



TESIS DE DOCTORADO

**PEDECIBA AREA BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**Análisis de los mecanismos de determinación y
diferenciación del sexo en *Austrolebias charrua*
(Cyprinodontiformes: Rivulidae)**

María José Arezo Rezza
Sección Biología Celular
Facultad de Ciencias

Orientadora

Dra. Nibia Berois
Sección Biología Celular
Facultad de Ciencias.

Co-orientadora

Dra. Graciela García
Sección Genética Evolutiva
Facultad de Ciencias

Tribunal:

Presidente: **Dr. Omar Macadar**

Vocales: **Dras. Annabel Ferreira y Estela Castillo**

Marzo, 2012

*A mis hijos y compañero de la vida,
a mi mamá y mis hermanos,
a toda la familia.*

Agradecimientos

A **Nibia Berois**, junto a quién aprendí muchísimas cosas, entre ellas a cómo disfrutar de la Ciencia compatibilizándola plenamente con la vida familiar. Gracias por el apoyo y el afecto de siempre.

A **Graciela García**, quién me contagió el gusto por las *Austrolebias* hace ya 15 años, y me acompañó durante parte de este trabajo.

A **Cristina Arruti** por haberme permitido iniciar esta tesis y por el apoyo de siempre.

A la **Facultad de Ciencias, Sección Biología Celular, Sección Genética Evolutiva**, a los programas **PEDECIBA, AMSUD-Pasteur, Wood-Whelan Research Fellowships (IUBMB)** y a la **Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)** que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Comisión de seguimiento: **Dras. Cristina Arruti, Mónica Brauer y Ekaterina Scvortzoff**.

A **Nicolás Papa** por toda la ayuda brindada desde el comienzo, por involucrarse en la temática y trabajar codo a codo en la mesada con mucha dedicación.

A **Núria Lahuerta** por haber colaborado y compartido los primeros pasos de la puesta a punto de los RT-PCR.

A **Cora Chalar** por el apoyo y la guía en la discusión de los resultados y el ánimo necesario para concretar esta etapa final.

A mis **compañeros de Biología Celular** por todo su apoyo académico y afectivo. En especial a **Coya** por su cálida disposición y el tiempo dedicado a la discusión de los resultados obtenidos y confección de gráficos y a **Daniel** también por su cálida disposición y ayuda con los protocolos moleculares.

A mis **compañeros de Genética Evolutiva: Silvana, Sebastián y Julia** y en especial a **Verónica Gutiérrez**, quién me acompañó y apuntaló en las largas jornadas experimentales de PCR y clonaciones, sobre todo cuando los resultados no eran los esperados.

A **Gustavo Saona** por su apoyo y asesoramiento en los análisis estadísticos.

A **Carlos Passos** por compartir los datos de muestreo del campo.

A **Tom Van Dooren** por compartir los datos de temperatura a nivel de los charcos.

A **Fernanda Azpiroz** por su siempre amable colaboración cada vez que requería ayuda con las bacterias.

A **Soledad De la Piedra** por compartir sus datos sobre las diapausas y desarrollo temprano de *Austrolebias charrua* y su siempre cálida disposición a colaborar.

A **Germán Reig** por enseñarme y ayudarme a microinyectar embriones y en todo lo referente a protocolos moleculares durante las pasantías en el Laboratorio del Dr. Miguel Concha (Neurobiología comparada y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago).

Al **Miguel Concha** por aceptarme en tres oportunidades en su Laboratorio y brindarme todo su apoyo durante esas estadías.

Al proyecto multidisciplinario (**Fondo Profesor Clemente Estable** N°4017) por facilitar el banco de tejidos de *Austrolebias* para obtener las muestras de ADN.

A **Miguel Allende** y **Luisa Pereiro** por brindarme su casa y su apoyo durante las estadías en Chile.

A **Marcelo Antonelli** por compartir con generosidad los anticuerpos anti-Vasa y su conocimiento en herramientas moleculares.

A **Rafael de Sà** por sus cálidas sugerencias en la redacción del artículo Arezo y col. (2007) y demás aspectos académicos.

A **Gabriel Santoro** que me asistió en la impresión de todas las imágenes.

A los miembros del **Tribunal**, **Dr. Omar Macadar** y **Dras. Annabel Ferreira** y **Estela Castillo** por aceptar la evaluación de mi trabajo de tesis, por las sugerencias y los valiosos aportes realizados al mismo.

Por último, a quienes ocupan el primer lugar: **mi familia**, especialmente a **Luis** mi compañero de camino...sin él la realización de este trabajo hubiese sido sencillamente imposible, a mi mamá, **Cristina**, quién fue el pilar más importante durante los duros años de estudio y remó y remó junto conmigo y a mi hijito **Joaquín** por haber cedido varias horas de juego y por todo su amor, combustible esencial de mi vida, y a mi querida segunda mamá **Cristina (la abu Chacha)**, por su cariño y apoyo en esta última etapa.

Muchas gracias por brindarme de manera incondicional el apoyo más importante, el emocional, indispensable para seguir avanzando.... gracias por estar, por ser el sostén necesario para continuar y acompañarme siempre en todos mis emprendimientos.

Índice

Resumen	7
Introducción general	9
Hipótesis de trabajo	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27

Capítulo I:

Estrategia de diferenciación sexual de *Austrolebias charrua*.

I.1	Antecedentes	29
I.2	Materiales y Métodos	39
I.3	Resultados y Discusión	43
I.4.	Conclusiones	57
I.5	Perspectivas	58
I.6	Anexo	59

Capítulo II:

Mecanismos de determinación del sexo en *Austrolebias charrua*: ensayos de termosensibilidad.

II.1	Antecedentes	61
II.2	Materiales y Métodos	71
II.3	Resultados	74
II.4	Discusión	80
II.5	Conclusiones	93
II.6	Perspectivas	94

Capítulo III:

Búsqueda de genes candidatos sexo-específicos en *Austrolebias charrua*.

III.1	Antecedentes	96
III.2	Materiales y Métodos	108
III. 3	Resultados	127
III.4	Discusión	141
III.5	Conclusiones	159
III. 6	Perspectivas	160
III.7	Anexo	161
	Contribución al conocimiento de la biología de peces anuales (<i>A.charrua</i>)	164
	Referencias bibliográficas	167

RESUMEN

Conocer los mecanismos de determinación y diferenciación del sexo en peces posee un doble interés. En el área básica, aporta a la comprensión de aspectos relacionados con la diversidad reproductiva y la evolución. En el área aplicada, optimiza el manejo de recursos de importancia en acuicultura y es necesario en especies que poseen las características adecuadas para ser biomonitores de contaminación ambiental. A diferencia de otros vertebrados, el desarrollo sexual en peces presenta gran plasticidad a factores ambientales aunque en última instancia, la diferenciación sexual es controlada por genes determinantes del sexo. Dentro de éstos, los *dmrt* (*doublesex-mab-3 related transcription factor*) presentan patrones de expresión sexualmente dimórficos tanto en vertebrados como en invertebrados. Los peces anuales, habitantes de masas de agua temporales, son un grupo de vertebrados que muestran estrategias únicas a nivel reproductivo y del desarrollo. Las especies sobreviven la estación seca bajo la forma de embriones enterrados en el sustrato, protegidos por un corion resistente a la desecación. Presentan un patrón de desarrollo temprano atípico sumado a la capacidad de experimentar diapausas. Para dilucidar el mecanismo de determinación del sexo operante en una especie dada es necesario, en primera instancia, conocer el patrón de diferenciación sexual en términos morfológicos y temporales ya que se ha establecido que, en los peces, el período de labilidad a factores ambientales durante la determinación sexual es previo a la diferenciación gonadal histológica. Una vez caracterizado este proceso, es posible aplicar las estrategias experimentales para analizar la influencia de factores genéticos y ambientales sobre la proporción sexual. Con este fin definimos el patrón de diferenciación en *Austrolebias charrua* (gonocórico diferenciado) y la ventana de diferenciación gonadal. Exploramos la termosensibilidad y la presencia de genes candidatos sexo específicos durante este proceso. Aislamos un

fragmento de 205 pares de bases de expresión testicular que comienza a detectarse muy tempranamente en el desarrollo embrionario sugiriendo un rol importante en la determinación sexual de esta especie. Los análisis filogenéticos agrupan a esta secuencia con los genes *dmrt1*, el gen “río abajo” involucrado en el desarrollo masculino más conservado durante la evolución cuya versión duplicada actúa como el gen maestro de determinación masculina en el pez *Oryzias latipes*. Los ensayos de termosensibilidad se realizaron a 19 y 25°C en embriones desde el estadio de blástula hasta embriones de un mes post fecundación incluyendo todo el período termolábil. Las temperaturas utilizadas fueron seleccionadas en base a datos obtenidos del ambiente natural en el que se desarrolla esta especie no encontrándose correlación entre las temperaturas aplicadas y la determinación del sexo. En conjunto, estos datos indican que el mecanismo de determinación sexual en la población analizada de *Austrolebias charrua* depende de claves genéticas.

Introducción general

Definición de los mecanismos y breve reseña histórica

La determinación del sexo es el proceso por el cual se define el sexo de un organismo, generalmente, de manera binaria: hembra o macho (Penman y Piferrer, 2008). Involucra los mecanismos que actúan sobre una gónada indiferenciada y bipotencial (situación embriológica única en la que el primordio posee la capacidad de originar un ovario o un testículo) transformándola en una gónada que permanece morfológicamente indiferenciada pero cuyo destino ya se ha especificado. La diferenciación del sexo es el proceso mediante el cual esta gónada y sus conductos anexos se transforman en un ovario o un testículo y sus correspondientes conexiones con el exterior (Gilbert, 2010).

El problema de la determinación del sexo ha sido objeto de interés y análisis desde épocas muy antiguas. El filósofo griego Aristóteles (384-322 a. C.) basó su teoría de la determinación del sexo en la idea propuesta por su par Empédocles (490-430 a. C.), que consideraba a los individuos masculinos como seres provistos de mayor temperatura corporal en comparación con los femeninos (Mittwoch, 2005). Aristóteles sostenía que la temperatura jugaba un papel fundamental en la determinación sexual. En particular, para la especie humana, sugería que a mayor temperatura durante el intercambio sexual mayor sería la probabilidad de concebir un individuo de sexo masculino (Gilbert, 2010). Según Parménides (515 a. C.) el sexo del embrión era definido por su ubicación en el útero materno (derecho: masculino, izquierdo: femenino) mientras que Anaxágoras (500 – 428 a. C.) postulaba que el factor determinante del sexo provenía del padre (la fecundación producida por espermatozoides provenientes del testículo derecho generaban un individuo masculino mientras que espermatozoides producidos en el testículo izquierdo generaban uno femenino). En discordancia con ambas teorías, Aristóteles

presentó evidencias indicando la presencia de embriones de mamíferos de ambos sexos en el mismo sector del útero materno además de la existencia de hijos de ambos sexos provenientes de padres que presentaban un solo testículo. En este sentido, se ha descrito recientemente en humanos hermafroditas que el componente testicular de la gónada se ubica en la porción derecha de ésta mientras que el tejido ovárico se encuentra a la izquierda. Hacia fines del siglo XIX, prevalecía la idea de que la determinación del sexo se encontraba fuertemente correlacionada con el estado nutricional de la madre (nutrición pobre: masculinización del embrión; buen estado nutricional: feminización del embrión) (Mittwoch, 2000, 2005).

Esta visión ambiental de la determinación del sexo se mantuvo como la principal teoría para explicar la ocurrencia de ambos sexos en las poblaciones humanas hasta principios del siglo XX. En aquel entonces, el redescubrimiento de los trabajos de Mendel en el año 1900, la descripción de los cromosomas sexuales en plantas por McClung en 1902 y la correlación entre el fenotipo sexual y el par cromosómico correspondiente en invertebrados (realizado de manera independiente por Stevens y Wilson en 1905), promovieron un cambio conceptual acerca de esta temática. El avance de las técnicas de análisis y los conocimientos en Genética demostraron finalmente que el sexo en *Homo sapiens* y en la mayoría de los mamíferos se establece mediante un sistema genético (cromosomas sexuales X e Y), siendo el macho el sexo heterogamético. En el siglo XX, se hipotetizó sobre la existencia de un posible factor determinante testicular específico del cromosoma masculino. Finalmente, se logró el aislamiento de un gen en la especie humana y en ratón denominado *SRY* / *Sry* (sex-determining region of the Y-chromosome) demostrándose, en el año 1991, que éste representaba el gen maestro al inicio de la cascada de determinación del sexo masculino (la adición de *Sry* como un transgen en embriones de ratón cuyo genotipo era femenino, XX, causaba desarrollo masculino de los individuos). En la actualidad, contamos con datos sobre diferentes grupos zoológicos y se acepta que los mecanismos de determinación sexual a lo largo de la evolución pueden obedecer a claves

genéticas y / o a claves ambientales según las especies (Devlin y Nagahama, 2002; Mittwoch, 2005; Gilbert, 2010, Volff y col. 2007).

Determinación y diferenciación del sexo en vertebrados

Los mecanismos de determinación del sexo pueden dividirse en dos grandes categorías: determinación sexual genotípica y determinación sexual ambiental. En la primera, el sexo se determina en la fecundación en respuesta a genes presentes en los cromosomas sexuales (sistemas monogénicos) y/o en respuesta a un conjunto de genes presentes en los autosomas (sistemas poligénicos). En la segunda, el sexo se determina en etapas posteriores a la fecundación por factores ambientales como la temperatura, el pH o factores sociales (Devlin y Nagahama, 2002). Como consecuencia de los mecanismos de determinación del sexo operantes, en cada especie se establece la proporción sexual, parámetro demográfico fundamental que influye sobre la estructura poblacional y determina su potencial reproductivo (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008). Una diferencia crítica entre los sistemas basados en componentes genéticos y ambientales de determinación del sexo son las proporciones sexuales primarias producidas por éstos. Mientras que en los sistemas genéticos se generan proporciones sexuales balanceadas 1:1, en los sistemas ambientales estas proporciones, en general, se encuentren sesgadas hacia un sexo excepto en cierto rango de temperatura en la cual la proporción de sexos es 1:1 (Devlin y Nagahama, 2002).

La definición del sexo en varios grupos de vertebrados se adquiere por la expresión de genes generalmente ubicados en cromosomas sexuales que pueden diferir morfológicamente (heteromórficos) o no (homomórficos) (Solari, 1994). En algunas especies los machos representan el sexo heterogamético (sistema de cromosomas sexuales XX/XY) mientras que en otras las hembras son las que generan 2 tipos de gametos diferentes (sistemas de cromosomas sexuales ZZ/ ZW). La existencia de cromosomas sexuales se ha demostrado en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Asimismo, se ha reportado la existencia de cromosomas sexuales múltiples en algunas especies de todos los

grupos de vertebrados excepto en aves (Devlin y Nagahama, 2002 y Nakamura, 2009).

Los mamíferos placentarios comparten un sistema genético de determinación del sexo cuyo cromosoma X es rico en genes y su cromosoma Y, mayoritariamente heterocromático (Marshall-Graves y Peichel, 2010), excepto para algunas especies de roedores en las que se ha reportado la ausencia del cromosoma sexual Y (*Tokudaia osimensis osimensis* y *Tokudaia osimensis spp.*, Sutou y col. 2001; *Ellobius lutescens* y *Ellobius tancrei*, Vogel y col. 1998). Los mamíferos marsupiales presentan un cromosoma X más pequeño y un cromosoma Y diminuto en comparación con los placentarios mientras que los mamíferos monotremas presentan un complejo de 5 cromosomas X y 5Y. En aves, la determinación del sexo ocurre mediante un sistema cromosómico ZZ-ZW en el que la hembra es el sexo heterogamético y el cromosoma W es la versión degenerada del Z. Las serpientes también exhiben un sistema genético de determinación sexual de este tipo pero éstos no comparten homología en relación a su composición génica con los cromosomas aviares. Otros linajes de reptiles, anfibios y peces muestran una amplia variedad de sistemas de determinación del sexo. Aún especies muy cercanas filogenéticamente, o incluso diferentes poblaciones dentro de una misma especie, pueden presentar diferentes mecanismos de determinación sexual por lo que el estudio de estos mecanismos ofrece múltiples ejemplos de la correlación entre biología del desarrollo, ecología y evolución (Devlin y Nagahama, 2002, Marshall-Graves y Peichel, 2010). Si bien el registro fósil no brinda información acerca de la naturaleza de los mecanismos de determinación sexual, análisis filogenéticos de la evolución de éstos en vertebrados sugieren que la determinación sexual genética sería el mecanismo de determinación sexual ancestral (Mitchel y Janzen, 2010).

Los procesos de diferenciación del sexo a nivel fisiológico, histológico y genético están muy conservados en todos los vertebrados. La elección del camino de diferenciación testicular u ovárico del primordio gonadal bipotencial está gobernado por el mismo conjunto de genes que controlan estos dos procesos alternativos. Si bien la mayor parte de la información acerca de los

mecanismos moleculares involucrados que sostienen estos procesos se ha generado por estudios realizados en mamíferos, también se han descrito sus contrapartes en otros grupos. En todos los vertebrados, independientemente del mecanismo de determinación sexual operante, el gen autosómico *Sox9* (Sry-related HMG box-9) está presente en el genoma de ambos sexos pero el aumento en su nivel de expresión (en las futuras células de Sertoli) es uno de los primeros eventos moleculares en el camino de diferenciación testicular. En mamíferos, una deficiencia de este gen en individuos XY provoca desarrollo femenino mientras que una duplicación del mismo en individuos XX causa desarrollo masculino en ausencia del cromosoma Y. La expresión de *Sox9* es gatillada por el producto del gen *Sry*. La misma se mantiene por un sistema de autorregulación positiva y por acción del factor de crecimiento 9 (*FGF9*). Los productos de los genes *Sox9* y *FGF9*, a su vez, reprimen al regulador transcripcional β -catenina y a la molécula de señalización intercelular *WNT-4* (Wingless-type MMTV integration site family; member-4) que promueven el desarrollo ovárico. En las hembras, la proteína de secreción respondina-1 (*RSPO1*) actúa junto con *WNT4* estabilizando a la β -catenina que luego reprime a *Sox9* y *FGF9*. De esta manera, se establece una relación antagónica entre los caminos testicular y ovárico. En definitiva, el desarrollo ovárico es inducido por niveles bajos de *Sox9* que no son suficientes para suprimir la expresión de los genes *RSPO1* y *WNT4* (Marshall-Graves y Peichel, 2010)

Otros genes involucrados en la cascada de determinación y diferenciación sexual conservados en vertebrados son: 1) el factor de transcripción *dmrt1* (doublesex and mab-related transcription factor 1), gen que será abordado en profundidad en el Capítulo III de esta tesis. Este gen es homólogo de los genes *doublesex* en *Drosophila melanogaster* y *mab-3* en *Caenorhabditis elegans* involucrados en eventos de diferenciación sexual en invertebrados y parece ocupar una posición cercana al inicio de la cascada de determinación sexual ejerciendo una función crítica en la misma; 2) *Sf-1* (steroidogenic factor-1) factor de transcripción relacionado con la producción de testosterona y hormona anti-mülleriana; 3) *Wt1* (Wilm's tumor suppressor-1) es un factor de transcripción crítico en el desarrollo del sistema urogenital; 4) *Amh*

o *Mis* (Anti-Müllerian hormone) hormona responsable de la regresión de los conductos müllerianos durante la diferenciación testicular; en peces teleósteos que no presentan conductos müllerianos, este gen estaría relacionado con la diferenciación espermatogonial; 4) *Dax1* (Dosage-sensitive sex reversal, congenital adrenal hypoplasia, X-linked) codifica para un receptor nuclear atípico de hormonas; 5) *Foxl2* (Forkhead transcription factor-2) factor de transcripción relacionado con la diferenciación ovárica; 6) *Cyp19* (P450 aromatasa), enzima clave en la conversión de andrógenos a estrógenos (Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010).

En suma, en la mayoría de las especies de vertebrados es mayoritaria la presencia de dos sexos. A pesar de este resultado final común, parecen existir múltiples maneras en las que el sexo de un organismo puede ser determinado. Este hecho no deriva de diferencias en los programas de diferenciación celular (prácticamente idénticos en todos los vertebrados, dirigidos por el mismo grupo de genes) sino que la variación estaría generada por la diversidad de los factores capaces de gatillar la cascada de determinación sexual (Devlin y Nagahama, 2002, Marshall-Graves y Peichel, 2010).

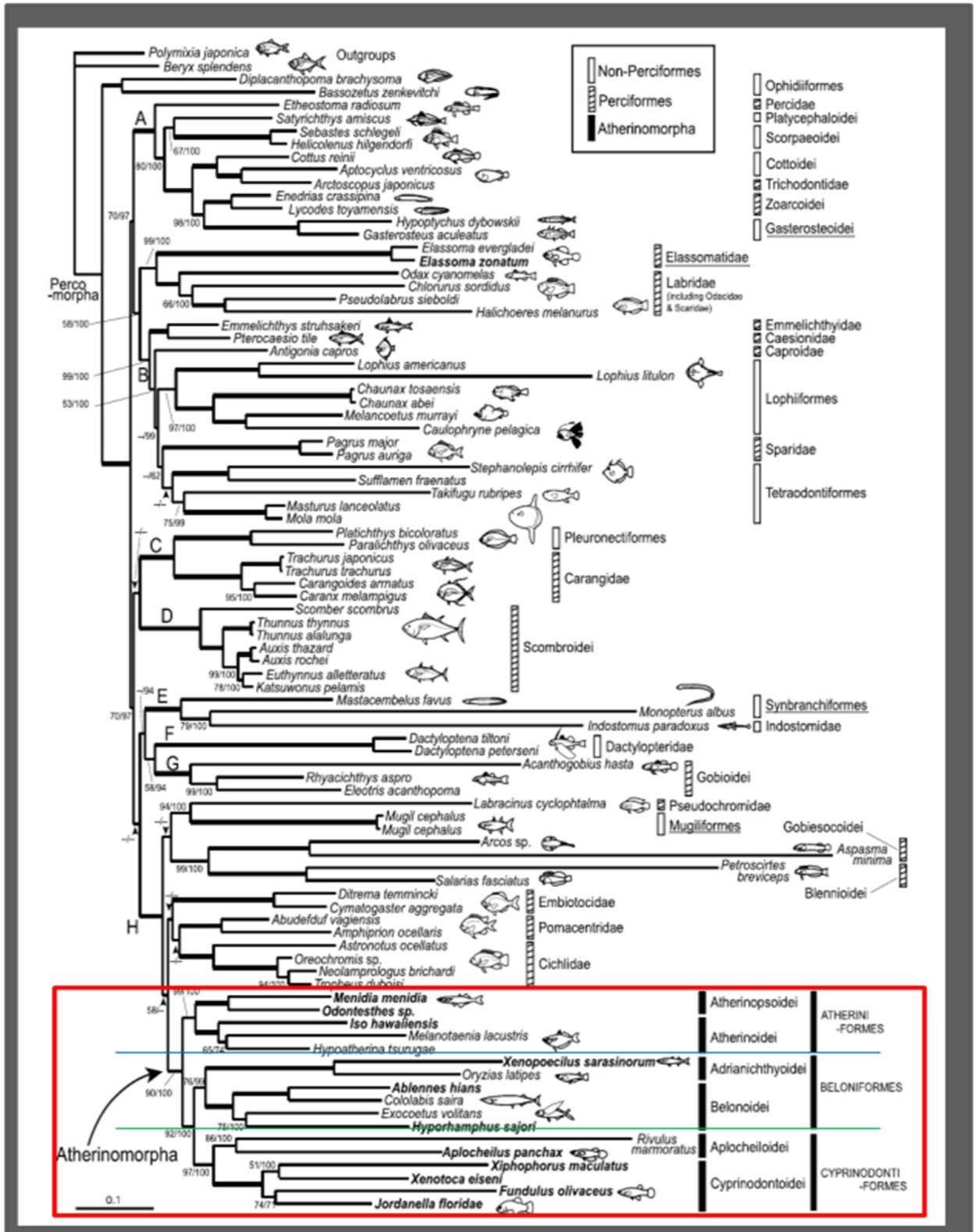
Determinación del sexo en peces

Los peces representan el grupo basal más extenso y diverso dentro de los vertebrados incluyendo aproximadamente 28.000 especies (Nelson, 2006). Esta diversidad se refleja a nivel morfológico, genómico y reproductivo entre otros aspectos, evidenciándose además relaciones filogenéticas controversiales. Particularmente en la Serie Atherinomorpha (que comprende a los órdenes Atheriniformes, Beloniformes y Cyprinodontiformes y dentro de la cual se encuentra la especie analizada en la presente tesis), si bien varios estudios filogenéticos basados en caracteres morfológicos han llevado a la conclusión de que este grupo es monofilético (Rosen, 1964; Parenti, 2005) la posición de esta Serie dentro de los peces teleósteos aún permanece incierta.

Incluso las interrelaciones de los órdenes y subórdenes dentro de la Serie aún no se encuentran claramente establecidas. El suborden Adrianichthyoidei (sensu Nelson, 2006) que incluye al pez *Oryzias latipes*, fue primeramente clasificado dentro de los Cyprinodontiformes por Rosen (1964). En 1981, Rosen y Parenti, reubicaron a este grupo dentro del Orden Beloniformes. Posteriormente, Li (2001) argumentó que debían ser reclasificados dentro de los Cyprinodontiformes en base a varias sinapomorfías (caracteres homólogos evolutivamente novedosos). La implementación de filogenias moleculares incluso cuestionó la monofilia de los Atherinomorpha (Chen y col. 2003). Finalmente, estudios basados en el análisis del genoma mitocondrial completo apoyaron el origen monofilético de los Atherinomorpha y ubicaron a los Beloniformes como grupo hermano de los Cyprinodontiformes siendo los Atheriniformes el grupo basal de ambos (Setiamarga y col. 2008) (Fig. 1)

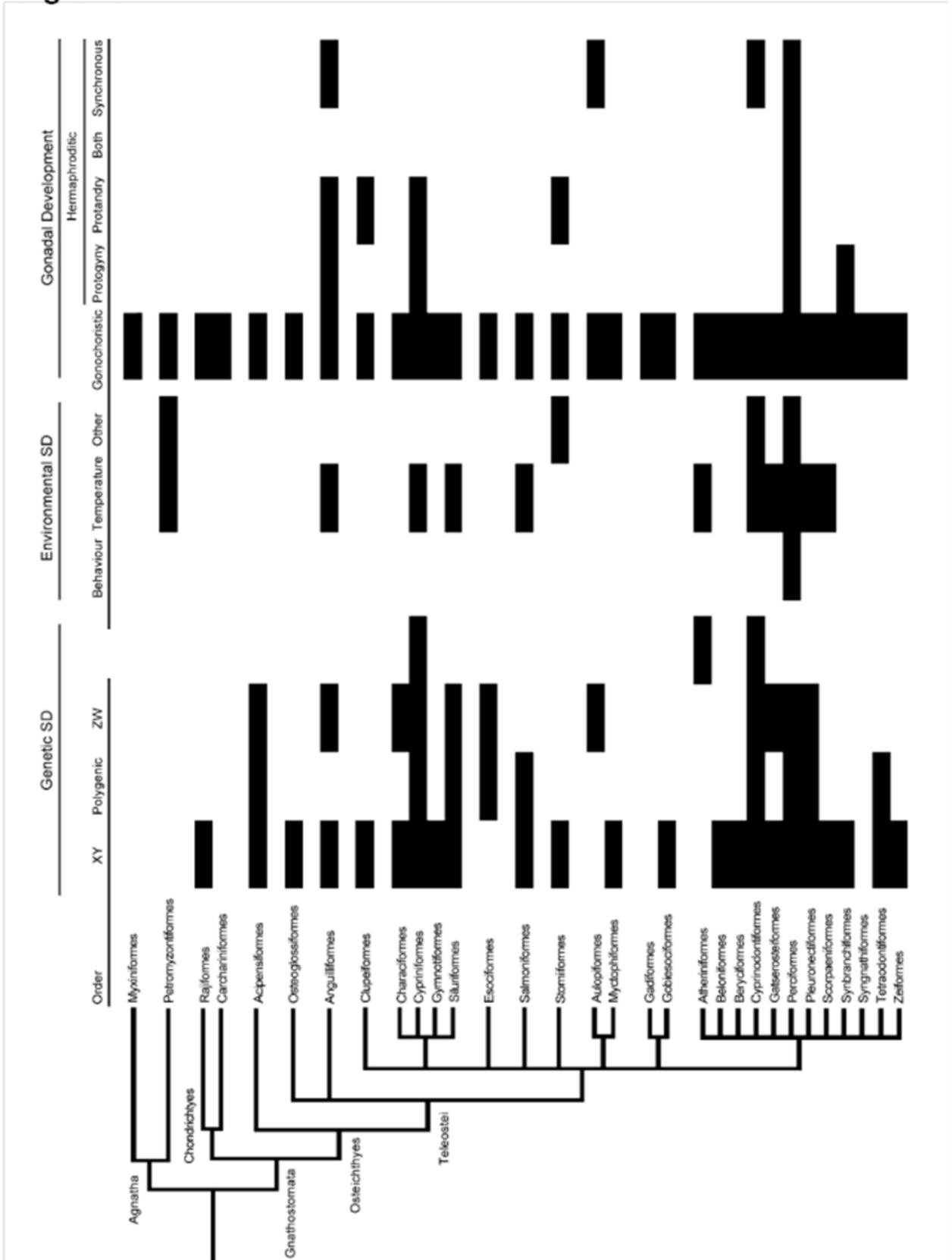
El grupo peces resulta interesante para el estudio de los procesos involucrados en la determinación y diferenciación del sexo dado que presenta un amplio rango de mecanismos y estrategias reproductivas que van desde el hermafroditismo (sincrónico y secuencial) al gonocorismo (diferenciado e indiferenciado). En especies gonocóricas, se han observado todas las formas posibles de determinación sexual: control poligénico, existencia de cromosomas sexuales altamente evolucionados presentando machos heterogaméticos (sistema XX/XY) o hembras heterogaméticas (sistema ZZ/ZW) con o sin influencia de *loci* autosómicos, sistemas que involucran varios cromosomas sexuales y determinación del sexo exclusivamente ambiental (Devlin y Nagahama, 2002; Godwin y col. 2003) (Fig.2). En algunas especies, el sexo fenotípico puede resultar de la interacción entre factores genéticos y ambientales variables (determinación del sexo polifactorial) generando una discordancia entre fenotipo y genotipo sexual (Redding y Patiño, 1993). Entre los factores ambientales, la temperatura que predomina durante el período previo a la diferenciación sexual primaria es el principal factor involucrado (Devlin y Nagahama, 2002). Algunos autores argumentan que los sistemas de determinación sexual genético y ambiental serían dos extremos mutuamente excluyentes (Valenzuela y col. 2003) mientras que otros sostienen que ambos

Figura 1



Árbol filogenético resultante utilizando el método de máxima verosimilitud que evidencia las relaciones de la Serie Atherinomorpha (recuadro rojo) (modificado de Setiamarga y col. 2008).

Figura 2



Representación esquemática de los mecanismos de determinación y diferenciación sexual descritos en peces (tomado de Devlin y Nagahama, 2002)

sistemas representan dos extremos de un continuo, siendo la combinación de ambos lo que establece la definición del sexo del individuo de manera especie-específica (Sarre y col. 2004).

Se ha observado que especies de peces filogenéticamente cercanas pueden presentar mecanismos de determinación del sexo diferentes. E cambios entre los sistemas de determinación del sexo durante la evolución a su vez, podrían estar asociados con eventos de especiación jugando un papel fundamental en la alta diversidad observada en este grupo. La base evolutiva estaría dada por la presencia de peculiaridades a nivel genómico y del desarrollo. Los eventos de duplicación genómica, que inicialmente aportaron redundancia, podrían representar réplicas de genes que potencialmente evolucionaron adquiriendo nuevas funciones lo que probablemente creó flexibilidad evolutiva adicional en las vías de determinación del sexo (Volf, 2005; Mank y col. 2006). La “habilidad” de modificar el control de la determinación sexual puede haber sido seleccionada como respuesta a distorsiones externas de la proporción sexual. Este hecho sería importante como adaptación a cambios ambientales que afecten este parámetro, por ejemplo la temperatura del agua, o en la colonización de un nuevo biotopo con diferentes claves ambientales. Un incremento de la temperatura del agua podría sesgar el desarrollo de los individuos hacia un fenotipo masculino comprometiendo la sobrevivencia de la población (el potencial reproductivo de varias comunidades de peces depende del número de hembras productoras de ovocitos) (Parker, 1980). Entonces, un cambio en el mecanismo de determinación del sexo restauraría el balance entre los sexos (Volf y col. 2007). Sin embargo y a pesar de esta gran diversidad, como ya se ha mencionado, existen evidencias de que el “corazón” de la cascada génica involucrada en los procesos de determinación y diferenciación sexual está conservada tanto a nivel de invertebrados como de vertebrados (Smith y col.1999).

