.

II.3.3. Síntesis de ADNc

La síntesis fue realizada siguiendo el protocolo sugerido para la enzima M-MLV RT por los fabricantes (Thermo Fisher Scientific). Las retrotranscripciones de ARN de gónada de individuos indiferenciados (3, 4, 5 y 6 meses), machos (testículos) y hembras (ovocitos) se desarrollaron partiendo 1 μ g de ARN mientras que las de gónada de individuos experimentales, partiendo de partiendo 0,2 μ g de ARN. En ambos casos en presencia de 200 ng de cebadores al azar en un volumen final de reacción de 20 μ l.

II.3.4- Diseño y validación de cebadores

Cebadores para cuantificación de la expresión de genes de estudio. Validación *in silico* de secuencias.

Las secuencias de ARNm correspondientes a *foxl3*, *cyp11c1* fueron obtenidas del transcriptoma de la gónada del esturión siberiano mediante tblastn local utilizando las secuencias XP_004070713.1, NP_001073673.1 respectivamente, obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias obtenidas del transcriptoma del esturión fueron validadas mediante Blastp en NCBI. Dada la similitud entre los mensajeros de *foxl3* y *foxl2* en las especies donde fueron caracterizados (secuencias disponibles) la secuencia obtenida correspondiente al ARNm de *foxl3* fue validada a partir de un análisis filogenético realizado en cooperación por el laboratorio de trabajo y el Instituto de Genómica Funcional de Lyon, Francia. A partir de las secuencias se diseñaron y ensayaron distintos juegos de cebadores hasta encontrar un juego específico para *foxl3* (Tabla 3). La secuencia de *cyp11c1* fue validada a partir de un análisis filogenético realizado en el presente trabajo incorporando las secuencias obtenidas del NCBI.

El diseño de los cebadores fue manual y se utilizó la herramienta OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies (IDT), para controlar contenido GC y temperaturas de dimerización. Los cebadores fueron sintetizados por la compañía IDT y el producto de qPCR secuenciado por el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo (UBM Instituto Pasteur) fue comparado con la secuencia proveniente del transcriptoma mediante alineamiento con la herramienta web MultAlin. La amplificación utilizando qPCR permitió a su vez verificar la curva del Melt del producto amplificado (Figura1).

	Cebador Forward	Cebador reverse	Tamaño
<i>foxl3</i>	5'- GAA ACC CTG CTT GAA TTA TTC CGA TC -3'	5'- GTG GGA CAG TCT AGC CCG T -3'	106pb
<i>cyp11c1</i>	5'- CTG CTT GTA TCC TCT GGG TC -3'	5'- CAT CTC CGT CTC TGC AAT CC -3'	175pb

Tabla 3. Secuencia de cada cebador y tamaño fragmento amplificado.

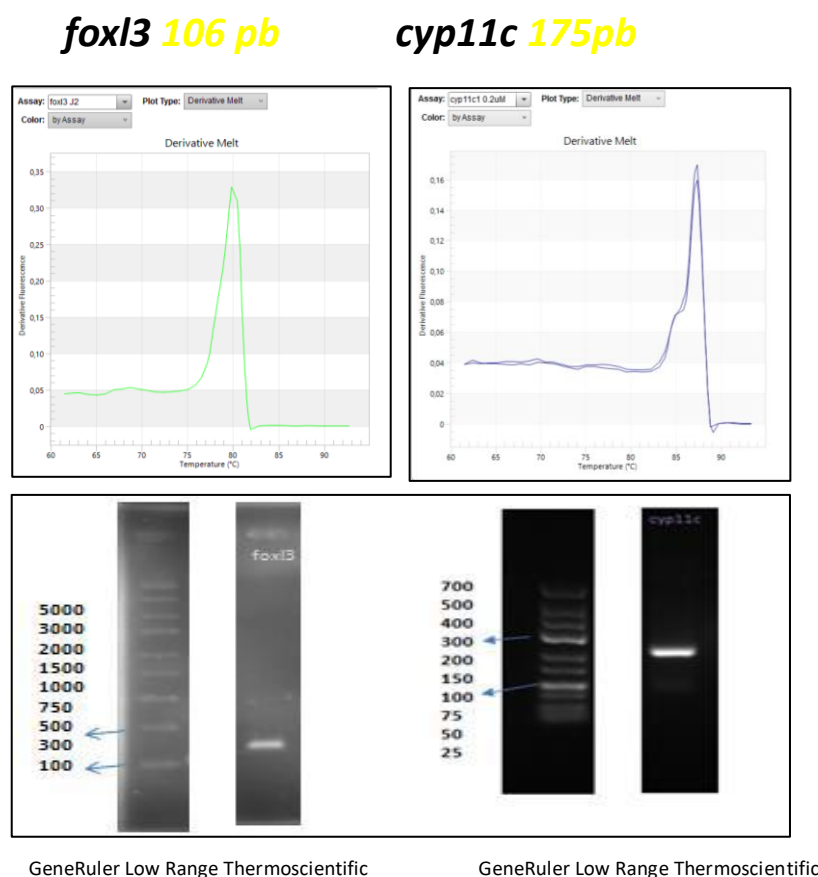


Figura 1. Curva de Melt correspondiente a cada gen de estudio y resultado electroforesis en gel de agarosa 1% (100 V, 200mA durante 60 min; agente intercalante Gel RedTm).

II.4- Cuantificación de la expresión de genes de estudio mediante PCR cuantitativa

II.4.1 Puesta a punto de la reacción

Las reacciones fueron realizadas en la plataforma ABI 7500 (Software Versión 2.0.6) utilizando placas de 96 pocillos y el reactivo Kappa Universal Sybr qPCR master mix. Previo a la cuantificación de los genes de estudio se realizaron ensayos para reducir el volumen final de la reacción de 20 a 12 ul. Para esto se compararon valores de Ct y Curvas de Melt de un mismo juego de cebadores (cebadores]f = 0,2 μ M) en reacciones de 20, 15 y 12 ul (volumen final). Los ensayos permitieron establecer 12 μ l como volumen final de reacción.

Posteriormente para cada juego de cebadores se ensayaron dos y hasta 3 concentraciones distintas (0.05 μ M; 0.1 μ M; 0.2 μ M) buscando un equilibrio entre disminución de formación de dímeros (validado por gel de agarosa) y especificidad de la reacción (Curvas

del Melt). Como resultado de estos ensayos se estableció como concentración final de cebadores en la reacción 0.1 μM para *18S* y *foxl3*; 0.2 μM para *cyp11c1*

II.4.2 Metodología empleada para la cuantificación de la expresión génica.

Se realizó cuantificación relativa de la expresión de los genes de estudio empleándose el método de la Curva Estándar (User Bulletin #2: ABI PRISM7700 Sequence Detection System). En cada caja de 96 pocillos de qPCR utilizada se corrieron 40 muestras de gónada por duplicado, 4 blancos de reacción y diluciones seriadas por duplicado (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320,) de un pool de cDNA de gónadas indiferenciadas obteniendo una Curva Estándar para cada gen cuantificado por caja a partir del gráfico Ct vs log dilución (Figura 2).

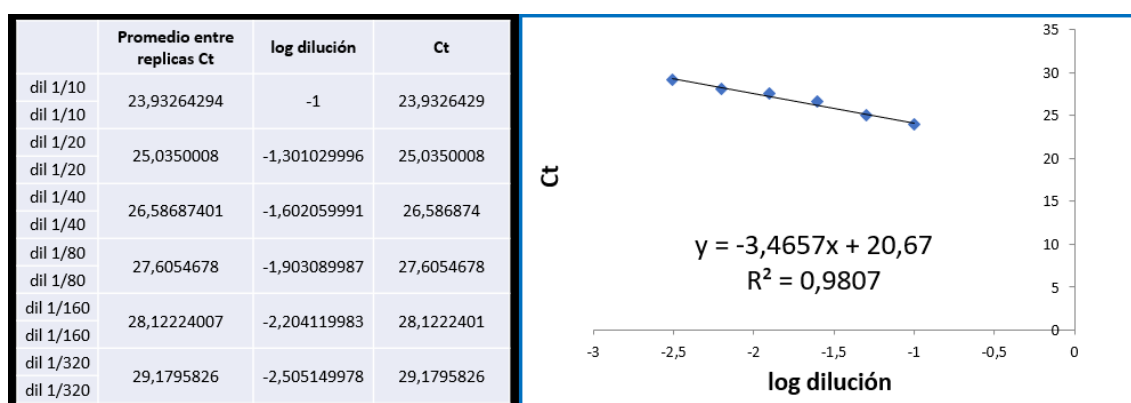


Figura 2. Ejemplo Curva Estándar cebadores *foxl3* ([cebadores] f = 0,1 μM)

A partir de la curva estándar se determinó para cada muestra el nivel de expresión de cada gen mediante la relación:

$10^{\frac{[log\ cantidad\ inicial\ gen\ estudio]}{[log\ cantidad\ inicial\ gen\ normalizador]}}$ siendo $log\ cantidad\ inicial = \frac{[Ct] - b}{m}$ (b = intersección eje y- línea curva estándar; m pendiente curva estándar). Como gen normalizador se utilizó el gen de expresión constitutiva *18S*.

En el Anexo 2 se presenta la estructura de cajas para la cuantificación de la expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en muestras de gónadas indiferenciadas presentadas en distintos colores en las cajas 1 a 4. Además, en las cajas 1 a 3 se sembraron muestras de ovocitos en diferentes estadíos y en la caja 4 muestras de testículos. Cada muestra se sembró por duplicado. Dado que se analiza un gen por caja, cada caja consta de una sola dilución seriada para establecer las curvas estándar correspondientes. Se puede ver que cada caja tiene asignados 2 pocillos al control del reactivo R (compuesto por la mezcla de reacción sembrada en la placa en sala de trabajo libre de ácidos nucleicos) y a blancos B (compuesto por la mezcla de reacción sembrada en la placa en sala de trabajo libre de ácidos nucleicos más los 2 µl de agua libre de nucleasas agregada en mesada de trabajo con ADN luego de sembrar los 2 µl de ADNc para cada muestra).

II.5- Ensayos de regulación *in vivo* de la expresión génica de *foxl3* por el andrógeno 11KT

En la búsqueda de un efecto de la 11KT sobre la expresión génica de *foxl3* se realizaron tres tratamientos. Los dos primeros correspondieron a tratamientos agudos usando una sola dosis de 11KT durante 6h en un caso y dos dosis de 11KT durante 24h. El tercero correspondió a un tratamiento crónico durante 6 días.

Tratamiento 1: AGUDO, 11KT dosis empleada 10 µg/g; duración: 6 h

Para este tratamiento se preparó una solución de 1 µg/µl de 11-KT en buffer salino. Se establecieron dos grupos experimentales. Individuos del Grupo 1 (n=7) fueron inyectados con solución 1 µg/µl de 11-KT para otorgar una dosis de 10 µg/g animal. El Grupo 2 fue control, a cada individuo (n=7) se le inyectó 226 µl de buffer salino con 2,5% de etanol. Los peces fueron mantenidos en 2 cubas (una por grupo experimental) en ayunas durante 6 h tras las cuales se

les dio punto final para realizar inmediatamente el muestreo de gónada para los estudios de expresión génica.

Tratamiento 2: AGUDO. 1 inyección de 11KT 5 µg/g y 10 µg/g; duración 24 h

Se disolvieron 5 mg de 11-KT (Sigma Aldrich USA) en 0,25 ml de etanol puro para análisis (PPA) obteniendo un volumen de 250 µl y 20 µg/µl de concentración. Posteriormente se diluyeron 150 µl de esta solución en 5,85 ml de buffer salino (NaCl₂, 0,15 M) obteniendo 6 ml de solución de 0,5 µg/µl de 11-KT en buffer salino a utilizar en las inyecciones.

Se establecieron tres grupos de peces (n=8 por grupo) a los cuales se les inyectó solución de 0,5 µg/µl de 11-KT para otorgar una dosis de 5 µg/g animal (Grupo 1) y 10 µg/g animal (Grupo 2). El tercer grupo de peces (Grupo 3) fue el grupo control que fueron inyectados con el mismo vehículo que los tratados con 11-KT es decir con buffer salino con 2,5% de etanol. Los peces fueron mantenidos en tres cubas (una por grupo experimental) en ayunas durante 24 h tras las cuales se dio punto final al experimento, sacrificándose a los peces para realizar inmediatamente el muestreo de gónada para los estudios de expresión génica.

Tratamiento 3: CRONICO, 11KT Duración; dosis empleada (total): 10 µg/g 6 días;

Para este tratamiento se preparó una solución de 0,5 µg/µl de 11-KT en buffer salino. Se establecieron dos grupos experimentales. Individuos del Grupo 1 (n=11) fueron inyectados con solución 0,5 µg/µl de 11-KT para otorgar una dosis total de 10 µg/g animal suministrada en 5 inyecciones. El Grupo 2 fue control, a cada individuo (n=11) se le inyectó 134,6 µl de buffer salino con 2,5% de etanol por inyección (5 en total). Los peces fueron mantenidos en 2 cubas (una por grupo experimental) en ayunas durante 6 días tras los cuales se les dio punto final para realizar inmediatamente el muestreo de gónada para los estudios de expresión génica.

II.6- Hibridaciones *in toto*

La metodología se basó en la hibridación de una sonda de ARN marcada con digoxigenina (utilizando los promotores SP6 y T7 para su síntesis mediante una transcripción *in vitro*) con su ARN mensajero complementario, correspondiente a *cyp11c1* o al *foxl3*, dependiendo de la sonda. Se utilizaron fragmentos de gónadas de individuos indiferenciados de 4 meses fijadas en paraformaldehído 4% - PBS para realizar las hibridaciones.

II.6.1 Diseño de cebadores para síntesis de molde de sonda

Para la síntesis de molde de sonda de ARNm de *foxl3* se diseñaron cebadores específicos con el agregado de los adaptadores Sp6 y T7 como se sugiere en Ghafoory et al. (2012). Se realizó una primer PCR con el objetivo de validar dichos cebadores. Como molde de la reacción se utilizó 1 µl de cDNA diluido 1/5 obtenido a partir de un pool de cDNA de gónadas de tres individuos indiferenciados y tres testículos, en uno de los cuales habíamos evidenciado presencia de *foxl3* mediante transcriptómica. La reacción se realizó en un volumen final de reacción de 25 µl; con 1,25 unidades de Taq polimerasa Roche; [dNTP's]_f = 0,2mM y utilizando cebadores específicos para *foxl3* ([cebadores]_f = 0,8mM). El termociclador utilizado fue marca Corbett Research Palm Gradient con un ciclado de 2' a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 40'' a 94 °C, 30'' a 60 °C y 1' a 72 °C. Por último 7' a 72°C. Las reacciones fueron reveladas mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (100 V, 200 mA durante 60 min) utilizando el agente intercalante Gel Red[™]. El producto de PCR fue purificado utilizando el kit ZYMO de purificación de ADN a partir de gel de agarosa siguiendo las instrucciones del fabricante para ser secuenciado (UBM Instituto Pasteur) y alineado con la secuencia de *foxl3* proveniente del transcriptoma. Una vez validado el juego de cebadores se replicó la reacción de PCR unas 20 veces con el objetivo de tener purificado 1 µg de molde de sonda.

Para la síntesis de molde de sonda de ARNm de *cyp11c1* se diseñaron cebadores específicos sin necesidad de adaptador ya que el molde de la sonda se obtendría mediante clonación del producto de PCR en el vector pGM-T para su multiplicación el cual ya posee los adaptadores Sp6 y T7. Los cebadores se diseñaron manualmente dentro del marco de lectura. Siguiendo el mismo protocolo de reacción de PCR que para *foxl3* (con la temperatura de melt de los cebadores de *cyp11c1*, 63°C); el producto obtenido con los cebadores fue secuenciado (UBM Instituto Pasteur) y alineado con la secuencia de *cyp11c1* proveniente del transcriptoma para su validación. Los cebadores usados para la síntesis del molde de la sonda específica para el ARNm de *cyp11c1* y *foxl3*, se presentan en la Tabla 4. Una vez validados, utilizando una polimerasa High Taq (polimerasa sin lectura de prueba para permitir extremos cohesivos en el fragmento amplificado) se procedió a la amplificación del producto con el objetivo de ligarlo al vector pGM-T. La reacción se realizó en un volumen final de reacción de 25 µl; con 1,25 unidades de Taq polimerasa Roche; [dNTP's]_f = 0,8mM y utilizando cebadores específicos para *cyp11c1* ([cebadores]_f = 0,5mM). El termociclador utilizado fue marca Corbett Research Palm Gradient con un ciclado de 2' a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 10'' a 94 °C, 20'' a 63 °C y 1' a 72 °C. La ligación se llevó a cabo a 4°C overnight en una mezcla de reacción compuesta por 2 µl producto de PCR (27,5 ng/µl), 0,5 µl pGM-T (50 ng/µl), 0,5 µl buffer de ligación (10X), 0,5 µl ligasa T4 y 1,5 µl H₂O. A continuación, se utiliza el vector para transformar la cepa competente *Escherichia coli* DH5alpha. La transformación transcurre a 37°C durante 16 h en placa de agar con ampicilina (50 µg/ml) suplementada con 80 µl (50mM) del inductor IPTG y 80 µl X-gal (mg/ml). La carencia del gen lacZ de la cepa de *E.coli* utilizada, y la inactivación del Alpha péptido β-galactosidasa por inserción del fragmento amplificado de *cyp11c1* permite diferenciar las bacterias transformadas que portan el vector con *cyp11c1* (incapaces de hidrolizar X-gal) reconocidas por coloración blanca de aquellas que no o portan, reconocidas por la coloración azul debida a la oxidación de uno de los productos de la hidrólisis. Luego de la transformación se seleccionaron 10 colonias blancas (y una azul como control negativo) para

identificar mediante una PCR con cebadores T7 y Sp6 aquellas que contienen el inserto de *cyp11c1* completo. Las reacciones fueron reveladas mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (100 V, 200 mA durante 60 min) utilizando el agente intercalante Gel Red™. En base a este resultado se seleccionaron dos colonias que *a priori* (presentaban el inserto de *cyp11c1*, de acuerdo al tamaño observado que correspondió al tamaño esperado. A partir de ellas se purificó el plásmido y se mandó secuenciar (UBM Instituto Pasteur) para validación secuencias. Una vez validadas se eligió el plásmido colonia #1 para la amplificación por PCR con cebadores Sp6 y T7 para sintetizar la sonda (Figura 3).

Tabla 4. Secuencia de cada cebador y tamaño fragmento amplificado

	Cebador forward	Cebador reverse	Tamaño
<i>foxl3-in toto</i>	5'- CAG TGA ATT GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA GTG TGG AAA CGT CTCA GGA CA -3'	5'- CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAT AAT GCA CAA CAG G -3'	927pb
<i>cyp11c1-in toto</i>	5'- CCT GTG GAA AGA GCA TGT CG -3'	5'- TAT CAG GGT GTA TTT CGT TCG G - 3'	743pb

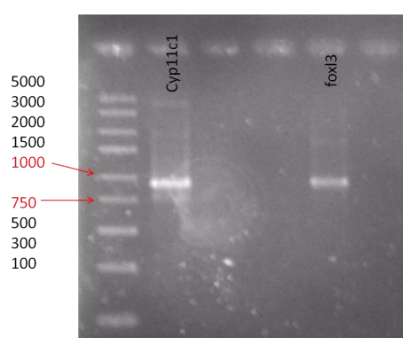


Figura 3. Electroforesis sobre gel agarosa de producto de PCR con cebadores T7 y Sp6 sobre plásmido pGM-T Colonia #1 (*cyp11c1*) y purificado de *foxl3* con adaptadores T7 y Sp6.

II.6.2 Síntesis de sonda marcada

La síntesis se realizó *in vitro* a partir de 1000 ng de molde de sonda. Utilizando como marcador DIG-UTP sintetizaron 4 sondas: *cyp11c1*-T7, *cyp11c1*-Sp6, *foxl3*-T7 y *foxl3*-Sp6 utilizando las transcriptasas T7 o Sp6 respectivamente. Con Sp6 se sintetizaron las sondas anti-sense de *cyp11c1* y sense de *foxl3*. Con T7 se sintetizaron las sondas sense de *cyp11c1* y anti-sense de *foxl3*. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante dos horas. Finalizada la misma, se

trataron con DNasa 15 minutos a 37 °C para eliminar el molde. Las sondas marcadas se evaluaron mediante gel de agarosa (tamaño de la sonda) y dot blot (cuantificación sonda marcada) (Figura 4).

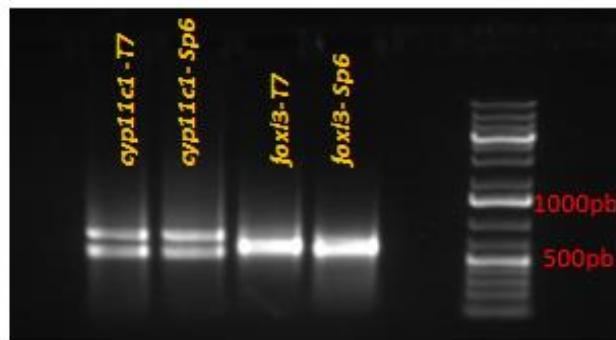


Figura 4. Electroforesis sobre gel agarosa de sonda de ARN marcadas (DIG-UTP).

II.6.3 Selección del material biológico

De los grupos control de los tratamientos dos y tres de los ensayos de regulación de la expresión génica de *foxl3* por el esteroide 11-Ketosterona, se seleccionaron gónadas de individuos en base a los niveles de expresión de *foxl2*, gen validado recientemente por el laboratorio de trabajo como marcador molecular de la diferenciación del sexo en el esturión Siberiano (Vizziano-Cantonnet, Di Landro, et al., 2018). De esta manera se realizaron las hibridaciones sobre tejido gonadal seleccionado de potenciales futuros machos y potenciales futuras hembras en diferenciación del sexo (Figura 5.)

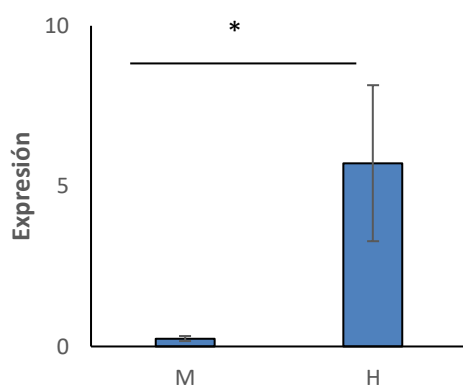


Figura 5. Expresión de *foxl2* en machos en diferenciación del sexo (n=4) y hembras en diferenciación del sexo (n=3) de 4 meses de edad. Hubo diferencias significativas (Student; $p < 0.05$) en los niveles de expresión de *foxl2* entre machos y hembras, siendo mayores en las hembras.

II:7. Filogenias Foxl3 y Cyp11c

Las secuencias de *foxl3* y *cyp11c1* obtenidas del transcriptoma de la gónada del esturión siberiano fueron confirmadas por estudios filogenéticos a nivel de proteínas. Para esto se tradujo la secuencia de ARNm utilizando la herramienta Translate de ExPASy y otras secuencias correspondientes a Foxl3 y Cyp11c fueron incorporadas de las bases de datos GeneBank y Ensemble.

La caracterización de Foxl3 fue realizada en el Instituto de Genómica Funcional de Lyon, Francia, en cooperación con el laboratorio FREP antes de iniciada la tesis. El método empleado fue el de máxima verosimilitud (Felsenstein et al., 2004) y las secuencias utilizadas se presentan en la misma. La caracterización de Cyp11c fue realizada en el marco de esta tesis. Se utilizaron las secuencias proteicas de Cyp11c correspondientes a *Oryzias latipes* (NP_001098570.1), *Dicentrarchus labrax* (AAQ04665.2), *Oreochromis niloticus* (XP_003450954.1), *Maylandia zebra* (XP_004541268.1), *Fundulus heteroclitus* (XP_012721270.1), *Oncorhynchus mykiss* (NP_001117736.1), *Odontesthes bonariensis* (ACU81083.1), *Danio rerio* (NP_001073673.1), *Rana catesbeiana* (D10984.1), *Homo sapiens* (AAA35741) y *Mus sp* (AAB21517.2). El método empleado fue Neighbor-Joining (Saitou et al., 1987), bajo 1000 réplicas (bootstrap), utilizando el programa MEGA7.

II.8- Análisis estadístico de datos de la expresión de *foxl3* y *cyp11c1* durante el desarrollo gonadal.

II.8.1 Para establecer si hay diferencias significativas en los niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* durante los diferentes estadios de desarrollo analizados

En primer lugar, para el conjunto de datos de expresión relativa de cada gen se evaluó normalidad mediante la prueba de Lilliefors (Abdi et al., 2007) y mediante la prueba de Levene para estudiar la homogeneidad de varianza entre grupos (Schultz, 1985). En los casos en donde no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza entre grupos se procedió a realizar análisis no-paramétricos mediante la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Vargha et al., 1998) seguido de la prueba no pareada de Mann-Whitney con corrección por Bonferroni (Ruxton, 2006). En casos de homogeneidad de varianza entre grupos se aplicó un análisis de varianza (ANVA) (Kaufmann et al., 2014). Se utilizaron los programas de análisis estadístico Gnumeric y Past.

II.8.2 Análisis de agrupamiento

Mediante el análisis de agrupamiento utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted pair-group average) y el coeficiente de correlación (r de Pearson), (Dawyndt et al., 2006) se intentó establecer si los patrones de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en alguno de los estadios de desarrollo durante el período de diferenciación molecular del sexo son suficientes para discriminar dos grupos dentro de los individuos analizados. Se utilizó el coeficiente de correlación cofenético como mediada de validación del dendograma. Los grupos obtenidos fueron verificados mediante análisis discriminante y análisis multivariante de la varianza (MANOVA) Carlson, D. (2017). Para cada clase de edad se compara los niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* entre los grupos obtenidos a partir del clustering mediante test estadísticos apropiados según el caso (paramétricos y no paramétricos).