Dentro de la Serie Atherinomorpha, se han caracterizado hasta el momento los sistemas de determinación sexual de *Oryzias latipes* (Beloniformes), varias especies de los géneros *Xiphophorus* y *Poecilia*

(Cyprinodontiformes) y en las especies *Menidia menidia*, *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes hatcheri* (Atheriniformes). *Oryzias latipes* (medaka) es una pequeña especie de pez ovíparo de agua dulce que habita en Japón, Corea y el este de China. Este pez ha emergido como modelo complementario al pez cebra *Danio rerio* particularmente para análisis funcionales de desarrollo en vertebrados e investigación biomédica ya que existe información completa de su genoma que ha sido mapeado y secuenciado (Wittbrodt y col. 2002; Naruse y col. 2004). Esta especie presenta un sistema de determinación sexual genético cuyo macho representa el sexo heterogamético (sistema con cromosomas sexuales homomórficos XY) (Yamamoto, 1955). Es el primer vertebrado no mamífero en el que se ha identificado al gen maestro determinante masculino a nivel molecular. Este gen, denominado *dmrt1bY* o *dmy* que es una copia Y-específica resultante de una duplicación de *dmrt1* autosómico (Matsuda y col. 2002; Nanda y col. 2002; Volff y col. 2007), será abordado en profundidad en el Capítulo III de esta tesis.

Los pecílidos (Cyprinodontiformes), peces de agua dulce que habitan en México, Guatemala, Belice y Honduras, representan uno de los grupos mejor caracterizados con respecto a la determinación del sexo, principalmente especies de los géneros *Xiphophorus* y *Poecilia* ya que éstos reflejan la diversidad de la determinación genética del sexo encontrada en los teleósteos. Incluso se han descrito especies unisexuales, compuestas exclusivamente por hembras, que se generan por el mecanismo de ginogénesis (retención del segundo cuerpo polar) como *Poecilia formosa*. Dentro de este grupo, especies muy cercanas, incluso poblaciones dentro de una misma especie, pueden presentar diferentes sistemas de determinación sexual por lo que este grupo ha sido considerado un excelente modelo para estudiar la dinámica evolutiva del proceso. Sin embargo, no se ha identificado aún el gen maestro determinante del sexo en ninguna especie de este grupo y se conoce muy poco acerca de los genes que actúan “río abajo” en la cascada de determinación y diferenciación sexual (Devlin y Nagahama, 2002; Volff y col. 2007; Schultheis y col. 2009).

Finalmente, el primer caso de determinación sexual temperatura-dependiente se demostró en Atheriniformes, en la especie *Menidia menidia* (Conover y Kynard, 1981). Posteriormente, se describieron otros ejemplos dentro del orden como *Odontesthes bonariensis*, *Patagonia hatcheri* (Strüssmann y col. 1997) así como en otros teleósteos (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008). Este mecanismo tiene alto valor adaptativo en poblaciones naturales (Conover y Heins, 1987) y es de gran interés práctico en acuicultura (Beardmore y col. 2001). La especie *Menidia menidia* posee una característica particularmente interesante. Las poblaciones que habitan en la región sureste de Norteamérica, cuyo período de crecimiento es más prolongado (7 a 10 meses), exhiben una determinación del sexo sensible a la temperatura. Las poblaciones de la región noreste, cuyo período de crecimiento es menor (4 a 6 meses), son menos termosensibles, siendo las que habitan en la región de Nueva Escocia (período de crecimiento de 3 meses) completamente insensibles a la temperatura (nivel de termosensibilidad en la determinación sexual se encuentra altamente correlacionado con la longitud en la temporada de crecimiento). En climas donde las temporadas de crecimiento son de corta duración, en las cuales la temperatura se vuelve una señal inestable por su variabilidad de un año al siguiente, los factores ambientales actuarían sesgando la selección hacia una determinación sexual genética. Ésta, conduciría a una proporción sexual 1:1 independiente del ambiente (Conover y Heins, 1987).

Se ha establecido que, en peces, el período crítico de sensibilidad a la temperatura se encuentra antes de la diferenciación gonadal histológica y que la misma ejerce su efecto como determinante sexual únicamente cuando se aplica en esa fase ontogénica específica. A su vez, es importante considerar que la ventana termosensible (período crítico) varía dependiendo de la especie (Strüssmann y col. 1997; Koumoundouros y col. 2002). En este sentido, para dilucidar el mecanismo de determinación del sexo operante en una especie dada es necesario, en primera instancia, conocer el patrón de diferenciación sexual en términos morfológicos y temporales para luego aplicar las estrategias

experimentales que permitan analizar la influencia de factores genéticos y ambientales sobre la proporción sexual (Devlin y Nagahama, 2002).

La influencia del pH como factor determinante del sexo se ha reportado en varias especies del género *Apistogramma* y *Pelvicachromis* (Orden Perciformes) así como también en las especies *Poecilia sphenops*, *Xiphophorus helleri* y *Poecilia reticulata*. Sin embargo, el efecto del pH en la proporción sexual es menos pronunciado que el efecto de la temperatura. En relación a los factores sociales como señales determinantes del sexo éstos han sido documentados en especies hermafroditas únicamente. En este caso la inversión sexual está controlada principalmente por factores como la densidad poblacional y por la proporción existente de machos y hembras de la población en un momento dado. Las señales sociales utilizadas deben incluir interacciones comportamentales y estímulos de carácter químico como feromonas. Sin embargo, los mecanismos específicos que interpretan estas señales aún permanecen desconocidos (Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010).

La temática relacionada con la diferenciación del sexo en peces se abordará en profundidad en el Capítulo I de este trabajo.

Modelo biológico de estudio

Dentro del orden Cyprinodontiformes existen géneros que presentan ciclos de vida anual. Los peces anuales habitan masas de agua temporales en las que, durante los períodos estivales de sequía, ocurre la muerte de los adultos y formas post-embrionarias. La clave que explica la sobrevivencia de estas poblaciones está localizada en los embriones. Estos son resistentes a la desecación y exhiben un patrón de desarrollo embrionario atípico. El desarrollo temprano se caracteriza por presentar una fase de dispersión de blastómeras y posterior reagregación de éstas entre las etapas de blástula y gástrula y la epibolia se encuentra separada temporal y espacialmente de la organogénesis (característica única entre los vertebrados). Además, poseen la capacidad de experimentar detenciones reversibles del desarrollo embrionario (diapausas)

en tres momentos definidos: diapausa I (fase dispersa), diapausa II (embrión somítico antes o después de la formación del tubo endocardiaco) y diapausa III (pre-eclosión). La eclosión ocurre en la siguiente estación lluviosa y en pocas semanas los juveniles alcanzan la madurez sexual. Esta estrategia reproductiva sugiere una plasticidad de respuesta a un entorno sumamente variable. Ejemplos de géneros que poseen este ciclo de vida son *Austrofundulus*, *Austrolebias*, *Rachovia* y *Pterolebias* de Sudamérica y *Aphyosemion* y *Nothobranchius* de África (Wourms, 1964, 1967, Wourms 1972, a,b,c).

El género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) incluye 39 especies distribuidas entre la cuenca Paraná-Plata y el sistema de lagunas costeras Patos-Merín (Costa, 2006). Es uno de los grupos más extensos dentro de los peces anuales Neotropicales y para Uruguay están citadas hasta el presente 22 especies (FishBase), algunas de las cuales son endémicas y otras compartidas con Brasil y Argentina. Si bien la monofilia del género está apoyada por análisis morfológicos (Costa, 2006) y moleculares (García y col. 2000; García, 2006) las relaciones filogenéticas dentro de éste son controversiales debido al carácter contradictorio de estos análisis (Costa, 1998, 2002, 2006; García y col. 2000; García, 2006; Loureiro, 2004) permaneciendo, aún en la actualidad, en el campo del debate (Loureiro y col. 2011).

Los integrantes del género *Austrolebias* que habitan en Uruguay han sido objeto de diferentes aproximaciones instrumentadas por grupos de investigadores nacionales en el área de la sistemática (Vaz-Ferreira y Sierra, 1971, 1973 a,b; Amato, 1986), la ecoetología (Vaz-Ferreira y col. 1964; García y col. 2008), la citogenética (Maspoli y García, 1988; García y col. 1993, 1995), la ultraestructural (Loureiro y de Sá, 1996; 2000; Berois y col. 2011), la osteológica (Loureiro y de Sá, 1998), la filogenética molecular (García y col. 2000; 2001, 2002, 2006), el análisis de redes tróficas (Laufer y col. 2009) y recientemente en el área neurobiológica (Fernández y col. 2011)

Especies del género *Austrolebias* de la región costera del este de Uruguay, fueron analizadas en un proyecto (CONICYT. Fondo Clemente Estable N°4017; 1999 - 2001) mediante un enfoque interdisciplinario del cual

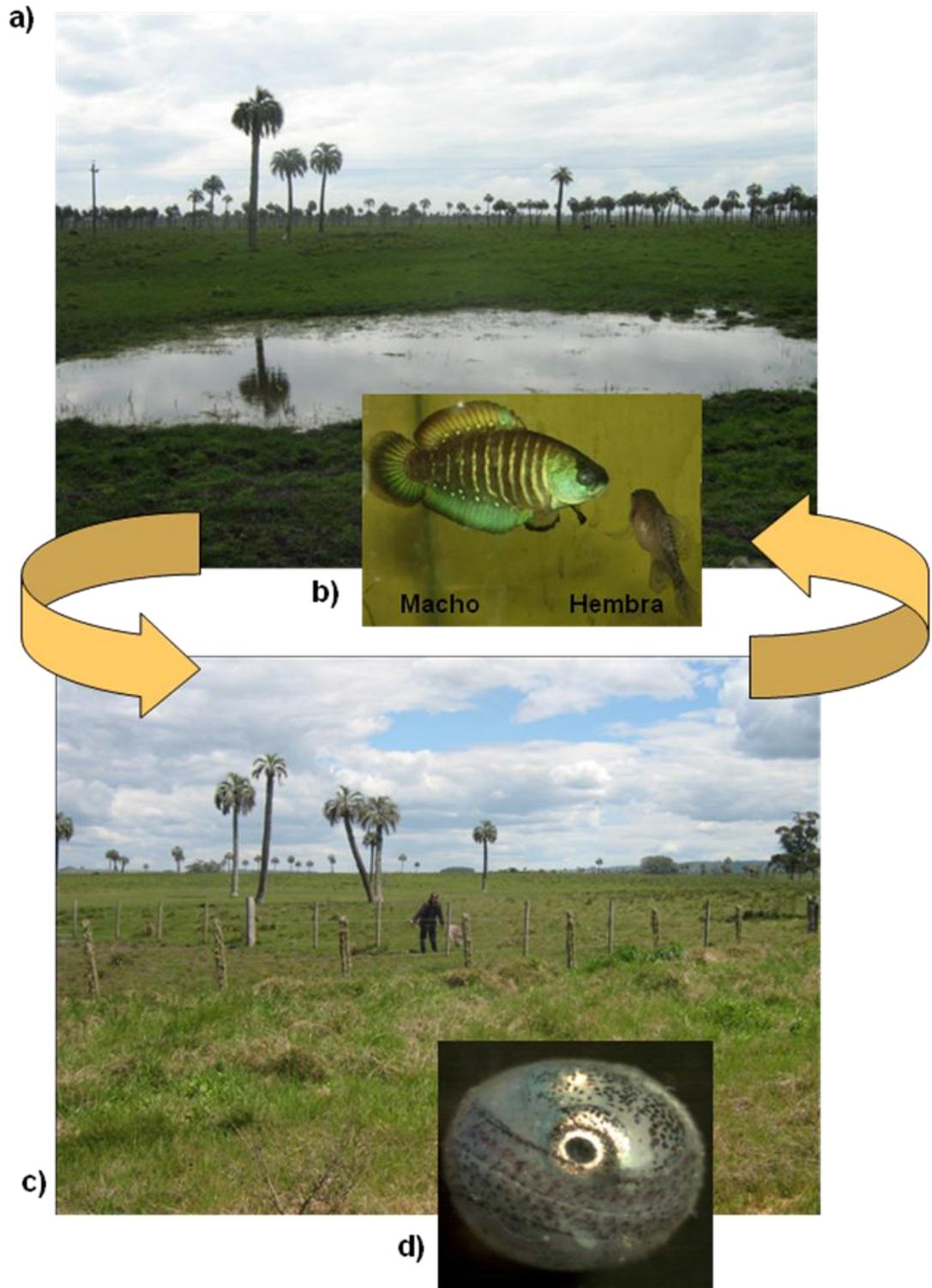
formamos parte. En este contexto, generamos el conocimiento necesario para la instrumentación de diferentes propuestas de investigación: biogeografía de las especies, mantenimiento y reproducción de adultos, cultivo de embriones en el laboratorio y datos relevantes acerca de posibles patrones de especiación de algunas especies de este género (García y col. 2009). Nuestro grupo se consolidó como referente regional en temas de biología del desarrollo del modelo siendo el único, a nivel internacional, que aborda temas relativos a estrategias reproductivas. En el marco de esta línea he desarrollado mis estudios de postgrado. Durante el trabajo de tesis de Maestría (PEDECIBA) definimos los estadios del desarrollo temprano (Arezo y col. 2005) y caracterizamos parcialmente secuencias génicas de tipo *Hox* en *Austrolebias viarius* (Gutierrez y col. 2007).

En el presente trabajo de tesis, nuestro interés se centró en el análisis de los mecanismos de determinación y diferenciación del sexo en *Austrolebias charrua* (Costa y Cheffe, 2001; Fig. 3). Esta especie se distribuye desde el sur de Brasil (zonas adyacentes a la laguna Merín) hasta el Departamento de Rocha. Las poblaciones rochenses habitan en la región costera denominada “Bañados del Este” declarada Reserva de la Biósfera (UNESCO, 1976) y sitio Ramsar (1986). Esta región contiene humedales expuestos a inundaciones y presenta una historia geológica compleja con numerosas transgresiones y regresiones marinas durante el período Cuaternario (Sprechmann, 1980). *Austrolebias charrua* forma parte del complejo de especies *Austrolebias adloffii* junto con los taxa *Austrolebias viarius* (Vaz-Ferreira y col. 1964), *Austrolebias minuano* (Costa y Cheffe 2001), *Austrolabias nigrofasciatus* (Costa y Cheffe 2001) *Austrolebias adloffii* (Costa y Cheffe, 2001), *Austrolebias reicherti* (Loureiro y García, 2004, 2008), *Austrolebias arachan* (Loureiro y col. 2004) y *Austrolebias natchtigalli* (Costa, 2006).

Análisis filogeográficos (García, 2006) sugieren la hipótesis de especiación simultánea y múltiple asociada a eventos de reticulación en especies de este complejo. Mediante un enfoque interdisciplinario, se ha sugerido una cronología de eventos en la diferenciación de *Austrolebias charrua* y *Austrolebias reicherti* constituyendo al presente filogrupos

Figura 3

Ambiente límnico temporal típico de peces que presentan ciclo de vida anual



- a) Charco durante la estación lluviosa (marzo/abril – noviembre/diciembre)
- b) Ejemplares adultos de *Austrolebias charrua* (foto gentileza de Nicolás Papa)
- c) Charco durante la estación seca (noviembre/diciembre – febrero/marzo)
- d) Embrión pre-eclosión de *Austrolebias charrua* enterrado en el sustrato

diferenciados con soportes robustos y de distribución parapátrida. Los mencionados análisis basados en métodos filogenéticos y poblacionales (Inferencia Bayesiana y parsimonia estadística) sugieren un escenario de pasada fragmentación alopátrica y expansión de rango, implicando contactos secundarios entre estas especies. Los análisis realizados sugieren la ocurrencia de eventos de expansión poblacional de los mencionados taxones que habrían contactado en las zonas bajas del Río Cebollatí, representando este sitio una potencial zona híbrida. Los eventos de especiación explosiva en estos dos taxa basados en estimaciones del reloj molecular fueron datados para el Pleistoceno (1.25 MA a 450.000 años). Por otro parte, la similitud en la morfología gamética encontrada entre ambos taxones sustenta el escenario de separación reciente entre ellos. No así los patrones de coloración y análisis morfométricos analizados en el mencionado estudio. Alternativamente, las similitudes morfológicas pudieran explicarse por la persistencia de polimorfismos ancestrales, luego de eventos de especiación explosiva como los postulados en este complejo de especies (García y col. 2009)

Estudios cromosómicos y análisis de estimaciones de polimorfismos a nivel de ADN demostraron que las poblaciones de *Austrolebias charrua* presentan los valores más altos de variación genética así como la presencia de polimorfismos ancestrales en ciertas poblaciones comparados con *Austrolebias reicherti* y *Autrolebias viarius*. Estos datos reflejan la necesidad prioritaria de su incorporación en programas de conservación de la biodiversidad (García, 2006; García y col. 2009). Asimismo, existe información creciente sobre el impacto de los contaminantes ambientales de origen diverso sobre la reproducción de los peces, por ejemplo xenobióticos capaces de producir impactos serios en la reproducción, alteración del patrón de diferenciación sexual, morfología gonadal, tasas de gametogénesis y fenotipo sexual. En este sentido, conocer las estrategias reproductivas resulta un aspecto esencial para la definición de estas poblaciones como posibles biomonitores en estudios de contaminación ambiental y posibles efectos asociados al calentamiento global en relación a los mecanismos de

determinación sexual (Devlin y Nagahama, 2002; Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008).

En suma, el análisis de los mecanismos de determinación y diferenciación del sexo en peces posee un doble interés: en el área básica y en el área aplicada. Aporta a la comprensión de aspectos relacionados con la diversidad reproductiva y la evolución de estos mecanismos en el grupo peces en particular y en los vertebrados en general. Contribuye a la optimización del manejo de recursos de interés en acuicultura. En esta área se ha provocado la inducción sexual mediante la administración de hormonas, práctica que ha suscitado creciente preocupación de los consumidores por los posibles efectos secundarios y la contaminación ambiental. Las investigaciones actuales se han centrado en la búsqueda de posibles factores ambientales como la temperatura implicados en el control del sexo que permitan su aplicación en acuicultura (Pavlidis y col. 2000). Asimismo, el conocimiento de estos mecanismos es absolutamente necesario en especies de peces que posean las características adecuadas para ser considerados biomonitores de contaminación ambiental (Devlin y Nagahama, 2002)

Con el fin de abordar esta temática en el pez anual *Austrolebias charrua*, planteamos como objetivo primario de esta tesis y habilitador de los siguientes, establecer el patrón de diferenciación gonadal a escala morfológica y temporal y la estrategia sexual de esta especie (Capítulo I). Posteriormente se analizará la influencia de la temperatura como clave ambiental en la determinación sexual (Capítulo II) y la existencia de genes candidatos sexo-específicos en esta especie (Capítulo III).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las especies del género *Austrolebias* se encuentran sometidas a un ambiente extremadamente variable en el que cada generación completa su ciclo de vida en aproximadamente 8 meses. Los juveniles presentan un crecimiento rápido que implica un alto rendimiento reproductivo desde la maduración sexual hasta la senescencia. Estas características hacen que se proponga la existencia de mecanismos de determinación del sexo con un fuerte componente genético, incidiendo en un grado mayor que las claves ambientales variables. Asimismo, se postula la existencia de genes candidatos sexo-específicos que presentarían patrones de expresión con dimorfismo sexual a partir del desarrollo embrionario en *Austrolebias charrua*.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la naturaleza de los mecanismos involucrados en la determinación primaria del sexo en la especie anual *Austrolebias charrua*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Conocer la estrategia de diferenciación sexual (características morfológicas y temporales) durante la ontogenia de *Austrolebias charrua*.
- b) Establecer si esta especie posee un mecanismo primario de determinación del sexo predominantemente genético o ambiental analizando la posible incidencia y período de acción de la temperatura en la determinación del sexo.
- c) Investigar la existencia de marcadores moleculares sexo-específicos a nivel genómico y/o de patrones de expresión sexualmente dimórficos.

Capítulo 1:

**Estrategia de diferenciación sexual de
Austrolebias charrua.**

1.1 Antecedentes

Los peces presentan diferentes estrategias reproductivas las cuales resultan, selección natural mediante, en la optimización de la producción de descendencia viable. Se entiende por estrategia reproductiva de una especie al conjunto de características involucradas en la reproducción tales como el sistema de apareamiento, número de desoves durante la temporada reproductiva (semelparos: desovan una sola vez durante su vida / iteroparos: varias veces), tipo de desove (total / parcial), patrón de diferenciación sexual (gonocóricos / hermafroditas / unisexuales), características sexuales secundarias (existencia de dimorfismo sexual), tipo de fecundación (externa o interna), relación madre-embrión (ovíparos / vivíparos), la existencia de cuidado parental y la edad de diferenciación sexual entre otros (Murua y Saborido-Rey, 2003).

Existen estudios que han definido algunas de las características relacionadas con la estrategia reproductiva en *Austrolebias charrua*. Se ha establecido la existencia de dimorfismo sexual acentuado (Costa y Cheffe, 2001), el tipo de sistema de apareamiento (promiscuo: ambos sexos múltiples parejas), la relación madre-embrión (es una especie ovípara), el tipo de fecundación (fecundación externa: la hembra libera 2 a 3 ovocitos en cada incursión al sustrato junto con el macho). Los huevos son demersales (asociados al sustrato) permaneciendo enterrados durante la fase de sequía (Belote y Costa, 2004). Sin embargo, otros caracteres relevantes involucrados en la estrategia reproductiva como el número de desoves durante la temporada reproductiva, tipo de desove, patrón de diferenciación sexual (gonocóricos / hermafroditas) y la edad de diferenciación sexual, aún no han sido determinados para esta especie.

El éxito reproductivo de un individuo depende de eventos que comienzan muy temprano en la vida del mismo. Para comprender los procesos relacionados con la diferenciación del sexo es esencial establecer el origen y desarrollo de las células involucradas en la formación de las gónadas las

cuales están constituidas por dos linajes celulares diferentes: las células germinales y las células somáticas (Nakamura y col. 1998; Devlin y Nagahama, 2002).

Identificación de la población de células germinales primordiales presuntivas

Las células germinales primordiales (CGPs) constituyen el punto de inicio de la siguiente generación y es a partir de ellas que se originarán los gametos. El término “primordial” se aplica a la población de células germinales previo a su arribo a la cresta genital durante el desarrollo embrionario (Gilbert, 2010). En muchos organismos se diferencian de las células somáticas durante el desarrollo embrionario, mediante, al menos, dos mecanismos de especificación. En algunas especies, esta población celular se especifica y es identificable tempranamente por la presencia de determinantes citoplásmicos de origen materno (preformación) mientras que en otras, las células germinales se especifican mediante señales inductivas de células vecinas (epigénesis) siendo reconocibles en estadios embrionarios más tardíos. Estudios realizados en 28 grupos de metazoarios sugieren que la epigénesis es el mecanismo de especificación que presenta mayor distribución además de constituir el mecanismo ancestral (mecanismo encontrado en los linajes más basales en la filogenia de los metazoarios) en relación al de preformación (Extravour y Akam, 2003).

Las células germinales primordiales de diferentes organismos comparten, a lo largo de la escala zoológica, características morfológicas, moleculares y comportamentales. A nivel histológico, son reconocibles por su gran tamaño, relación núcleo / citoplasma alta, nucleolo prominente y citoplasma con pocos organelos. A nivel ultraestructural, se evidencian cuerpos electrón-densos de origen materno conocidos como “nuage”. A nivel molecular, se han identificado marcadores específicos de este linaje celular como por ejemplo el producto del gen *vasa* entre otros (Extravour y Akam, 2003). Este gen fue originalmente identificado en *Drosophila* como un gen de efecto materno requerido en la

formación de segmentos abdominales y la especificación de las células germinales (Schupbach y Wieschaus, 1986). El mismo codifica para una helicasa de ARN ATP-dependiente de la familia DEAD-box (Hay y col. 1988) cuya función ha sido relacionada con el mantenimiento de la pluripotencialidad por medio de la inhibición de la expresión de genes involucrados en la diferenciación somática (Seydoux y Strome, 1999). El producto de este gen se encuentra altamente conservado en la escala evolutiva siendo expresado exclusivamente en la línea germinal de varias especies de invertebrados y vertebrados (Raz, 2000, 2002).

Las primeras observaciones de CGPs en peces teleósteos fueron realizadas originalmente mediante técnicas histológicas de rutina (Johnston, 1951; Gamo, 1961; Timmermans y Taverne, 1989). Mediante esta herramienta se corroboraron las características morfológicas previamente mencionadas. Sin embargo, la identificación del mecanismo que controlaba la especificación de esta población celular no era claro debido a que su origen era evidenciable recién a partir de los estadios de blástula tardía o somitogénesis (Yamaha y col. 2010). El aislamiento del gen *vas*, homólogo de *vasa*, en el pez cebra *Danio rerio* permitió identificar a estos transcritos, mediante la técnica de hibridación *in situ*, en forma de agregados en los surcos de segmentación en las primeras etapas de segmentación demostrándose que se trata de un gen de origen materno (Yoon y col. 1997). En esta misma región se han encontrado además otros ARNm específicos de la línea germinal homólogos de los genes *daz* (*daz1*), *nanos* (*nos1*) y *dead end* (*dnd*) también de origen materno (Maegawa y col. 1999; Köprunner y col., 2001; Weidinger y col. 2003).

Una distribución espacial similar del transcripto de *vas* observada en *Danio rerio* fue reportada en el pez dorado *Carasius auratus* (Otani y col. 2002), en los gobios *Leucopsarion petersii* y *Gymnogobius urotaenia* (Saito y col. 2002, 2004) y en la locha *Misgurnus anguillicaudatus* (Fujimoto y col. 2006). En el pez *Oryzias latipes* la expresión de los genes *vasa* (*olvas*) y *nanos* (*nos1*) no se detecta en forma de agregados en los surcos de segmentación sino que éstos se distribuyen uniformemente hasta el estadio de escudo embrionario (gástrula) (Shinomiya y col. 2000). La identificación, mediante microscopía

electrónica de transmisión de componentes granulares similares al plasma germinal o nuage de *Danio rerio* en *Oryzias latipes* observado en las primeras etapas de segmentación sugiere que la especificación de las CGPs en esta especie responde al mecanismo de preformación al igual que en *Danio rerio* (Herpin y col. 2007).

El desarrollo de técnicas moleculares que incluyen la utilización de la proteína fluorescente verde (GFP) y sus derivados ha permitido la visualización de células y órganos. Este tipo de metodología es particularmente útil en estudios *in vivo* que buscan interpretar las relaciones celulares espaciales durante la diferenciación (Yamaha y col. 2010). En teleósteos es posible visualizar específicamente la población de CPGs *in vivo* inyectando, en embriones de una célula, construcciones de ARNs quiméricos que contienen las secuencias regulatorias (3'UTR) del ARNm *vasa* o *nanos* unidas a secuencias que codifican para la proteína fluorescente verde (GFP). Estos transcriptos se mantienen específicamente en la línea germinal y están ausentes en la línea somática (Knaut y col. 2002). Las secuencias a nivel de las regiones 3'UTR serían las responsables de la eliminación de estos transcriptos en las células somáticas (vía microARNs) y de la estabilización de los mismos en las CGPs (vía unión de la proteína de unión al ARN *dead end*) (Kedde y col. 2007). Esta metodología fue aplicada por primera vez en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Yoshizaki y col. 2000). Posteriormente, la misma aproximación experimental fue instrumentada con éxito en otras especies de peces teleósteos como *Oryzias latipes* (Tanaka y col. 2001) y *Danio rerio* (Knaut y col. 2002).

Se ha demostrado que estas secuencias regulatorias son capaces de identificar a las células germinales primordiales derivadas de grupos taxonómicos muy divergentes (3'UTR del ARNm *vasa* proveniente de *Danio rerio* identifica específicamente a la población de células germinales primordiales de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y la corvina *Nibea mitsukurii*) (Yoshizaki y col. 2005). Sin embargo, la construcción que contiene la región 3'UTR del gen *vasa* de *Oryzias latipes* (*olvas*) unido a GFP no permite la visualización de estas células ni en *Danio rerio* ni en *Misgurnus*

anguillicaudatus. Asimismo, estudios realizados utilizando construcciones que contienen las secuencias 3'UTR de *nanos (nos1)* de *Danio rerio* unidas a GFP han demostrado ser útiles para identificar la población de CGPs en varias especies de Cyprinidae, Osmeridae y Gobioidae. Estos resultados sugieren que la función de *nos1* estaría más conservada en los teleósteos que *vasa* (Saito y col. 2006).

A nivel conductual, independientemente del mecanismo de especificación, la población de células germinales primordiales se determina durante el desarrollo embrionario antes del comienzo de la diferenciación gonadal. Por lo tanto, estas células migran desde el sitio de especificación hacia las gónadas en desarrollo. La migración celular *in vivo* no sólo involucra la interacción con diferentes células y sustratos sino que requiere de la habilidad de las mismas de interpretar e integrar diferentes tipos de señales. Las señales provenientes del medio definen el camino a seguir y pueden resultar conflictivas generando una respuesta de atracción o repulsión a este entorno. Estudios comparativos en organismos modelo representantes de invertebrados y vertebrados muestran evidencias claras de que los principios subyacentes de control de la migración de estas células se encuentran compartidos en la evolución. En los vertebrados pez cebra, ratón y pollo, se ha demostrado que la migración direccional depende de un sistema quimiotáctico conservado mediado por un receptor acoplado a proteína G (CXCR4) en la célula germinal primordial y la molécula soluble SDF1 (stromal derived factor 1) secretada por la gónada en desarrollo que, en conjunto con las señales de atracción y repulsión del entorno, guiarían a estas células hacia su destino final (Kunwar y col. 2006).

Los mecanismos que en conjunto crean, protegen y promueven el destino de las células germinales también se encuentran conservados a lo largo de la evolución. Inicialmente ocurre una represión global a nivel transcripcional de los programas de diferenciación somática mediada por diferentes factores según la especie. Una vez incorporadas en los rudimentos gonadales, éstas permanecen en un microambiente particular, el nicho, en el cual las interacciones entre el componente germinal y somático regulan el

comportamiento de las células germinales. Estas señales mantienen, por ejemplo, el balance entre la autorrenovación y la diferenciación necesaria para el progreso de la gametogénesis manteniendo el bloqueo hacia la diferenciación somática. En este sentido, la regulación a nivel post-transcripcional es esencial en el control de la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células germinales (en este nivel actuaría la helicasa de ARN Vasa). Recientemente se ha identificado una nueva clase de pequeños ARNs conocidos como “piRNAs” que estarían involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica durante la gametogénesis. Aún no se ha demostrado si estos ARNs, además de proteger la estabilidad genómica de las células germinales juegan un papel instructivo en la biología de las mismas (Cinalli y *col.* 2008).

Las células germinales primordiales han sido consideradas una población celular altamente útil para la preservación de material genético, en especial de especies en peligro de extinción o de interés económico. Éstas pueden ser marcadas específicamente inyectando las construcciones antes mencionadas y aisladas mediante citometría de flujo para posteriormente ser transplantadas en embriones en desarrollo. Estas células son capaces de colonizar las gónadas y diferenciarse en gametos masculinos o femeninos de acuerdo al sexo del individuo huésped. Estas técnicas abren una nueva posibilidad para preservar recursos genéticos dado que, aunque se ha criopreservado con éxito gametos masculinos, no ha sido posible el uso de esta técnica en ovocitos. La criopreservación de células germinales primordiales de peces ofrece entonces una alternativa útil ya que estas células pueden diferenciarse en cualquiera de los dos gametos de la especie, incluso, en individuos de especies cercanas filogenéticamente (Yoshizaki y *col.* 2005).

Asimismo, se ha descrito que los patrones de migración de esta población celular son similares a los observados en células del sistema inmune y ciertos tipos de células metastásicas por lo que la profundización en el conocimiento de la migración de estas células serían relevantes para comprender mecanismos involucrados en ciertas enfermedades de la especie humana (Richardson y Lehmann, 2010).