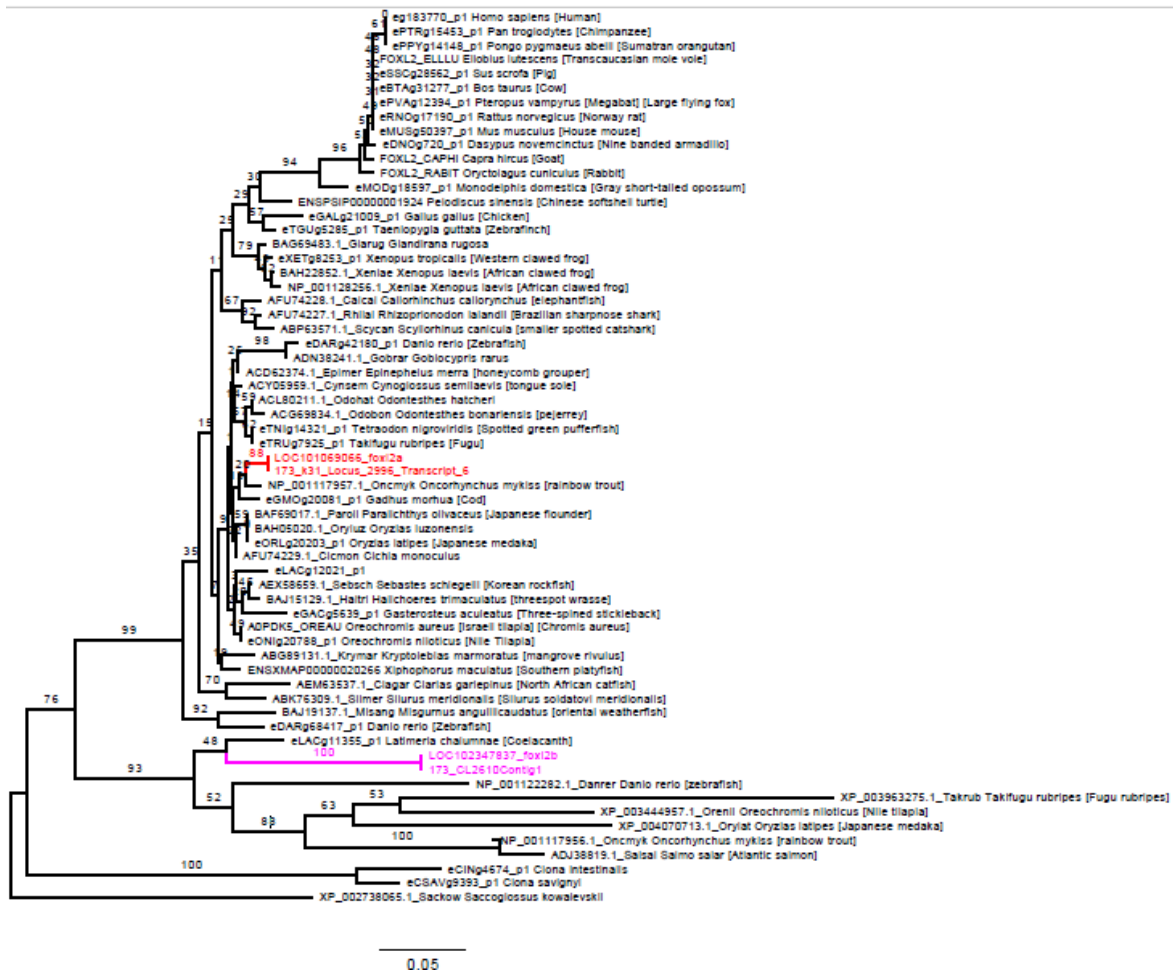
II.8.3 Análisis estadístico de datos de expresión génica obtenidos del ensayo de regulación por 11KT.

Para el análisis estadístico de los datos de expresión de *foxl3* obtenidos del ensayo de regulación por esteroides, se evaluó normalidad del conjunto de datos mediante la prueba de Lilliefors (Abdi et al., 2007) y homogeneidad de varianzas entre grupos (tratado y control) mediante la prueba de Levene (Schultz, 1985). En caso de cumplir con ambos supuestos se procedió a comparar los grupos utilizando el test de Student o el análisis de varianza ANVA (Kaufmann et al., 2014) (particularmente en la experimental 1 donde se conformaron tres grupos de peces).

III.- Resultados

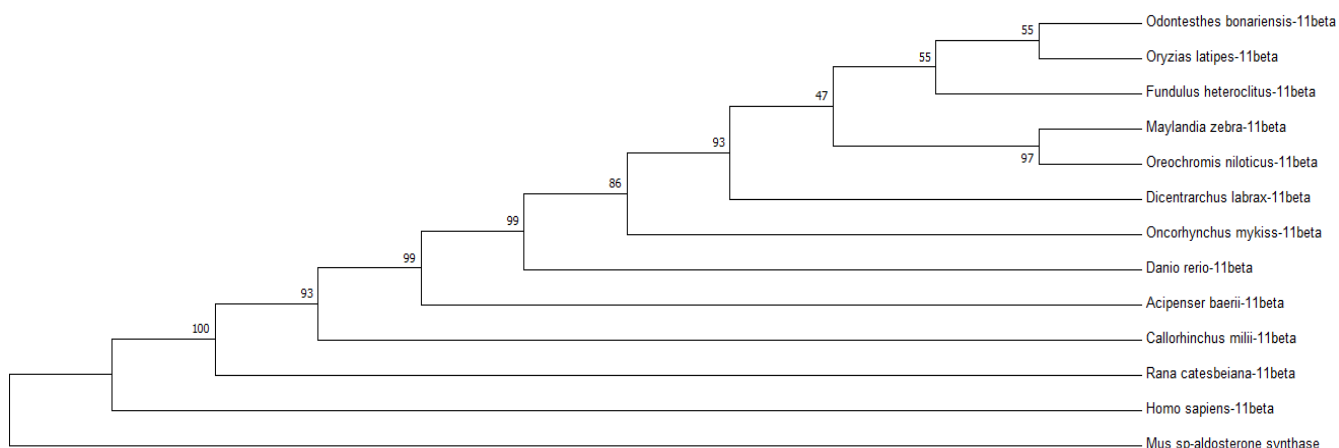
III.1- Caracterización mediante filogenia de *foxl3* y de *cyp11c*

El análisis filogenético confirma que la secuencia obtenida del transcriptoma de la gónada del esturión *Acipenser baerii* corresponde al *foxl3*. En la filogenia (Filogenia 1) se distinguen dos grupos monofiléticos validados por un bootstrap de 76% de credibilidad: en la parte superior el grupo correspondiente a *foxl2* y en la parte inferior, el grupo de su gen parálogo *foxl3* (*fox2b*). Se observa como *foxl3* del esturión siberiano (en rosado) forma un grupo que implica una mayor similitud con sus ortólogos (ver Filogenia 1).



Filogenia 1 (Foxl3). Obtenida mediante el método de Máxima verosimilitud (Felsenstein et al., 2004).

El análisis filogenético de Cyp11c confirma que la secuencia obtenida del transcriptoma de la gónada y validada en primera instancia mediante blastp (NCBI) corresponde a *cyp11c1*, el gen que codifica la enzima 11 β -hidroxilasa (Cyp11c) en el esturión (*Acipenser baerii*). La secuencia fue comparada con sus ortólogas en peces teleósteos y no teleósteos así con la 11 β -hidroxilasa de una anfibio y humano. Se observa como grupo monofilético Cyp11c en peces como era de esperar, viendo la secuencia del esturión más cercana al resto de los peces actinopterygios analizados (Filogenia 2).



Filogenia 2 (Cyp11c). Obtenida mediante el método Neighbor-Joining (Saitou et al., 1987), bajo 1000 réplicas (bootstrap), utilizando el programa MEGA7.

III.2- Cambios en la expresión de *foxl3* y *cyp11c* durante el período indiferenciado

Los cambios en los niveles de expresión gonadal del *foxl3* y del *cyp11c* durante el período de indiferenciación sexual comprendido entre los meses 3 y 6 de desarrollo se muestran en la Figura 6 A y B. La expresión de *foxl3* resultó significativamente mayor a los tres meses de edad, y se observa una disminución significativa durante el desarrollo. La expresión de *foxl3* es muy variable, sobre todo en los meses 4 y 5 coincidiendo con el pleno proceso de diferenciación molecular del sexo Figura 6B. La expresión de *foxl3* a los 4 y 5 meses de edad se diferencia significativamente ($p < 0,025$) de los meses 3 y 6 (Análisis estadístico en Anexo 1, pág. 56).

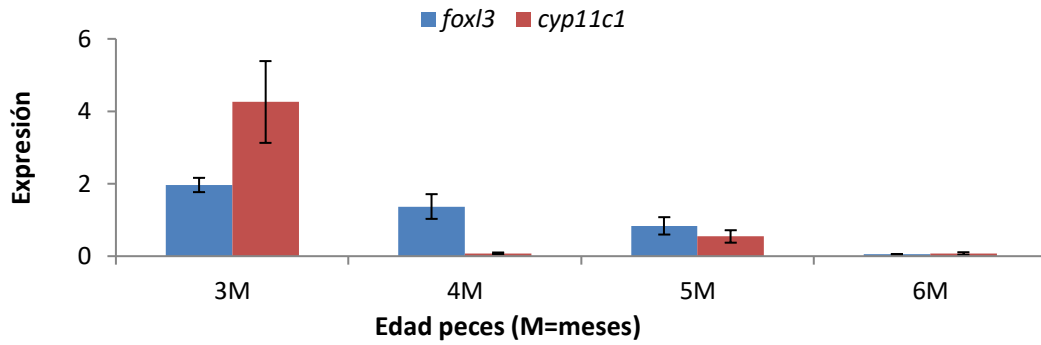


Figura 6A. Expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en la gónada de *A. baerii*. Los valores de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* para 3, 4, 5, y 6 meses corresponde al promedio de los valores de expresión de todas las muestras analizadas para cada estadio (n=30). Se presenta error estándar para cada valor de la expresión.

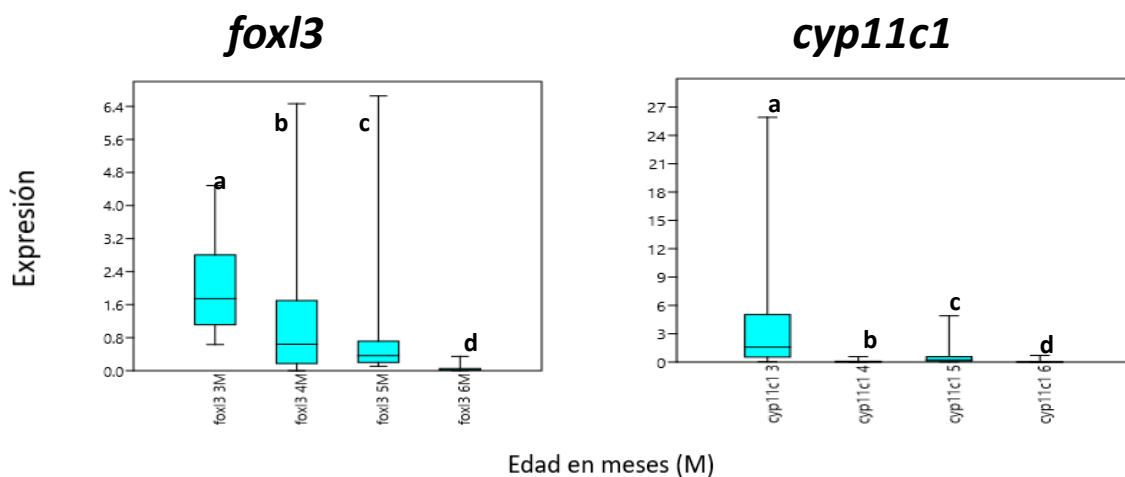


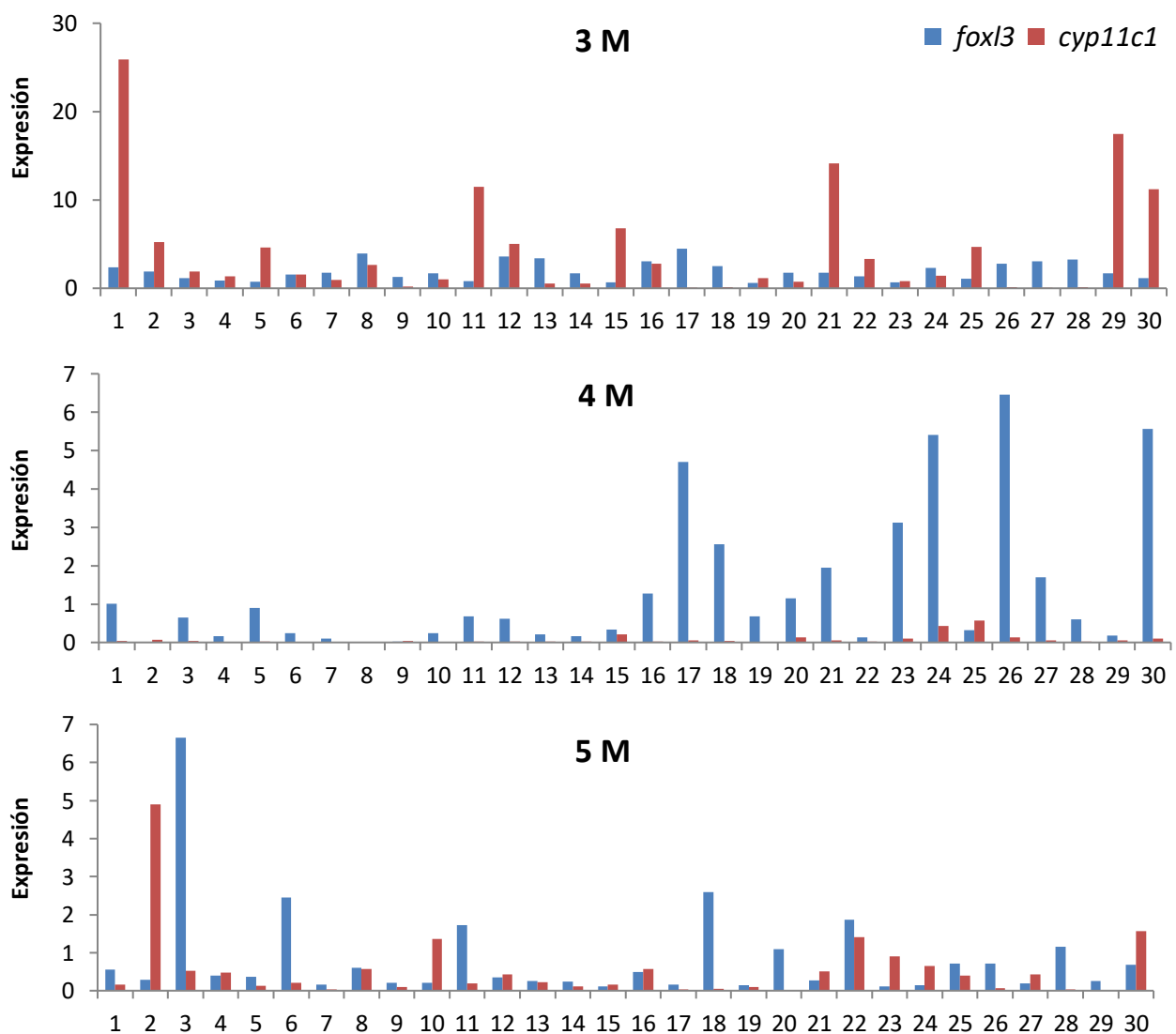
Figura 6B. Expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en la gónada de *A. baerii*. La expresión de *foxl3* y *cyp11c1* para 3, 4, 5, y 6 meses se visualizan mediante diagrama de cajas para cada estadio (n=30). Mann-Whitney test ($p < 0,025$).

En el caso de *cyp11c1*, los valores más elevados también se dan a los 3 meses de edad. Pero a diferencia de *foxl3*, la mayor variabilidad en su expresión es a los 3 meses (Figura 6 B), coincidiendo con el inicio del proceso de diferenciación molecular del sexo en el esturión siberiano. Posteriormente, y al igual que para *foxl3*, los niveles de expresión de *cyp11c1*

descienden significativamente ($p < 0,025$). Los 4 y 6 meses son los estados de desarrollo menor expresión de *cyp11c1* (Análisis estadístico en Anexo 1, pág.56).

III.3- Niveles de expresión individual de *foxl3* y *cyp11c1* durante el desarrollo

Para cada estadio de desarrollo (3 a 6 meses), se presentan los niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* por individuo. Se observa en forma intuitiva como dentro de un mismo estadio hay individuos en los que el nivel de expresión de *foxl3* es mayor al de *cyp11c1* mientras que en otros la relación es la opuesta (Figura 9).



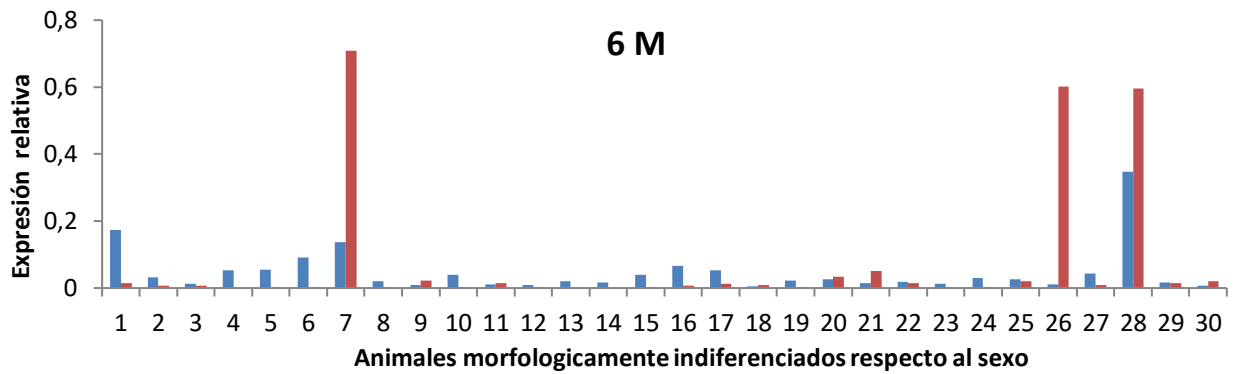
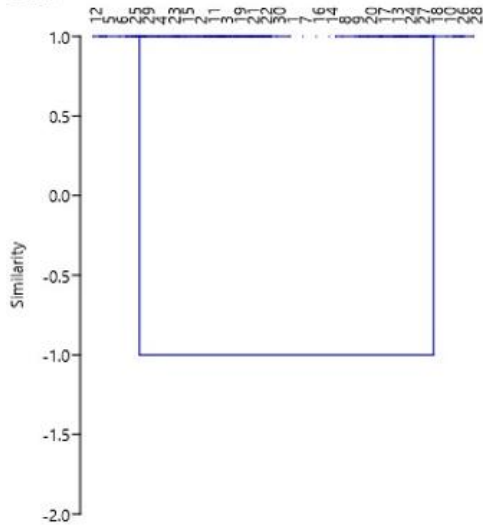


Figura 7. Expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en gónadas de 3, 4, 5, 6 meses (M) de *A. baerii*, indiferenciadas respecto al sexo.

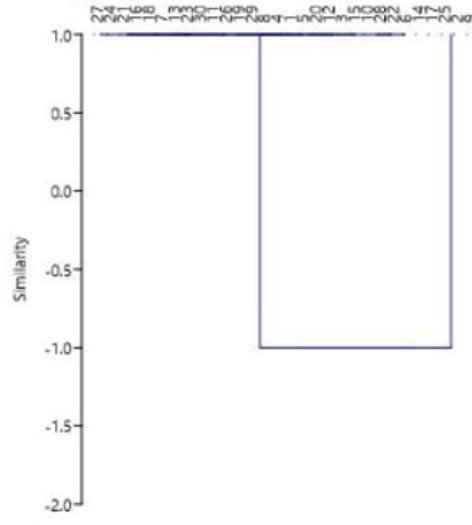
III.4- Análisis de agrupamiento

Se buscó si para cada mes, que representan distintas etapas del desarrollo gonadal en la cual no se distinguen cambios morfológicos, el comportamiento de estos dos genes a nivel individual permite establecer dos grupos distintos de individuos. El agrupamiento mostró como los patrones de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* observados durante el período de diferenciación molecular del sexo permiten discriminar dos grupos dentro de los individuos para cada clase de edad (Figura 7).

3M



4M



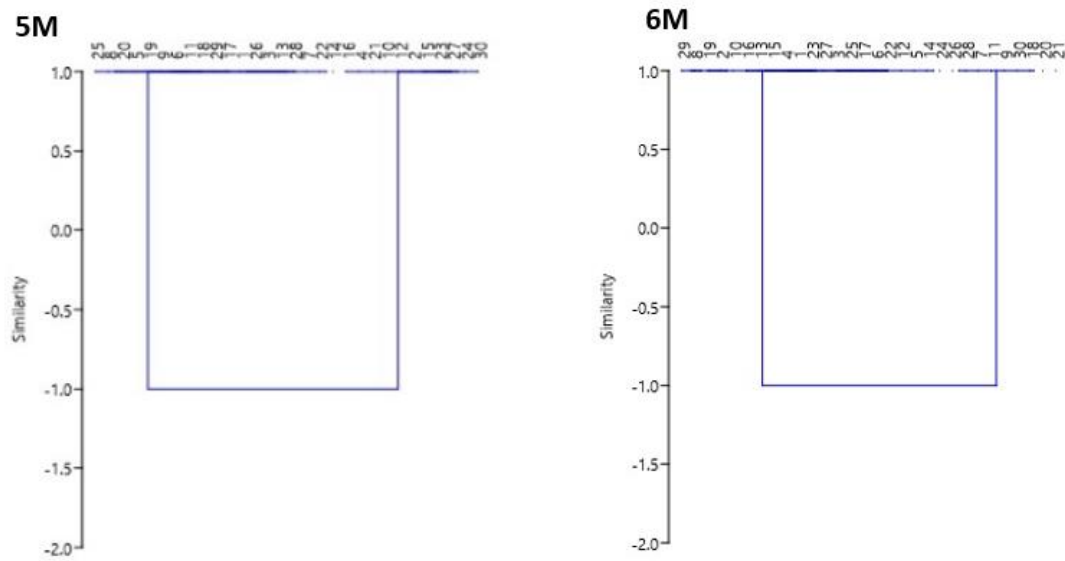


Figura 8. Agrupamientos considerando los valores de expresión de *cyp11c1* y *foxl3* en individuos de 3 meses (A), 4 meses (B), 5 meses (C) y 6 meses (D) de edad. En los cuatro casos se obtuvo un coeficiente de correlación cofenético igual a 1.

III.5- Comparación entre niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* entre los grupos establecidos el análisis de agrupamiento

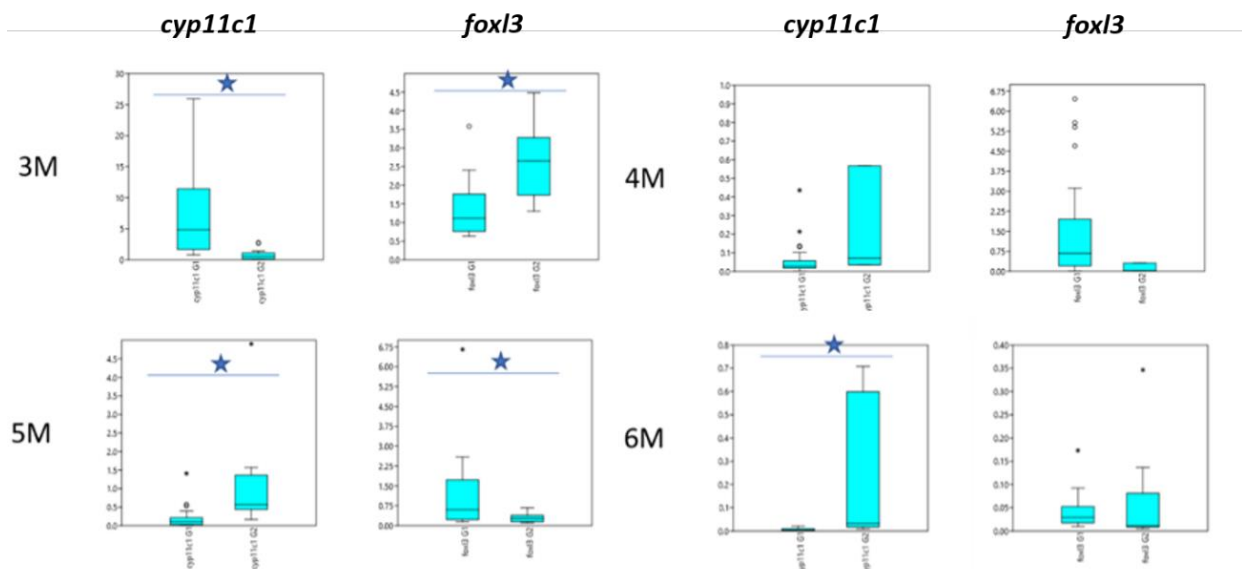


Figura 9: Representación gráfica mediante diagrama de cajas de los niveles de expresión de *cyp11c1* y *foxl3* para cada grupo (G1 y G2) obtenido a partir de los grupos (Figura 12) para individuos de 3, 4, 5 y 6 meses de edad. La estrella indica que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

Cuando se compararon los niveles de *foxl3* y *cyp11c* en los dos grupos formados para cada edad se observaron diferencias significativas solo en algunas edades. A los 3 y a los 5 meses, el *foxl3* se mostró activado significativamente ($p < 0,05$) en el grupo donde el *cyp11c* estuvo reprimido, e inversamente el *cyp11c* se elevó significativamente ($p < 0,05$) en el mismo grupo donde el *foxl3* se mantuvo reprimido. A los 4 meses, no hay diferencias significativas entre grupos ($p > 0,05$) para ninguno de los dos genes ensayados, mientras que a los 6 meses de edad, solo *cyp11c1* muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) en su expresión entre grupos (Figura 9) (Anexo1, pág 58-59-60).

III.6- Efecto del tratamiento in vivo con 11KT sobre la expresión de *foxl3*

No se observaron cambios significativos ($p > 0,05$) en los niveles de expresión gonadales de *foxl3* luego de los ensayos agudos utilizando dos dosis de 11KT y finalizados a las 6 y 24h post-inyección (Figuras 10 y 11; Anexo 1, pág. 60-61)

Tratamiento 1. AGUDO. Una sola inyección de 10µg/g de pez. 6 horas

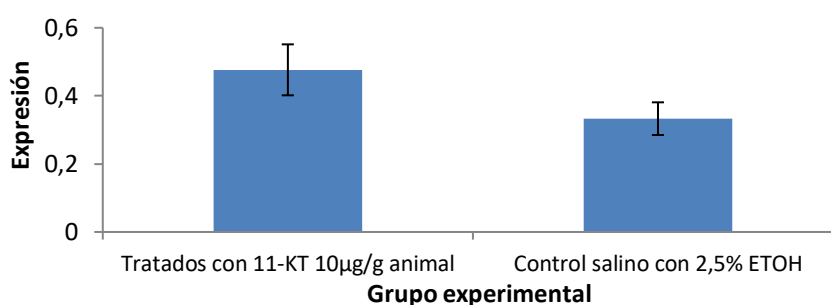


Figura 10. Expresión de *foxl3* en grupos experimentales. Los valores de expresión corresponden al promedio de los valores de expresión de todas las muestras analizadas por grupo (n=7). No hay diferencias significativas ($p > 0,05$) del valor de expresión del *foxl3* entre grupos. (Anexo 1, pág. 60-61).

Tratamiento 2. AGUDO, inyecciones de 11KT de 5 µg/g y 10 µg/g – 24 horas

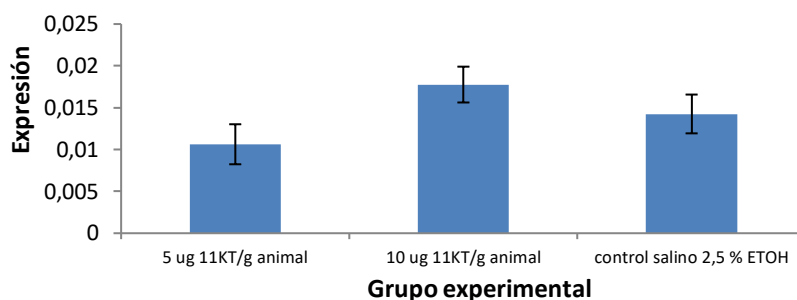


Figura 11. Expresión de *foxl3* en grupos experimentales. Los valores de expresión corresponden al promedio de los valores de expresión de todas las muestras analizadas por grupo (n=7 por grupo tratado, n=8 grupo control salino). No hay diferencias significativas ($p>0,05$) del valor de expresión del *foxl3* entre grupos. (Anexo 1, pág. 60-61).

Posteriormente se cambió el tratamiento agudo por uno crónico usando la dosis de 10 µg/g de pez inyectado durante 6 días. Este tratamiento tampoco indujo cambios en la expresión gonadal del *foxl3* (Figura 16, Anexo 1, pág. 60-61).