Diferenciación gonadal

Patrones de diferenciación gonadal

De acuerdo con el patrón de diferenciación gonadal, las especies se clasifican en gonocóricas (sexos separados en distintos organismos) o hermafroditas (ambos sexos en un mismo individuo). Dentro de los organismos gonocóricos, se pueden definir a su vez dos categorías: gonocorismo diferenciado (las gónadas se diferencian directamente en testículos u ovarios) y gonocorismo indiferenciado (las gónadas atraviesan una fase ovárica luego de la cual el 50% de los ovarios se diferencia en testículos). A su vez, los organismos hermafroditas pueden ser sincrónicos (presentando autofecundación o fecundación cruzada) o secuenciales (Yamamoto, 1969). En especies hermafroditas sincrónicas los individuos poseen tejido gonadal masculino y femenino funcional. Los hermafroditas secuenciales pueden madurar inicialmente como machos (protandria) o como hembras (protoginia) (Ross, 1990). Si bien los peces teleósteos exhiben toda la gama de patrones de diferenciación sexual, la mayoría corresponde al tipo gonocórico (Yamamoto, 1969; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010).

Diferenciación gonadal temprana a nivel morfológico

En los vertebrados pertenecientes a aves y mamíferos, es posible reconocer en el componente somático de las gónadas dos regiones: la corteza (originada a partir de la pared peritoneal) y la médula (derivada del mesonefros). Durante la diferenciación ovárica, la corteza se desarrolla y la médula degenera mientras que durante la diferenciación testicular, la corteza degenera desarrollándose la región medular. Sin embargo, el componente gonadal somático en los anfibios anuros y los peces teleósteos presenta un origen embrionario único que no implica participación de células derivadas del mesonefros (Hoar, 1969; Lepori, 1980; Merchant-Larios y Villalpando, 1981; Capel, 2000). El origen histológico de las células que forman el soporte al parénquima gonadal sería la pared peritoneal (derivada del mesoderma lateral)

(Nakamura y col. 1998). Otro elemento que distingue a los teleósteos del resto de los vertebrados es el desarrollo del sistema de ductos, esenciales para la liberación de los gametos durante el período reproductivo. En vertebrados no teleósteos, los ductos müllerianos y wolffianos juegan roles importantes en la formación del sistema de conductos femenino y masculino respectivamente mientras que en peces teleósteos, el sistema de ductos incluye, en las hembras, a la cavidad ovárica (donde son depositados los ovocitos ovulados) que se conecta con los oviductos y en los machos los ductos eferentes, ambos ductos finalmente se comunican con las papilas genitales (Rasotto y Shapiro, 1998; Strüssman y Nakamura, 2002).

Los primeros eventos hacia la formación de una gónada funcional involucran la diferenciación del linaje germinal tempranamente en el desarrollo, la formación de los rudimentos gonadales (componente somático) y la migración e incorporación de las células germinales primordiales a las gónadas en desarrollo. Las gónadas rudimentarias experimentan luego un período de crecimiento somático sin diferenciación sexual que puede extenderse días, meses o años dependiendo de la especie (Strüssman y Nakamura, 2002). En los teleósteos adultos se ha documentado la presencia de un par de gónadas excepto en los peces vivíparos cuyos primordios gonadales se fusionan durante el desarrollo (Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010).

En la mayor parte de las especies de peces teleósteos gonocóricas analizadas, el desarrollo ovárico ocurre antes que el testicular (Nakamura y col. 1998). Por ejemplo, el inicio de la mitosis (seguida de la meiosis) en las células germinales en hembras y machos en la tilapia *Oreochromis niloticus* ocurre a los 35 y 70 días post eclosión respectivamente (Nakamura y Nagahama, 1985, 1989) y 49 y 98-119 días post eclosión en el pejerrey *Odonthesthes bonariensis* (Strüssmann y col. 1996). Muy pocas especies presentan diferenciación simultánea de ambos sexos como es el caso de la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Nakamura y Takahashi, 1973) pero no se ha descrito ningún caso de diferenciación testicular anterior a la ovárica (Strüssman y Nakamura, 2002)

Se ha sugerido que la aparición de estructuras como la cavidad ovárica y ductos eferentes, diferencias en relación al número de células germinales presentes y el comienzo precoz de la meiosis en células germinales femeninas, son criterios válidos para identificar el sexo de una gónada en etapas tempranas del desarrollo (Nakamura y col. 1998). Sin embargo, la elección del criterio a aplicar en el diagnóstico depende de la especie en estudio. Mientras que la mitosis en las células germinales necesariamente precede a la meiosis, la diferenciación germinal y somática (por ejemplo la formación de la cavidad ovárica) ocurre simultáneamente. La diferenciación somática claramente precede a la germinal en pocas especies como la carpa *Ctenopharyngodon idella* (Jensen y Shelton 1983), pudiendo incluso no ser reconocida en especies que no presentan una cavidad ovárica verdadera como por ejemplo en la anguila europea *Anguilla anguilla* (Colombo y Grandi 1996). Como consecuencia, se ha establecido, para la mayoría de los teleósteos, que el criterio más confiable para diagnosticar el sexo gonadal se refiere al número de células germinales presentes: este número es mucho mayor en ovarios presuntivos en comparación con testículos presuntivos (Nakamura y col. 1998; Strüssman y Nakamura, 2002).

En relación a la diferenciación ovárica, se ha documentado en la mayoría de los teleósteos que el camino de diferenciación comienza con el inicio de la proliferación de las células somáticas y las células germinales, la formación de la cavidad ovárica y el inicio de la meiosis en una fracción de las células germinales (Nakamura y col. 1998). Durante esta diferenciación se establece el folículo ovárico mediante la interacción entre las células germinales y las células foliculares (Grier, 2000). En algunas especies como *Carassius auratus* y *Oreochromis mossambicus* el inicio en la formación de la cavidad ovárica coincide con la aparición de células germinales al inicio de la meiosis mientras que en otras especies del mismo Orden como *Oreochromis niloticus* la cavidad ovárica se forma previamente a la aparición de células meióticas (Nakamura y col. 1998)

En relación a la diferenciación testicular, como ya se ha mencionado anteriormente en este Capítulo, los testículos permanecen indiferenciados por

períodos más extensos que los ovarios. La espermatogénesis comienza en períodos post-eclosión, como es el caso de *Oreochromis mossambicus* y *Oreochromis niloticus* en los que ésta comienza entre los 50 y 70 días post-eclosión (Nakamura y Nagahama 1989). La formación de los ductos eferentes, oficio de elemento estructural somático indicativo de la diferenciación testicular reconociéndose por la aparición de pequeños espacios en el primordio gonadal (Nakamura y col. 1998). En especies gonocóricas indiferenciadas, el primer signo de diferenciación testicular es la regresión de los elementos femeninos. En *Danio rerio* se demostró que este fenómeno ocurre por apoptosis. Luego se inicia la espermatogénesis identificable por un aumento en la proliferación espermatogonial y la formación de los cistos compuestos por las células germinales y las células de Sertoli en la periferia de la gónada (Uchida y col. 2002).

En este capítulo se analizarán las características de las células germinales primordiales presuntivas utilizando inmunodetección y microinyección *in vivo* de marcadores moleculares específicos de esta población celular. Analizaremos también la formación de las gónadas, a escala morfológica y temporal durante la ontogenia de *Austrolebias charrua*, mediante técnicas histológicas.

1.2 Materiales y métodos

1. Inmunodetección *in toto* de células germinales primordiales presuntivas

Embriones (n=50) de *Austrolebias charrua* fueron obtenidos, cultivados y clasificados según Arezo y col. (2005). Se anestesiaron en 2-phenoxy-ethanol (Sigma) al 1 ‰ durante 10 minutos según normativa de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal). Se fijaron en PFA 4%-PBS toda la noche a temperatura ambiente. Luego de decorionados bajo microscopio mediante tracción con pinzas (Dumont N° 5), se bloqueó la actividad peroxidasa endógena (4 partes de metanol, 1 parte de H₂O₂ 3%) durante 10 minutos y se expusieron a solución de bloqueo de sitios inespecíficos (20% suero fetal bovino, 1%DMSO, 0,1% Tween en PBS) durante 3 horas. La incubación con anticuerpo primario policlonal anti-Vasa 1:1000 se realizó a 4°C toda la noche. Este anticuerpo reconoce la región MITTY 2 (aminoácidos 155 al 166) de la proteína Vasa del pez *Danio rerio* (Yoon y col. 1997), fue producido y cedido para esta aproximación experimental por el Dr. Marcelo Antonelli (Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Se incluyó un control negativo (sin anticuerpo anti Vasa). Lavados: PBST-1%DMSO 5 veces durante 20 minutos. La incubación con anticuerpo secundario (anti conejo IgG conjugado con peroxidasa, SIGMA) 1:250 se realizó durante 4 horas a temperatura ambiente. Las células Vasa-positivas fueron detectadas mediante el sustrato de peroxidasa AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, SIGMA). Para visualizarlas se utilizaron microscopios Nikon Eclipse E1000 (DIC) u Olympus Vanox; las fotografías fueron tomadas con cámara: CCD cooled Hamamatsu C4742-95 o PM 10 AD camera respectivamente.

2. Ensayos de microinyección para identificación de células germinales primordiales presuntiva

Los embriones (n=22) en el estadio de 1 célula fueron aislados de las turbas y se procedió, bajo lupa, a rasurarlos utilizando un bisturí con el fin de eliminar los filamentos adherentes que recubren toda su superficie. Éstos fueron posteriormente inyectados con:

1) 5 nl de una solución que contenía: 0,3 ng de la construcción 3'UTR *vasa-GFP* (Knaut y col. 2002), 0,33 ng de la construcción nuclear histona H₂B- proteína roja fluorescente (RFP) (Concha, no publicado) y 0,3 µl de rojo fenol (SIGMA) (n=17).

2) 5 nl de una solución que contenía 0,315 ng de la construcción 3'UTR *nos1-GFP* (homólogo de *nanos*) (Köprunner y col. 2001), 0,33 ng de la construcción nuclear histona H₂B- RFP (Concha, no publicado) y 0,3 µl de rojo fenol (SIGMA) (n=5).

La construcción histona H₂B-RFP nuclear fue utilizada con 2 objetivos: evidenciar la ubicación de los núcleos celulares para distinguir claramente entre células GFP positivas y negativas y como control de la distribución de las construcciones inyectadas.

Los embriones inyectados se cultivaron en Yamamoto a 25°C y se observó su desarrollo cada 24 horas. Para visualizarlos se utilizó el microscopio Nikon Eclipse E1000 (DIC) equipado con la cámara CCD cooled Hamamatsu C4742-95.

Consideraciones acerca del diseño experimental de microinyección

Más allá del estadio somítico temprano del desarrollo ningún embrión inyectado continuó viable. Existen ciertas desventajas para la instrumentación de la microinyección en embriones de *Austrolebias charrua*. En primera instancia, es dificultosa la obtención de embriones en estadio de 1 célula debido al patrón de desove que presenta esta especie obteniéndose 2-3 ovocitos por hembra, por incursión en el sustrato (Belote y Costa, 2004) en el transcurso del día a diferencia de lo que ocurre en pez cebra cuyo desove ocurre de manera sincronizada a las 2 horas de iniciado el período de luz,

obteniéndose unos 200 ovocitos por hembra (Westerfied, 2000). Los ovocitos de *Austrolebias charrua* presentan un corion muy resistente, completamente cubierto por filamentos adherentes (Arezo y col. 2007). Una vez fecundados, bajo lupa se debe proceder a rasurarlos uno a uno, utilizando una pinza como sostén y un bisturí, con la finalidad de evitar la obstrucción de la aguja de inyección. Este procedimiento provoca la rotura de algunos embriones, hecho que, sumado al bajo número de ovocitos que se logran obtener al día, dificulta alcanzar un número elevado de embriones en 1 célula a inyectar por sesión. Finalmente, la rotura del corion por el procedimiento de inyección compromete la viabilidad de los embriones incrementando su vulnerabilidad.

3. Análisis histológico

Tres tipos de materiales fueron examinados mediante esta metodología: embriones, larvas y gónadas adultas de *Austrolebias charrua*. Los embriones (n=161) se anestesiaron en 2-phenoxy-ethanol (Sigma) al 1 ‰ durante 10 minutos según normativa de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal). Se fijaron en solución de Stockard (formol, ácido acético glacial, glicerina, y agua destilada, 5:4:6:85; Costello y col. 1957) durante 48 horas. La finalidad de este paso es lograr una prefijación del material para mejorar la manipulación durante el decorionado mecánico de los mismos. Posteriormente se procedió a decorionarlos como se describió anteriormente y los embriones fueron fijados en solución de Bouin (75 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formol y 5 ml de ácido acético glacial.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las larvas (n=35) fueron sacrificadas exponiéndolas durante 10 minutos a una solución anestésica de 2-phenoxy-ethanol (Sigma) al 1 ‰ y luego fijadas en solución Bouin durante 2 horas a temperatura ambiente. Ovarios y testículos fueron obtenidos de peces adultos colectados durante los meses de mayo a diciembre (10 hembras y 10 machos por mes) Los mismos fueron sacrificados por inmersión en agua de acuario conteniendo el anestésico 2-phenoxyethanol (Sigma) al 5‰. Las gónadas fueron removidas y fijadas en solución Bouin durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego de lavarlas y deshidratarlas en una serie de alcoholes de

graduación creciente, los embriones, larvas y gónadas adultas fueron embebidas en parafina (Paraplast, Fluka) . Se realizaron cortes semiseriales de 7 μm de espesor los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina y montados en un medio sintético (Entellan, Fluka) (Ganter y Jolles 1970). Los cortes fueron examinados y fotografiados mediante un microscopio de luz Olympus-Vanox equipado con cámara PM 10 AD. Las medidas fueron realizadas utilizando un micrómetro ocular (E. Leitz 1/100 mm).

Los estadios del desarrollo embrionario para realizar este estudio fueron determinados en relación al tiempo post-fecundación sumado a características morfológicas. Los estadios de maduración ovocitaria y organización testicular fueron definidos de acuerdo a Wallace y Selman (1981) y Grier (1981) respectivamente.

1.3 Resultados y discusión

Identificación de células germinales primordiales presuntivas

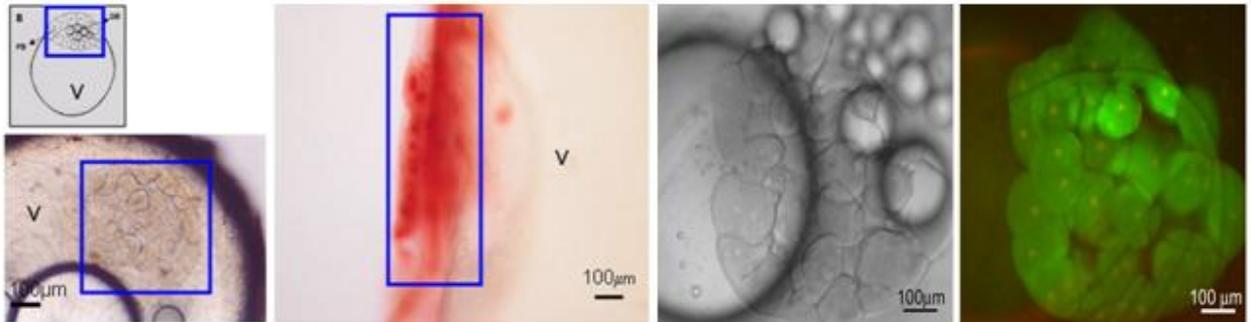
El anticuerpo anti-Vasa generado contra una región de esta proteína del pez *Danio rerio*, permitió la identificación de una población de células positivas en embriones de *Austrolebias charrua*. Asimismo, fue posible detectar en los embriones inyectados con las construcciones 3'UTR *vasa-GFP* y 3'UTR *nos1-GFP* células GFP-positivas desde el estadio de 1 célula hasta embriones somáticos tempranos.

Durante el estadio de blástula temprana la totalidad de las blastómeras resultaron ser Vasa / GFP-positivas (Fig. I. 1a). El primer patrón de expresión diferencial de marcado se observó durante las etapas de epibolia (blástula tardía) (Fig. I.1b) y reagregación (etapa donde ocurre la gastrulación en embriones de peces anuales). En esta última, la marca se detectó en una población celular restringida de aproximadamente 10 células de $13 (\pm 3,2) \mu\text{m}$ de diámetro (Fig. I.1c), alejadas de la zona de reagregación. Durante la somitogénesis y organogénesis temprana (aproximadamente 2 semanas post-fecundación), las células Vasa / GFP-positivas permanecían fuera del embrión (Fig. I.1d). En embriones de 1 mes post-fecundación (Fig. I.1e), detectamos una región interna Vasa-positiva en la zona ventral media de los mismos coincidente con la región en que los rudimentos gonadales comienzan a diferenciarse (Arezo y col. 2007).

Figura 1.1

Inmunodetección de células Vasa-positivas (derecha) observados con microscopía de campo claro e inyección de ARNm 3'UTR vasa- GFP/RFP nuclear *in vivo* (izquierda).

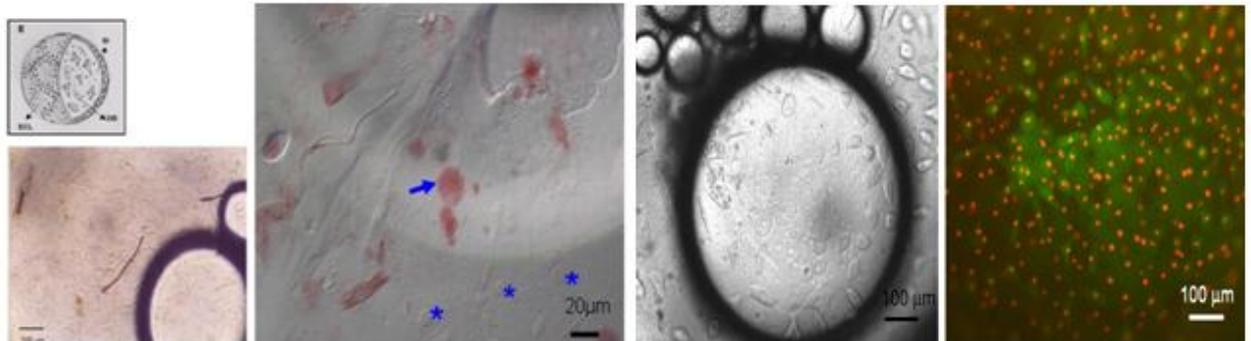
a) Blástula temprana



(izq: embrión *in vivo*; der: células Vasa-positivas)
DB: blastómeras profundas; PB: blastómeras periféricas; V: vitelo. Recuadro: blástula.

(izq: embrión campo claro; der: epifluorescencia)
Rojo: núcleos celulares.
Verde: células GFP-positivas.

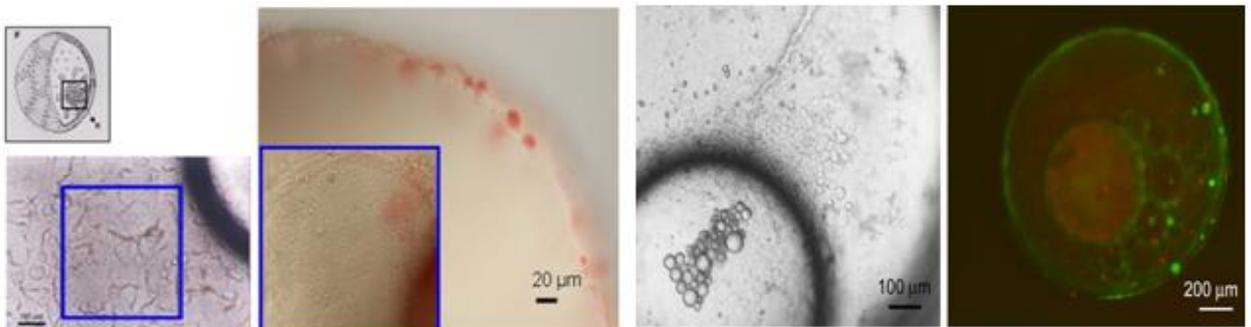
b) Epibolia - Fase dispersa



(izq: embrión *in vivo*; der: células Vasa-positivas)
DB: blastómeras profundas; SL: capa sincitial;
ECL: capa celular envolvente.
Flecha: células Vasa-positivas.
Asteriscos: células Vasa-negativas.

(izq: embrión campo claro; der: epifluorescencia)
Rojo: núcleos celulares.
Verde: células GFP-positivas

c) Fase de reagregación

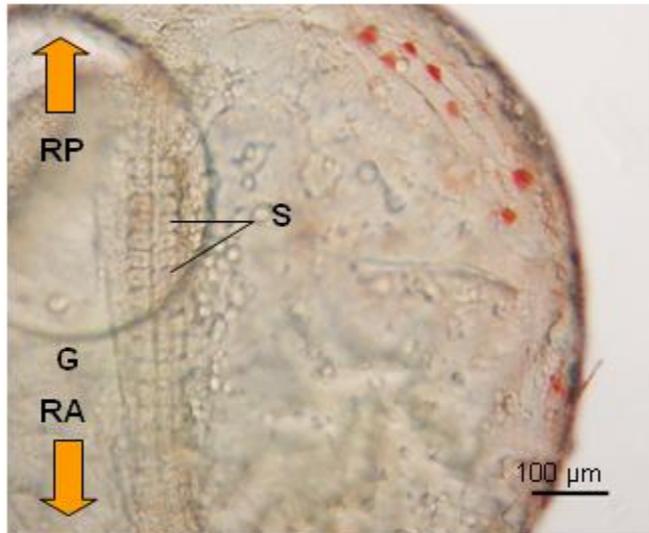


(izq: embrión *in vivo*; der: células Vasa-positivas) Recuadro: reagregado.

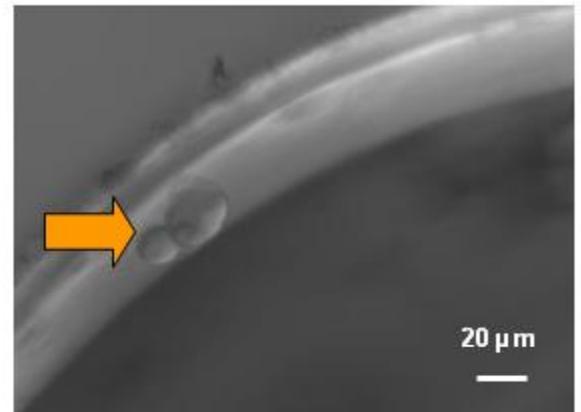
(izq: embrión campo claro; der: epifluorescencia)
Rojo: núcleos celulares.
Verde: células GFP-positivas

Figura I.1

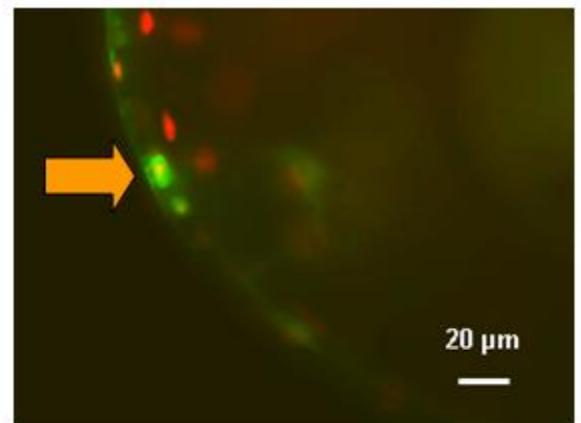
d) Embrión somítico



Células Vasa-positivas (rojo).
 Flecha RP: región caudal (posterior)
 Flecha RA: región cefálica (anterior)
 S: somites
 G: gota lipídica

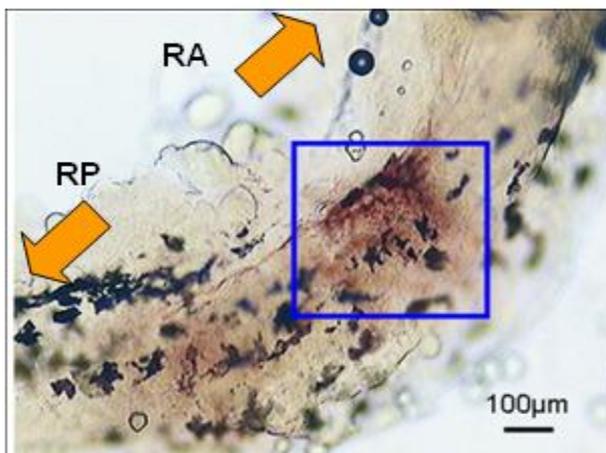


Microscopía de Nomarski

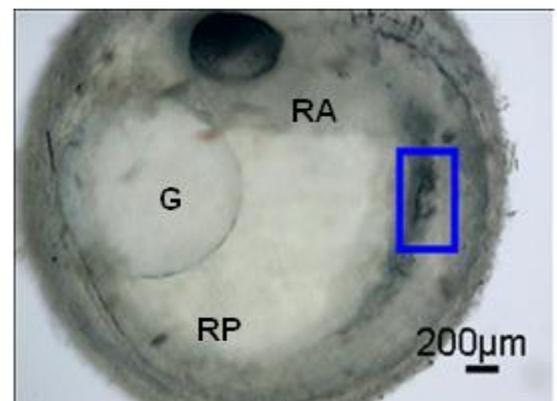


Epifluorescencia. Rojo: núcleos celulares.
 Verde: células GFP-positivas
 Flechas: células GFP positivas

e) Embrión de un mes post-fecundación



Recuadro: zona Vasa-positiva.
 Flecha RP: región caudal (posterior)
 Flecha RA: región cefálica (anterior)



Embrión *in vivo*.
 Recuadro: zona del primordio gonadal
 G: gota lipídica
 RP: región caudal (posterior)
 RA: región cefálica (anterior)

En *Oryzias latipes*, mediante la técnica de hibridación *in situ*, se describió la existencia de 10 a 25 células Vasa-positivas en el estadio equivalente a la reagregación en *Austrolebias charrua* (Shinomiya y col. 2000). A su vez el patrón de expresión evidenciado por inmunodetección en blástulas de *Austrolebias charrua* es similar al descrito en blástulas de *Danio rerio* (Braat y col. 2000) aunque los anticuerpos utilizados por este grupo y por nosotros reconocen regiones diferentes de la misma proteína. Esta proteína, de origen materno, se encuentra distribuída de forma homogénea en todas las blastómeras restringiéndose a una subpoblación de éstas durante el estadio de blástula media (estadio de 1.000 células, Braat y col. 2000) a blástula tardía (estadio de esfera, Knaut y col. 2000). Vasa muestra una degradación gradual en células somáticas permaneciendo sólo en aquella población celular precursora de la línea germinal (Wolke y col. 2002). Los resultados obtenidos en embriones de *Austrolebias charrua* demuestran que el primer evento de expresión diferencial estaría comenzando durante la etapa de blástula tardía (momento en el que se observa por primera vez una distinción entre poblaciones celulares positivas y negativas).

El patrón de expresión de las construcciones 3'UTR vasa-GFP y 3'UTR nos1-GFP fue análogo en ambas poblaciones de embriones inyectados y a su vez, coincidente con el patrón de expresión observado mediante inmunodetección antes descrito. La regulación de la expresión de nos1-GFP sería dependiente de los mismos procesos de degradación-protección tejido específico (Kopranner y col. 2001) descritos para vasa (Wolke y col. 2002)

El marcado de los núcleos celulares con la construcción histona H₂B-RFP mostró una intensidad similar en la totalidad de las células, en todos los estadios y embriones analizados. Este hecho sugiere que la distribución de los diferentes ARNm inyectados es homogénea, por lo tanto la ausencia de marcado en la totalidad de las células podría atribuirse a una diferencia en la estabilidad del mensajero entre la población de células somáticas y las células germinales primordiales presuntivas.

El ARNm del gen vasa, en *Danio rerio*, se distribuye de manera asimétrica en los planos de segmentación en embriones tempranos de 2 y 4

células (Yoon y col. 1997). Este mensajero se degrada específicamente en las células somáticas pero se encuentra estabilizado y traducido en células que contienen plasma germinal (Wolke y col. 2002). En *Oryzias latipes*, el ARNm homólogo de *vasa* se encuentra uniformemente distribuido hasta el estadio de gástrula tardía (Shinomiya y col. 2000). Sin embargo, la proteína Vasa se restringe más tempranamente a la población de células germinales primordiales (Herpin y col. 2007). Esta localización de la proteína Vasa podría atribuirse a mecanismos post-transcripcionales específicos complementarios: 1) traducción específica potenciada debido a 3'UTR del mensajero *vasa* (Kurokawa y col. 2006); 2) inhibición somática de la traducción; 3) desestabilización soma-específica de la proteína (Wolke y col. 2002). En *Oncorhynchus mykiss*, Yoshizaki y col. (2005), proponen dos mecanismos potenciales para explicar la expresión de GFP bajo el mando de 3'UTR de *vasa*: 1) al igual que en pez cebra, la región 3'UTR de *vasa* estabilizaría específicamente al ARN quimérico en las células germinales primordiales pero no en las células somáticas; 2) la región 3'UTR de *vasa* potencia la traducción del ARN quimérico específicamente en las células germinales primordiales. Los autores sugieren que, aunque no es posible descartar el segundo mecanismo, el primero sería más razonable considerando que la vida media de la proteína GFP es de 24 horas (Corish y col. 1999) y que la sola potenciación de la traducción de GFP no explicaría que GFP se observara durante 50 días en estos individuos.

Se ha descrito que el control de la expresión génica diferencial entre células germinales y somáticas dependería de eventos post-transcripcionales en diferentes especies de peces teleósteos como *Oryzias (latipes, curvinotus, y luzoiensis)* y *Betta splendens*. Estos mecanismos postranscripcionales diferenciales serían un mecanismo conservado en diferentes linajes de peces alejados filogenéticamente (Cypriniformes, Perciformes y Beloniformes), (Herpin y col. 2007).

Los estudios comparativos en diferentes especies revisten gran importancia para la comprensión de la dinámica del desarrollo de las células germinales primordiales. Análisis desarrollados por Saito y col. (2006) en 7

especies representantes de 4 clados del árbol filogenético de los teleósteos (Clupeiformes, Cypriniformes, Beloniformes y Perciformes) mostraron que la expresión de 3'UTR ARNm *nanos*-GFP se observa desde el estadio de blástula. Luego, en el estadio 50% epibolia hasta la somitogénesis se observó una disminución en el número de células GFP positivas que varía entre los embriones, incluso de una misma especie. La expresión de GFP disminuye en las células somáticas no así en un subgrupo de células durante el desarrollo embrionario sugiriendo que existe una diferencia en la estabilidad de los ARNm inyectados entre ambas poblaciones celulares (células somáticas y células GFP positivas) por lo que los autores concluyen que las células GFP positivas representan a las células germinales primordiales presuntivas. Estos resultados sugieren que *nanos* 3'UTR está ampliamente conservado en los peces, no así 3'UTR ARNm *vasa* de *Oryzias latipes* ya que éste no permitió la visualización de células germinales primordiales en 2 especies de Cypriniformes (*Danio rerio* y *Misgurnus anguillicaudatus*, Saito y col.2006). La región 3'UTR de *vasa* tanto en *Danio rerio* como en *Oryzias latipes* posee un rol crítico en la estabilización de éste en las células germinales primordiales (Wolke y col. 2002; Tanaka y col. 2001). Estos resultados indican que el mecanismo de mantenimiento de *vasa* en las células germinales primordiales de *Oryzias latipes* o su degradación en las células somáticas no es el mismo en *Danio rerio* y *Misgurnus anguillicaudatus* por lo que no estaría conservado en todas las especies de peces a diferencia de lo que ocurre con *nanos* (Saito y col.2006).

Los resultados obtenidos en *Austrolebias charrua* evidencian un comportamiento similar de la población de células GFP positivas durante las primeras etapas del desarrollo al descrito por Saito y col. (2006) tanto en embriones inyectados con 3'UTR *vasa* – GFP o 3'UTR *nos1* –GFP. Estos datos concuerdan con los resultados presentados por Yoshizaki y col. (2005) argumentando a favor de la hipótesis en relación a la existencia de conservación de la secuencia 3'UTR del ARNm *vasa* proveniente de grupos taxonómicos muy divergentes.

Diferenciación gonadal

La especie *Austrolebias charrua*, al igual que otros peces anuales, presenta diferencias en cuanto a los tiempos de desarrollo y eclosión incluso comparando embriones de una misma puesta (Wourms 1972 a; Lesseps y col. 1975; Van Haarlem 1983; Arezo y col. no publicado). A su vez, la posibilidad de experimentar diapausas de diferente duración (Wourms 1972c) incrementa aún más la asincronicidad durante el desarrollo. Por lo tanto, considerando esta variabilidad, el criterio utilizado para establecer los estadios del desarrollo tardío de *Austrolebias charrua* analizados en el presente trabajo conjuga dos variables: el tiempo post-fecundación y algunas características morfológicas del embrión.

Los embriones de aproximadamente tres semanas post-fecundación (n=36) ocupan más de la mitad del perímetro vitelino, las retinas oculares han comenzado a pigmentarse, se observan algunos eritrocitos circulantes en los vasos sanguíneos y las vesículas óticas no contienen otolitos. Los primordios gonadales en este estadio se observan en la región media del eje antero-posterior embrionario ubicados en posición dorso-lateral con respecto al tubo digestivo y ventrales a la notocorda (Fig. I.2a). Están formados por grupos de células germinales que no presentan ningún signo de diferenciación rodeadas por células somáticas aplanadas (estado indiferenciado) (Fig. I.2b). Las células germinales son reconocidas en base a criterios morfológicos: forma redondeada, gran tamaño ($12\pm 2,5\mu\text{m}$), relación núcleo/citoplasma alta, nucleolos fuertemente teñidos y citoplasma hialino (Fig I.2 b,c).

Los embriones de aproximadamente un mes post-fecundación (n=43) ocupan todo el perímetro vitelino, las retinas oculares están intensamente pigmentadas, la circulación sanguínea es evidente, las vesículas óticas presentan dos otolitos y algunos melanóforos se observan dispersos en la epidermis embrionaria. En este momento, es posible diferenciar dos tipos gonadales en diferentes individuos. El tipo gonadal I está compuesto por dos poblaciones celulares de células germinales. Un tipo celular presenta características morfológicas similares a las células germinales indiferenciadas descritas en el estadio previo, mientras que el otro tipo (células con núcleo

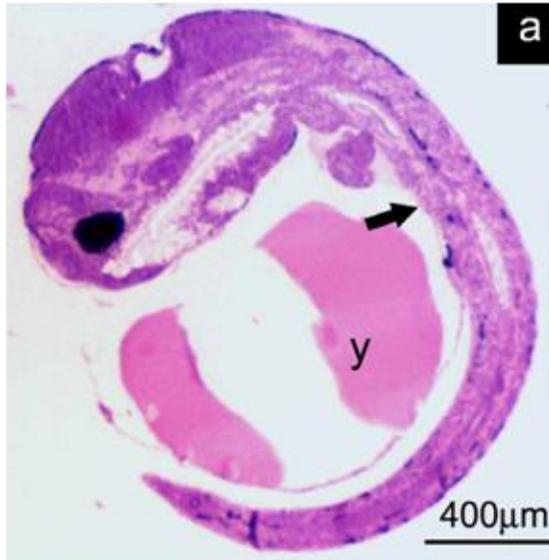
basófilo y cromatina condensada) está experimentando mitosis (Fig. 1.2c). El tipo gonadal II muestra menor número de células con características similares a las observadas en el estadio indiferenciado (Fig. 1.2d). Aplicando el criterio más confiable para evidenciar la diferenciación gonadal en la mayoría de los teleósteos (mayor número de células germinales en ovarios presuntivos en relación a testículos presuntivos) (Nakamura y *col.* 1998; Strüssman y Nakamura, 2002), observamos en este momento del desarrollo, el primer signo de diferenciación gonadal histológico. El tipo gonadal I correspondería a un ovario presuntivo y el tipo gonadal II a un testículo presuntivo.

En los embriones pre-eclosión, (aproximadamente 38 días post-fecundación, n=42), el extremo de la aleta caudal contacta con los ojos y la epidermis se encuentra intensamente pigmentada. Algunos individuos presentan una gónada en desarrollo en la cual se observaron ovogonias y ovocitos pre-vitelogénicos. Las ovogonias presentan grandes núcleos eucromáticos y escaso citoplasma (algunas de ellas se encontraban en mitosis). Los ovocitos meióticos tempranos contienen núcleos con finas hebras de cromatina mientras que los ovocitos en el estadio nucleolar son identificados por su escaso citoplasma y núcleo basófilo y excéntrico. Los ovocitos en estadio perinucleolar son caracterizados por la presencia de nucleolos periféricos y citoplasma basófilo (Fig. 1.2e). Otros individuos presentan células germinales en un estadio morfológico indiferenciado siendo clasificados como machos presuntivos (Fig. 1.2f).

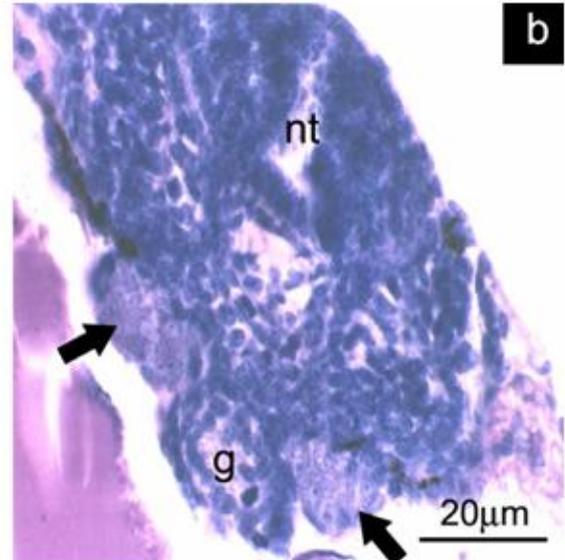
En el momento de eclosión (al menos 98 días post-fecundación, n=40) y 7 días post-eclosión (n=10), los ovarios muestran mayor tamaño, exhibiendo las mismas poblaciones celulares que fueron descritas en el estadio anterior (Fig. 1.2g), y un gradiente de diferenciación sexual antero-posterior. Los testículos presuntivos aún permanecen indiferenciados es esta etapa (Fig. 1.2h).

Figura I.2

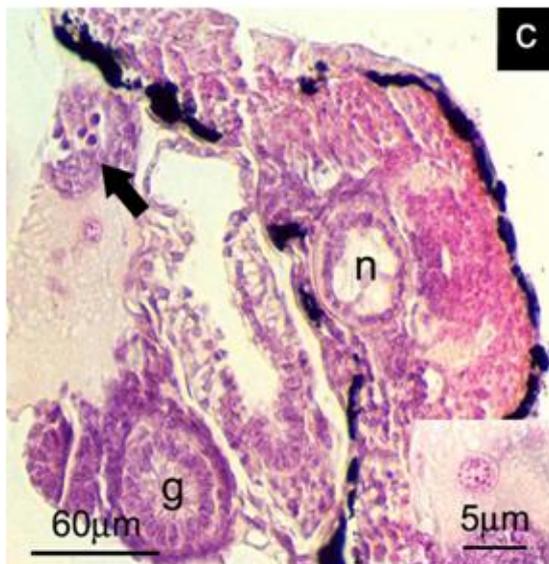
Diferenciación gonadal de *Austrolebias charrua* (hematoxilina y eosina)



Corte longitudinal de un embrión de 3 semanas post-fecundación.
Flecha: primordio gonadal; y: vitelo.



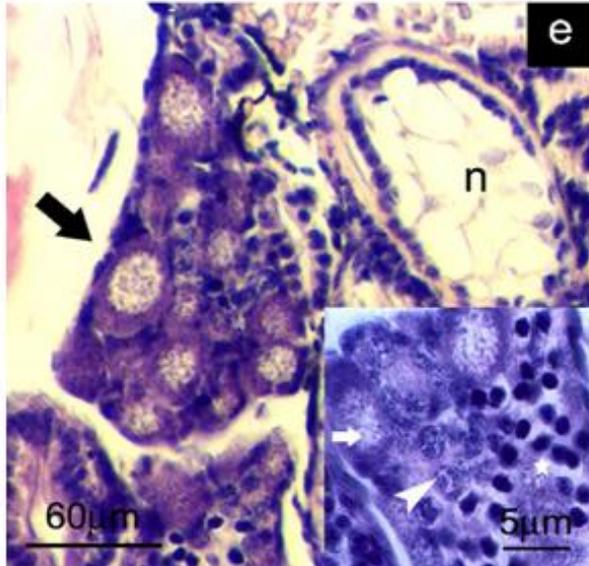
Corte transversal de un embrión de 3 semanas post-fecundación.
Flechas: primordios gonadales
g: tubo digestivo; nt: tubo neural



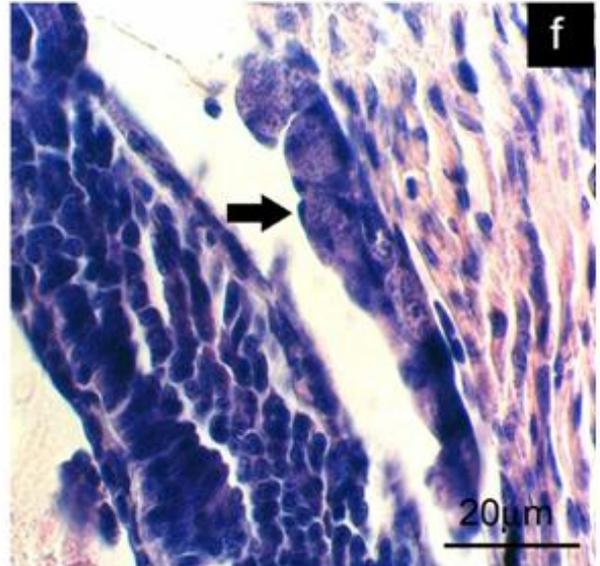
Embrión de 30 días post-fecundación.
Flecha: tipo gonadal I
Células germinales experimentando mitosis son reconocidas por su núcleo basófilo y cromatina condensada
g: tubo digestivo; n: notocorda
Cuadrado: magnificación de una célula germinal arribando a la gonada en desarrollo



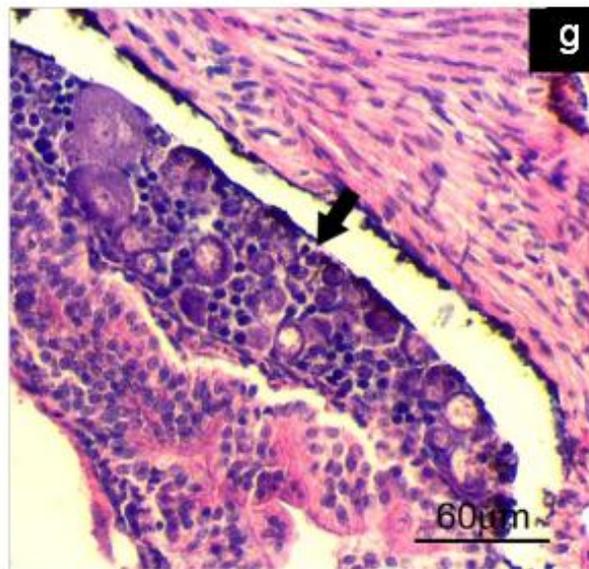
Embrión de 30 días post-fecundación
Flecha: tipo gonadal II
Y: vitelo; g: tubo digestivo.



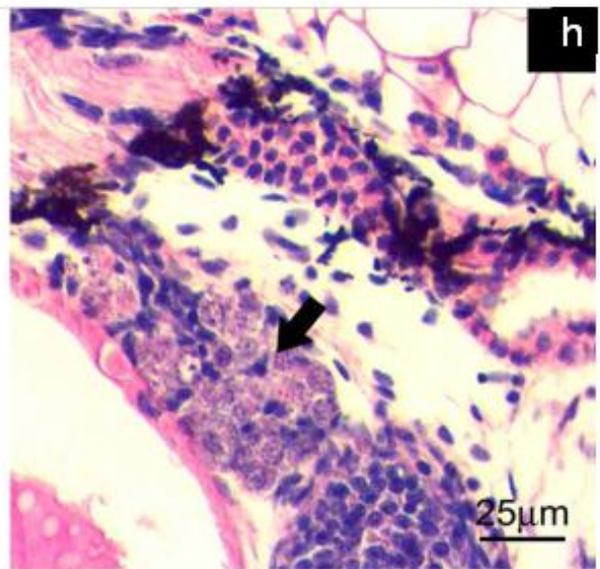
Embrión pre-eclosión
 Flecha: ovario en desarrollo
 n: notocorda; cuadro: magnificación de la gonada
 Estrella: población de ovogonias
 Cabeza de flecha: ovocitos en estadio cromatina nucleolar
 Flecha: ovocitos en estadio perinucleolar



Embrión pre-eclosión: macho presuntivo
 Flecha: gonada indiferenciada



Día de la eclosión (larva).
 Flecha: ovario.

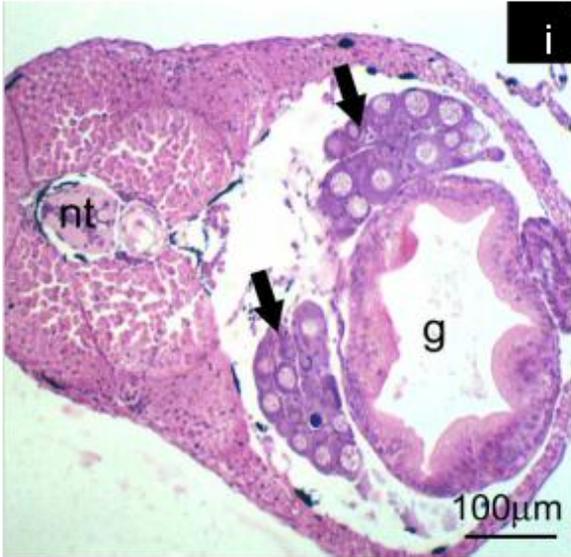


Día de la eclosión (larva).
 Flecha: testículo presuntivo

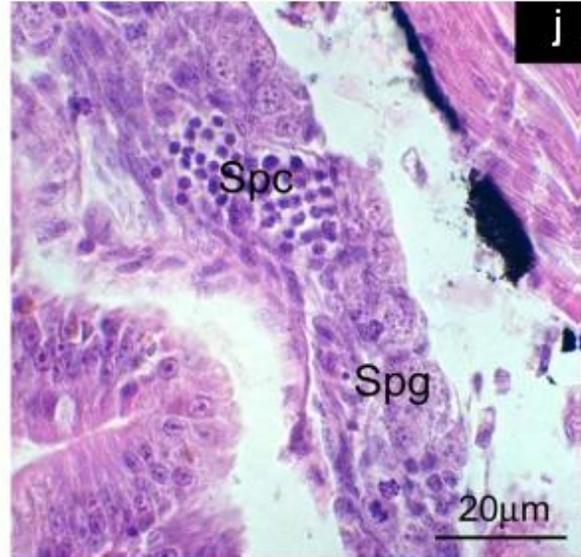
En larvas de 30 días post-eclosión, (n=15), los ovarios están compuestos principalmente de ovocitos perinucleolares (Fig. 1.2i). En otros individuos de la misma edad, se encuentran testículos en desarrollo conteniendo cistos con espermatoцитos meióticos (Fig. 1.2j).

En individuos juveniles (45 días post-eclosión, n=10), algunos individuos presentan los ovarios con ovocitos pre-vitelogénicos descritos anteriormente, ovocitos en estadio córtico-alveolares (más grandes que los perinucleolares y contienen alvéolos corticales) y ovocitos vitelogénicos (Fig. 1.2k). Otros individuos presentan testículos conteniendo todos los estadios celulares de la espermatogénesis (Fig. 1.2l).

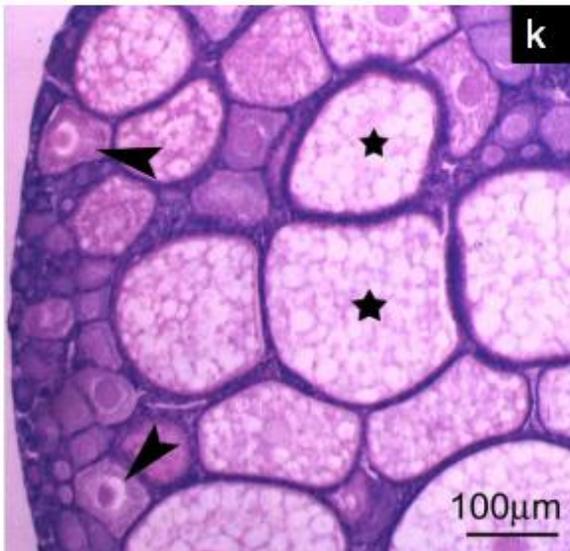
Como ya se ha mencionado en los Antecedentes de este Capítulo, la diferenciación sexual en la mayoría de los teleósteos gonocóricos, ocurre en diferentes momentos luego de la eclosión (días, meses o años dependiendo de la especie) comenzando previamente en el sexo femenino (Nakamura y col. 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002). En la especie *Oryzias luzonensis* (Beloniformes), el primer signo de diferenciación gonadal se evidencia a los 11 días post-fecundación (3 días post-eclosión) (Nakamoto y col. 2009). Sin embargo, en *Oryzias latipes* la misma ocurre a los 6 días post-fecundación (1 día pre-eclosión) (Kobayashi y col. 2004). En ambas especies el patrón de diferenciación gonadal corresponde al gonocórico diferenciado (Yamamoto, 1969). *Oryzias mekongensis*, especie filogenéticamente más cercana a las anteriores, presenta un sistema de determinación del sexo XX/XY (Hamaguchi y col. 2004) todos los individuos, independientemente del sexo, presentan ovogonias en el día de la eclosión evidenciándose diferencias entre los sexos a los 10 días post-eclosión (Otake y col. 2008). Este patrón de diferenciación gonadal corresponde al gonocórico indiferenciado (Yamamoto, 1969) al igual que el observado en *Danio rerio* (Uchida y col. 2002). Este hecho demuestra que, aún en especies muy cercanas, la ventana temporal de diferenciación e incluso el tipo de patrón en que ésta ocurre pueden ser variables evidenciando la especie-especificidad del mismo (Devlin y Nagahama, 2002).



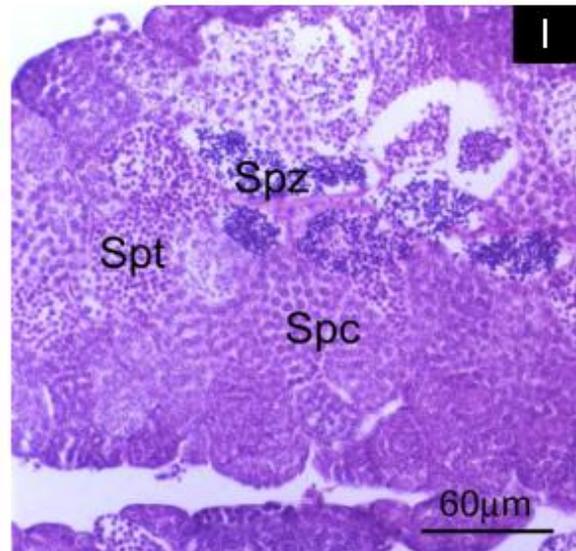
Larva de 30 días post-eclosión.
 Flechas: ovarios
 g: tubo digestivo; nt: tubo neural



Larva de 30 días post-eclosión.
 Spg: espermatogonias;
 Spc: nidos de espermatocitos



Juvenil de 45 días post-eclosión.
 Cabezas de flecha: ovocitos en estadio
 cortico-alveolar.
 Estrella: ovocitos vitelogénicos.



Juvenil de 45 días post-eclosión.
 Spc: espermatocitos; Spt: espermátidas; Spz:
 espermatozoides.

En *Austrolebias charrua* las gónadas comienzan su diferenciación en estadios pre-eclosión al igual que en *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes) (Koya y col. 2003) y *Oryzias latipes* (Kobayashi y col. 2004).

En relación a la estrategia de diferenciación sexual, los análisis histológicos de embriones de tres semanas post-fecundación hasta individuos adultos (Arezo y col. 2007) no mostraron la presencia de gónadas intersexo ni la existencia de un estadio 100% ovárico en el total de individuos analizados (n=341). Por definición, la ocurrencia transitoria de gónadas intersexo o estadios 100% ováricos ocurriría en individuos cuyo patrón de diferenciación sexual es el definido como gonocórico indiferenciado (Yamamoto 1969; Strüssmann y Nakamura 2002). Por consiguiente concluimos que la estrategia de diferenciación sexual para *Austrolebias charrua* corresponde al tipo gonocórico diferenciado al igual que el Cyprinodontiforme *Xiphophorus maculatus* (Flores y Burns, 1993).

Gónadas adultas

La morfología de las gónadas adultas ha sido utilizada tradicionalmente para identificar ciclos reproductivos anuales, inicio de la madurez reproductiva, ritmos de desove y otros aspectos de la biología reproductiva. Los análisis histológicos son considerados métodos apropiados para determinar el patrón reproductivo en los teleósteos (Parenti y Grier, 2004). *Austrolebias charrua* desova diariamente desde que alcanza la madurez sexual hasta la senescencia. En los análisis histológicos realizados durante la temporada reproductiva, se han encontrado células de la línea germinal femenina y masculina en todos los estadios de la gametogénesis (Arezo y col. 2007). Estas observaciones permiten definir un patrón asincrónico de desove (presencia de ovocitos en todos los estadios de diferenciación, Wallace y Selman, 1981) para la especie en estudio.

La organización histológica testicular de *Austrolebias charrua* corresponde al patrón lobular restringido descrito por Grier (1981) encontrado únicamente en la Serie Atherinomorfa (Atheriniformes, Beloniformes y Cyprinodontiformes). En esta especie, las espermatogonias están confinadas al

extremo distal de los lóbulos en correspondencia al patrón espermatogonial restringido. A diferencia de esta distribución, en la mayoría de los teleósteos no atherinomorfos, las espermatogonias se encuentran indistintamente en cualquier zona de los lóbulos testiculares (patrón espermatogonial irrestringido) (Grier, 1981).

Durante la etapa final de la ovogénesis, el vitelo muestra un cambio en su aspecto, pasando de granular a fluido y ocupa casi todo el ovocito. Esta característica del vitelo, la presencia de una envoltura vitelina con largos filamentos adhesivos y el patrón espermatogonial restringido (Arezo y col. 2007) presentan valor filogenético ya que constituirían caracteres derivados compartidos únicamente por los integrantes de la Serie Atherinomorfa (Parenti y Grier, 2004) representando sinapomorfías que apoyan la monofilia de este grupo de peces (Parenti, 2005).

1.4 Conclusiones

Identificación de las células germinales primordiales

Los resultados obtenidos indican que el patrón observado mediante inmunodetección *in toto* de la proteína Vasa endógena presuntiva coincide con los ensayos de expresión *in vivo* de la misma (inyección de la construcción 3'UTR ARNm *vasa*-GFP). A su vez, el patrón de expresión de la construcción 3'UTR ARNm *nanos*-GFP coincide con el observado en los ensayos de expresión *in vivo* de la construcción 3'UTR ARNm *vasa*-GFP. Estos datos, sumados a reportes en que se indica la existencia de conservación a nivel de los marcadores moleculares de células germinales primordiales en grupos taxonómicos divergentes, permiten sugerir que las células Vasa / GFP positivas constituirían la población de células germinales primordiales presuntivas de *Austrolebias charrua*.

De acuerdo con el patrón de expresión tempranamente diferencial de estos marcadores moleculares específicos de la población de células germinales primordiales observado en *Austrolebias charrua* al igual que el descrito en *Danio rerio*, *Oryzias latipes* y otras especies de peces teleósteos, el mecanismo de especificación de la línea germinal sería el de preformación en esta especie.

Diferenciación gonadal

Los datos obtenidos mediante análisis histológicos de 341 individuos permiten concluir que:

- 1) la estrategia de diferenciación sexual en la especie *Austrolebias charrua* corresponde al patrón "gonocórico diferenciado".
- 2) la ventana de diferenciación gonadal es temprana con inicio en el período pre-eclosión.
- 3) el patrón de desove es de tipo asincrónico.
- 4) la organización de la gónada masculina corresponde al patrón testicular restricto.

1.5 Perspectivas

Identificación de las células germinales primordiales

El paso inmediato es la caracterización de los genes homólogos *vasa* y *nanos* de *Austrolebias charrua* con el fin de diseñar construcciones tendientes a validar los resultados obtenidos y definir la ruta de migración de las células germinales primordiales presuntivas *in vivo*, desde el sitio de especificación hasta su incorporación en la gónada en desarrollo. En este sentido, es importante optimizar la viabilidad de los embriones inyectados ajustando y poniendo a punto la fineza de la tecnología de microinyección.

1.6 ANEXO

Capítulo 11:

**Mecanismos de determinación del sexo en
Austrolebias charrua: ensayos de termosensibilidad.**

11.1 Antecedentes

La determinación sexual implica una dicotomía: el sexo de un individuo es determinado por su genotipo en el momento de la fecundación o por factores ambientales que operan más tardíamente en la ontogenia como ya se ha mencionado en la Introducción de este trabajo. Con el objetivo de dilucidar el significado ecológico y evolutivo de la determinación sexual dependiente de la temperatura en vertebrados, es fundamental discernir entre los casos donde verdaderamente ocurre éste fenómeno y casos en los que esta variable simplemente ejerce un efecto sobre la proporción sexual primariamente determinada por factores genéticos. Estas instancias de susceptibilidad ambiental dentro de sistemas de determinación genética del sexo representarían una base importante en la evolución de los mecanismos de determinación sexual por temperatura cuya distinción es esencial para realizar análisis evolutivos (Valenzuela y *col.* 2003)

Si bien la literatura es concordante con respecto a las definiciones de los mecanismos de determinación sexual genética y ambiental, los criterios utilizados para diferenciar estos procesos no son claros. En general, existe confusión entre mecanismos de determinación y procesos de diferenciación sexual, siendo común que se refiera indistintamente a una u otra etapa. Existen casos de mortalidad embrionaria diferencial inducida por la temperatura (Burger y Zappalorti, 1988) donde ésta no afecta la determinación sexual en sí misma sino que simplemente impide el desarrollo de cigotos de un sexo establecido genéticamente generando una proporción sexual sesgada hacia el sexo resistente. Asimismo, determinados rangos de temperatura pueden afectar la diferenciación sexual causando reversión del fenotipo en especies que presentan cromosomas sexuales generando una discordancia entre el sexo fenotípico y el genotípico (Baroiller y *col.* 1995). Sin embargo, este caso tampoco implica determinación sexual dependiente de temperatura dado que

existen cromosomas sexuales que definieron el sexo en el momento de la fecundación (Valenzuela y col. 2003).

Conocer las causas de los cambios evolutivos repetidos entre mecanismos de determinación sexual genética y ambiental es uno de los problemas más importantes de la investigación en determinación del sexo que todavía no ha sido resuelto (Pen y col. 2010). Charnov y Bull (1977) proponen que la determinación sexual ambiental está favorecida por la selección natural cuando la aptitud individual (como macho o hembra) se encuentra fuertemente influenciada por condiciones ambientales. Por ejemplo, se han observado diferentes mecanismos de determinación sexual en lagarto *Niveoscincus ocellatus* operantes en distintas poblaciones según su ubicación geográfica. Esta especie habita en un gradiente desde el nivel del mar hasta regiones elevadas de Tasmania donde las condiciones climáticas varían sustancialmente en los diferentes ecosistemas. Las poblaciones de lagartos que se encuentran en las zonas más elevadas presentan una temporada de actividad más corta que las poblaciones que habitan zonas más bajas. Además, las primeras experimentan mayor varianza en relación a la temperatura ambiental lo que habría implicado la selección de mecanismos de determinación del sexo genéticos (independientes del ambiente) dado que éstos impedirían la aparición de proporciones sexuales extremas. Asimismo, un clima más estable, que es la condición de las zonas bajas, permite el establecimiento de una temporada de actividad más larga. Esta condición habría favorecido un cambio evolutivo que permitió el establecimiento de mecanismos de determinación sexual dependiente del ambiente en las poblaciones que habitan en las zonas bajas (Pen y col. 2010).

En los peces teleósteos, como ya se ha mencionado en la sección Introducción de esta tesis, la primera evidencia de determinación del sexo mediada por temperatura fue obtenida en estudios de campo y laboratorio en la especie *Menidia menidia* (Conover y Kynard, 1981). Desde entonces, se han descrito 55 especies con esta modalidad de determinación sexual cuyos patrones se clasifican básicamente en tres grupos: 1) bajas temperaturas producen proporciones sexuales sesgadas hacia hembras y altas temperaturas

producen proporciones sexuales sesgadas hacia machos; 2) bajas temperaturas producen proporciones sexuales sesgadas hacia machos y altas temperaturas producen proporciones sexuales sesgadas hacia hembras; 3) proporciones sexuales sesgadas hacia machos generadas en los extremos (bajas y altas temperaturas) mientras que las proporciones balanceadas macho: hembra se obtienen en rangos intermedios de temperatura (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008) (Fig. II.1).

En varias de estas especies, las evidencias provienen de ensayos de laboratorio utilizando temperaturas extremas que los organismos no experimentan en la naturaleza. Entonces, los cambios evidenciados en la proporción sexual resultante serían consecuencia de una influencia térmica en el proceso genético de determinación del sexo y no una demostración de que el factor inicial que desencadena la cascada de determinación sexual es la temperatura (Valenzuela y *col.* 2003). En este contexto, Opsina-Alvarez y Piferrer (2008), re-evaluaron la prevalencia de este mecanismo aplicando dos criterios independientes para discernir entre verdaderos casos de determinación ambiental del sexo (por temperatura) y casos de determinación sexual genética influidos por variables ambientales. El primer criterio utilizado por estos autores es el que describió Valenzuela y *col.* (2003) estableciendo, que la presencia de un sistema cromosómico de determinación del sexo en el cariotipo de una especie constituye una evidencia robusta a favor de un mecanismo de determinación del sexo genético. El segundo criterio propuesto por estos autores, implica que, para que una especie dada presente un mecanismo de determinación del sexo temperatura dependiente, la proporción sexual debe modificarse en respuesta a un rango de temperaturas ambientales específicamente experimentado por los individuos durante el período termosensible que usualmente ocurre durante el desarrollo embrionario, larvario o juvenil, dependiendo de la especie.