Tratamiento 3. CRONICO. Inyecciones diarias. Dosis total: 10µg/g. 6 días

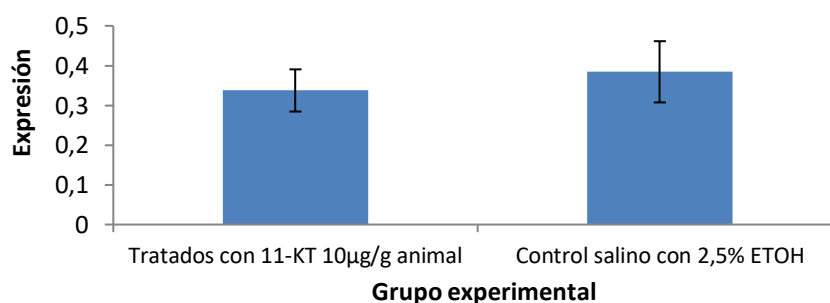


Figura 12. Expresión de *foxl3* en grupos experimentales. Los valores de expresión corresponden al promedio de los valores de expresión de todas las muestras analizadas por grupo (n=11). No hay diferencias significativas ($p>0,05$) del valor de expresión del *foxl3* entre grupos (Anexo 1, pág. 60-61).

III.7- Niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c* durante la gametogénesis temprana

Los niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c* se estudiaron en la gametogénesis femenina abarcando desde los ovocitos previtelogénicos (estadio II), los ovocitos en plena vitelogénesis

(estadio III), y los ovocitos post-vitelogénicos (estadio IV). Ninguno de los dos genes presentó diferencias significativas en los niveles de expresión entre estadios ovocitarios (Figura 13A; Anexo 1, pág. 55).

Además, se estudiaron los niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en testículos inmaduros (no meióticos) de 10, 11 y 14 meses. Una vez más no ninguno de los dos genes presentó diferencias significativas en los niveles de expresión entre los meses estudiados (Figura 13B; Anexo 1, pág. 55).

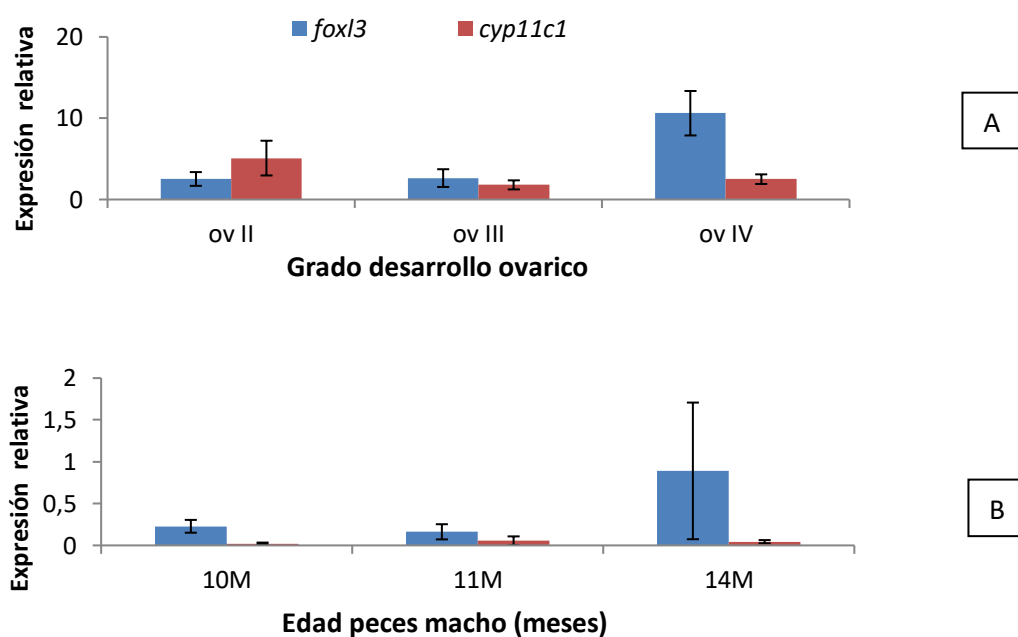


Figura 13. Expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en A) ovocitos en estadios de desarrollo II (n=9), III (n=10), IV (n=10). B) testículos previo al inicio de la gametogénesis (10 (n=3), 11 (n=2), y 14 (n=5) meses de edad).

III.8- Comparación entre niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c* entre testículos inmaduros y ovarios inmaduros (pre-vitelogénicos)

Los dos genes ensayados (*foxl3* y *cyp11c1*) mostraron niveles de expresión significativamente mayores en los ovocitos inmaduros respecto de los testículos inmaduros (Figura 8, resultados

estadísticos en Anexo 1, pág. 56), lo que indica la presencia de una expresión sexo dimórfica ($p < 0,05$) durante la gametogénesis temprana para los dos genes estudiados.

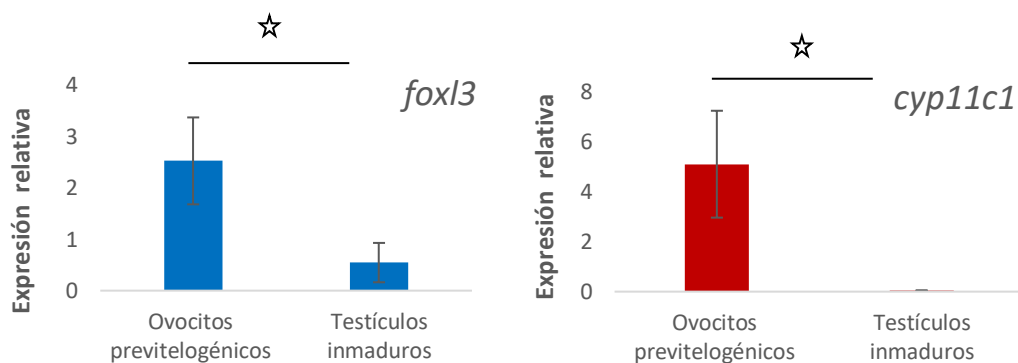


Figura 14. Expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en ovocitos pre-vitelogénicos (n=9), y testículos previo al inicio de la gametogénesis (n=10).

IV.- Discusión

El proceso de diferenciación de la gónada en el que células somáticas y germinales adoptan un destino sexual aún no es bien comprendido en peces en general lo que incluye al esturión Siberiano y a los esturiones en general. Los primeros signos claros de diferenciación de la gónada en el esturión Siberiano para las condiciones de cultivo en Uruguay aparecen a los 8 meses de edad y están basados en el reconocimiento de grupos de células germinales meióticas como un signo de desarrollo del ovario y una distribución homogénea de células germinales no meióticas como un signo de presuntos testículos (Vizziano-Cantonnet et al., 2016, 2018a). Habiendo cumplido los objetivos planteados, se caracterizó la expresión gonadal de *foxl3* y *cyp11c1* durante el periodo de diferenciación molecular del sexo que antecede la diferenciación morfológica de la gónada y etapas posteriores del esturión siberiano y se evaluó la regulación de *foxl3* por el andrógeno 11-oxigenado 11-ketotesterona en tratamientos *in vivo*.

IV.1- Potencialidad de producción temprana de andrógenos

Si bien los andrógenos 11-oxigenados son considerados los principales y más potentes esteroides sexuales masculinos en peces (Borg, 1994); Takeshi Miura et al. (2003), el rol de inductor de la diferenciación testicular solo se ha confirmado en la especie protándrica *Amphiprion clarkii* (anemona fish) (S. Miura et al., 2008) y en la especie con determinación del sexo dependiente de la temperatura, *Odontesthes bonariensis* (pejerrey), demostrando con esto que a temperaturas de masculinización, las enzimas 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa; 11 β -hidroxilasa; 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa estaban activas (Blasco et al., 2013). Los andrógenos como la 11KT se producen en individuos aún no diferenciados sexualmente expuestos a temperaturas masculinizantes en el pejerrey (Hattori et al., 2009). Además, estudios de expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de andrógenos 11-oxigenados muestran que en trucha arcoíris el primordio gonadal de machos genéticos tiene el potencial de sintetizarlos, pero dado el patrón de expresión en relación a la expresión del gen determinante del sexo (*sdv*,) (Yano et al., 2013), los andrógenos no serían los desencadenantes de la vía masculina de diferenciación sino más bien los mediadores (Vizziano et al., 2007b; Vizziano et al., 2008), una vez que el *sdv* se expresa en los futuros machos. Sin embargo, en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), en el medaka (*Oryzias latipes*), en el lebiges (*Poecilia reticulata*), en la *Poecilia latipinna* y en el platy (*Xiphophorus maculatus*) el potencial de producción de andrógenos 11-oxigenados es detectado luego de la aparición de los primeros signos de diferenciación morfológica de la gónada (Nakamura et al., 1998b; Ijiri et al., 2008a). El *cyp11c1* es uno de los genes más utilizados como marcador de síntesis de andrógenos 11-oxigenados (Vizziano et al., 2007b; Ijiri et al., 2008a; Blasco et al., 2010), y como marcador de la célula de Leydig (Khatun, 2013). Este codifica la enzima 11 β -hidroxilasa. El estudio de expresión de *cyp11c1* a nivel gonadal en el período comprendido entre los 3 y 6 meses de edad en el esturión Siberiano, muestra que la

mayor expresión ocurre a los 3 meses de edad, coincidiendo con el inicio del período de diferenciación molecular del sexo en el esturión. Esto muestra la importancia de una potencial producción muy temprana de andrógenos 11-oxigenados en los esturiones, como se reportó en el pejerrey (Hattori et al., 2009). A su vez, estudios previos han demostrado que durante el período de diferenciación del sexo la receptividad a los andrógenos en la gónada del esturión siberiano ya existiría ya que existe una expresión clara de los receptores a los andrógenos (Vizziano-Cantonnet et al., 2016). Todo indica que habría producción y receptividad de andrógenos en forma temprana durante el desarrollo gonadal del esturión siberiano.

IV.2- *foxl3* durante el desarrollo gonadal

El *Foxl3* pertenece a la familia de factores de transcripción con dominio Forkhead Box (FOX) de unión al ADN, y surge a consecuencia de la duplicación completa del genoma en la base de los vertebrados (Dehal et al., 2005) a partir del gen ancestral *foxl2/3* (Bertho et al., 2016). Mientras que *foxl2* es considerado un factor clave en la diferenciación del ovario y ovogénesis en peces (Guiguen et al., 2010; Li et al., 2013) y la gran variabilidad en los patrones de expresión de su gen parálogo *foxl3* hacen que su rol no esté bien comprendido.

Existen muy pocos estudios sobre el *foxl3* y su papel en la diferenciación sexual de peces. Los patrones de expresión en truchas muestran que este gen se activa varios días después del *foxl2* y de la *aromatasa* durante la diferenciación molecular del sexo femenina, que ocurre previa a la diferenciación morfológica del sexo (Baron et al., 2004; Vizziano et al., 2007). En un primer momento se lo relacionó con la entrada en meiosis de las células germinales femeninas (Baron et al., 2004). El *foxl3* se mantiene claramente reprimido durante el desarrollo masculino de truchas (Baron et al., 2004; Vizziano et al., 2007). A su vez y en concordancia con lo que ocurre con otros genes femeninos (*foxl2*, *aromatasa*) el *foxl3* es fuertemente reprimido por los andrógenos-11 oxigenados para inducir la transdiferenciación

de ovario a testículo (Vizziano et al., 2008). A diferencia del *foxl2* y la *aromatasa*, que se localizan en células somáticas (Vizziano et al., 2007; Guiguen et al., 2010), no se localizó en un inicio en qué tipos celulares se expresaba el *foxl3*. Todo esto indicaba un papel del *foxl3* en la diferenciación femenina. Sin embargo, estudios posteriores desarrollados en medaka (*Oryzias latipes*) mostraron que el *foxl3* se localiza en las células germinales y que se mantiene expresado en aquellas células que realizan mitosis, pero no en aquellas quiescentes o en ovocitos que entraron en meiosis (Nishimura et al., 2015). A su vez, estos autores muestran que el *foxl3* se puede detectar en las hembras, pero es reprimido en los machos luego de la diferenciación sexual, y que la delección del *foxl3* (*foxl3*^{-/-}) induce el desarrollo de espermatogénesis en un ovario, suprimiendo la línea germinal femenina (Nishimura et al., 2015). Todo ello indica que la represión del *foxl3* es clave en la determinación del sexo de las células germinales y que se mantiene activado en la vía de desarrollo femenino reprimiendo la espermatogénesis (Nishimura et al., 2015). El estudio de expresión de *foxl3* en la gónada del esturión Siberiano durante el período comprendido entre los 3 y 6 meses de edad muestra que el pico de mayor expresión es a los 3 meses, coincidiendo con el inicio de la diferenciación molecular del sexo para el especie en las condiciones de cultivo en Uruguay (Vizziano-Cantonnet et al., 2016). Esto está de acuerdo con la activación del *foxl3* durante el período de diferenciación sexual de hembras de truchas (Baron et al., 2004; Vizziano et al., 2007) y con la posibilidad de que el *foxl3* juegue también un papel en la diferenciación sexual del esturión Siberiano. A nivel individual, se pudo ver que hay dos clases de individuos, unos con alta expresión de *foxl3* y otros con niveles más bajos en comparación con los primeros a los 3 y a los 5 meses, sugiriendo que la activación del *foxl3* estaría indicando el inicio de la diferenciación femenina.