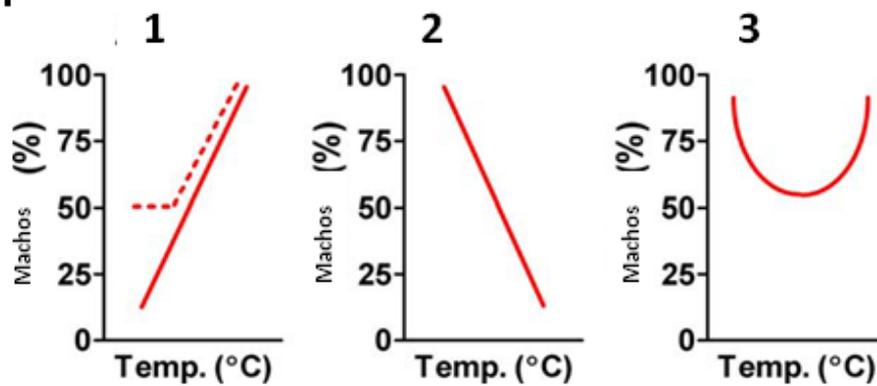
Como resultado, Opsina-Alvarez y Piferrer (2008) concluyeron que la determinación del sexo dependiente de la temperatura en peces teleósteos se encuentra restringida a un menor número de especies (40) que el reportado anteriormente (55). Asimismo, aquellas especies que efectivamente cumplen

con ambos criterios presentan un único patrón de respuesta a esta variable y no tres. El patrón observado en todos los casos coincide con el patrón 1 (bajas temperaturas producen proporciones sexuales sesgadas hacia hembras y altas temperaturas producen proporciones sexuales sesgadas hacia machos) (Fig. II.1). Estudios recientes han demostrado que la exposición a temperaturas más elevadas durante el período termosensible suprime la expresión del gen aromatasa (*cyp19a1a*) resultando, presumiblemente, en niveles bajos de estrógeno. La ausencia de estrógeno a su vez, sería responsable de la masculinización observada (Guiguen y col. 2010). El mecanismo subyacente que conecta la temperatura ambiente con la expresión del gen *cyp19a1a* permanece desconocido. Sin embargo, existe evidencia de análisis provenientes de *Dicentrarchus labrax* que sugiere que los efectos producidos por las temperaturas altas en la expresión del gen *cyp19a1a* estarían mediados por metilación de ciertos sitios específicos del promotor de este gen (Piferrer y col. 2008)

Los datos disponibles en relación a la determinación del sexo en peces teleósteos representan un reflejo de la biodiversidad en este grupo si bien el número de taxa analizado al momento actual es muy bajo dado que existen aproximadamente 28.000 especies de teleósteos descritas (Nelson, 2006). Es de esperar que el escenario actual pueda modificarse a medida que se aporten nuevos datos en diferentes especies (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008). La determinación sexual temperatura dependiente se ha constatado hasta el momento en 4 órdenes (Perciformes, Atheriniformes, Cyprinodontiformes y Siluriformes) no existiendo relación cercana entre las familias que lo presentan. Estos datos concuerdan con la visión evolutiva de que este mecanismo de determinación sexual ha evolucionado varias veces de forma independiente. Diversas especies dentro de estas mismas familias (Ciclidae, Poeciliidae, Atherinopsidae y Callichthyidae) presentan una determinación sexual genética sugiriendo que la determinación sexual inducida por la temperatura es una excepción en los teleósteos. La distribución filogenética sugiere además que este tipo de determinación sexual ambiental sería un mecanismo derivado y no

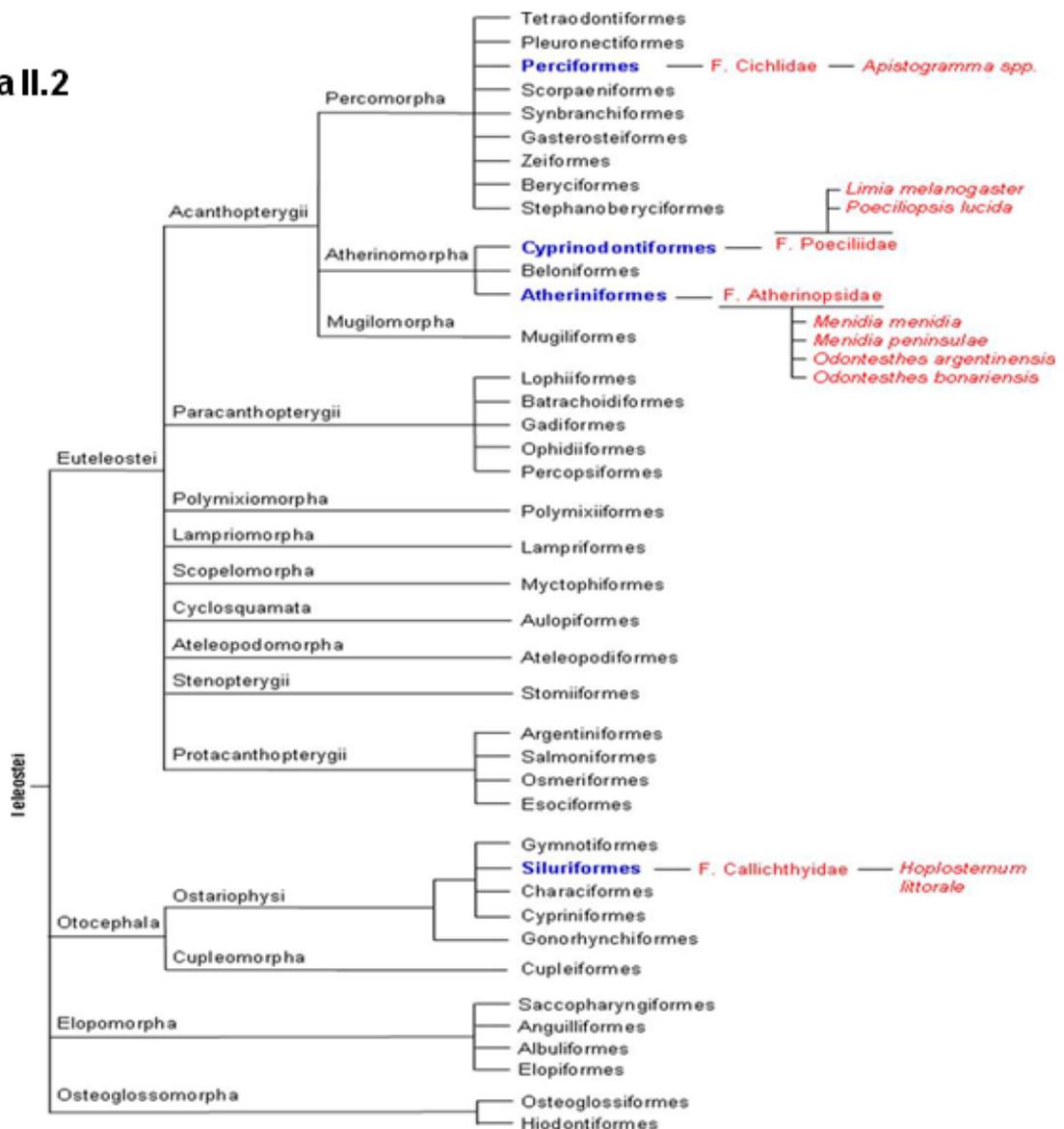
ancestral (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008) (Fig.II.2), al igual que en reptiles (Pokorná y Kratochvíl, 2009).

Figura II.1



Patrones de determinación sexual temperatura dependiente en peces definidos previo a la revisión de Opsina-Alvarez y Piferrer (2008). Patrón 1: mayor proporción de machos a mayor temperatura. Patrón 2: menor proporción de machos a mayor temperatura. Patrón 3: mayor proporción de machos en los extremos de temperatura. Modificado de Opsina-Alvarez y Piferrer (2008).

Figura II.2



Peces teleósteos que presentan determinación sexual temperatura dependiente (azul: órdenes; rojo: familias / especies). Filogenia basada en Nelson (2006) (Opsina-Alvarez y Piferrer 2008).

Determinación del sexo y cambio global

Los cambios ambientales ocurridos en el planeta Tierra, particularmente en los límites entre épocas geológicas, han estado implicados en la extinción de varios linajes de organismos mientras que otros, sujetos a las mismas condiciones, han permanecido (Mitchel y Janzen, 2010). En este sentido, se ha sugerido que el impacto de un meteorito en la península de Yucatán y varias erupciones volcánicas sucedidas en la India serían los eventos responsables de la extinción masiva ocurridos en el límite entre el Cretácico y el Paleoceno. Ambos eventos habrían generado profundos efectos en el clima global, particularmente, la liberación de grandes cantidades de dióxido de carbono eventos que habrían marcado el inicio del calentamiento global (Silber y col. 2011). Se ha planteado la hipótesis de que los dinosaurios presentaban determinación sexual temperatura dependiente y que este cambio en la temperatura produjo poblaciones constituidas mayoritariamente por machos. Este desbalance en la proporción sexual habría conducido finalmente a su extinción (Miller y col. 2004). Un estudio que analizó la sobrevivencia de especies de tetrápodos en el límite Cretácico-Paleoceno concluyó que, a diferencia de lo esperado, los taxa que presentaban mecanismos de determinación sexual genética sufrieron más extinciones que los dependientes de la temperatura. Es posible que estas especies hayan logrado responder a los cambios de temperatura modificando la temperatura a la cual se genera una proporción sexual 1:1, alterando el sitio de incubación de sus huevos o colonizando un nuevo hábitat (Silber y col. 2011)

La exposición repetida a condiciones ambientales que generan proporciones sexuales altamente sesgadas hacia un sexo promoverían: 1) la adaptación a esa condición (restaurando el equilibrio de la proporción sexual y a su vez reteniendo el carácter termosensible); 2) la selección de mecanismos alternativos de determinación sexual independientes del ambiente (genéticos) o 3) la extinción de la población. Si bien algunos reptiles como los cocodrilos se originaron en el Mesozoico (280-200 millones de años) donde las temperaturas medias globales eran entre 10-20°C más altas que las actuales y los cambios

eran abruptos (hasta 5°C en décadas), la extensión geográfica de estos eventos se restringía únicamente al hemisferio Norte (Mitchel y Janzen, 2010).

A diferencia de las fluctuaciones naturales de la temperatura global ocurridas en épocas prehistóricas, el evento de cambio climático que está ocurriendo en la actualidad se caracteriza por su extensión global y de rápido avance por lo que se ha sugerido que las especies termosensibles no se adaptarían a este cambio (Janzen, 1994). La vulnerabilidad de cada especie en relación a las tasas proyectadas de calentamiento global estarán influenciadas por múltiples factores que pueden estar interrelacionados y que se aplican tanto para especies que presentan una determinación sexual dependiente de la temperatura como para aquellas cuya determinación del sexo es genética. En este sentido, Mitchel y Janzen (2010) han propuesto un sistema basado en una serie de factores que permitiría evaluar el riesgo relativo que presentan, particularmente las especies de reptiles, frente a esta condición climática. De todos modos, estos factores podrían ser extrapolables a otros vertebrados.

En primera instancia, las especies que presentan un mecanismo de determinación sexual dependiente de la temperatura serían las que se encuentran en mayor riesgo frente al calentamiento global. Éstas han sido propuestas como indicadores confiables del impacto biológico del calentamiento global dado que las desviaciones de la proporción sexual inducidas por cambios en la temperatura constituyen una respuesta directa a las fluctuaciones térmicas (Janzen, 1994). Asimismo, los efectos previstos como consecuencia de estos cambios en las poblaciones de peces incluyen alteraciones en la distribución de las mismas (Perry y *col.* 2005) y modificaciones en los tiempos de desarrollo embrionario (O'Connor y *col.* 2007) entre otros. Los efectos del cambio climático en la proporción sexual han sido inferidos para algunas poblaciones de tortugas marinas (Hawkes y *col.* 2007) y en los peces teleósteos, es posible realizar algunas deducciones en base al estudio proporcionado por Opsina-Alvarez y Piferrer (2008). Los teleósteos que presentan este tipo de determinación sexual conforman un grupo heterogéneo que incluye especies de agua dulce y marinas que habitan en altas y bajas latitudes. Algunas son euritéricas (toleran un amplio rango de temperaturas) y

otras estenotérmicas (toleran un rango limitado de temperaturas) además de exhibir diferentes estrategias reproductivas. Si bien el calentamiento global es un proceso que afecta diferencialmente a distintas regiones del planeta, se proyectan incrementos de 4°C para los cuerpos de agua hacia el fin del corriente siglo. En este contexto, se ha demostrado que aún cambios menores (1 a 2°C) generan modificaciones significativas de las proporciones sexuales (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008). En el pez *Menidia menidia* se observó que en huevos colectados de la naturaleza una diferencia de 2°C durante el período termosensible resulta en un aumento de la proporción de machos de 50% a 69% (Conover y Heins, 1987). En el pejerrey *Odontesthes bonariensis*, especie argentina de interés comercial y recreativa, existen estudios que sugieren que en poblaciones naturales ya están ocurriendo efectos sobre el desarrollo gonadal inducidos por los cambios térmicos (Cornejo, 2003). En esta misma especie, se ha reportado que un incremento de 1,5°C modifica la proporción sexual de machos de un 50 a un 73% (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008). Dado que el potencial reproductivo de varias comunidades de peces está determinado por el número de hembras disponibles para la producción de ovocitos (Parker, 1980), proporciones sexuales altamente sesgadas hacia el sexo masculino afectarían la estructura poblacional y viabilidad de las mismas (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008). Sin embargo, los efectos potenciales de la temperatura sobre las proporciones sexuales son difíciles de cuantificar en el caso de que los mismos fueran mitigados por otros efectos (también inducidos por el calentamiento global) como, por ejemplo, una redistribución de las especies (Perry y col. 2005).

Es importante destacar que el impacto de la temperatura sobre las proporciones sexuales también afecta a especies cuyo sistema de determinación sexual primario es genético pero susceptible a influencias térmicas. Por ejemplo, este efecto puede reflejarse en cambios de sexo. De esta manera, un mayor número de taxa verían comprometida su viabilidad por disminución de las hembras en respuesta a pequeños incrementos en las temperaturas de su hábitat (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008).

En este contexto, definir exactamente qué especies presentan un mecanismo de determinación del sexo por temperatura es importante por dos razones: 1) conocer la prevalencia de éste para esclarecer la evolución de los mecanismos de determinación del sexo; 2) establecer claramente los taxa que serían afectados en relación a sus proporciones sexuales para calibrar los daños potenciales del aumento de la temperatura global en las poblaciones susceptibles (Opsina-Alvarez y Piferrer, 2008; Valenzuela y col. 2003).

En concordancia con los Antecedentes planteados en este Capítulo y en la Introducción general de este trabajo, se propone que la temperatura es un posible factor de incidencia en la determinación sexual de *Austrolebias charrua*.

Con el objetivo de analizar el posible efecto de la temperatura en la determinación del sexo en *Austrolebias charrua*, se diseñaron experimentos en los cuales dos grupos de embriones de esta especie, cultivados en condiciones de laboratorio, fueron sometidos a dos temperaturas diferentes (19 y 25° C). La selección de estas temperaturas deriva de un análisis de datos previos sobre los rangos de temperaturas experimentadas por estos peces en la naturaleza que abarcarían el posible período termosensible (Errea y Danulat, 2001; Van Doren, com.pers), el análisis de los factores térmicos que inducen la diapausa I (De la Piedra, 2007) así como el análisis sobre temperaturas que afectan la viabilidad embrionaria. Con posterioridad a la eclosión se analizaron las proporciones sexuales en ambos grupos.

11.2 Materiales y métodos

Ensayos de termosensibilidad

Diseño experimental I: obtención de una familia endogámica o “hermanos totales”

Con el objetivo de aproximarnos a dilucidar si el mecanismo de determinación del sexo que poseen estos ejemplares es básicamente genético o ambiental una de las estrategias a utilizar es la generación de familias endogámicas entre hermanos totales (FS-mating, Falconer, 1983) con el fin de homogeneizar la base genética de la población embrionaria.

Los peces adultos fundadores de la línea fueron colectados en el charco temporal del Departamento de Rocha (empalme de las rutas 13 y 16) (GPS: 34°03'34"S/53°51'17"W). Se mantuvieron en el laboratorio en acuarios de 30 litros que contenían agua declorinada (pH 7, temperatura: 19°C aproximadamente, y con aireación permanente) la cual era parcialmente renovada cada 5 días. Los adultos se expusieron a un fotoperíodo natural y se alimentaron con *Tubifex sp.*

La reproducción de los ejemplares se llevó a cabo en acuarios que contenían recipientes con turba Xaxim (hervida durante 30 minutos y enjuagada 3 veces en agua declorinada) utilizando una pareja de peces por cruzamiento. Se seleccionaron 3 parejas las cuales fueron mantenidas en las condiciones anteriormente descritas durante un mes. Durante este período se produjo la deposición diaria de huevos embrionados en la turba. Al finalizar el plazo se retiró el recipiente con turba, y se dejó secar durante 4 meses, período óptimo establecido en el laboratorio (Papa, com.pers.), imitando de esta forma el período natural de sequía de los charcos. Se realizaron 3 réplicas por pareja.

Transcurridos los meses de secado, la turba fue colocada en acuarios con agua declorinada. Una hora después se observó eclosión de alevines (**F1**). Éstos fueron alimentados diariamente (*Artemia* y *Daphnia*). Las características

externas propias de cada sexo (dimorfismo sexual) se constataron a los 3 meses post-eclosión. Una vez que estos ejemplares alcanzaron la madurez sexual se seleccionaron nuevamente 3 parejas de esta F1 y se colocaron las turbas correspondientes para la recepción de huevos embrionados durante 1 mes. Transcurridos nuevamente los 4 meses de secado, se volvió a colocar la turba en acuarios con agua de clorinada. Una hora después se observó eclosión de alevines (**F2**). Los alevines se cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para la generación anterior y se repitió el seleccionado de parejas y la obtención de embriones.

Al llegar a este punto, los embriones obtenidos (**F3**) se sometieron a los experimentos control (cultivo a 25°C en solución de Yamamoto) con el fin de evaluar su viabilidad previo al establecimiento de los tratamientos térmicos. La identificación de los estadios del desarrollo se realizó de acuerdo con la tabla diseñada para *Austrolebias viarius* (Arezo y col. 2005) la cual es aplicable a lo observado para *Austrolebias charrua*.

Diseño experimental II: cruzamientos entre ejemplares salvajes

Se seleccionaron 6 parejas de *Austrolebias charrua* colectados en la naturaleza (Ruta 14 km 500, GPS: 33°54'09"S/53°40'38"W) y mantenidos en condiciones de laboratorio a las cuales se les proporcionó un recipiente con turba a cada una (durante 1 mes para la deposición de huevos embrionados). Los embriones en el estadio de dispersión se separaron en 2 grupos los cuales se cultivaron en solución de Yamamoto a 19°C y 25°C respectivamente durante un mínimo de 30 días. Este plazo se definió teniendo en cuenta un trabajo con resultados de la presente tesis donde establecimos que en embriones de 30 días post-fecundación es posible identificar histológicamente ambas gonadas (Arezo y col. 2007). A continuación los embriones se colocaron en turbas que fueron desecadas siguiendo los mismos plazos descritos anteriormente para los embriones del Diseño Experimental I. Una vez transcurrido el plazo, se procedió a la eclosión de las larvas. La adquisición de los caracteres sexuales dimórficos ocurrió aproximadamente a los 3 meses post-eclosión. El diagnóstico del sexo se llevó a cabo a nivel macroscópico en

los juveniles que alcanzaron la madurez sexual y mediante diagnóstico histológico (utilizando el mismo protocolo detallado en el Capítulo I) en los casos de alevines que murieron durante la fase de diferenciación. La proporción sexual se calculó como el número de machos dividido el total de la muestra analizada (Wilson y Hardy, 2002)

Muestreo en la naturaleza

Con el objetivo de conocer la proporción sexual en la naturaleza se seleccionaron 5 charcos del Departamento de Rocha (1: Ruta 9 Km 272 GPS: 34°12'54"S/53°46'18"W; 2: Ruta 16 Km 25,500; 3: Ruta 13 km 268, 4: Ruta 16 y 13, GPS: 34°03'34"S/53°51'17"W; 5: Ruta 16 km 34, GPS: 33°59'48"S/53°49'03"W) en los cuales se realizó un muestreo el mes de octubre de 2008. Se calculó la proporción sexual en cada charco y la proporción sexual global.

Análisis estadísticos

Para determinar la significación estadística en la proporción de sexos a 19 y 25°C se aplicó un modelo de regresión logística mediante el uso del programa STATA 12 (StataCorp. LP, Licencia: Mag. Gustavo Saona, Asesor de Bioestadística del Fondo Nacional de Recursos). La regresión logística es un tipo de modelo lineal generalizado desarrollado para analizar datos de proporción (Wilson y Hardy, 2002). Se aplicó además un modelo de regresión de Poisson utilizando el mismo programa. Con el fin de verificar si las proporciones sexuales encontradas en la naturaleza son diferentes a 1:1 se realizó la prueba de chi-cuadrado (bondad de ajuste) utilizando el programa R 2.7.0 (R Development Core Team, 2008, <http://www.R-project.org/>).

11.3 Resultados

Ensayo de termosensibilidad en embriones provenientes de una familia endogámica de “hermanos totales”

Los embriones correspondientes a F3 obtenidos fueron sometidos a los primeros tratamientos térmicos estandarizados de prueba (25°C en solución de Yamamoto). Se observó una viabilidad embrionaria extremadamente baja (menor al 5%) en comparación con embriones salvajes. De los embriones que lograron atravesar las primeras etapas del desarrollo, la mayoría presentaba malformaciones a nivel cefálico con interrupción de su desarrollo. Por este motivo, se diseñó una estrategia experimental alternativa utilizando distintas parejas de ejemplares salvajes provenientes de la naturaleza.

Ensayo de termosensibilidad en embriones provenientes de cruzamientos entre ejemplares salvajes

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de temperatura aplicados a ejemplares provenientes de la naturaleza se resumen en la tabla II.1. En ella se registra la proporción sexual de los ejemplares que alcanzaron la madurez sexual. Los porcentajes de eclosión de los embriones sometidos a los tratamientos de temperatura oscilaron entre 0 y 95%. A partir de estos resultados, se seleccionaron las parejas que mostraron mayor rendimiento: parejas 2, 3 y 6 (evidenciado por la obtención de un mayor porcentaje de eclosión) y de las que contábamos con mayor cantidad de alevines fijados en condiciones aceptables para el sexado histológico y posterior análisis estadísticos correspondientes. En la tabla II.2 se muestra la proporción sexual de los alevines procesados para histología (ejemplares que no alcanzaron la madurez sexual) de las mismas parejas. De estos datos surge que, en ambos

grupos experimentales (19 y 25°C), los machos sufrieron mayor porcentaje de mortalidad (69%) con respecto a las hembras (31%).

Tabla II.1

Resultados obtenidos de los ensayos de temperatura en ejemplares que alcanzaron la madurez sexual.

<i>Pareja</i>	<i>Nº de embriones</i>	<i>Temperatura de cultivo °C</i>	<i>Nº eclosiones</i>	<i>% eclosión</i>	<i>Nº hembras</i>	<i>Nº machos</i>	<i>Prop. sexual</i>	<i>%mortalidad</i>
1	35	25	4	11.4	2	0	0 (0m/2h)	94.3
1	41	19	17	41.5	3	4	0.57 (4m/3h)	83
2	191	25	115	60	14	23	0.62(23m/41h)	91.6
2	191	19	94	49.2	17	10	0.37(10m/17h)	85.9
3	103	25	58	56	19	10	0.34(10m/19m)	71.9
3	87	19	83	95	7	6	0.46(6m/7h)	85.1
4	82	25	17	41.5	17	4	0.19(4m/17h)	74.4
4	83	19	22	90.4	22	6	0.21(6m/22h)	66.3
5	28	25	0	0	0	0	0	100
5	28	19	2	14.3	2	1	0.33(1m/2h)	89.3
6	114	25	76	66.7	38	10	0.2(10m/38h)	57.9
6	114	19	95	83.3	5	6	0.54(6m/5h)	90.4

Tabla II.2 Sexado, mediante histología, de los alevines obtenidos en los ensayos de laboratorio con ejemplares salvajes. m: machos; h: hembras.

<i>Pareja</i>	<i>Temperatura de cultivo °C</i>	<i>Proporción sexual</i>
2	25	0.57 (15m/11h)
2	19	0.68 (13m/6h)
3	25	0.77 (14m/4h)
3	19	0.46 (15m/17h)
6	25	0.50 (3m/3h)
6	19	0.57 (12m/9h)

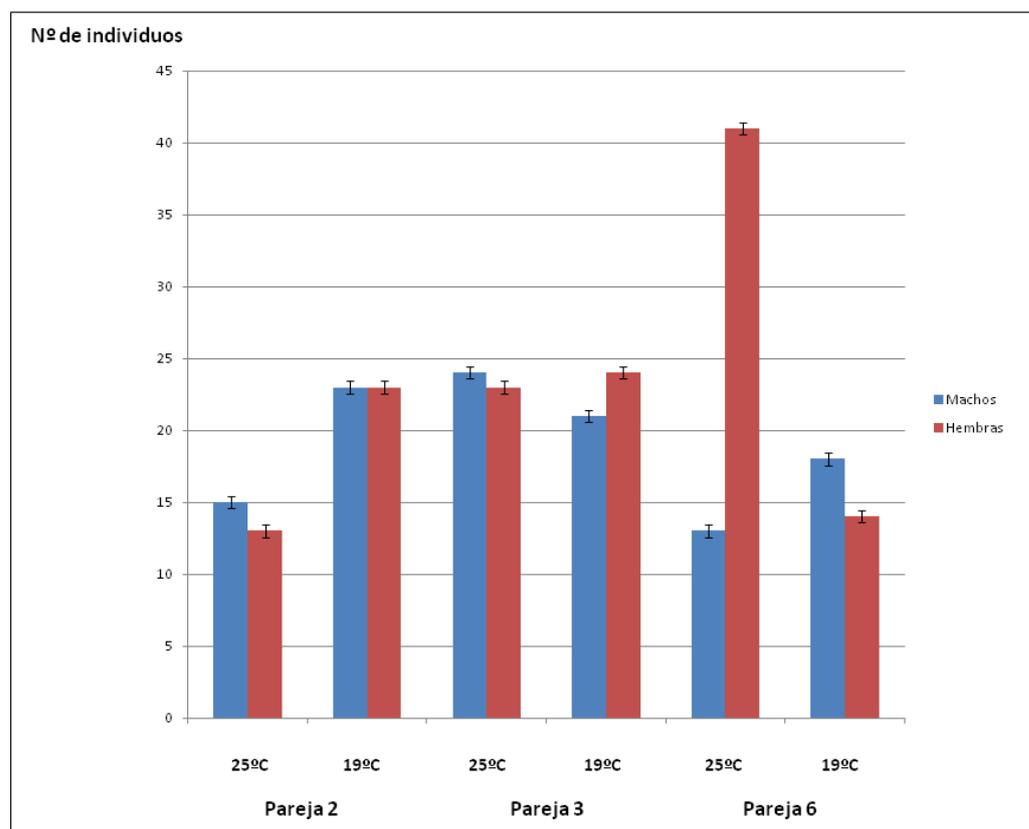
Considerando el conjunto de alevines y adultos, en total se sexaron 252 ejemplares (Tabla II.3; Figura II.3). La proporción sexual global a 25°C fue 0.4 y a 19°C fue 0.5 (Tabla II.4). Los análisis estadísticos realizados sobre este total (252) sugieren que el cultivo de los embriones a 19 y 25°C no afectaría la proporción sexual (Tabla II.5 a y b). En el modelo de regresión logística se consideró al sexo como la variable dependiente (codificado 0 y 1) y temperatura como la única variable independiente (19°C= 0; 25°C= 1), se especifica como “logit” en el programa. El parámetro “fweight=W1” permite ingresar la sumatoria de ejemplares de un mismo sexo a determinada temperatura (por ejemplo: sexo= 1; temperatura = 0; W1= 20). El parámetro W1 se refiere a las veces que aparece determinado caso. Offset (logn) permite introducir en el análisis que la población de embriones al ingreso de los tratamientos era mayor. “logn” es el logaritmo del número de embriones, lo cual permite ajustar por el total de embriones del ensayo dada la alta tasa de mortalidad. “Odds ratio” es una medida de cuantas veces es más probable determinado caso que otro. En este análisis, “OR= 1.641624” significa que a 25°C es 1.64 veces más probable que nazca una hembra que un macho. Sin embargo, el valor p es de 0.053, por lo tanto, la diferencia se puede deber al azar ya que no es significativo (si el valor p es menor o igual ($p \leq 0.05$) a 0.05 es significativo). Este valor se encuentra muy cercano al límite significativo indicando una fuerte tendencia a que la determinación sexual posiblemente esté afectada por la temperatura.

Para corroborar estos resultados se aplicó el modelo de regresión de Poisson (Tabla II.5 b) en el cual se ejecutó un análisis con las variables temperatura y sexo más una variable de interacción. Si la variable de interacción (TEMP##SEXO) hubiese dado significativo habría una relación entre la temperatura y el sexo. Sin embargo, en este caso, el valor p no es significativo ($p=0,108$).

Tabla II.3 Proporción sexual de *A. charrua* en los ensayos de laboratorio (adultos y alevines). m: machos; h: hembras.

Pareja	Temperatura de cultivo °C	Proporción sexual
2	25	0.53 (15m/13h)
2	19	0.50 (23m/23h)
3	25	0.51 (24m/23h)
3	19	0.46 (21m/24h)
6	25	0.24 (13m/41h)
6	19	0.56 (18m/14h)

Figura II.3



Histograma que ilustra el número y sexo de los individuos obtenidos en ambos tratamientos térmicos por pareja en los ensayos de laboratorio de *A. charrua* (adultos y alevines) correspondiente a la tabla II.3.

Tabla II.4 Proporción sexual global obtenida en ambos tratamientos térmicos.

Temperatura de cultivo	Machos	Hembras	Proporción sexual	Total
25°C	52	77	0.4	129
19°C	62	61	0.5	123
Total	114	138		252

Proporción sexual en la naturaleza

En la tabla II.6 se muestran los datos de proporción sexual relevados en el muestreo realizado en el mes de octubre del año 2008 en 5 localidades del Departamento de Rocha. En 3 de los 5 charcos analizados, la proporción sexual es 1:1 (2: $p=0,15$; 4: $p=0,33$; 5: $p=0,67$) mientras que en 2 de ellos se constató una mayor cantidad de hembras con respecto a los machos (1: $p=0,028$; 3: $p=0,007$). Considerando la proporción sexual global (sumatoria de los 5 charcos analizados) se evidencia que la misma es 1:1 (proporción sexual global = 0.44, $p=0,12$).

Tabla II.6 Proporción sexual de *A. charrua* en la naturaleza. m: machos; h: hembras

Charco	Prop. sexual	Fecha de colecta
1: R9 Km 272,500	0.3 (9m/21h)	4/10/08
2: R16 Km 25,500	0.6 (24m/15h)	4/10/08
3: R13 Km 268	0.2 (4m/16h)	4/10/08
4: R16 empalme R13	0.4 (16m/22h)	4/10/08
5: R16 Km 34	0.5 (12m/10h)	4/10/08

11. 4 Discusión

Ensayo de termosensibilidad en embriones provenientes de una familia endogámica de “hermanos totales”

La construcción de una familia endogámica entre “hermanos totales”, es una de las aproximaciones utilizadas con el fin de descartar influencias debidas a la variabilidad genética de los parentales en la proporción de sexos de las progenies. De esta manera se genera una población de embriones cuyo contenido de información genética presenta mayor homogeneidad con respecto a la población salvaje (Falconer, 1983).

La baja viabilidad obtenida en los alevines provenientes de estos experimentos sugiere una baja tolerancia a la endogamia en esta especie, ya que en los grupos control (embriones provenientes de parejas salvajes) cultivados en iguales condiciones, se constató una viabilidad similar a la observada habitualmente en condiciones estandarizadas en el laboratorio. Estos resultados son concordantes con lo descrito previamente en relación a este fenómeno relacionado con la reducción del valor fenotípico de varios caracteres adaptativos como la sobrevida, la tolerancia a la salinidad, un aumento en la aparición de anomalías durante el desarrollo embrionario y una disminución en la eficiencia de conversión energética entre otros. La depresión endogámica produce efectos negativos como incremento en la homocigosidad que, a su vez, incrementan las posibilidades de expresión de genes letales recesivos. La endogamia es uno de los factores más importantes de evaluación genética de una especie (Falconer, 1989). Se ha reportado depresión endogámica para varios caracteres relacionados con la sobrevida, crecimiento y reproducción en peces y un incremento en la existencia de anomalías durante el desarrollo como la aparición de deformidades a nivel de la columna vertebral y desarrollo gonadal. En este sentido, es necesario

contar con información más detallada sobre la depresión endogámica y heterosis en diferentes especies de peces, información que resulta de utilidad para la implementación de programas de conservación o acuicultura (Nakadate y col. 2003). El monitoreo de la variabilidad genética y de la endogamia en especies sometidas a la acuicultura es importante para la conservación de la capacidad de adaptación de las mismas (Saura y col. 2006). Según Wang y col. (2002), un 10% de aumento en la endogamia puede resultar en una reducción de la capacidad de supervivencia en alrededor de 3 a 15%. El monitoreo de la diversidad genética de las poblaciones salvajes y de los lotes de peces mantenidos en cautiverio es importante para la conservación de las especies. En este sentido, los marcadores moleculares (ej., RAPD y microsatélites) pueden ser eficientemente utilizados para cumplir con este propósito, especialmente en programas de repoblamiento de peces (Povh y col. 2008).

Ensayo de termosensibilidad en embriones provenientes de cruzamientos entre ejemplares salvajes

El resultado del análisis estadístico (regresión logística, Tabla II.5a) demuestra que la variable temperatura no afecta la determinación del sexo en este grupo de individuos. Sin embargo, el valor p obtenido (0.053) es muy cercano al límite significativo (0.05) indicando una fuerte tendencia de un posible efecto de esta variable sobre la determinación sexual. En el histograma representativo de los datos analizados (Fig. II.3) se observa que la descendencia de la pareja 6 a 25°C sería la responsable de acercar el valor p obtenido al límite significativo. Este hecho implica que esta pareja eventualmente sería más susceptible a la temperatura en relación a la determinación sexual que las parejas 2 y 3 a 25°C. Sin embargo, el resultado del análisis estadístico aplicando el modelo de regresión de Poisson (Tabla II.5 b) demostró que las variables sexo y temperatura no estaban relacionadas. De estos resultados se desprende la necesidad de ampliar estos análisis a un mayor número de parejas salvajes.

La mayoría de los estudios de laboratorio que describen los patrones de determinación sexual temperatura dependiente están basados en la aplicación de temperaturas constantes de incubación (al igual que el presente trabajo) y no incorporan la complejidad de los estímulos ambientales experimentados por los embriones en condiciones naturales. La implementación de experimentos multidimensionales es compleja y requiere un gran número de tratamientos pero es esencial para definir el rango de respuestas frente a las temperaturas experimentadas en el ambiente natural en aquellas especies cuyo mecanismo de determinación sexual es temperatura dependiente. Sin embargo, los estudios que utilizan temperaturas de incubación constantes son muy útiles para diagnosticar si una especie dada presenta, o no, un mecanismo de determinación sexual mediado por la temperatura (Warner y Shine, 2010).

La elección de las temperaturas para evaluar una posible termosensibilidad en el mecanismo de determinación sexual en *Austrolebias charrua* se basó en cuatro consideraciones: 1) el cultivo de embriones de *A. charrua* a temperaturas menores o iguales a 17°C provoca la inducción de la entrada en diapausa I y permanencia en ésta por, al menos, 8 meses. Esta diapausa es facultativa y se establece durante el estadio de blástula tardía, en el momento en que todas las blastómeras se han dispersado por la superficie del embrión en desarrollo (De la Piedra, 2007.); 2) se observó una elevada letalidad en embriones cultivados a temperaturas de 28 y 29°C y aquellos que permanecían viables desarrollaban malformaciones, principalmente a nivel cefálico (Arezo y col. no publicado); 3) las temperaturas seleccionadas (19 y 25°C) se ubican dentro del rango promedio observado en la naturaleza (Errea y Danulat, 2001; Van Dooren, com.pers.). Este rango de temperaturas se registró durante fines de octubre hasta enero (datos obtenidos durante un muestreo anual mediante el uso de dispositivos colocados dentro de los charcos, Van Dooren, com.pers.), 4) para definir si el mecanismo de determinación sexual depende de la temperatura optamos por el segundo criterio propuesto por Opsina-Alvarez y Piferrer (2008) que establece que la proporción sexual debe modificarse en respuesta a un rango de temperatura

ambiente experimentado por los individuos durante el período termosensible. En la naturaleza, es esperable que los embriones de *Austrolebias charrua* retomen el desarrollo embrionario (final de la diapausa I) en estadio de blástula tardía, cuando las temperaturas superan los 17°C (De la Piedra, com.pers). Por lo tanto y teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, para realizar los ensayos de termosensibilidad se seleccionaron embriones en el estadio blástula tardía (fase dispersa) – gástrula temprana (fase de reagregación), de manera de considerar el posible período termosensible en su totalidad (hasta observar el primer signo de diferenciación gonadal, proceso que ocurre aproximadamente al mes post-fecundación, Arezo y col. 2007)

Elección de los análisis estadísticos aplicados

El término proporción sexual es utilizado comúnmente para indicar la relación numérica entre los sexos. Convencionalmente se expresa como el número de machos dividido el número total de individuos de la muestra. Los datos sobre proporción sexual en una población dada o de progenie son datos de tipo binario (el sexo de 1 individuo puede ser hembra o macho solamente). Se asume que este tipo de datos conforman una distribución binomial siendo la probabilidad de cada uno de ellos constante en una serie de repeticiones. La aproximación más apropiada para el análisis de proporción sexual es el uso de la regresión logística, un tipo de modelo lineal generalizado desarrollado para analizar datos de proporción en general (Wilson y Hardy, 2002). Los modelos de regresión logística permiten estudiar si una variable binomial depende, o no, de otra u otras variables (no necesariamente binomiales): Si una variable binomial de parámetro p es independiente de otra variable X , se cumple $p=p|X$, por consiguiente, un modelo de regresión es una función de p en X que a través del coeficiente de X permite investigar la relación anterior (Hosmer y Lemeshow, 1989)

En el análisis de los datos de los tratamientos con temperatura se decidió aplicar un modelo de regresión logística siguiendo la recomendación propuesta por Wilson y Hardy (2002). Adicionalmente los datos fueron

corroborados aplicando otro modelo lineal generalizado como la regresión de Poisson (Saona, com.pers.)

Análisis de la proporción sexual en la naturaleza

La diferencia en la proporción sexual (menor proporción de machos con respecto a hembras) observada en 2 de los charcos analizados (1 y 3) puede ser explicada por: 1) dimorfismo sexual. En peces anuales involucra los siguientes factores: un patrón de coloración diferencial entre los machos y las hembras de la especie (machos con mayor pigmentación en cuerpo y aletas y hembras cuya coloración es más homogénea, que la exhibida por los machos), diferencias morfológicas (machos con aletas más largas) (Vaz-Ferreira y col. 1964); 2) existencia de un comportamiento de cortejo elaborado que implica un alto gasto energético (Belote y Costa, 2004, D'Anatro & Loureiro, 2005, García y col. 2008) De esta manera, los machos de *Austrolebias charrua* se encontrarían más expuestos a los depredadores que las hembras por sus características morfológicas y comportamentales de cortejo. Asimismo, es factible que el alto gasto energético del cortejo por parte de los machos esté relacionado con una sobrevivencia más corta lo que explicaría que hacia fines de ciclo vital predominaran las hembras (Loureiro y Passos com.pers.); 3) en general, los machos de especies polígamas, como es el caso de los peces anuales, presentan tasas de sobrevivencia menores que las hembras durante la mayoría de las etapas de su ontogenia (Clinton y col. 1993).

Datos relevados en otras especies de *Austrolebias* que habitan en la misma área geográfica (Departamento de Rocha), mostraron diferencias en las proporciones sexuales según la especie. *Austrolebias viarius*: presenta una proporción desbalanceada sesgada a hembras, *Austrolebias luteoflammulatus*, una proporción desbalanceada sesgada a machos siendo *Austrolebias cheradophilus* la única especie analizada que mantiene una proporción balanceada 1:1 (Laufer y col. 2009).

Tasas de mortalidad embrionaria y larval en peces teleósteos

Las tasas de mortalidad de embriones y larvas descritas para peces teleósteos son altas (hasta un 67%) y variables en diferentes poblaciones y en distintos ciclos anuales (Fossum, 1988). Los factores propuestos que estarían involucrados en este fenómeno pueden dividirse en dos grandes categorías: exógenos (depredación, cambios ambientales como salinidad, oxígeno, temperatura, radiación UV, contaminantes) y endógenos (caracteres genéticos, baja viabilidad gamética, por ejemplo debido a malas condiciones nutricionales) (Heath, 1992). Dentro de los factores endógenos, la hipótesis de “incompatibilidad genética” ha obtenido apoyo mediante experimentos como los realizados mediante fecundación *in vitro* en el salmón *Oncorhynchus tshawytscha* que han demostrado efectos significativos en la calidad de los embriones. Los ovocitos de una hembra pueden presentar buena viabilidad cuando son fecundados por espermatozoides de un macho particular. Sin embargo, ovocitos de la misma puesta pueden desarrollar una muy pobre sobrevivencia cuando son fecundados por otro macho (Withler, 1988). En el salmónido *Coregonus sp.* se han estudiado las interacciones entre gametos de 10 machos y 10 hembras mediante fecundación *in vitro* observándose diferencias entre las distintas combinaciones durante la primera mitad del período comprendido desde la fecundación a la eclosión (Wedekind y col. 2001). También se han reportado resultados similares en otros grupos de teleósteos analizados (Nordeide, 2007)

En relación con la alta tasa de mortalidad reportada en los embriones de peces, existen datos referidos a los patrones de mortalidad embrionaria en un pez coralino *Pomacentrus amboinensis* cuyos huevos son demersales (enterrados en el sustrato). Los datos demostraron niveles máximos similares de mortalidad tanto en el ambiente natural: 69% como en el artificial: 69, 5%. En poblaciones que habitan en el océano, se asume generalmente que la mortalidad durante la fase pelágica (flotante en la columna de agua) es extremadamente alta (95%) con respecto a las poblaciones que presentan huevos demersales debido a la ausencia de depredadores. Sin embargo, en

Pomacentrus amboinensis se observó una alta mortalidad tanto en su ambiente natural como en el artificial donde se descarta la existencia de depredadores (Emslie y Jones, 2001). En todas las especies estudiadas, las etapas tempranas del desarrollo, especialmente durante el período de blástula y gástrula, son las de mayor vulnerabilidad (Bunn y Webb, 2000)

En *Austrolebias charrua*, los porcentajes de mortalidad variaron desde 5% (porcentaje de eclosión 95%) hasta un 100% (porcentaje de eclosión = 0). Los embriones cultivados a 19°C evidenciaron un mayor porcentaje de eclosión sugiriendo que esta temperatura se encuentra más cercana a los rangos experimentados en la naturaleza durante el desarrollo embrionario.

Con respecto a la mortalidad en las larvas, un estudio realizado en el lenguado *Paralichthys dentatus* identifica un período de alta mortalidad desde la eclosión hasta el momento en que comienzan a alimentarse (transición del suplemento nutricional endógeno al exógeno). Sin embargo, la alimentación probablemente no sea la única causa de mortalidad. Se postula que existirían factores relacionados con la calidad del agua y ambiente microbiano, aún no identificados, del entorno de crecimiento larvario que estarían influyendo. Las larvas de determinados cruzamientos presentan una mayor sobrevivencia sugiriendo la importancia de la calidad de los gametos (Nordeide, 2007) en este aspecto. Sin embargo, algunas replicas de cada cruzamiento presentaron altas tasas de mortalidad por lo que las causas de índole ambiental jugarían un papel importante (Alves y col. 1999). En este sentido, también se observaron diferencias en la sobrevivencia de las larvas provenientes de las distintas parejas de *Austrolebias charrua* (Tabla II.2).

En relación al mayor porcentaje de mortalidad observado en los machos de *Austrolebias charrua* en ambos tratamientos térmicos, la explicación podría encontrarse en una de las siguientes propuestas:

- 1) Se ha reportado un caso en la serpiente *Pituophis melanoleucus* de mortalidad embrionaria diferencial inducida por temperatura (Burger y Zappalorti, 1988) donde ésta no afecta la determinación sexual en sí

misma sino que simplemente impide el desarrollo de cigotos de un sexo establecido genéticamente.

- 2) Charles Darwin, en su libro “El origen de las especies” (1859) hacía notar que en especies en las cuales la selección natural ha tenido como consecuencia un alto grado de dimorfismo sexual, los caracteres masculinos seleccionados sexualmente acarrearían desventajas que afectarían la sobrevivencia de estos individuos. Esta hipótesis ha sido comprobada en los vertebrados ya que, como ya se ha mencionado, en general los machos de especies polígamas presentan tasas de sobrevivencia menores que las hembras durante la mayoría de las etapas de su ontogenia (Clinton y col. 1993).

Si bien no es posible descartar la primera explicación, sugerimos que en *Austrolebias charrua* la segunda propuesta estaría operando en la relación al mayor porcentaje de mortalidad observado en machos ya que las temperaturas seleccionadas para realizar los tratamientos se incluyen dentro del rango natural de temperaturas (7 a 28°C) en que éstos se encuentran expuestos en la naturaleza (Van Dooren, com.pers.) co-existiendo ambos sexos.

La determinación sexual en *Austrolebias charrua*: ¿es genética o ambiental?

Diagnóstico de la determinación sexual temperatura-dependiente:

Criterio 1:

Considerando el primer criterio propuesto por Valenzuela y col. (2003) posteriormente utilizado por Opsina-Alvarez y Piferrer, (2008) para la re-evaluación de la prevalencia de especies de peces con determinación del sexo temperatura dependiente que se refiere a la presencia de cromosomas sexuales, se han descrito 4 citotipos en los ejemplares de *Austrolebias charrua* con un número diploide de 48 cromosomas. A nivel cariotípico, no se evidenciaron cromosomas sexuales (García, 2006) al igual que en el pez anual africano *Nothobranchius furzeri* (Reichwald y col.2009).

Este hecho concuerda con los datos obtenidos en la mayoría de los peces teleósteos estudiados en los que la existencia de cromosomas sexuales citogenéticamente diferenciados ocurre esporádicamente dentro de diferentes taxa hecho que sugiere un origen polifilético y reciente de los cromosomas sexuales (Mank y col. 2006). Sin embargo, las diferencias entre pares cromosómicos pueden ser muy pequeñas para ser observadas mediante técnicas citogenéticas clásicas. Los cromosomas sexuales de peces son, en general, muy pequeños. Por esta razón el análisis de la formación de los complejos sinaptonémicos durante el paquiteno de la meiosis a nivel ultraestructural puede revelar la presencia de pequeñas regiones de los cromosomas sexuales (no distinguibles mediante microscopía óptica), que no se aparean o cuyo apareamiento se encuentra demorado en el sexo heterogamético (Devlin y Nagahama, 2002). En la tilapia *Oreochromis niloticus* análisis de este tipo en complejos sinaptonémicos revelaron un pequeño segmento, en la región terminal de un bivalente donde no ocurría apareamiento. Estas regiones sólo se encuentran presentes en machos y se asocian con el sexo heterogamético (sistema XX/XY) sugiriendo que éste sería el par de cromosomas sexuales para esta especie. Estas pequeñas regiones no apareadas evidencian que los cromosomas sexuales de *Oreochromis niloticus* se encuentran en una etapa temprana de diferenciación (Carrasco y col. 1999). Por lo tanto, no descartamos la existencia de cromosomas sexuales en *Austrolebias charrua* hasta tanto no se logre implementar su estudio a nivel ultraestructural.

Aún en ausencia de cromosomas sexuales morfológicamente distinguibles, muchas especies de peces se encuentran en etapas tempranas de diferenciación de los mismos presentando sistemas de determinación sexual genéticos claramente definidos (Penman y Piferrer, 2008) como sucede en el pez anual *Nothobranchius furzeri*. Valenzano y col. (2009) evidenciaron en esta especie, mediante la construcción de un mapa de ligamiento basado en microsatélites, un sistema genético de determinación sexual cuyo sexo heterogamético es el masculino, indicativo de un sistema XX/XY. La región determinante masculina en *Nothobranchius furzeri* (Valenzano y col. 2009)

presenta una región no recombinante similar a la descrita en otras especies de peces filogenéticamente cercanas: *Oryzias latipes* (Matsuda y col. 2002; Nanda y col. 2002), *Gasterosteus aculeatus* (Peichel y col. 2004), *Xiphophorus maculatus* (Schultheis y col. 2006) y *Poecilia reticulata* (Tripathi y col. 2009).

Criterio 2:

En relación al segundo criterio utilizado por Opsina-Alvarez y Piferrer (2008) (modificación de la proporción sexual en respuesta a un rango de temperatura ambiente específicamente experimentado por los individuos durante el período termosensible), se debe argumentar que, según los datos proporcionados por De la Piedra (2007) (temperaturas menores a 17°C inducen la diapausa I) en la naturaleza los embriones permanecerían detenidos en esta etapa del desarrollo (fase dispersa) hasta que ocurren temperaturas mayores de 17°C. Datos de campo correspondientes al año 2005 (Van Dooren, com.pers) indican que la temperatura, en dos charcos del departamento de Rocha, superó los 17°C a partir del comienzo del mes de noviembre. En ese momento, los embriones retomarían el desarrollo ingresando en la fase de reagregación (gatrulación). En condiciones de cultivo constantes en el laboratorio (25°C en solución de Yamamoto), el primer signo de diferenciación sexual aparece a las 3 semanas a partir de la fase de dispersión (1 mes post-fecundación) (Arezo y col. 2007). En la naturaleza, la situación es diferente ya que la temperatura osciló entre los 17 y 25°C durante ese intervalo temporal de tres semanas. Es importante considerar que el parámetro temperatura se encuentra estrechamente relacionado con el desarrollo embrionario. Se ha constatado que existen diferencias en los tiempos de desarrollo dependiendo de las temperaturas de incubación de los embriones. En general, cuanto mayor es la temperatura (en un rango entre 19.4 y 27.5°C para el pez anual sudafricano *Nothobranchius guentheri*) la duración de los estadios embrionarios disminuye (Markofsky y Matías, 1977). Estudios comparativos en especies de este género mostraron que la mayoría de los embriones, incubados a 25°C, no ingresan en diapausa y el tiempo de desarrollo total es de 30 días. Si éstos eran cultivados a 30°C, su tiempo de desarrollo se reducía a 20 días y si la

temperatura de cultivo era de 15°C los mismos ingresaban y permanecían en la diapausa I hasta 22 días (Wourms, 1972 c). Se constató que una variación de 5°C implica una diferencia de 10 días en el curso temporal del desarrollo en estas especies.

Considerando lo expuesto anteriormente, es posible sugerir que dadas las condiciones ambientales naturales (temperaturas hasta 8°C más bajas que las condiciones de cultivo estandarizadas en el laboratorio), el desarrollo embrionario de *Austrolebias charrua* en la naturaleza sería más lento que el estipulado en condiciones de laboratorio llegando a experimentar temperaturas de hasta 27°C durante el período de determinación y diferenciación sexual.

En suma, las temperaturas seleccionadas para realizar los tratamientos térmicos en embriones provenientes de parejas salvajes, efectivamente se encuentran dentro de las temperaturas experimentadas por éstos en la naturaleza durante el período de desarrollo que incluiría la ventana termosensible.

Otros aportes relevantes:

La regla de Haldane

John Haldane, en el año 1922, postuló que en la descendencia híbrida (producto de la cruce entre ejemplares de diferentes especies) el sexo ausente, raro o estéril, es el sexo heterogamético. Una de las razones por la que aún en la actualidad esta observación presenta interés en el estudio de la genética de la especiación es porque se trata de una generalización empírica, sobre la biología evolutiva, que ha sido corroborada en varios grupos de organismos (machos heterogaméticos, por ejemplo, moscas y mamíferos así como en grupos donde las hembras son heterogaméticas, como, aves y mariposas). La prevalencia de este patrón sugiere que sería generado por mecanismos comunes en los diversos organismos. La observación original de Haldane concernía a la afectación de la fertilidad y viabilidad de los híbridos pero esta

regla puede extenderse también a otras características incluso a nivel morfológico (Johnson, 2008).

En este sentido, existen datos sobre cruzamientos realizados entre individuos de *Austrolebias charrua* y *Austrolebias reicherti* donde se obtuvieron híbridos que posteriormente se cruzaron con parentales de ambas especies. En la F2 el número de machos fue mayoritario, principalmente en el cruzamiento entre un macho híbrido (F1) y hembras de *Austrolebias charrua* y *Austrolebias reicherti* donde sólo se obtuvieron machos. La línea de la hembra híbrida (F1) retrocruzada con un macho de *Austrolebias charrua* generó una hembra que al cruzarse con las especies parentales generó muy poca descendencia. Cuando ésta se cruza con un macho *Austrolebias reicherti* se genera un macho híbrido que al retrocruzarlo con las especies parentales genera una descendencia sensiblemente mayor. Con respecto a la fecundidad, los machos F2 demostraron mayor fecundidad cuando se cruzaron con hembras *Austrolebias reicherti* que cuando se cruzaron con hembras *Austrolebias charrua*. Si bien el número de individuos estudiados fue bajo, estos datos permiten postular que los machos híbridos presentan mayor éxito en la reproducción que las hembras híbridas (Rovira, 2008; Oviedo, 2009). Asimismo, en cruzamientos interespecíficos utilizando individuos del complejo *Austrolebias adloffii* (García y col. 2002) se detectó la ausencia de hembras híbridas.

Haldane (1922) también postuló que, en el sexo heterogamético, los eventos de recombinación se encuentran reducidos. La construcción de grupos de ligamiento para el cruzamiento hembra híbrida x macho *Austrolebias reicherti* a partir del macho híbrido de la F2 evidenció la existencia de recombinación en los machos híbridos obtenidos. El hecho de que estos machos híbridos surgen del cruzamiento de una hembra híbrida x un macho *Austrolebias reicherti* y que la retrocruza con una hembra *Austrolebias reicherti* genera mayor descendencia sugiere que los machos mantienen la capacidad de recombinación (Oviedo, 2009).

En conjunto estas observaciones sugieren que las hembras representarían el sexo heterogamético en *Austrolebias charrua* (Rovira, 2008; Oviedo, 2009).

Características del ambiente

Los ambientes límnicos temporales presentan alta productividad y proveen la oportunidad de un crecimiento rápido. Sin embargo, su duración es incierta. La sobrevida en hábitats como los charcos efímeros impone varias restricciones en el comportamiento, desarrollo e historia de vida de las especies (Ludwig y Rowe, 1990). Los peces anuales han evolucionado en estos hábitats particulares completando su ciclo de vida en menos de un año (Wourms, 1972). Esta adaptación requiere altas tasas de crecimiento y desarrollo cuyos valores han sido comprobados (Errea y Danulat, 2001). Para este grupo de peces, es “esencial” crecer y alcanzar la maduración sexual en un lapso relativamente corto y depositar sus huevos embrionados antes de que ocurra la desecación del charco. El contexto ecológico y evolutivo de los charcos temporales tiene implicancias profundas en la biología de las especies que han sido bien estudiadas en anfibios e invertebrados pero no en el grupo peces (Laufer y col. 2009).

11.5 Conclusión

Los datos obtenidos en este trabajo (ensayos de temperatura a 19 y 25°C) evidencian ausencia de termosensibilidad en la determinación sexual en el grupo de individuos analizados. Estos resultados sumados a antecedentes previos sobre cruzamientos interespecíficos que sugieren que las hembras de *Austrolebias charrua* serían el sexo heterogamético, la imposibilidad de descartar la presencia de cromosomas sexuales y el tipo de ambiente en que se desarrolla esta especie argumentan a favor de la hipótesis de que el mecanismo de determinación sexual operante es genético.

Cabe destacar que, si bien los resultados obtenidos concuerdan con los resultados esperados, su conocimiento es esencial para habilitar el planteo del siguiente objetivo de esta tesis relativo a la búsqueda de genes sexo-específicos a desarrollarse en el próximo Capítulo.

11.6 Perspectivas

Es indispensable ampliar los ensayos de termosensibilidad (19 y 25°C) en relación a la determinación sexual a un mayor número de individuos que abarquen poblaciones habitantes de toda el área de distribución de *A. charrua* con los objetivos de: 1) evaluar si la pareja 6 representa, o no, un caso aislado de susceptibilidad a estas temperaturas y 2) determinar si existen diferencias entre las distintas poblaciones como se ha descrito en el pez *Menidia menidia*, especie cercana filogenéticamente a *A. charrua*. Asimismo, es necesario analizar otras temperaturas comprendidas en el rango experimentado por *A. charrua* en la naturaleza (19 y 27°C) para validar esta conclusión y conocer la proporción sexual durante todo el ciclo de vida completo en la naturaleza.

La instrumentación del análisis de los complejos sinaptonémicos durante el paquiteno de la meiosis es necesaria para evidenciar la existencia o no de cromosomas sexuales en esta especie. Esta técnica implica la puesta a punto de microesparcidos testiculares y ovocitarios para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión.

Con el objetivo de establecer si, efectivamente, el sistema de determinación sexual en *Austrolebias charrua* corresponde a la hipótesis de hembra heterogamética, es necesaria la generación de un mapa de ligamiento basado en microsatélites para definir el sistema genético de determinación sexual (Valenzano y col. 2009). En este sentido, encontrar alelos de microsatélites que segreguen de manera diferencial en ambos sexos puede sugerir que los mismos están estrechamente asociados o forman parte de regiones cromosómicas involucradas con la determinación sexual.

Capítulo III

**Búsqueda de genes candidatos sexo-específicos en
Austrolebias charrua.**

III.1 Antecedentes

La existencia de dos fenotipos sexuales es común en el reino animal, vegetal y fungi. Este hecho implica que, en los organismos que presentan ambos fenotipos, existirá un momento en el ciclo de vida en que se establece el camino de desarrollo femenino o masculino. En el reino animal, décadas de estudios a nivel genético han conducido a la hipótesis global de que los genes que inician las cascadas regulatorias de determinación sexual presentan poca similitud. Este hecho sugiere que la determinación sexual estaría regulada por pautas diferentes a las que operan en la conservación evolutiva de las redes regulatorias de los procesos del desarrollo. Estas redes están generalmente dirigidas por genes maestros universales, altamente conservados, que determinan el destino de un linaje celular hacia la diferenciación en cierto tejido u órgano (revisado por Herpin y Schartl, 2011).

En general, el control y la coordinación de la expresión génica eucariota recae en redes regulatorias transcripcionales y postranscripcionales. Desde la perspectiva evolutiva, las innovaciones y adaptaciones en determinadas redes requieren de rápidos cambios en la regulación génica. Un ejemplo puede ser cambios a nivel del ADN que alterando la ubicación o accesibilidad a determinadas secuencias en *cis* genera nuevos sitios de unión a factores de transcripción. Estas alteraciones pueden ocurrir en cualquier módulo de secuencias regulatorias generando diferentes efectos según la estructura de la red donde ocurran. Se ha postulado recientemente la hipótesis de que el movimiento de los elementos transponibles (parte más dinámica del genoma eucariota) participaría, modificando las cascadas génicas, en la reorganización de redes pre-establecidas. Estos elementos, además de donar secuencias en *cis*, serían responsables de formar nuevas redes regulatorias (Herpin y *col.* 2010).

La determinación sexual involucra una compleja jerarquía de genes. Análisis a nivel de expresión han identificado cientos de genes candidatos que muestran patrones de expresión sexo-específicos. Sin embargo, ha sido difícil

situarlos en una red de regulación génica y establecer claramente su función (Herpin y col. 2010). Esta cascada involucra una jerarquía que presenta alta plasticidad donde ocurren cambios rápidos durante la evolución. Estudios en diferentes grupos revelan que los genes maestros al inicio de la cascada regulatoria varían dramáticamente a medida que evolucionan nuevas especies mientras que los genes ubicados en etapas posteriores (“río abajo”) permanecen conservados ejecutando funciones esencialmente idénticas (Marin y Baker, 1998; Herpin y col. 2010).

Familia de genes *DM*

Entre los genes “río abajo” involucrados en la determinación/diferenciación del sexo, se ha identificado una familia génica (genes *dm*) presente en organismos filogenéticamente divergentes como *doublesex* de *Drosophila*, *mab-3* de *Caenorhabditis elegans* y *dmrt* (*doublesex-mab-3* related transcription factor) de vertebrados. Todos estos genes codifican proteínas que comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado, el dominio “*DM*”. El dominio *DM* codifica para un motivo de unión “dedos de zinc” rico en cisteínas inusual (no canónico) el que contacta predominantemente a nivel del surco menor de la doble hélice de ADN. Los genes *dm* fueron originalmente descritos como genes esenciales en la regulación de varios aspectos del dimorfismo sexual somático durante la determinación sexual de moscas y nemátodos (Raymond y col. 1998, Smith y col. 1999, Zhu y col. 2000).

La familia *dmrt* de vertebrados está integrada por diferentes miembros generados por eventos de duplicación durante el curso de la evolución. En los mamíferos se han descrito 7 en ratones y 8 en humanos. En el grupo peces se han identificado 5 clases (*dmrt 1, 2, 3, 4 y 5*) (Huang y col. 2002; Volff y col. 2003) ortólogos de los humanos, por lo que se estima que existen desde al menos, 450 millones de años (tiempo aproximado en el que se presume ocurrió la divergencia entre peces y tetrápodos). En los peces existen, además, versiones duplicadas de éstos halladas en especies filogenéticamente divergentes que posiblemente resultaron de la duplicación genómica ancestral

ocurrida específicamente en el linaje de los teleósteos (Volf y col. 2003; Zhou y col. 2008).

Genes *dmrt1*

El primer miembro identificado de esta familia génica fue *dmrt1* en mamíferos. Este gen es el componente “río abajo” evolutivamente más conservado implicado en el desarrollo sexual masculino de los vertebrados. (Raymond y col. 1998, 1999, 2000; Smith y col. 1999; Guan y col. 2000; Marchand y col. 2000; Herpin y col. 2010). En los mamíferos placentarios y marsupiales *dmrt1* es autosómico y está ubicado “río abajo” del gen maestro determinante masculino *Sry* (Raymond y col. 1998) mientras que en los mamíferos del género *Platypus* (Orden Monotremas) el gen *dmrt1* está situado en un cromosoma sexual. En este género se ha sugerido que *dmrt1* estaría involucrado en la determinación sexual (El-Mogharbel y col. 2007) dada la ausencia del gen *sry* (Grutzner y col. 2004). En la especie humana, se ha demostrado que una haploinsuficiencia del mismo estaría involucrada en cierto tipo de reversión del fenotipo sexual de masculino a femenino (Raymond y col. 1999). En las aves, se encuentra presente en el cromosoma Z y su expresión se observa predominantemente en la gónada masculina embrionaria y adulta (Shan y col. 2000). El gen *dmrt1* en este grupo presenta todas las características que permiten considerarlo como el gen maestro de la determinación sexual masculina (Smith y col. 2009). Estas son: 1) está ligado al sexo, 2) está conservado en los cromosomas Z de todas las aves estudiadas, incluso las especies de aves más basales (Shetty y col. 2002), 3) se expresa exclusivamente en el sistema urogenital previo a la diferenciación gonadal presentando una expresión más elevada en los machos (Smith y col. 2003), 4) una disminución a nivel de expresión de este gen (mediante ARNs de interferencia) provoca feminización (Smith y col. 2009). En las tortugas, en las que el mecanismo de determinación sexual es estrictamente ambiental (el fenotipo sexual depende de la temperatura de incubación embrionaria), la expresión del gen *dmrt1* es más elevada en las gónadas de los embriones cultivados a temperatura masculinizante (Kettlewell y col. 2000). En el anfibio

Xenopus laevis se han identificado 2 genes, *dmrt1* autosómico y su parólogo *DM-W* a nivel del cromosoma W. En este caso *DM-W* está involucrado en el desarrollo ovárico (Yoshimoto y col. 2008).

Con respecto a los peces, en todas las especies analizadas se demostró la presencia del gen *dmrt1* a nivel autosómico exhibiendo, en algunas especies como medaka *Oryzias latipes* (Kobayashi y col. 2004) y el bagre *Clarias gariepinus* (Raghuveer y Senthilkumaran, 2009), un patrón de expresión restringida al tejido testicular. En otras especies como la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Marchand y col. 2000), el pez cebra *Danio rerio* (Guo y col. 2005), la anguila *Monopterus albus* (Huang y col. 2005) y el pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Fernandino y col. 2008) la expresión del gen *dmrt1* se observa en ambas gónadas.

El interés en el estudio del gen *dmrt1* en relación a la determinación sexual en peces se profundizó con el descubrimiento de una duplicación de *dmrt1* designado *dmrt1b(Y)* (Nanda y col. 2002) o *dmy* (Matsuda y col. 2002, 2003) por su ubicación exclusiva en el cromosoma sexual Y en *Oryzias latipes*, cuya función sería equivalente al gen *sry* de mamíferos (gen maestro de la determinación sexual masculina). Se estima que el evento de duplicación ocurrió aproximadamente hace 10 a 18 millones de años dentro del intervalo de separación de las especies *Oryzias mekongensis*, *Oryzias latipes*, *Oryzias curvinotus* y *Oryzias luzonensis* (Kondo y col. 2004).

El gen *dmrt1b(Y)* se expresa únicamente en embriones masculinos previo a la diferenciación gonadal. La evidencia más clara que apunta a *dmrt1b(Y)* como gen regulador maestro en el desarrollo masculino proviene del hallazgo, en la naturaleza, de mutaciones espontáneas en éste que conducen a inversiones del sexo en *Oryzias latipes* (macho XY a hembra fenotípica XY) (Matsuda y col. 2002). Experimentos basados en la sobreexpresión de *dmrt1b(Y)* inyectado en embriones cuyo genotipo era XX, demostraron que ésta es suficiente para inducir el desarrollo sexual masculino indicando que se trata del gen responsable de la determinación del sexo en este grupo (Matsuda y col. 2007).

El primer signo que indica el comienzo de la diferenciación sexual a nivel morfológico en *Oryzias latipes* es una diferencia en el número de células germinales a nivel del ovario en desarrollo, previo al momento de la eclosión (Hamaguchi, 1982). La expresión de *dmrt1b(Y)* comienza mucho antes de este evento, durante el estadio de neurula (24 horas post-fecundación) (Iwamatsu, 1994; Nanda y col. 2002) mientras que la expresión del gen autosómico *dmrt1a* ocurre por primera vez entre los 20 a 30 días post-eclosión (durante el período de diferenciación testicular) (Kobayashi y col. 2004). Este gen está involucrado en la especificación de destino y mantenimiento de las células de Sertoli. En testículos adultos, se expresan ambos parálogos pero el nivel de expresión de *dmrt1a* predomina con respecto al de *dmrt1bY* (Hornung y col. 2007). En otros peces como tilapia (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) la ventana temporal de expresión del gen *dmrt1* comienza en las gónadas masculinas antes de su diferenciación morfológica y se mantiene durante la misma (Marchand y col. 2000; Ijiri y col. 2008). Basándose en los distintos patrones temporales de expresión que exhiben estos genes, Otake y col. (2008) plantean la hipótesis de que *dmrt1a* y *dmrt1bY* adquirieron funciones complementarias en *Oryzias latipes*, posteriormente a su duplicación.