Si se analizan en conjunto los niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* a nivel individual se encuentra un patrón opuesto de expresión entre estos genes, el cual a su vez permite agrupar a los individuos de 3 y 5 meses en dos clases donde los niveles de expresión de ambos

genes difieren significativamente entre sí. La desregulación de *foxl3* por parte de los andrógenos 11-oxigenados, particularmente 11-KT como mecanismo masculinizante de la gónada es la hipótesis que nos planteamos para el esturión siberiano y el patrón opuesto de expresión entre ambos genes a los 3 meses va en acuerdo con esta idea. Sin embargo, la ausencia de represión del *foxl3* por parte de la 11KT no permitió sustentar esta idea. Es de destacar que como ya mencionamos más arriba en ‘Potencialidad de producción temprana de andrógenos’ existe la potencialidad de producir andrógenos 11-oxigenados en las etapas bien tempranas del desarrollo gonadal del esturión Siberiano, así como la receptividad a los andrógenos, de modo que este no sería un argumento para descartar la falta de efecto de los andrógenos sobre el *foxl3*. Respecto de las dosis utilizadas, el modo de aplicación y los tiempos seleccionados, en trabajos en paralelo con estrógenos realizados en el Laboratorio usando dosis, modos de aplicación y tiempos similares se obtuvieron resultados de regulación muy claros y significativos sobre otros genes como el *foxl2*. En esta Tesis y como control (resultados en Anexo 1) se analizó el efecto del tratamiento de 11KT sobre el *foxl2*, y no hubo una represión de este gen femenino por los andrógenos como se esperaba. Posiblemente tratamientos más drásticos como los que se usan para invertir el sexo tengan un efecto inhibitorio del *foxl3*, como fue demostrado en tratamientos de inversión (Vizziano et al., 2008).

Por otra parte, estudios recientes, muestran un comportamiento de *foxl3* durante el período de diferenciación del sexo opuesto el observado hasta entonces en los modelos animales estudiados. Por un lado dos variantes de *foxl3* (*foxl3a* y *foxl3b*), fueron descritas en *Anguilla japonica*, y aunque insensibles a los tratamientos con 11-KT efectuados, ambas presentan mayor expresión en la vía masculina de diferenciación de la gónada, aparentemente en la célula germinal, y son desreguladas en tratamientos con estrógenos (E2), sugiriendo un rol protagónico en el destino sexual de la línea germinal (Wu et al., 2019). El otro caso de estudio corresponde a la especie hermafrodita (protogínico) *Epinephelus coioides*, donde la expresión de *foxl3* también predomina en la vía masculina de diferenciación. En este caso su

expresión resultó ser estimulada por los andrógenos (mientras que *foxl2* fue inhibido) (Lyu et al., 2019). Los estudios de la expresión del *foxl3* durante la gametogénesis temprana que se discuten más adelante tampoco permiten concluir sobre una activación del *foxl3* en la vía masculina como se está proponiendo más recientemente.

Dado que no tenemos marcadores del sexo a nivel del ADN genómico, no podemos confirmar la vía de desarrollo sexual que están tomando los individuos con *foxl3* activado y *cyp11c* reprimido y viceversa. A pesar de ello, algunos resultados del Laboratorio, nos hacen dudar si los individuos con *foxl3* activado son realmente futuras hembras. Por un lado el estudio del transcriptoma durante la diferenciación sexual, no mostró una activación del *foxl3*, en las futuras hembras identificadas por los marcadores femeninos *foxl2* y *aromatasa* (Vizziano-Cantonnet et al., 2018 a, b). Además, los mismos individuos estudiados en esta Tesis fueron evaluados en otra Tesis en curso (André Lasalle) usando el *foxl2* y la *aromatasa* como marcadores femeninos y los patrones de expresión son discordantes con los de *foxl3*. Es de destacar que los genes relacionados con la producción de estradiol (*aromatasa* y *foxl2*) están ampliamente validados como marcadores de la diferenciación ovárica en peces (ver revisiones de Piferrer et al., 2008; Guiguen et al., 2010), mientras que para el *foxl3* los patrones femeninos durante la diferenciación del sexo se han visto muy poco estudiados (Vizziano et al., 2007; Nishimura et al., 2015) y que en forma muy reciente se comienza a considerarlos como masculinos (Lyu et al., 2019).

Solamente, el descubrimiento de un marcador del sexo genético permitirá dirimir esta problemática. El Laboratorio se encuentra en esa búsqueda a través de estudios de RAD-sequencing en el esturión siberiano.

IV.3- *foxl3* y *cyp11c* durante la gametogénesis temprana

Los estudios de expresión de *foxl3* en esta etapa del desarrollo mostraron mayor expresión en el ovario pre-vitelogénico si se lo compara con el testículo inmaduro del esturión Siberiano.

Esto se asemeja a lo observado en trucha arcoíris donde *foxl3* alcanza su pico de expresión justo antes y durante la meiosis del ovocito mientras que en testículo permanece indetectable (Baron et al., 2004) y se distingue del comportamiento en medaka donde no hay expresión de *foxl3* en células germinales en meiosis (ovocitos) ni tampoco en testículo, por tratarse de un factor supresor de la espermatogénesis en este modelo (Nishimura et al., 2015b). A su vez en *Salmo salar* (salmón del atlántico), *Dicentrarchus labrax* (lúrina) y *Monopterus albus* (anguila del arrozal) y *Anguilla japonica*, el patrón de expresión de *foxl3* es distinto a los anteriores, con mayor presencia de transcritos en testículo que en ovario (von Schalburg et al., 2011; Crespo et al., 2013; Gao et al., 2016; Wu et al., 2019). Particularmente en lúrina se vio que la expresión de *foxl3* varía durante la espermatogénesis, alcanzando valores máximos en testículos inmaduros y valores mínimos al inicio de la meiosis (Crespo et al., 2013). Los resultados sugieren que el *foxl3* estaría involucrado en el inicio de la meiosis en la hembra (Baron et al., 2004) y regulando el desarrollo testicular en machos (Crespo et al., 2013). Los resultados en esturión sugieren que *foxl3* estaría implicado en el desarrollo del ovocitario, pero no tenemos datos sobre el inicio de la meiosis en los testículos como para ver si los niveles de expresión del *foxl3* reportados son reprimidos en este período como se estableció anteriormente en otras especies (Crespo et al., 2013).

El rol de los andrógenos 11-oxigenados en la gónada diferenciada de peces teleósteos parece estar bastante dilucidado. Aunque aún se desconocen los mecanismo de acción, (ya que la línea germinal no expresa receptor de andrógenos, (de Castro Assis et al., 2018), en testículos, particularmente la 11-ketosterona actúa como inductor de la espermatogénesis en salmón atlántico (Melo et al., 2014), *Clarias gariepinus* (bagre africano) (Cavaco et al., 1998), *Danio rerio* (pez cebra) (de Castro Assis et al., 2018) y *Anguilla japonica* (T Miura et al., 1991). Por otra parte la 11-KT también tiene un rol importante en el ovario, encontrándose que estimula el crecimiento y desarrollo de los ovocitos durante la vitelogénesis temprana en varios tipo de anguila (Matsubara, 2001; Sbahi et al., 2001; Lokman et al., 2007; Divers et al.,

2010; Kazeto et al., 2011), así como *Gadus morhua* (bacalao) (Kortner et al., 2009) y *Oncorhynchus kisutch* (salmón coho) (Forsgren et al., 2010), aparentemente mediante la sensibilización del ovario a los efectos de la hormona folículo estimulante (FSH) al estimular la expresión de los receptores de FSH (Setiawan et al., 2012).

Al igual que para *foxl3*, los estudios de expresión de *cyp11c1* en esta etapa del desarrollo mostraron mayor expresión en el ovario pre-vitelogénico que en testículo inmaduro del esturión Siberiano, concordando con trabajos previos para la especie (Cuisset et al. (1995); y sugiriendo que los andrógenos 11-oxigenados podrían incidir en la regulación del *foxl3* en hembras en las primeras etapas de la gametogénesis como se está planteando en anguilas, bacalao y salmones (Matsubara, 2001; Sbaihi et al., 2001; Lokman et al., 2007; Kortner et al., 2009; Divers et al., 2010; Forsgren et al., 2010; Kazeto et al., 2011).

V.- Conclusiones

Esta tesis formó parte del esfuerzo por comprender si el *foxl3* está involucrado en la diferenciación sexual del esturión Siberiano, en particular si su represión por andrógenos se relaciona con la vía de desarrollo masculino antes de la diferenciación sexual.

Se caracterizó por primera vez para esturiones en general: 1.- la identidad del *foxl3* y de la *cyp11c* a través de estudios de filogenia, 2.- la expresión en gónada de los genes *foxl3* y *cyp11c1* durante el período de diferenciación molecular del sexo y etapas posteriores, 3.-la posible regulación del *foxl3* por parte de los andrógenos. A pesar de ello no se pudo confirmar la hipótesis de trabajo dado que por un lado no se pudo identificar en forma completamente certera el sexo de los animales indiferenciados, y el otro no se pudo confirmar su represión por parte de la 11KT.

VI.- Bibliografía consultada

- Abdi, H. et al. (2007) Lilliefors/Van Soest's test of normality. *Encyclopedia of measurement and statistics*, 540-544.
- Adams, I. R. et al. (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, **129**, 1155-1164.
- Baker, I. J. et al. (1988) Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17 α -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*, **72**, 359-367.
- Baroiller, J.-F. et al. (2009) Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **153**, 30-38.
- Baroiller, J.-F. et al. (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and molecular life sciences*, **55**, 910-931.
- Baron, D. et al. (2004) An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of molecular endocrinology*, **33**, 705-715.
- Barrios, F. et al. (2010) Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on *Nanos2* expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of Cell Science*, **123**, 871-880.
- Berbejillo, J. et al. (2012) Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular reproduction and development*, **79**, 504-516.
- Bertho, S. et al. (2016) Foxl2 and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation. *Sexual Development*, **10**, 111-129.
- Blasco, M. et al. (2010) Molecular characterization of cyp11a1 and cyp11b1 and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **156**, 110-118.
- Blasco, M. et al. (2013) Presence of 11-ketotestosterone in pre-differentiated male gonads of *Odontesthes bonariensis*. *Fish physiology and biochemistry*, **39**, 71-74.
- Borg, B. (1994) Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **109**, 219-245.
- Bowles, J. et al. (2007) Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*, **134**, 3401-3411.
- Brennan, J. et al. (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 509.
- Cavaco, J. E. B. et al. (1998) Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **275**, R1793-R1802.
- Conover, D. O. et al. (1986) Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, **43**, 514-520.
- Conte, F. S. (1988) *Hatchery manual for the White Sturgeon (Acipenser transmontanus Richardson): with application to other North American Acipenseridae*. UCANR Publications.
- Crespo, B. et al. (2013) foxl2 and foxl3 are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts. *General and comparative endocrinology*, **194**, 81-93.
- Cui, Z. et al. (2017) Genome editing reveals dmrt1 as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, **7**, 42213.
- Cuisset, B. et al. (1995) Occurrence and in vitro biosynthesis of 11-ketotestosterone in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt maturing females. *Fish Physiology and Biochemistry*, **14**, 313-322.

- Cutting, A.et al. (2013) Just how conserved is vertebrate sex determination? *Developmental Dynamics*, **242**, 380-387.
- Chen, X.et al. (2006) Observations on the formation and development of the primary germinal tissue of cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, **22**, 358.
- Dai, X.et al. (2015) Sufficient numbers of early germ cells are essential for female sex development in zebrafish. *PLoS one*, **10**, e0117824.
- Dawyndt, P.et al. (2006) UPGMA clustering revisited: A weight-driven approach to transitive approximation. *International Journal of Approximate Reasoning*, **42**, 174-191.
- de Castro Assis, L. H.et al. (2018) Estrogen-induced inhibition of spermatogenesis in zebrafish is largely reversed by androgen. *Journal of molecular endocrinology*, **60**, 273-284.
- Dehal, P.et al. (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS biology*, **3**, e314.
- Devlin, R. H.et al. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, **208**, 191-364.
- Divers, S. L.et al. (2010) Effects of reproductive stage and 11-ketotestosterone on LPL mRNA levels in the ovary of the shortfinned eel. *Journal of lipid research*, **51**, 3250-3258.
- Fedorov, K.et al. (1990) Secretory cells in the gonads of the young sterlet *Acipenser ruthenus* during sex differentiation. *Vopr. Ikhtiol*, **30**, 65-75.
- Feist, G.et al. (1995) The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, **131**, 145-152.
- Felsenstein, J.et al. (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer associates Sunderland, MA.
- Flynn, S.et al. (2007) Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* Lesueur. *Journal of Fish Biology*, **70**, 1027-1044.
- Flynn, S.et al. (2006) Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*, **253**, 721-727.
- Fopp-Bayat, D. (2010) Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*, **305**, 174-177.
- Forsgren, K.et al. (2010) The regulatory role of sex steroids during primary growth of ovarian follicles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In *Proceedings of the INTEGRATIVE AND COMPARATIVE BIOLOGY*, pp. E54-E54. OXFORD UNIV PRESS INC JOURNALS DEPT, 2001 EVANS RD, CARY, NC 27513 USA.
- Gao, Y.et al. (2016) Foxl3, a Target of miR-9, Stimulates Spermatogenesis in Spermatogonia During Natural Sex Change in *Monopterus albus*. *Endocrinology*, **157**, 4388.
- Geraldo, M.et al. (2013) The discovery of Foxl2 paralogs in chondrichthyan, coelacanth and tetrapod genomes reveals an ancient duplication in vertebrates. *Heredity*, **111**, 57.
- Ghafoory, S.et al. (2012) A fast and efficient polymerase chain reaction-based method for the preparation of in situ hybridization probes. *Histopathology*, **61**, 306-313.
- Godin, I.et al. (1990) Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*, **108**, 357-363.
- Goto, R.et al. (2012) Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Developmental biology*, **370**, 98-109.
- Grandi, G.et al. (2007) Gonadogenesis in early developmental stages of *Acipenser naccarii* and influence of estrogen immersion on feminization. *Journal of Applied Ichthyology*, **23**, 3-8.
- Guiguen, Y.et al. (1999) Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **54**, 154-162.
- Guiguen, Y.et al. (2010) Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and comparative endocrinology*, **165**, 352-366.
- Hacker, A.et al. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*, **121**, 1603-1614.