Herpin y col. (2007) demostraron que *dmrt1bY* actúa como regulador negativo de la proliferación celular promoviendo el cese de la división de células germinales que ocurre previo a la diferenciación testicular. Este hallazgo así como la demostración de la expresión de *dmrt1bY* (ARNm y proteína, Kobayashi y col. 2004) en los precursores de las células de Sertoli, sugiere que en embriones XY de *Oryzias latipes*, el evento inicial que especificaría a la gónada en su conjunto (línea germinal y somática) ocurre mediante una comunicación direccional desde las células precursoras de Sertoli hacia las células germinales primordiales. En este momento, las células precursoras de Sertoli inhibirían la proliferación de las células germinales en el primordio gonadal mediante una acción parácrina. En esta línea, ratones mutantes en el gen *dmrt1*, evidencian una alta incidencia de teratomas y la incapacidad de las células germinales para detener la mitosis (Krentz y col. 2009). Ambas proteínas, *Dmrt1bY* y *Dmrt1a*, actuarían como factores de

transcripción (demostrado por la ubicación nuclear de proteínas de fusión, Herpin y col. 2007; Hornung y col. 2007 y ensayos en geles de retardo, Herpin y col. 2010).

La inserción de un elemento transponible (denominado *Izanagi* específico de *Oryzias latipes*) es el responsable de la regulación de la expresión del gen *dmrt1bY* además de contribuir a la creación de esta nueva jerarquía. Esta inserción se produjo en la región que comanda el patrón de expresión específico de la proteína, luego de la duplicación. La actividad transcripcional del gen *dmrt1bY* está disminuida por un sistema de retroalimentación negativo generado por su propia proteína y por su paróloga ancestral autosómica *Dmrt1a*. Experimentos *in vivo* revelaron la expresión de la proteína reportera GFP unida a la región promotora del gen *dmrt1bY* en la línea somática gonadal (células de Sertoli y las células intersticiales) (Herpin y col. 2010). Estos datos confirman el patrón de expresión reportado anteriormente utilizando anticuerpos específicos anti la proteína *Dmrt1bY* (Kobayashi y col. 2004). La fluorescencia causada por la expresión de GFP dirigida por el promotor de *dmrt1bY* declina a medida que aumenta la expresión de *dmrt1a* en esta población celular. En testículos maduros, la expresión de *dmrt1bY* permanece restringida a unas pocas células de Sertoli dispersas alrededor de células germinales mientras que predomina la expresión de *dmrt1a* (Herpin y col. 2010). Los mecanismos post-transcripcionales que involucran a la región 3'UTR son esenciales en la regulación de la expresión espacial de *dmrt1bY* en el embrión y la restricción de la misma a la gónada del pez adulto (Herpin y col. 2009). Se ha identificado un motivo de 11 nucleótidos, presente en la región 3'UTR de *dmrt1bY*, responsable de la estabilidad y control traduccional gónada-específica de este mensajero. Este motivo se encuentra conservado en los ortólogos *dmrt1* desde invertebrados a los mamíferos indicando que diferentes organismos emplearían un mecanismo regulatorio conservado en la evolución (Herpin y col. 2009)

En conjunto, estos estudios demuestran que *dmrt1* se encuentra altamente conservado en los vertebrados presentando un patrón de expresión principalmente vinculado al desarrollo de las gónadas masculinas en etapas

post natales (Hodgkin 2002; Yamaguchi y col. 2006). Asimismo, en todas las especies de peces gonocóricas estudiadas, el patrón de expresión de *dmrt1* se encuentra íntimamente asociado con la gonadogénesis y posterior diferenciación masculina. En peces hermafroditas, las vías de diferenciación gonadal son especialmente plásticas y susceptibles a las señales de cambio de sexo más allá de la embriogénesis. En éstas, la expresión de *dmrt1* acompaña el desarrollo de la fase testicular confirmando su rol durante el desarrollo masculino y/o espermatogénesis (Herpin y Schartl, 2011). Incluso, en *Odontesthes bonariensis* cuyo sistema de determinación sexual es ambiental (temperatura-dependiente), la expresión de *dmrt1* se correlaciona perfectamente con la temperatura de incubación embrionaria (aumenta cuando la temperatura ambiente determina machos y disminuye cuando ésta genera hembras) (Fernandino y col. 2008). Sin embargo, a pesar de la atención recibida por este factor, no se ha logrado caracterizar cuáles son sus blancos “río abajo” ni dilucidar aún de que manera funciona (Murphy y col. 2010).

Algunos datos sugieren que *Dmrt1* podría jugar diferentes roles (determinación del destino celular, diferenciación post natal de las células de Sertoli y mantenimiento de las células germinales y su progreso por la meiosis). En este contexto, cuando un gen ejerce múltiples funciones, es esperable la ocurrencia de diversidad a nivel transcripcional reflejada en la generación de versiones de procesamiento alternativo del gen original lo cual contribuye a incrementar la diversidad proteómica (Kriventseva y col. 2003; Kim y col. 2007). El procesamiento alternativo múltiple del gen *dmrt1* es una característica común descrita en varias especies de vertebrados como reptiles (Anand y col. 2008; Sreenivasulu y col. 2002), mamíferos (humanos: Cheng y col. 2006; ratón: Lu y col. 2007) y aves (Zhao y col. 2007) al igual que sus contrapartes en invertebrados *dsx* y *mab-3* donde isoformas macho/hembra específicas controlan diferentes aspectos del desarrollo sexual (Hodgkin, 2002). El significado funcional y evolutivo de la gran mayoría de estos eventos de procesamiento alternativo aún permanece desconocido (Kriventseva y col. 2003; Raghuveer y Senthilkumaran, 2009).

En la anguila hermafrodita *Monopterus albus* se identificaron variantes del gen *dmrt1* expresados diferencialmente durante la transformación de la gónada (ovario, ovostestis, testículo) (Huang y col. 2005). Asimismo, también han sido descritos eventos de procesamiento alternativo del gen *dmrt1* en *Danio rerio* (Guo y col. 2005).

En el bagre *Clarias gariepinus* se han identificado recientemente, además de la versión autosómica *dmrt1a*, otros transcritos del gen generados por procesamiento alternativo que generan proteínas de diferentes tamaños *dmrt1b* y *dmrt1c*. Es interesante mencionar que la isoforma *dmrt1c* carece de la mayor parte de la región que codifica para el dominio DM en el extremo 5' tanto en ésta como en la especie hermana *Clarias batrachus* (Raghuveer y Senthilkumaran, 2009). Este hecho ya había sido reportado en ratón, donde existen 4 isoformas diferentes de *dmrt1* gonadales, de las que una de ellas no presenta dominio DM (Lu y col. 2007).

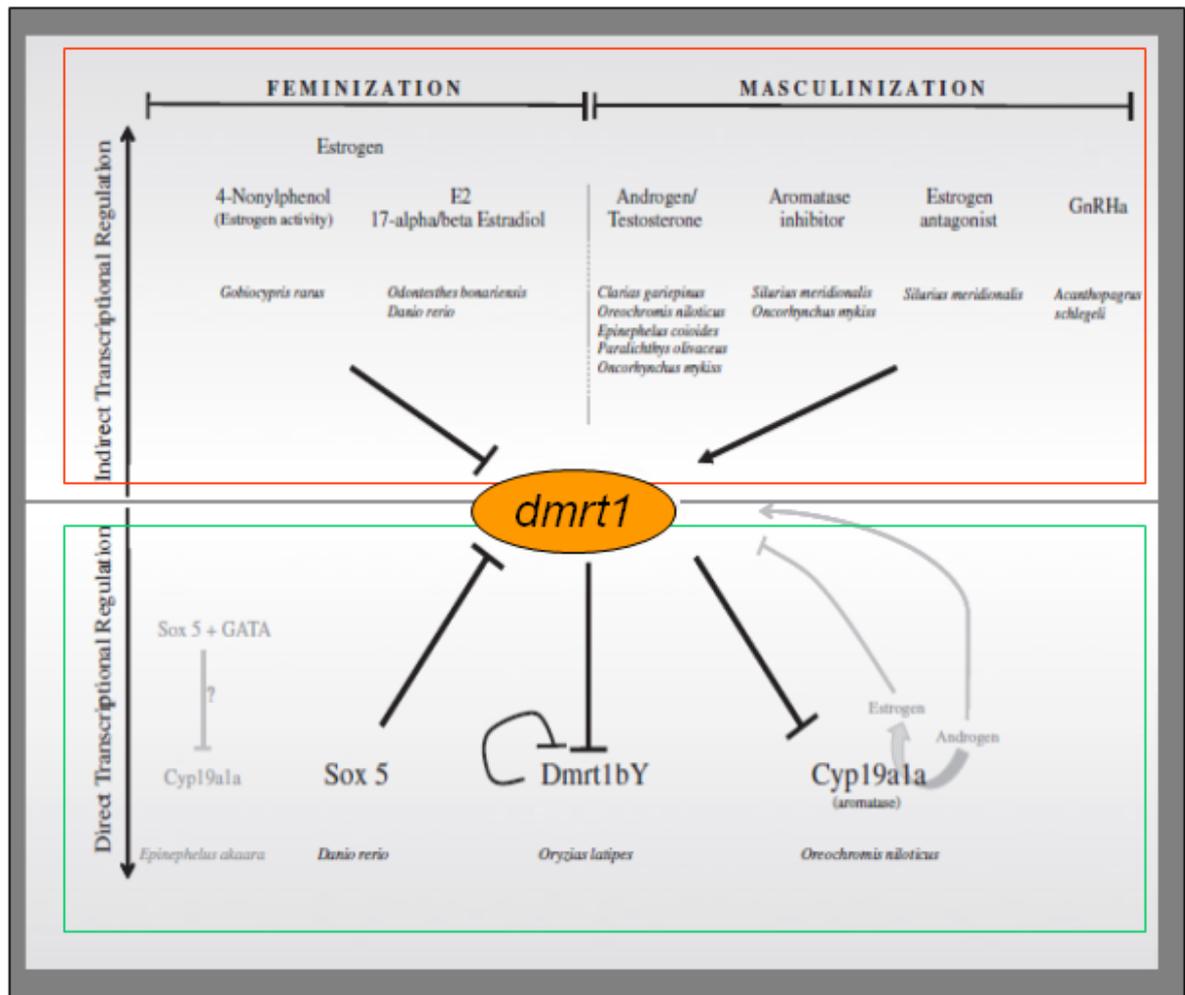
El patrón de expresión de los *dmrt1a, b* y *c* en *Clarias gariepinus* se detectó en gónadas masculinas en desarrollo y en testículos adultos, siendo más elevada la expresión de *dmrt1a* con respecto a sus versiones alternativas en la fase adulta. Datos de inmunodetección de la proteína *Dmrt1* revelan que la misma se localiza únicamente en espermatogonias y espermatocitos, por lo tanto en la línea germinal masculina. Estos cambios estacionales en la expresión contribuirían al mantenimiento del ciclo testicular (Raghuveer y Senthilkumaran, 2009). Consistente con estos datos, se reportó en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Marchand y col. 2000) y en el pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Fernandino y col. 2006) que la expresión del gen *dmrt1* es alta durante toda la espermatogénesis, decreciendo durante la espermiación.

Con respecto a la localización de la expresión *dmrt1* a nivel celular existen diferencias reportadas en la literatura. En algunos teleósteos como la tilapia *Oreochromis niloticus* (Guan y col. 2000), medaka *Oryzias latipes* (Shinomiya y col. 2004), el pez globo *Takifugu rubripes* (Yamaguchi y col. 2006) y el calandino *Squalius alburnoides* (Pala y col. 2009) la expresión de *dmrt1* se observa exclusivamente en las células somáticas (células de Sertoli);

contrariamente, en *Danio rerio* (Guo y col. 2005) la expresión se encuentra restringida a las células germinales mientras que en otras especies como el pez cola de espada *Xiphophorus maculatus* (Veith y col. 2006) se observa expresión en ambos linajes celulares (somáticas y germinales) al igual que en mamíferos (Raymond y col. 1999).

En relación a los efectos de la exposición de los peces a las hormonas esteroideas femeninas (estrógenos) o sustancias que mimetizan su acción (xenoestrógenos) sobre la expresión del gen *dmrt1*, existen algunos estudios (*Danio rerio*, Schultz y col. 2007; *Odontesthes bonariensis*, Fernandino y col. 2008; *Gobiocypris rarus* Zhang y col. 2008) que indican un efecto de interrupción del desarrollo gonadal masculino y cambio de identidad sexual. Este hecho siempre se correlaciona con un pronunciado decrecimiento de los niveles de ARNm de *dmrt1* excepto en *Oncorhynchus mykiss* indicando que una cantidad reducida de expresión de *dmrt1* no sería incompatible con la diferenciación ovárica (Vizziano y col. 2008). En *Odontesthes bonariensis*, la combinación de diferentes temperaturas de cultivo con tratamientos estrogénicos demuestran que una baja expresión del gen *dmrt1* y alta expresión de la enzima aromatasa se correlacionan con la diferenciación ovárica mientras que lo opuesto se observa durante la diferenciación testicular. Incluso en hembras, la expresión de la enzima aromatasa se evidencia 1 a 2 semanas previo a la expresión del gen *dmrt1* y la aparición de los primeros signos de diferenciación morfológica ovárica sugiriendo que los estrógenos regulan la expresión de *dmrt1* (Fernandino y col. 2008). Asimismo, los tratamientos con andrógenos, antagonistas de receptores estrogénicos o inhibidores de aromatasa en peces gonocóricos o hermafroditas resultan en un proceso de masculinización correlacionada con un aumento de la expresión del gen *dmrt1* (Devlin y Nagahama, 2002). La modulación de la expresión de este gen por hormonas esteroideas sería un efector clave en la inducción de la identidad gonadal (Fig. III.1).

Figura III.1



Modelo de la red regulatoria del gen *dmrt1* en peces (modificado de Herpin y Scharf, 2011).

Recuadro rojo: regulación transcripcional indirecta luego del tratamiento esteroideo
 Recuadro verde: regulación transcripcional directa

Otros genes de la familia *dmrt*

Aunque los otros integrantes de la familia *dmrt* han sido estudiados en menor grado, es posible observar dos tendencias. En peces, los genes *dmrt2*, *3*, *4* y *5*, exhiben un patrón de expresión conservado durante las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. Más adelante en la ontogenia, estos genes usualmente permanecen expresándose en un subgrupo de tejidos adultos que incluyen sistema nervioso (cerebro y médula espinal) y las gónadas (Herpin y Scharl, 2011). Se ha observado expresión gonadal macho-específica para los genes *dmrt3* y *4* en *Oryzias latipes* (Winkler y col. 2004) y el lenguado *Paralichthys olivaceus* (Wen y col. 2009) mientras que en *Oreochromis niloticus* la expresión de *dmrt4* se observa a nivel ovárico (Guan y col. 2000). Finalmente, se evidenció expresión en ambas gónadas de los genes *dmrt2* en *Oryzias latipes*, (Winkler y col. 2004) y *dmrt3* y *5* en *Danio rerio* (Guo y col. 2004; Li y col. 2008). Estas diferencias en los patrones de expresión entre parálogos indicarían un posible cambio funcional en los diferentes linajes filogenéticos (Herpin y Scharl, 2011). En otros vertebrados, como los ratones, *dmrt3* se expresa en las células somáticas del testículo en desarrollo mientras que *dmrt4* se expresa en ambas gónadas. Este patrón se extiende hasta la vida adulta incorporándose además la expresión de los genes *dmrt2* y *5* en la gónada femenina (Kim y col. 2003). En el monotrema *Platypus*, *dmrt3* se expresa únicamente en testículo (El-Mogahbel y col. 2007).

Una característica peculiar de la familia de genes *dmrt* se refiere a su organización genómica en grupos, conduciendo a la idea de que este patrón de expresión gonadal común estaría conectado a su organización de manera similar a la observada en los complejos de genes *hox*. Para comprender la función de esta familia génica en el desarrollo es importante diferenciar, en primera instancia, entre las funciones conservadas y divergentes durante la evolución de los vertebrados (Winkler y col. 2004). En general, en la actualidad se acepta que los miembros de la familia *dmrt* se encuentran conservados estructuralmente y que jugarían distintos roles en el desarrollo sexual aunque su función precisa aún no está establecida por lo que se plantea la necesidad

de ampliar el conocimiento de estos genes en otras especies (Wen y col. 2009).

La comparación de los diferentes mecanismos de determinación sexual en peces teleósteos en relación con su filogenia revela un cambio frecuente entre los diferentes mecanismos de determinación del sexo durante el curso de la evolución del linaje peces como ya se ha mencionado en la Introducción de este trabajo. La identificación, caracterización y análisis comparativo de genes maestros determinantes del sexo en diferentes especies de peces son necesarios para entender los mecanismos moleculares que dirigen este fenómeno así como su significado biológico (Veith y col. 2003).

En base a los antecedentes detallados y a la cercanía filogenética entre *Oryzias latipes* (Beloniformes) y *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes), se plantea la hipótesis de la existencia de al menos un gen relacionado con la determinación sexual masculina en *Austrolebias charrua*. Se utilizará la estrategia de la búsqueda del “gen candidato” como primera aproximación experimental a esta temática con el fin de explorar la posible existencia, en este grupo de peces, del gen maestro de la determinación sexual masculina *dmrt1bY* identificado en *Oryzias latipes*.

III.2 Materiales y métodos

1. Búsqueda de marcadores moleculares sexo-específicos a nivel genómico

Extracción de ADN

Se realizaron extracciones de ADN genómico (n= 12 machos y n= 18 hembras) para PCR utilizando un protocolo sin fenol/cloroformo (modificado de Medrano y col. 1990) a partir de hígados de ejemplares adultos provenientes de un banco de tejidos existente. Estos tejidos fueron conservados, en el momento de la disección, en etanol absoluto a 4°C hasta su utilización. Trozos del tejido se lavaron en STE 1X (Apéndice) y se agregó tampón de lisis (Apéndice) suplementado con 11µl Proteinasa K (10mg/ml). Se homogeneizó el tejido y permaneció toda la noche a 55°C. Luego se agregó ARN asa A (10mg/ml) y se incubó 1 hora a 55°C. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante conteniendo el ADN se transfirió a otro tubo y se desproteinizó con NaCl 5M. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se precipitó con etanol absoluto en frío (el doble del volumen obtenido) manteniéndose las muestras a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos. Se lavó el precipitado con etanol 70% 2 veces centrifugando nuevamente a 6.000 rpm durante 5 minutos y se dejó secar a 37°C. El ADN genómico se resuspendió en TE 1X (Apéndice) y se colocó en baño a 55°C para su total disolución. Se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

Valoración del ADN obtenido

Se preparó una dilución 1:100 de las muestras de ADN y se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro (A 260 y 280 nm) para estimar la concentración y grado de pureza. La concentración se estimó considerando la equivalencia 1 unidad D.O 260nm = 50µg/ml (Mülhardt, 2007). La integridad del

ADN aislado se verificó mediante una corrida electroforética (80v durante 40 minutos en una minicuba horizontal BioRad) en un gel de agarosa (ICN Biomedicals) 1% en tampón Tris-Acetato_EDTA (TAE) 1X (Apéndice) teñido con bromuro de etidio. Se sembraron 5 µl de ADN y 2 µl de tampón de carga junto con un marcador de pares de bases (1 Kb DNA ladder GIBCO). Las bandas teñidas con bromuro de etidio se visualizaron en un transiluminador con luz UV.

Amplificación *in vitro*

Una vez verificada la calidad del ADN, se procedió a la amplificación *in vitro* vía PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Las condiciones de los experimentos de amplificación utilizadas fueron: desnaturalización inicial 94°C 5 minutos seguido por 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Oligonucleótidos diseñados por el grupo de Nanda *y col.* (2002) que reconocen la copia del gen *dmrt1bY* ubicada en el cromosoma Y de *Oryzias latipes*:

DMTYh: 5´ TCT GCT GAG CTC CCC GGG 3´

DMTYi: 5´ GCC TCG CAG CTT CTC A 3´

La mezcla de reacción se realizó agregando a cada tubo 9,9 µl de agua Amresco, 1,5 µl de tampón 10X, 0,6 µl de Cloruro de Magnesio (50 mM) , 0,3 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM) y 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase 5U/ µl (Invitrogen) incorporando al final 1,5 µl de cada muestra de ADN. Asimismo se preparó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados, conteniendo la mezcla de reacción y 1,5 µl de agua Amresco sustituyendo la muestra de ADN. El volumen final fue de 15 µl y las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC 100.

Detección y aislamiento de los productos de PCR obtenidos

Los productos de PCR se detectaron mediante una corrida electroforética (80v durante 40 minutos en una minicuba horizontal CleverScientific) en un gel de agarosa (Biotools) 1% en tampón TAE 1X. Se sembraron 5 µl de ADN y 2 µl de tampón de carga Fermentas junto con un marcador de pares de bases (1 Kb DNA ladder Fermentas). Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed 1X (BIOTIUM) en un transiluminador con luz ultravioleta.

Purificación de las bandas obtenidas

Los productos de amplificación de interés se eluyeron de un gel de agarosa 1% en tampón TAE 1X teñidos con GelRed 1X (BIOTIUM). Las bandas seleccionadas se purificaron mediante el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences).

Clonación de los productos de PCR

a- Reacción de ligación

Se utilizó el kit de clonación CloneJet 1.2 PCR cloning kit de Fermentas (www.fermentas.com) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para productos de amplificación con extremos cohesivos. Se agregó en un tubo de 1.5 ml estéril: 2 µl de agua AMRESCO, 10 µl de Tampón 2X, 7 µl de los productos de PCR purificados y 1µl de enzima DNA Blunting (Fermentas), se mezcló por vortex y luego de una centrifugación de 10 segundos se incubó por 5 minutos a 70°C. Concluido este tiempo se colocó en hielo durante 1 minuto y se agregó 1 µl de vector de clonación pJET 1.2 (Fig.III.2) y 1 µl de la enzima DNA Ligase. Nuevamente se mezcló por vortex se centrifugó, 10 segundos y se incubó 50 minutos a temperatura ambiente (22°C). Se incubó 15 minutos a 70°C (inactivación de la enzima ligasa con el fin de optimizar el porcentaje de transformación; Michelsen ,1995).

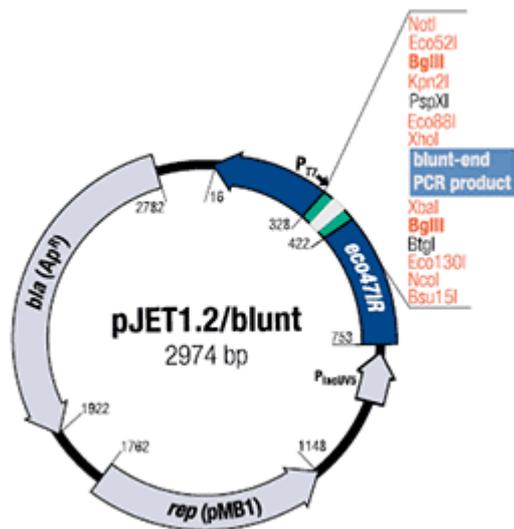


Fig. III.2. Mapa del plásmido pJET 1.2 (Fermentas). El tamaño del plásmido es 2974 pares de bases (pb) indicado en el centro de la figura. El mapa de restricción muestra la ubicación de la secuencia de replicación (*rep*), del gen de resistencia a ampicilina (*bla*), promotor de la ARN polimerasa T7 y los sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción. Posee a su vez el gen que codifica para la endonucleasa de restricción Eco47I que en ausencia de metilaciones específicas, la endonucleasa es letal para las células huésped *E. coli.*, este sistema de selección positiva se inactiva al lograr la inserción del fragmento de ADN de interés en el sitio MCS. (<http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/pjet12>)

b- Competencia y transformación de las bacterias

Se realizó una estría de bacterias *E. coli* de la cepa JM107 en condiciones de esterilidad, en una placa de LB- Agar (Apéndice) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Mediante un ansa previamente flameada se inoculó una colonia bacteriana en 1,5 ml de Medio C estéril (TransfomrAid Fermentas) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente en la zona estéril se transfirió 150 µl del cultivo a 1,5 ml de medio C pre-calentado a 37°C durante 20 minutos y se cultivó durante 2 horas a 37°C en agitación. Se transfirieron 1,5 ml del subcultivo a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 10.000g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se

resuspendió suavemente el precipitado de bacterias en 600 µl de solución T recién preparada (500µl de solución A y 500 µl de solución B) y se incubó en hielo 5 minutos. Se centrifugó nuevamente 1 minuto en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado suavemente en 240 µl de Solución T, se colocó en hielo inmediatamente y se mantuvo durante 5 minutos, adquiriendo la competencia (capacidad de incorporar un plásmido).

La transformación se llevó a cabo transfiriendo 5 µl de cada producto de ligación a tubos de 1,5 ml que permanecieron en hielo por lo menos 2 minutos antes de agregarle 50 µl de las bacterias competentes. Luego de una incubación de 5 minutos en hielo, se sembraron 25 µl en cada placa de LB-Agar-ampicilina (200mg/ml) (Apéndice). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Este sistema de selección positiva de colonias se basa en que este vector, además de conferir la resistencia a la ampicilina, contiene un gen letal que es desactivado por la ligación del inserto en el sitio de clonado. Como resultado, sólo aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido con el inserto serán capaces de crecer en un medio de cultivo con ampicilina. Se seleccionaron al menos 6 colonias de cada inserto, se re-picaron en otra placa de LB-agar/ampicilina y se inocularon en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina (1,5µl 200mg/ml). Se incubaron toda la noche a 37°C.

c- Preservación de transformantes y purificación del plásmido

Luego de transcurridas las 12 horas, se transfirieron 800 µl del cultivo líquido de cada colonia a tubos de 1,5 ml estériles con 250µl de Glicerol (Sigma) autoclavado, se mezcló suavemente y se almacenaron a -20°C para su conservación.

Los 2,2 ml restantes del cultivo líquido se centrifugaron a 10.000g 2 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. La purificación de los plásmidos se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook y col. 1989). El mismo consiste en resuspender el precipitado en 100 µl de Solución I

(Apéndice), mezclar por vortex, agregar 200µl de Solución II recién preparada (Apéndice), invertir 5 veces cada tubo y colocar en hielo. Luego en frío se agregaron 150µl de Solución III fría (Apéndice) se invirtió 10 segundos y se incubó en hielo entre 3 y 5 minutos. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10.000g y se transfirió el sobrenadante a otro tubo (aproximadamente 400µl). Se agregó 1µl de ARNasa (10mg/ml) e incubó 30 minutos a 37°C en bloque térmico. Se agregó 1µl de Dextrano Sigma y 800µl de etanol absoluto, se mezcló y se precipitó el ADN plasmídico durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 10.000g, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 1 ml de etanol 70% cada vez. Se centrifugó a 10.000g y se descartaron nuevamente los sobrenadantes. Se secaron los precipitados bajo lámpara incandescente, para luego resuspenderlos en 40µl de agua AMRESCO inicialmente por pipeteo y luego incubando a 60°C 15 minutos. La estimación de la concentración de los productos obtenidos se realizó en geles de Agarosa Biotools al 2%, en TAE 1X, a 80 V 45 minutos visualizados con GelRed™ 1X (Biotum) en transiluminador ultravioleta.

d- Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas

Los plásmidos purificados se enviaron a secuenciar a MacroGen (www.macrogen.com), utilizando ambos oligonucleótidos (pJET1.2 forward y pJET1.2 Reverse) suplementados en el kit de clonación utilizado.

Las secuencias fueron analizadas en el programa Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation <http://www.genecodes.com>), para eliminar la información perteneciente al vector y ensamblar las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos forward y reverse. Luego fueron incorporadas en el programa MEGA 4 (Tamura y *col.*2007) y comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul y *col.*1990). Se realizó un análisis comparativo del conjunto de secuencias obtenidas mediante clonación,

y secuencias obtenidas del GenBank, usando el método de múltiples alineamientos del programa Clustal W (MEGA 4.0) (Tamura y *col.* 2007).

El análisis filogenético se realizó mediante el programa MEGA versión 4.0 (Tamura y *col.*2007). Se utilizó el algoritmo de “unión de vecinos” (Saitou y Nei, 1987) basado en el número de diferencias, a partir de la matriz de datos de 22 secuencias nucleotídicas. El soporte de las ramas en el árbol se obtuvo mediante la prueba estadística “bootstrap” (Felsenstein, 1985) con 1.000 réplicas. Los valores superiores a 50% de soporte fueron considerados como válidos.

El análisis estadístico de las secuencias (Tabla III.1) se realizó en el programa MEGA (Tamura y *col.* 2007). Se analizó el patrón de sustitución nucleotídica (transiciones / transversiones) utilizando la estimación de máxima verosimilitud compuesta (Tamura y *col.* 2004). Las transiciones son sustituciones nucleotídicas que involucran el cambio de una base purina por otra purina o de una base pirimidina por otra pirimidina; las transversiones son sustituciones de una base purina por una pirimidina o vice-versa (Nei y Kumar, 2000). Se aplicó la prueba de selección de Fisher, utilizando el método de Nei y Gojobori (1986), para inferir el patrón de la selección en la evolución de estas secuencias. Esta prueba se basa en la comparación entre sustituciones sinónimas (K_s) (que resultan en codones que mantienen el mismo aminoácido) y no sinónimas (K_a) (que resultan en codones que provocan un cambio de aminoácido) por sitio entre las secuencias. Si el valor p resultante es menor a 0.05 se rechaza la hipótesis nula (evolución neutral) aceptándose la alternativa: evolución positiva. Si el número observado de diferencias sinónimas por sitio excede el número de diferencias no sinónimas el valor p será 1 indicando selección purificadora (Nei y Kumar, 2000)

Tabla III.1

Secuencias nucleotídicas seleccionadas del GenBank para realizar el análisis filogenético a nivel genómico.

Secuencia	Organismo	Nº acceso (GenBank)
<i>dmrt1bY</i>	<i>Oryzias latipes</i> (HNI)	AY129241.1
<i>dmy</i>	<i>Oryzias curvinotus</i>	AB091695.1
<i>dmrt1</i>	<i>Odontesthes hatcheri</i>	EU864152.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias latipes</i>	AY524417.1
<i>dmrt1</i>	<i>Monopterus albus</i>	AF421347
<i>dmrt2</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	AF350428.1
<i>dmrt2</i>	<i>Danio rerio</i>	NM_130952.1
<i>dmrt2</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001037946.1
<i>dmrt3</i>	<i>Danio rerio</i>	NM_001005779.2
<i>dmrt3</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001037945.1
<i>dmrt3</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	AJ251455.1
<i>dmrt4</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	AF350427.1
<i>dmrt4</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	AB201464.1
<i>dmrt4</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	AJ251456.1
<i>dmrt5</i>	<i>Danio rerio</i>	AY618549.1
<i>dmrt5</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	AB201465.1
<i>dmrt5</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	DQ335470.1
<i>dmrt5</i>	<i>Oryzias latipes</i>	AB083691.1

2. Estudio de la expresión de genes candidatos sexo-específicos durante la ontogenia

Extracción de ARN

Se realizaron extracciones de ARN total a partir de embriones en los estadios de 2 a 128 células (n = 8), blástula temprana (n= 7) , dispersión (n= 7), reagregación (n= 10), 0 a 10 somites (n= 8), 10 a 20 somites (n= 11), 20 a 30 somites (n= 11) , 3 semanas post-fecundación (n= 8), 4 semanas post-fecundación (n= 10) y pre-eclosión (aproximadamente 38 días post-eclosión) (n= 10) por duplicado mediante el reactivo comercial Trizol Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en una relación: 5 volúmenes de trizol / 1 volumen de tejido. Una vez homogeneizadas las muestras se adicionó 0,2 ml de cloroformo por ml de Trizol agregado inicialmente. Luego se agitaron 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos previo a la centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa que contiene el ARN y se le agregó 0,5 ml de alcohol isopropílico por ml de Trizol agregado inicialmente para la homogeneización. Se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C durante 30 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1ml de etanol 75% por ml de Trizol agregado inicialmente para la homogeneización. Las muestras fueron agitadas vigorosamente (vortex) y se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y, previo secado del precipitado, los mismos se resuspendieron en 15µl de agua AMRESCO libre de nucleasas (cada muestra). Se incubaron a 60°C durante 10 minutos y se almacenaron a -80°C.