- Hattori, R. S.et al. (2009) Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLOS one*, **4**, e6548.
- Herpin, A.et al. (2011a) Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *The FEBS journal*, **278**, 1010-1019.
- Herpin, A.et al. (2011b) Sex determination: switch and suppress. *Current Biology*, **21**, R656-R659.
- Herpin, A.et al. (2011c) Vertebrate sex determination: questioning the hierarchy. *The FEBS journal*, **278**, 1001-1001.
- Heule, C.et al. (2014) Genetics of sexual development: an evolutionary playground for fish. *Genetics*, **196**, 579-591.
- Hobbs, J.et al. (2004) Social induction of maturation and sex determination in a coral reef fish. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **271**, 2109-2114.
- Hurvitz, A.et al. (2007) Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*, **270**, 158-166.
- Ijiri, S.et al. (2008a) Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of reproduction*, **78**, 333-341.
- Ijiri, S.et al. (2008b) Sexual Dimorphic Expression of Genes in Gonads During Early Differentiation of a Teleost Fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* 1. *Biology of reproduction*, **78**, 333-341.
- Jorgensen, A.et al. (2014) Regulation of meiotic entry and gonadal sex differentiation in the human: normal and disrupted signaling. *Biomol Concepts*, **5**, 331-341.
- Kamiya, T.et al. (2012) A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genetics*, **8**, e1002798.
- Kato, Y.et al. (2016) Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. **7**, 11272.
- Kaufmann, J.et al. (2014) Analysis of variance ANOVA. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*.
- Kazeto, Y.et al. (2011) Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **127**, 149-154.
- Keyvanshokoo, S.et al. (2010) A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture research*, **41**, e1-e7.
- Khatun, M. M. (2013) Identification of gonial stem cells and Leydig cells in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) reporter strains.
- Kikuchi, M.et al. (2019) Novel components of germline sex determination acting downstream of foxl3 in medaka. *Dev Biol*, **445**, 80-89.
- Kobayashi, Y.et al. (2013) Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sexual Development*, **7**, 115-125.
- Kortner, T. M.et al. (2009) Previtellogenic oocyte growth and transcriptional changes of steroidogenic enzyme genes in immature female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after exposure to the androgens 11-ketotestosterone and testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **152**, 304-313.
- Li, M.-H.et al. (2013) Antagonistic roles of Dmrt1 and Foxl2 in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs. *Endocrinology*, **154**, 4814-4825.
- Liew, W. C.et al. (2012) Polygenic sex determination system in zebrafish. *PloS one*, **7**, e34397.
- Liu, S.et al. (2000) Expression of cytochrome P450 11 β (11 β -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **75**, 291-298.
- Lokman, P. M.et al. (2007) 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, in vitro. *Reproduction*, **133**, 955-967.

- Lyu, Q.et al. (2019) Expression profiles of dmrt and foxl3 during gonadal development and sex reversal induced by 17 α -methyltestosterone in the orange-spotted grouper. *General and comparative endocrinology*, **274**, 26-36.
- Matsubara, H. (2001) Changes in the expression of steroidogenic enzyme genes in the Japanese eel ovary during artificial maturation. In *Proceedings of the Proceedings of the International Symposium in Advances in Eel Biology, 28-30 September 2001*, pp. 213-215. The University of Tokyo.
- Matsuda, M.et al. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**, 559.
- McCormick, C.et al. (2008) Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Journal of Applied Ichthyology*, **24**, 643-645.
- Melo, M. C.et al. (2014) Salinity and photoperiod modulate pubertal development in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *The Journal of endocrinology*, **220**, 319-332.
- Miura, S.et al. (2008) Immunohistochemical evidence for 11 β -hydroxylase (P45011 β) and androgen production in the gonad during sex differentiation and in adults in the protandrous anemonefish *Amphiprion clarkii*. *Zoological science*, **25**, 212-220.
- Miura, T.et al. (2003) Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, **28**, 181-186.
- Miura, T.et al. (1991) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 5774-5778.
- Nace, G. W.et al. (1970) Parthenogenesis and genetic variability. I. Linkage and inbreeding estimations in the frog, *Rana pipiens*. *Genetics*, **66**, 349.
- Nagy, A.et al. (1981) Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **38**, 725-728.
- Nakamura, M.et al. (1998a) Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, **281**, 362-372.
- Nakamura, M.et al. (1998b) Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, **281**, 362-372.
- Navarro-Martín, L.et al. (2011) DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS genetics*, **7**, e1002447.
- Nieuwkoop, P. D.et al. (1979) *Primordial germ cells in the chordates: embryogenesis and phylogenesis*. CUP Archive.
- Nishimura, T.et al. (2015a) foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science*, **aaa2657**.
- Nishimura, T.et al. (2015b) foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science*, **349**, 328-331.
- Nishimura, T.et al. (2016) The mechanism of germline sex determination in vertebrates. *Biology of reproduction*, **95**, 30, 31-36.
- Ohmura, M.et al. (2004) Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Archives of histology and cytology*, **67**, 285-296.
- Okutsu, T.et al. (2006) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 2725-2729.
- Omoto, N.et al. (2005) Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female $\times$ *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture*, **245**, 39-47.
- Pandian, T.et al. (1995) Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, **138**, 1-22.
- Piferrer, F.et al. (1989) Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, **77**, 251-262.

- Piferrer, F. et al. (2008) Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, **16**, 35-55.
- Römer, U. et al. (1996) Environmental determination of sex in Apistogrammai (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, **48**, 714-725.
- Ruxton, G. D. (2006) The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behavioral Ecology*, **17**, 688-690.
- Rzepkowska, M. et al. (2014) Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*, **6**, 75-88.
- Rzepkowska, M. et al. (2014) Intersex gonad differentiation in cultured Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon. *Biology of reproduction*, **90**.
- Saito, D. et al. (2007) Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Dev Biol*, **310**, 280-290.
- Saitou, N. et al. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, **4**, 406-425.
- Sbaihi, M. et al. (2001) Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the Europe eel. *Journal of Fish Biology*, **59**, 302-318.
- Schultz, B. B. (1985) Levene's test for relative variation. *Systematic Zoology*, **34**, 449-456.
- Setiawan, A. N. et al. (2012) Androgen-specific regulation of FSH signalling in the previtellogenic ovary and pituitary of the New Zealand shortfinned eel, *Anguilla australis*. *General and comparative endocrinology*, **176**, 132-143.
- Shinomiya, A. et al. (2003) Sex reversal of genetic females (XX) induced by the transplantation of XY somatic cells in the medaka, *Oryzias latipes*. *International Journal of Developmental Biology*, **46**, 711-717.
- Simide, R. et al. (2018) Evolution of Molecular Investigations on Sturgeon Sex Determination and Most Recent Developments in DNA Methylation with a Focus on the Siberian Sturgeon. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology*, pp. 71-91. Springer.
- Simontacchi, C. et al. (2009) Whole-body concentrations of cortisol and sex steroids in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*, Richardson 1836) during early development and stress response. *Aquaculture international*, **17**, 7-14.
- Tanaka, M. (2016) Germline stem cells are critical for sexual fate decision of germ cells. *Bioessays*, **38**, 1227-1233.
- Van Eenennaam, A. et al. (1999) Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity*, **90**, 231-233.
- Vargha, A. et al. (1998) The Kruskal-Wallis test and stochastic homogeneity. *Journal of Educational and behavioral Statistics*, **23**, 170-192.
- Vizziano-Cantonnet, D. et al. (2018) Sex Determination and Differentiation of the Siberian Sturgeon. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology*, pp. 93-113. Springer.
- Vizziano-Cantonnet, D. et al. (2018) De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and comparative endocrinology*, **268**, 96-109.
- Vizziano-Cantonnet, D. et al. (2016) Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular reproduction and development*, **83**, 19-36.
- Vizziano, D. et al. (2008) Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biology of reproduction*, **78**, 939-946.
- Vizziano, D. et al. (2007a) Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, **236**, 2198-2206.

- Vizziano, D. et al. (2007b) Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **236**, 2198-2206.
- von Schalburg, K. R. et al. (2011) Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon. *BMC genomics*, **12**, 31.
- Wong, T.-T. et al. (2011) Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biology of reproduction*, **84**, 1190-1197.
- Wu, G.-C. et al. (2019) The germline-specific expression of Foxl3a and its paralogous Foxl3b are associated with male gonadal differentiation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *General and comparative endocrinology*.
- Wuertz, S. et al. (2006) Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*, **258**, 685-688.
- Wuertz, S. et al. (2018) Sex determination in sturgeon. *Sex Control in Aquaculture*, 645-668.
- Yamamoto, T.-O. (1969) Sex Differentiation. In *Fish physiology*, pp. 117-175. Elsevier.
- Yamamoto, T. O. et al. (1968) Sex hormone induction of sex reversal in the goldfish and evidence for male heterogamity. *Journal of Experimental Zoology*, **168**, 215-221.
- Yamamoto, Y. et al. (2014) Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PLoS One*, **9**, e102574.
- Yano, A. et al. (2013) The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary applications*, **6**, 486-496.
- Yoshizaki, G. et al. (2010) Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, dev. 044982.

Anexo I Resultados estadísticos

Niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* en gónadas de individuos indiferenciados de 3, 4, 5 y 6 meses de edad.

Prueba de Normalidad para el conjunto de expresión en 3, 4, 5 y 6 meses para *foxl3* (n=120) y *cyp11c1* (n=120): Test de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov)

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: 6,22E-017 ; p-Value *cyp11c1*: 1,3E-044

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula, los valores de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* no tienen distribución Normal.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas entre los grupos (3, 4, 5 y M): Test de Levene

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: (Levene test (median): 0,0009 ; p-Value *cyp11c1*: (Levene test (median): 1,33E-06

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula, no hay homogeneidad de varianza entre grupos para *foxl3* y *cyp11c1*.

Kruskal-Wallis test

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: 3,916E-15 < 0,05; p-Value *cyp11c1*: 4,106E-15 < 0,05

Mann-Whitney test

Foxl3

	<i>foxl3</i> 3M	<i>foxl3</i> 4M	<i>foxl3</i> 5M	<i>foxl3</i> 6M
<i>foxl3</i> 3M		0,009581	1,39E-05	1,812E-10
<i>foxl3</i> 4M	0,009581		1	5,438E-07
<i>foxl3</i> 5M	1,39E-05	1		1,566E-09
<i>foxl3</i> 6M	1,812E-10	5,438E-07	1,566E-09	

cyp11c1

	<i>cyp11c1</i> 3M	<i>cyp11c1</i> 4M	<i>cyp11c1</i> 5M	<i>cyp11c1</i> 6M
<i>cyp11c1</i> 3M		1,103E-08	0,0003364	2,292E-09
<i>cyp11c1</i> 4M	1,103E-08		0,0001885	0,03186
<i>cyp11c1</i> 5M	0,0003364	0,0001885		8,157E-07
<i>cyp11c1</i> 6M	2,292E-09	0,03186	8,157E-07	

Tabla 1. Resultado test Mann-Whitney con corrección por Bonferroni entre grupos (meses) para *foxl3* y *cyp11c1*.

Las celdas pintadas de rosado indican entre que grupos hay diferencia significativa (p-Value < 0,025).

Niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* durante diferentes estadios de desarrollo posteriores a la diferenciación morfológica del sexo.

Prueba de Normalidad para el conjunto de expresión en ov II, ov III y ov IV para *foxl3* (n=29) y *cyp11c1* (n=29): Test de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov)

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: 0,00029 ; p-Value *cyp11c1*: 7,53E-006

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula, los valores de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* no tienen distribución Normal.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas entre los grupos (ov II, ov III y ov IV): Test de Levene

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: Levene test (median): 0,016 ; p-Value *cyp11c1*: Levene test (median): 0,1859

Conclusión: *foxl3*: se rechaza la hipótesis nula, no hay homogeneidad de varianza entre grupos.
cyp11c1: no se rechaza la hipótesis nula, hay homogeneidad de varianza entre grupos.

foxl3

Kruskal-Wallis test

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: 0,041 < 0,05;

Mann-Whitney test

	II	III	IV
II		1	0,09146
III	1		0,1129
IV	0,09146	0,1129	

Tabla 2. Resultado test Mann-Whitney con corrección por Bonferroni entre grupos (meses) para *foxl3*. No hay diferencia significativa entre grupos (p-Value < 0,025).

cyp11c1

Análisis de Varianza

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	56,2213	2	28,1106	2,115	0,1409
Within groups:	345,564	26	13,2909		
Total:	401,785	28			

Tabla 3. Resultado test ANOVA entre grupos (meses) para *cyp11c1*. No hay diferencia significativa entre grupos (p-Value > 0,05).

Prueba de Normalidad para el conjunto de expresión en testículos 10 meses, 11 meses y 14 meses para *foxl3* (n=10) y *cyp11c1* (n=10): Test de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov)

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: 2,71E-007 ; p-Value *cyp11c1*: 0,427

Conclusión: *foxl3*: Se rechaza la hipótesis nula, los valores no tienen distribución Normal.
cyp11c1: no se rechaza la hipótesis nula, los valores tienen distribución Normal.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas entre los grupos 10 meses, 11 meses y 14 meses: Test de Levene

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: (Levene test (median): 0,67 ; p-Value
cyp11c1: (Levene test (median): 0,46

Conclusión: *foxl3* y *cyp11c1*: no se rechaza la hipótesis nula, hay homogeneidad de varianza entre grupos.

foxl3

Análisis de Varianza

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,191	2	0,595501	0,3893	0,6914
Within groups:	10,7085	7	1,52979		
Total:	11,8995	9			

Tabla 4. Resultado test ANOVA entre grupos (meses) para *foxl3*. No hay diferencia significativa entre grupos (p-Value > 0,05).

cyp11c1

Análisis de Varianza

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,00145183	2	0,000725917	0,5441	0,6031
Within groups:	0,00933917	7	0,00133417		
Total:	0,010791	9			

Tabla 5. Resultado test ANOVA entre grupos (meses) para *cyp11c1*. No hay diferencia significativa entre grupos (p-Value > 0,05).

Comparativa expresión de *foxl3* y *cyp11c1* entre ovocito previtelogénico y testículo inmaduro.

Prueba de Normalidad para el conjunto de expresión en ovocitos previtelogénicos y testículos inmaduros *foxl3* (n=19) y *cyp11c1* (n=19): Test de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov)

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: 0,00036 ; p-Value *cyp11c1*: 2,298E-005

Conclusión: *foxl3* y *cyp11c1*: Se rechaza la hipótesis nula, los valores no tienen distribución Normal.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas entre los grupos ovocitos previtelogénicos y testículos inmaduros: Test de Levene

Alpha: 0,05 ; p-Value *foxl3*: Levene test (median): 0,051 ; p-Value

cyp11c1: Levene test (median): 0,053

Conclusión: *foxl3* y *cyp11c1*: no se rechaza la hipótesis nula, hay homogeneidad de varianza entre grupos.

*foxl3*Análisis de Varianza

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	18,5883	1	18,5883	5,473	0,03177
Within groups:	57,7364	17	3,39626		Permutation p (n=99999)
Total:	76,3247	18			0,02557

Tabla 6. Resultado test ANOVA entre grupos para *foxl3*. Hay diferencia significativa entre grupos (p-Value > 0,05).

*cyp11c1*Análisis de Varianza

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	121,034	1	121,034	7,046	0,01669
Within groups:	292,031	17	17,1783		Permutation p (n=99999)
Total:	413,065	18			3E-05

Tabla 7. Resultado test ANOVA entre grupos (meses) para *cyp11c1*. Hay diferencia significativa entre grupos (p-Value > 0,05).

Validación mediante análisis discriminante de los grupos formados por clustering a partir de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* para 3, 4, 5 y 6 meses de edad.

	1	2	Total	Pillai trace:	0,5706
3M	1	15	16	df1:	2
	2	1	14	df2:	27
	Total	16	30	F:	17,94
				p (same):	1,105E-05

93.3 % de los individuos (n= 30) correctamente clasificados. Los Individuos 9 y 12 fueron incorrectamente clasificados.

	1	2	Total	Pillai trace:	0,2933
4M	1	25	27	df1:	2
	2	2	3	df2:	27
	Total	27	30	F:	5,603
				p (same):	0,009218

86.67 % de los individuos (n= 30) correctamente clasificados. Los Individuos 2, 9, 25 y 24 fueron incorrectamente clasificados.

5M		1	2	Total	Pillai trace: 0,2996 df1: 2 df2: 27 F: 5,774 p (same): 0,008171
	1	18	1	19	
	2	5	6	11	
	Total	23	7	30	

80 % de los individuos (n= 30) correctamente clasificados. Los Individuos 4, 12, 15, 16, 22 y 27 fueron incorrectamente clasificados.

6M		1	2	Total	Pillai trace: 0,3264 df1: 2 df2: 27 F: 6,541 p (same): 0,004825
	1	21	0	21	
	2	7	2	9	
	Total	28	2	30	

76.67 % de los individuos (n= 30) correctamente clasificados. Los Individuos 9, 11, 18, 20, 21, 28, 30, fueron incorrectamente clasificados.

Comparación niveles de expresión de *foxl3* y *cyp11c1* entre grupos formados por clustering a partir de expresión para 3, 4, 5 y 6 meses de edad.

3M:

cyp11c1 G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,0002461
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,008483
Mann-Whitn <i>U</i> : 15		
<i>z</i> : -4,0116	<i>p</i> (same med.):	6,0319E-05
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same med.):	0,0001

foxl3 G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,2856
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,2603
<i>t</i> : -4,0092	<i>p</i> (same mean):	0,00041
Uneq. var. <i>t</i> : -3,9588	<i>p</i> (same mean):	0,00053781
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same mean):	0,0003

4M:*cyp11c1* G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,0005501
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,05981
Mann-Whitn <i>U</i> : 19		
<i>z</i> : -1,455	<i>p</i> (same med.):	0,14568
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same med.):	0,1507

foxl3 G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,07312
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,2631
<i>t</i> : 1,2618	<i>p</i> (same mean):	0,21743
Uneq. var. <i>t</i> : 3,7097	<i>p</i> (same mean):	0,00090994
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same mean):	0,1319

5M:*cyp11c1* G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,01544
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,112
Mann-Whitn <i>U</i> : 24		
<i>z</i> : -3,4429	<i>p</i> (same med.):	0,00057547
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same med.):	0,0001

foxl3 G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,01907
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,08694
Mann-Whitn <i>U</i> : 54		
<i>z</i> : -2,1518	<i>p</i> (same med.):	0,031411
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same med.):	0,0305

6M:*cyp11c1* G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	2,965E-12
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,002886
Mann-Whitn <i>U</i> : 11		
<i>z</i> : -3,7563	<i>p</i> (same med.):	0,00017246
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same med.):	0,0001

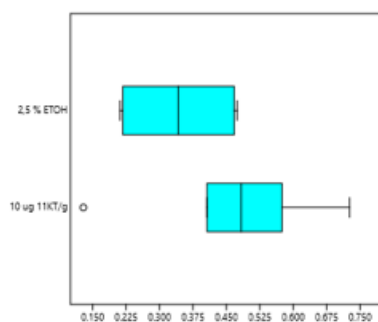
foxl3 G1vs G2

Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,00645
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,2279
Mann-Whitn <i>U</i> : 55		
<i>z</i> : -1,765	<i>p</i> (same med.):	0,077565
Monte Carlo permutation:	<i>p</i> (same med.):	0,0703

Ensayos de regulación hormonal

Ensayo de regulación hormonal de *foxl3* por 11-KTTratamiento 1

Duración: 6hs; Dosis empleada: 10µg/g

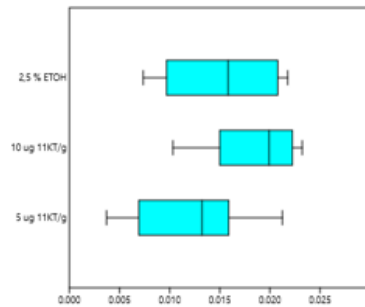


Levene's test for homogeneity of variance, from means	<i>p</i> (same):	0,7114	
Levene's test, from medians	<i>p</i> (same):	0,7124	
<i>t</i> :	1,7427	<i>p</i> (same mean):	0,10693
Uneq. var. <i>t</i> :	1,7427	<i>p</i> (same mean):	0,11134
Monte Carlo permutations:		<i>p</i> (same mean):	0,1151
Exact permutation:		<i>p</i> (same mean):	0,1116
		Critical <i>t</i> value (<i>p</i> =0.05):	2,1788

Resultado test Student entre grupo tratado y control para *foxl3*. No hay diferencia significativa entre grupos (*p*-Value > 0,05).

Tratamiento 2

Duración: 24 hs; Dosis empleada: 5µg/g y 10µg/g



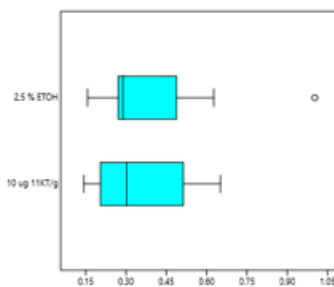
Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 0,437
 Levene's test, from medians p (same): 0,4237

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,000170845	2	8,54223E-05	2,843	0,08317
Within groups:	0,000570947	19	3,00498E-05		Permutation p (n=99999)
Total:	0,000741792	21			0,08665

Resultado test ANOVA entre grupos experimentales para *foxl3*. No hay diferencia significativa entre grupos (p -Value > 0,05).

Tratamiento 3

Duración: 6 días; Dosis empleada (total): 10µg/g



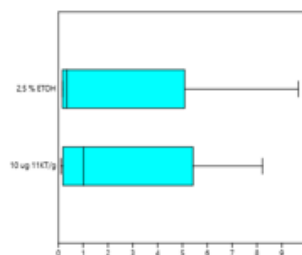
Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 0,4747
 Levene's test, from medians p (same): 0,8362

	t :	p (same mean):	Critical t value ($p=0.05$):
Uneq. var. t :	0,52528	0,60516	2,086
Monte Carlo permutation:	0,52528	0,60589	
Exact permutation:	0,6279	0,62732	

Resultado test Student entre grupo tratado y control para *foxl3*. No hay diferencia significativa entre grupos (p -Value > 0,05).

Ensayo de regulación hormonal de *foxl2* por 11-KTTratamiento 1

Duración: 6hs; Dosis empleada: 10µg/g



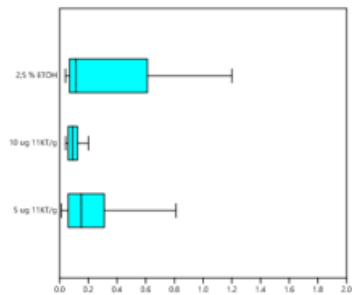
Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 0,7944
 Levene's test, from medians p (same): 0,9008

	t :	p (same mean):	Critical t value ($p=0.05$):
Uneq. var. t :	0,052085	0,95932	2,1788
Monte Carlo permutation:	0,052085	0,95933	
Exact permutation:	0,9351	0,9359	

Resultado test Student entre grupo tratado y control para *foxl2*. No hay diferencia significativa entre grupos (p -Value > 0,05).

Tratamiento 2

Duración: 24 hs; Dosis empleada: 5µg/g y 10µg/g



Levene's test for homogeneity of variance, from means
Levene's test, from medians

p (same): 0,01723
 p (same): 0,356

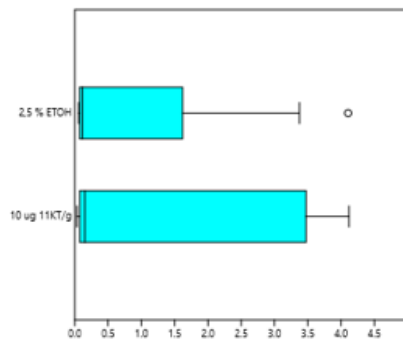
Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,175473	2	0,0877366	0,9585	0,4013
Within groups:	1,73918	19	0,0915356		Permutation p (n=99999)
Total:	1,91465	21			0,4829

Resultado test ANOVA entre grupos experimentales para *foxl2*. No hay diferencia significativa entre grupos (p -Value > 0,05).

Tratamiento 3

Duración: 6 días; Dosis empleada (total): 10µg/g



Levene's test for homogeneity of variance, from means
Levene's test, from medians

p (same): 0,377
 p (same): 0,7331

req. var. t : 0,32055
Monte Carlo permutation:
exact permutation:

p (same mean): 0,75188
 p (same mean): 0,75197
 p (same mean): 0,7793
 p (same mean): 0,78108

Critical t value ($p=0.05$): 2,086

Resultado test Student entre grupo tratado y control para *foxl2*. No hay diferencia significativa entre grupos (p -Value > 0,05).

Anexo II Figuras suplementarias

Estructura de cajas qPCR plataforma ABI 7500.

Caja 1												
Gónadas Ind 3M					Ovocitos estadio II							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	390	390	392	392	394	394	397	397	398	398	399	399
B	402	402	403	403	404	404	405	405	406	406	407	407
C	409	409	410	410	411	411	413	413	414	414	416	416
D	428	428	429	429	430	430	431	431	432	432	434	434
E	436	436	437	437	438	438	439	439	440	440	441	441
F	dil 1/10	dil 1/10	dil 1/20	dil 1/20	dil 1/40	dil 1/40	dil 1/80	dil 1/80	dil 1/160	dil 1/160	dil 1/320	dil 1/320
G	970	970	972	972	973	973	975	975	977	977	980	980
H	983	983	984	984	995	995			B	B	R	R
Caja 2												
Gónadas Ind 4M					Ovocitos estadio III							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	554	554	557	557	558	558	559	559	560	560	561	561
B	563	563	564	564	565	565	566	566	567	567	568	568
C	569	569	571	571	572	572	573	573	574	574	575	575
D	576	576	577	577	579	579	580	580	581	581	582	582
E	583	583	584	584	585	585	586	586	588	588	590	590
F	dil 1/10	dil 1/10	dil 1/20	dil 1/20	dil 1/40	dil 1/40	dil 1/80	dil 1/80	dil 1/160	dil 1/160	dil 1/320	dil 1/320
G	974	974	978	978	985	985	988	988	990	990	991	991
H	996	996	1001	1001	1003	1003	1004	1004	B	B	R	R
Caja 3												
Gónadas Ind 5M					Ovocitos estadio IV							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	633	633	634	634	635	635	638	638	639	639	640	640
B	641	641	642	642	643	643	646	646	647	647	648	648
C	649	649	650	650	651	651	652	652	654	654	656	656
D	657	657	658	658	659	659	661	661	662	662	663	663
E	664	664	665	665	666	666	670	670	671	671	672	672
F	dil 1/10	dil 1/10	dil 1/20	dil 1/20	dil 1/40	dil 1/40	dil 1/80	dil 1/80	dil 1/160	dil 1/160	dil 1/320	dil 1/320
G	989	989	993	993	994	994	998	998	1000	1000	1005	1005
H	1008	1008	1010	1010	1011	1011	1012	1012	B	B	R	R
Caja 4												
Gónadas Ind 6M					Testículo							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	736	736	737	737	739	739	740	740	742	742	743	743
B	744	744	745	745	746	746	747	747	748	748	749	749
C	750	750	751	751	752	752	753	753	754	754	755	755
D	756	756	757	757	761	761	762	762	763	763	764	764
E	768	768	770	770	771	771	772	772	773	773	774	774
F	dil 1/10	dil 1/10	dil 1/20	dil 1/20	dil 1/40	dil 1/40	dil 1/80	dil 1/80	dil 1/160	dil 1/160	dil 1/320	dil 1/320
G	162	162	165	165	168	168	169	169	170	170	252	252
H	256	256	263	263	296	296	297	297	B	B	R	R

- Búsqueda de la localización celular de la expresión de *foxl3* y *cyp11c*

Se desarrolló una pasantía de aprendizaje de hibridación *in situ* en el Laboratorio de la Dra. Estela Castillo (Facultad de Ciencias, UdelAR), que incluye todo lo mencionado en materiales y métodos. No se pudo establecer claramente si la reacción era específica. Tampoco se pudieron identificar los tipos celulares en los cuales se expresaron los genes.