Se procedió a la eutanasia por inmersión en 2-fenoxietanol 2 ppm de alevines (n= 3 de cada sexo) y en 2-fenoxietanol 5 ppm de adultos hembra y macho (n= 3 de cada sexo) de *Austrolebias charrua* (protocolo habilitado por certificación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CHEA). Los alevines y las gónadas obtenidas en condiciones libres de ribonucleasas se colocaron inmediatamente en el reactivo comercial TRIZOL (Invitrogen) en una relación: 5 volúmenes de trizol / 1 volumen de tejido. La extracción de ARN total de los tejidos, se realizó según las recomendaciones del fabricante. El

material se descongeló a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000g y se homogeneizó nuevamente. Se agregó cloroformo (0,2ml por 1ml de TRIZOL) y se agitó durante 15 segundos. Se centrifugó a 12.000g, 15 minutos a 4°C para la separación de las fases. Se extrajo cuidadosamente la fase acuosa que contenía el ARN, a ésta se le agregó isopropanol (0,5ml por 1ml TRIZOL), 1 µL de Dextrano Sigma 20 µg/mL, (para optimizar la visualización del precipitado) y se centrifugó a 12.000g, 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado con 1ml de etanol 75%, centrifugando a 12.000g, 5 minutos a 4°C y secado bajo lámpara incandescente. Finalmente el ARN fue resuspendido en agua AMRESCO libre de nucleasas a 55°C durante 10 minutos en un bloque térmico Labnet.

Las extracciones de ARN provenientes de alevines *in toto* y de gónadas adultas fueron sometidos a un tratamiento adicional con la enzima Desoxirribonucleasa I (ADNasa I, Invitrogen) para digerir posibles trazas de ADN genómico presentes en las muestras. Se utilizaron entre 10 y 15 µl de las muestras provenientes de la extracción de ARN a las que se le agregaron 2 µl de la solución tampón 10X (Apéndice), 1µl RNaseOUT (inhibidor de ARNasas Invitrogen), 2 µl de enzima ADNasa I y agua AMRESCO libre de ARNasas hasta completar los 20 µl. La mezcla de reacción se agitó suavemente y se incubó por 30 minutos a 37°C. Se agregaron 2 µl de Cloruro de Litio 4M, 1 µl de dextrano y 44 µl de etanol absoluto. Se sumergió el tubo de 1.5 ml durante 2 segundos en nitrógeno líquido, con el fin de acelerar la precipitación (adaptado de Ausubel *y col*, 1992). Luego se centrifugó a 4°C, 10.000g, por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%. Finalmente se centrifugó a 4°C y 10.000g, 5 minutos, se descartó el sobrenadante, el precipitado se secó bajo lámpara incandescente y se resuspendió como en el paso anterior. El ARN se almacenó a -80°C.

Valoración del ARN obtenido

La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución tampón Tris-Acetato_EDTA (TAE) 1X. Se cargaron

4 µl de muestra y 3 µl de tampón de carga específico para ARN, (Formamida 70%, Azul Bromofenol 0,1%). La corrida electroforética se realizó en TAE 1X a 90 V durante 20 minutos. Las muestras se visualizaron mediante GelRed™ 1X (BIOTIUM) en un transiluminador ultravioleta.

La concentración de ARN se estimó según la correlación de absorción/emisión del ARN frente al marcador de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas). Esta correlación se calculó previamente a partir de un índice obtenido comparando la absorción/emisión de las bandas de ARN ribosomales de cuatro muestras de ARN de concentraciones conocidas y calculando la correspondencia con el valor de emisión de la banda de 500 pb del marcador de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas) con el programa ImageJ (Java Image, Abramoff, 2004; Rasband, 1997-2009),

Retrotranscripción. Síntesis de ADNc.

Se utilizó la enzima Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen) para la retrotranscripción siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó durante 5 minutos a 65°C la mezcla de: ARN total (10pg a 5µg) con 1µl de oligo (dT)₂₀ 50 µM (Invitrogen), 1µl de dNTPs 10 mM y agua AMRESCO libre de ARNasas hasta completar 13µl. Se colocó la mezcla 1 minuto en hielo, luego se adicionaron: 4µl de solución tampón 5X, 1µl DTT 0.1M, 1µl RNaseOUT (inhibidor de ARNasas Invitrogen), 1µl de enzima retrotranscriptasa. Por último, la reacción se produjo en el termociclador Multigene II, Labnet a 50°C durante 1 hora y finalizó inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos.

Evaluación de la síntesis de ADNc

Se comprobó la síntesis del ADNc mediante la amplificación de un gen de expresión constitutiva. Se utilizó una pareja de oligonucleótidos específicos

que amplifican una región codificante del gen de la β Actina del pez *Danio rerio* (número de acceso del GenBank AF057040, Barralo y col. 1999).

β -actina-RSA-1: 5' GCCGGTTTTGCTGGAGATGAT 3'

β -actina-RSA-2: 5' ATGGCAGGGGTGTTGAAGGTC 3'

Las reacciones se llevaron a cabo en Termociclador Multigene II (Labnet) , bajo las condiciones de amplificación que se detallan a continuación: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de anclaje a 55°C y 1 minuto de extensión a 72°C y por último una extensión final de 7 minutos a 72°C. La mezcla de reacción se realizó agregando a cada tubo 9,9 μ l de agua Amresco, 1,5 μ l de tampón 10X, 0,6 μ l de Cloruro de Magnesio (50 mM) , 0,3 μ l de dNTPs (10 mM), 0,5 μ l de cada oligonucleótido (10 μ M) y 0,2 μ l de enzima Taq DNA polimerase 5U/ μ l (Invitogen). Al final se agregó 1,5 μ l de cada ADN copia a evaluar. Se preparó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados que contenía la mezcla de reacción y 1,5 μ l de agua Amresco sustituyendo el ADNc. El volumen final de reacción fue de 15 μ l.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de Agarosa (Biotools) al 1%, en TAE 1X, a 80 V durante 30 minutos. La visualización se realizó mediante el agente intercalante GelRed™ 1X (Biotum) en transiluminador ultravioleta. Los productos obtenidos a partir de las reacciones de amplificación se recortaron del gel de agarosa y se purificaron mediante el kit GFX PCR DNA Gel Band purification kit (G. Electric) según las especificaciones del fabricante. Los productos purificados fueron enviados al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador automático ABI3130 Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.,1990) para confirmar si efectivamente los productos obtenidos corresponden a la actina beta de *Austrolebias charrua*.

Amplificación *in vitro* del gen de interés

Una vez verificado el estado del ADNc, se procedió a la utilización de los oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia de interés. Las condiciones de los experimentos de amplificación utilizadas fueron: desnaturalización inicial 94°C 5 minutos seguido por 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C con una incubación final de 7 minutos a 72°C.

Oligonucleótidos diseñados por el grupo de Nanda *y col.* (2002)

DMTYh: 5' TCT GCT GAG CTC CCC GGG 3'

DMTYi: 5' GCC TCG CAG CTT CTC A 3'

La mezcla de reacción se realizó agregando a cada tubo 9,9 µl de agua Amresco, 1,5 µl de tampón 10X, 0,6 µl de Cloruro de Magnesio (50 mM) , 0,3 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM) y 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase 5U/ µl (Invitrogen) incorporando al final 1,5 µl de cada ADN copia. Asimismo se preparó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados, conteniendo la mezcla de reacción y 1,5 µl de agua Amresco sustituyendo el ADNc. El volumen final fue de 15 µl y las reacciones se llevaron a cabo en Termociclador Multigene II (Labnet)

Los productos de PCR fueron observados una corrida electroforética (80v durante 30 minutos en una minicuba horizontal Cleaver Scientific) en un gel de agarosa (Biotools) 2% en tampón TAE 1X. Se sembraron 5 µl de muestra y 2 µl de tampón de carga junto con un marcador de pares de bases de amplio rango (Mass ruler DNA ladder mix, Fermentas). Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed (BIOTIUM) en un transiluminador con luz UV. La concentración de cada producto obtenido se estimó mediante la comparación del marcador de pares de bases y las bandas utilizando el programa Image J de dominio público (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>)

Se realizó una re-amplificación de los productos obtenidos manteniendo las condiciones antes detalladas excepto que la temperatura de anclaje de los oligonucleótidos se aumentó a 59°C.

Las bandas de interés se eluyeron y purificaron mediante el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences). Para corroborar que se estaba re-amplificando una única banda en cada caso, se realizó un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con GelRed (BIOTIUM). La concentración se estimó según la correlación de absorción/emisión del ARN frente al marcador de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas). Esta correlación se calculó previamente a partir de un índice obtenido comparando la absorción/emisión de las bandas de ARN ribosomales de cuatro muestras de ARN de concentraciones conocidas y calculando la correspondencia con el valor de emisión de la banda de 500 pb del marcador de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas) con el programa ImageJ (Java Image, Abramoff, 2004; Rasband, 1997-2009),

Clonación del producto de PCR

a- Reacción de ligación

Se utilizó el kit de clonación CloneJet 1.2 PCR cloning kit de Fermentas (www.fermentas.com) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para productos de amplificación con extremos pegajosos. Se agregó en un tubo de 1.5 ml estéril: 2 µl de agua AMRESCO, 10 µl de Tampón 2X, 7 µl de los productos de PCR purificados (testículo adulto) y 1µl de enzima DNA Blunting (Fermentas), se mezcló por vortex y luego de una centrifugación de 10 segundos se incubó por 5 minutos a 70°C. Concluido este tiempo se colocó en hielo durante 1 minuto y se agregó 1 µl de vector de clonación pJET 1.2 (Fig. II.2) y 1 µl de la enzima DNA Ligase. Nuevamente se mezcló por vortex se centrifugó, 10 segundos y se incubó 50 minutos a temperatura ambiente (22°C). Se incubó 15 minutos a 70°C (inactivación de la enzima ligasa con el fin de optimizar el porcentaje de transformación; Michelsen ,1995).

b- Competencia y transformación de las bacterias

Se realizó una estría de bacterias *E. coli* de la cepa JM107 en condiciones de esterilidad, en una placa de LB- Agar (Apéndice) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Mediante un ansa previamente flambada se inoculó una colonia bacteriana en 1,5 ml de Medio C estéril (TransfomrAid Fermentas) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente en la zona estéril se transfirió 150 µl del cultivo a 1,5 ml de medio C pre-calentado a 37°C durante 20 minutos y se cultivó durante 2 horas a 37°C en agitación. Se transfirieron 1,5 ml del subcultivo a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 10.000g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el precipitado de bacterias en 300 µl de solución T recién preparada (250µl de solución A y 250 µl de solución B) y se incubó en hielo 5 minutos. Se centrifugó nuevamente 1 minuto en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado suavemente en 120 µl de Solución T, se colocó en hielo inmediatamente y se mantuvo durante 5 minutos, adquiriendo la competencia (capacidad de incorporar un plásmido).

La transformación se llevó a cabo transfiriendo 5 µl del producto de ligación a tubos de 1,5 ml que permanecieron en hielo por lo menos 2 minutos antes de agregarle 50 µl de las bacterias competentes. Luego de una incubación de 5 minutos en hielo, se sembraron 25 µl en cada placa de LB- Agar-ampicilina (200mg/ml) (Apéndice). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Se seleccionaron 7 colonias, se re-picaron en otra placa de LB-agar/ampicilina y se inocularon en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina (1,5µl 200mg/ml). Se incubaron toda la noche a 37°C.

c- Preservación de transformantes y purificación del plásmido

Luego de transcurridas las 12 horas, se transfirieron 800 µl del cultivo líquido de cada colonia a tubos de 1,5 ml estériles con 250µl de Glicerol

(Sigma) autoclavado, se mezcló suavemente y se almacenaron a -20°C para su conservación.

Los 2,2 ml restantes del cultivo líquido se centrifugaron a 10.000g 2 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. La purificación de los plásmidos se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook y col. 1989). El mismo consiste en resuspender el precipitado en 100 µl de Solución I (Apéndice), mezclar por vortex, agregar 200µl de Solución II recién preparada (Apéndice), invertir 5 veces cada tubo y colocar en hielo. Luego en frío se agregaron 150µl de Solución III fría (Apéndice) se invirtió 10 segundos y se incubó en hielo entre 3 y 5 minutos. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10.000g y se transfirió el sobrenadante a otro tubo (aproximadamente 400µl). Se agregó 1µl de ARNasa (10mg/ml) e incubó 30 minutos a 37°C en bloque térmico. Se agregó 1µl de Dextrano Sigma y 800µl de etanol absoluto, se mezcló y se precipitó el ADN plasmídico durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 10.000g, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 1 ml de etanol 70% cada vez. Se centrifugó a 10.000g y se descartaron nuevamente los sobrenadantes. Se secaron los precipitados bajo lámpara incandescente, para luego resuspenderlos en 40µl de agua AMRESCO inicialmente por pipeteo y luego incubando a 60°C 15 minutos. La estimación de la concentración de los productos obtenidos se realizó en geles de Agarosa Biotools al 2%, en TAE 1X, a 80 V 45 minutos visualizados con GelRed™ 1X (Biotum) en transiluminador ultravioleta. La misma se estimó según la correlación de absorción/emisión del ADN frente al marcador de pares de bases (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas) calculando la correspondencia con el valor de emisión de la banda de 500 pb del marcador de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas) con el programa ImageJ (Java Image, Abramoff, 2004; Rasband, 1997-2009)

d- Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas

Los plásmidos purificados se enviaron a secuenciar a Macrogen (www.macrogen.com), utilizando ambos oligonucleótidos (pJET1.2 forward y pJET1.2 Reverse) suplementados en el kit de clonación utilizado.

Las secuencias fueron analizadas en el programa Sequencher 4.10.1 (www.genecodes.com), para eliminar la información perteneciente al vector y ensamblar las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos forward y el reverse. Luego fueron incorporadas en el programa MEGA 4 (Tamura y *col.* 2007) y comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul y *col.*1990).

Se realizó un análisis comparativo del conjunto de secuencias obtenidas mediante clonación, utilizando el algoritmo de “unión de vecinos” (Saitou y Nei, 1987) basado en el número de diferencias (MEGA 4.0) (Tamura y *col.* 2007).

El análisis filogenético de la matriz de datos constituida por 24 secuencias nucleotídicas de ARNm seleccionadas del GenBank (Tabla III.2) y la obtenida en el presente trabajo, se realizó mediante el programa MEGA versión 4.0 (Tamura y *col.*2007). Se utilizó el algoritmo de “unión de vecinos” (Saitou y Nei, 1987) basado en el número de diferencias, distancia p y el método de máxima parsimonia (Fitch, 1971), búsqueda heurística. El soporte de las ramas en las topologías se obtuvo mediante la prueba estadística “bootstrap” (Felsenstein, 1985) con 1.000 réplicas. Los valores superiores a 50% de soporte fueron considerados como válidos.

El análisis estadístico de las secuencias (Tabla III.2) se realizó en el programa MEGA (Tamura y *col.* 2007). Se analizó el patrón de sustitución nucleotídica (transiciones / transversiones) utilizando la estimación de máxima verosimilitud compuesta (Tamura y *col.* 2004). Se aplicó la prueba de selección de Fisher, utilizando el método de Nei y Gojobori (1986), para inferir el patrón de la selección en la evolución de las secuencias.

Tabla III.2

Secuencias nucleotídicas seleccionadas del GenBank para realizar el análisis filogenético a nivel de expresión (pb: pares de bases; pa: procesamiento alternativo)

Secuencia	Organismo	Características	Nº acceso (GenBank)
<i>dmrt1bY</i>	<i>Oryzias latipes (HNI)</i>	ARNm 804 pb completa	AY129241.1
<i>dmy a1</i>	<i>Oryzias latipes</i>	ARNm (pa) 1123 pb completa	AY448017.2
<i>dmy a2</i>	<i>Oryzias latipes</i>	ARNm (pa) 1115 pb completa	AY448018.2
<i>dmy</i>	<i>Oryzias curvinotus</i>	ARNm 1100 pb completa	AB091695.1
<i>dmrt1</i>	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	ARNm 3052 pb completa	DQ683742.1
<i>dmrt1</i>	<i>Odontesthes bonariensis</i>	ARNm 1285 pb completa	AY319416.3
<i>dmrt1a</i>	<i>Odontesthes hatcheri</i>	ARNm (pa)1294 completa	EU864152.1
<i>dmrt1b</i>	<i>Odontesthes hatcheri</i>	ARNm (pa)1123 completa	EU864153.1
<i>dmrt1c</i>	<i>Odontesthes hatcheri</i>	ARNm (pa)1002 completa	EU864154.1
<i>dmrt1a</i>	<i>Oryzias latipes</i>	ARNm (pa) 980 pb parcial	AY524417.1
<i>dmrt1c</i>	<i>Oryzias latipes</i>	ARNm (pa) 429 pb parcial	AY524419.1
<i>dmrt1d</i>	<i>Oryzias latipes</i>	ARNm (pa) 245 pb parcial	AY524420.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias marmoratus</i>	ARNm 849 pb completa	AY521023.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias luzonensis</i>	ARNm 8493 pb completa	AY521021.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias mekognensis</i>	ARNm 846 pb completa	AY521020.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias curvinotus</i>	ARNm 800 pb parcial	AY157713.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias marmoratus</i>	ARNm 849 pb completa	AY521023.1
<i>dmrt1</i>	<i>Oryzias celebensis</i>	ARNm 1147 pb completa	AY239587.1
<i>dmrt1</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	ARNm 413 pb parcial	HM046940.1
<i>dmrt1</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	ARNm 882 pb completa	AF529187.1

<i>dmrt1b</i>	<i>Clarias gariepinus</i>	ARNm (pa) 805 pb completa	FJ596555
<i>dmrt1c</i>	<i>Clarias gariepinus</i>	ARNm (pa) 742 pb completa	FJ596556.1
<i>dmrt1</i>	<i>Monopterus albus</i>	ARNm (pa) 1483 pb completa	AF421347
<i>dmrt1</i>	<i>Mus musculus</i>	ARNm 2251 pb	NM_015826
<i>dsx</i>	<i>Drosophila</i>	ARNm 3242 pb	NM_079548

11.3 Resultados

Búsqueda de marcadores moleculares sexo-específicos a nivel genómico

A partir de muestras de ADN se amplificaron, utilizando la pareja de cebadores específicos para identificar al gen *dmrt1bY* del pez *Oryzias latipes* (Nanda y col. 2002), dos secuencias en el genoma de los machos (denominadas M N1A de 1.000 pb y M N1B de 900 pb) y dos secuencia en el genoma de las hembras (denominadas H N2A de 1.000 pb y H N2B de 900 pb) (Fig.III.3). Este patrón de dos bandas se verificó en 15 de un total de 18 hembras (83%) y en 8 de un total de 12 machos (67%) analizados. Sin embargo, las bandas denominadas M N1B (machos) y H N2B (hembras) se identificaron en la totalidad de los individuos estudiados presentando un nivel de similitud del 100%.

De los clones obtenidos, se seleccionaron los que contenían insertos de: 1028 nucleótidos (M N1A), 884 nucleótidos (M N1B), 975 nucleótidos (H N2A) y 731 nucleótidos (H N2B). La comparación de estas secuencias con los bancos de datos (programa BLASTn) mostró que, utilizando la opción “altamente similar”, el programa no encontró similitud con ninguna secuencia publicada. Se encontró una similitud de 1% para M N1A y H N2A y un 2% para M N1B y H N2B con respecto a la secuencia *dmrt1bY* de *Oryzias latipes* del cual son originarios los cebadores específicos.

Análisis filogenéticos

Para determinar las relaciones evolutivas entre las secuencias aisladas y la familia de genes *dmrt*, se realizaron análisis filogenéticos utilizando el algoritmo de “unión de vecinos” basado en el número de diferencias y distancia p incluyendo 18 secuencias nucleotídicas genómicas seleccionadas del GenBank (Tabla III.1) y las 4 secuencias obtenidas de *Austrolebias charrua*. Mediante el programa MEGA se definieron los sitios variables y los sitios

parsimoniosamente informativos del conjunto de secuencias analizadas (Tabla III.3)

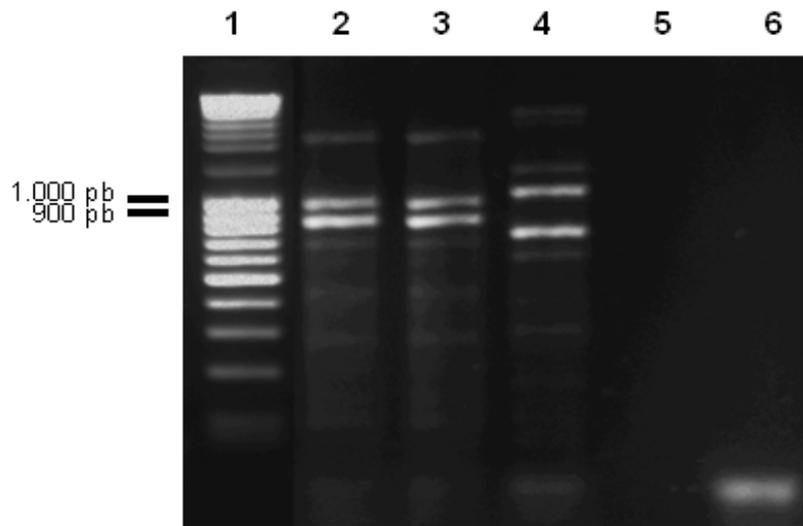
El análisis filogenético reveló una topología que demuestra la existencia de 3 grupos principales (Grupo 1, 2 y 3) (Fig. III.4). El primer grupo (soporte estadístico de 89%) está integrado por el gen *dmrt1* autosómico de *Oryzias latipes*, *Odontesthes hatcheri* y *Monopterus albus*, *dmrt1bY* (duplicación macho específica perteneciente a *Oryzias latipes* y *Oryzias curvinotus*) y las secuencias aisladas en *Austrolebias charrua*. El segundo grupo, con un soporte estadístico de 100%, está integrado por los genes *dmrt2* de *Danio rerio*, *Xiphophorus maculatus* y *Takifugu rubripes*. El tercer grupo, con un soporte estadístico del 76%, nuclea a los genes *dmrt3* de *Danio rerio*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *dmrt4* de *Xiphophorus maculatus* y *Takifugu rubripes* y *dmrt 5* de *Oryzias latipes*, *Xiphophorus maculatus*, *Danio rerio* y *Takifugu rubripes*

Tabla III.3

Cuantificación de los sitios variables y parsimoniosamente informativos de las secuencias analizadas.

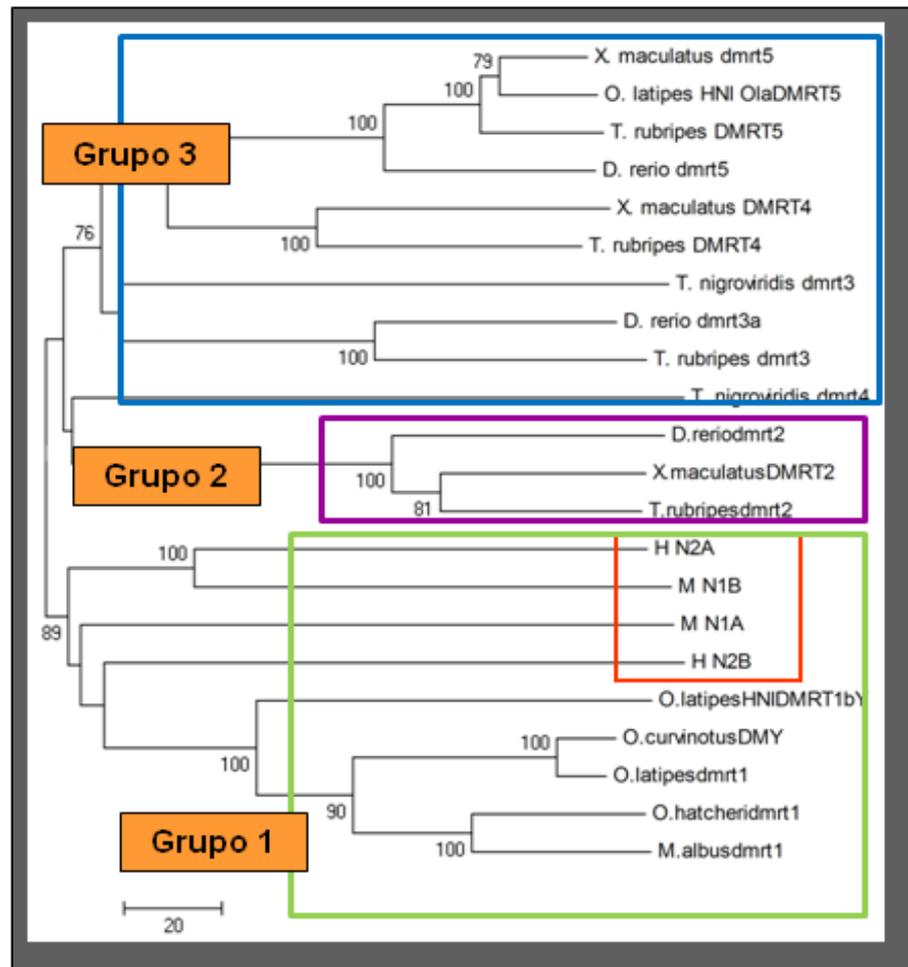
	Nucleótidos	Sitios variables	Sitios parsimoniosamente informativos
Conjunto completo de secuencias	1088	1084	1054
Secuencias <i>dmrt1</i>	1088	1046	768
Secuencias <i>A.charrua</i>	1088	933	110

Figura III.3 Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los productos amplificados a partir de ADN genómico de machos y hembras de *A. charrua*.



Carriles: 1. Marcador de pares de bases (Mass Ruler DNA ladder Fermentas); 2. ADN genómico de *A. charrua* macho; 3. ADN genómico de *A. charrua* hembra; 4. Control positivo: ADN genómico de *O. latipes* macho; 5. pocillo vacío; 6. Control negativo de la reacción.

Figura III.4



Árbol filogenético resultante utilizando del algoritmo "unión de vecinos" que evidencia las relaciones entre las secuencias *dmt* y las secuencias obtenidas en *A. charrua* a nivel genómico. Se muestran los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas mayores al 50 %. En rojo se señala el conjunto de secuencias pertenecientes a *A. charrua*. La escala de barra indica distancias.

Análisis estadísticos

El estudio de las tasas de sustitución nucleotídica entre las 22 secuencias analizadas (Tabla III.1) evidenció que existe mayor número de transiciones con respecto a transversiones en las tres posiciones de los codones ($R = 1.227$) (en la primera posición del codón $R = 1.116$; en la segunda $R = 1.237$ y en la tercera $R = 1.525$).

La aplicación de la prueba exacta de Fisher al mismo conjunto de secuencias evidenció, para la secuencia M N1A, selección positiva con respecto a 2 secuencias; selección purificadora con respecto a 8 secuencias y evolución neutra con respecto a 10 secuencias dentro de las que se encuentra *dmrt1bY* de *Oryzias latipes*. Para la secuencia M N1B, se verificó selección purificadora con respecto a 13 secuencias y evolución neutral con respecto a 8 secuencias que, al igual que M N1A, incluyen a *dmrt1bY* de *Oryzias latipes*. En el caso del fragmento H N2A, se detectó selección purificadora con respecto a 16 secuencias y evolución neutral con respecto a 3 secuencias. Para H N2B se corroboró selección positiva con respecto a una secuencia, selección purificadora con respecto a 11 secuencias y evolución neutral con respecto a 7 secuencias (Tabla III.4).

Estudio de la expresión de genes candidatos sexo-específicos durante la ontogenia

Valoración de los ARNs obtenidos y evaluación de la síntesis de ADNc

La integridad de los ARNs totales obtenidos se verificó en todas las muestras observándose dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, una banda inferior correspondiente a los ARN de transferencia y un sombreado característico de la población de ARN mensajeros.

El análisis mediante electroforesis de los productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos que amplifican el ARNm de la proteína actina beta reveló la presencia de una sola banda a nivel de los 400 pb en todos los ADNc sintetizados. Estos resultados confirmaron que la síntesis de ADNc se

Tabla III.4 Prueba exacta de Fisher de selección aplicada al conjunto de secuencias genómicas. (Hipótesis nula: selección neutral; hipótesis alternativa: selección positiva)
 En amarillo se señala los valores p menores a 0.05 que indican rechazo de hipótesis nula.
 Valores p menores a 0.05: selección positiva
 Valores p iguales a 1: selección purificadora
 Valores p entre 1 y 0.05: evolución neutral.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1. O.lalipesHNDMRT1bY																							
2. O.cuvirobusDMY	0.548																						
3. O.helcheidmrt1	0.303	1.000																					
4. O.lalipesdmrt1	0.370	0.414	1.000																				
5. M.abuodmrt1	1.000	1.000	1.000	1.000																			
6. X.maculatusDMRT2	1.000	0.235	1.000	0.236	1.000																		
7. D.reidmrt2	0.217	0.118	0.260	0.140	0.401	1.000																	
8. T.rubripesdmrt2	0.342	0.478	1.000	0.480	0.455	1.000	1.000																
9. D.reio dmrt3a	1.000	0.119	0.430	0.185	0.079	1.000	1.000	1.000															
10. T.rubripes dmrt3	1.000	0.078	0.087	0.029	0.219	0.358	0.314	0.189	1.000														
11. T.nigrovindis dmrt3	1.000	0.317	1.000	0.193	0.157	0.455	1.000	0.335	0.173	0.529													
12. X.maculatus DMRT4	0.083	0.135	0.461	0.314	0.473	1.000	0.143	0.269	1.000	1.000	1.000												
13. T.rubripes DMRT4	1.000	0.011	0.379	0.018	0.386	1.000	1.000	0.369	1.000	1.000	1.000	1.000											
14. T.nigrovindis dmrt4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.482	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000										
15. D.reio dmrt5	1.000	0.185	0.194	0.185	0.543	1.000	1.000	1.000	0.528	1.000	1.000	1.000	0.483										
16. T.rubripes DMRT5	1.000	0.220	0.041	0.191	0.353	1.000	0.589	0.183	0.545	0.288	1.000	1.000	1.000	1.000									
17. X.maculatus dmrt5	1.000	0.044	0.044	0.049	0.225	0.470	1.000	0.443	1.000	0.301	0.455	1.000	0.504	0.544	1.000	1.000							
18. O.lalipes HNI DIdMRT1E	1.000	0.110	0.160	0.084	1.000	1.000	1.000	0.500	1.000	0.304	0.259	1.000	1.000	0.278	1.000	1.000	1.000						
19. H.N2A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.206	0.389	1.000	1.000	1.000	0.107	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000						
20. H.N2B	0.124	0.340	0.024	1.000	0.181	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.123	0.401	1.000	0.173	1.000	1.000	1.000	1.000					
21. M.N1A	0.116	0.954	1.000	1.000	1.000	0.304	0.007	0.028	1.000	1.000	0.400	0.267	0.408	0.484	1.000	0.521	0.488	1.000	1.000				
22. M.N1B	0.281	0.484	1.000	0.521	0.447	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.401	0.382	0.547	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.081	

produjo correctamente y que además éstos no contienen contaminación con ADN genómico (ausencia de una banda a nivel de las 700 pb) (Fig.III.5)

Asimismo, el análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de 400 pb aislada en *Austrolebias charrua* y el conjunto de secuencias presentes en el GenBank demostró homologías entre un 85 y 89 % de identidad con secuencias de actina beta de distintas especies de peces (ej. *Poecilia reticulata*, *Fundulus heteroclitus*, *Dicentrarchus labrax*, *Danio rerio*, *Salmo salar*).

Patrón de expresión

Se identificó un fragmento de amplificación de aproximadamente 200 pb, utilizando la pareja de oligonucleótidos específicos DMTYh-DMTYi, a partir de los ADNc obtenidos desde el estadio embrionario de dispersión (blástula tardía) hasta el estadio pre-eclosión. En el caso de los ADNc provenientes de individuos juveniles, se observó amplificación únicamente a partir de los ADNc pertenecientes a los alevines machos (Fig. III.6). Asimismo, se corroboró la existencia de un fragmento de iguales características sólo a partir de los ADNc obtenidos de las gónadas adultas masculinas (Fig. III.7).

La traducción de este fragmento, mediante el programa MEGA, a secuencia aminoacídica evidencia la existencia de tres codones de terminación en el marco de lectura 1 y 2 codones de terminación en los marcos de lectura 2 y 3.

Búsqueda de la identidad de la secuencia obtenida a partir del ADNc de testículos

El fragmento secuenciado de 205 nucleótidos (Fig. III.8) fue incorporado al programa MEGA 4.0 (Tamura y col. 2007) para realizar el análisis comparativo con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul y col.1990). Utilizando la opción “altamente similar” el programa no encontró similitud con ninguna secuencia publicada. Esta búsqueda mostró únicamente cierto grado de identidad con:

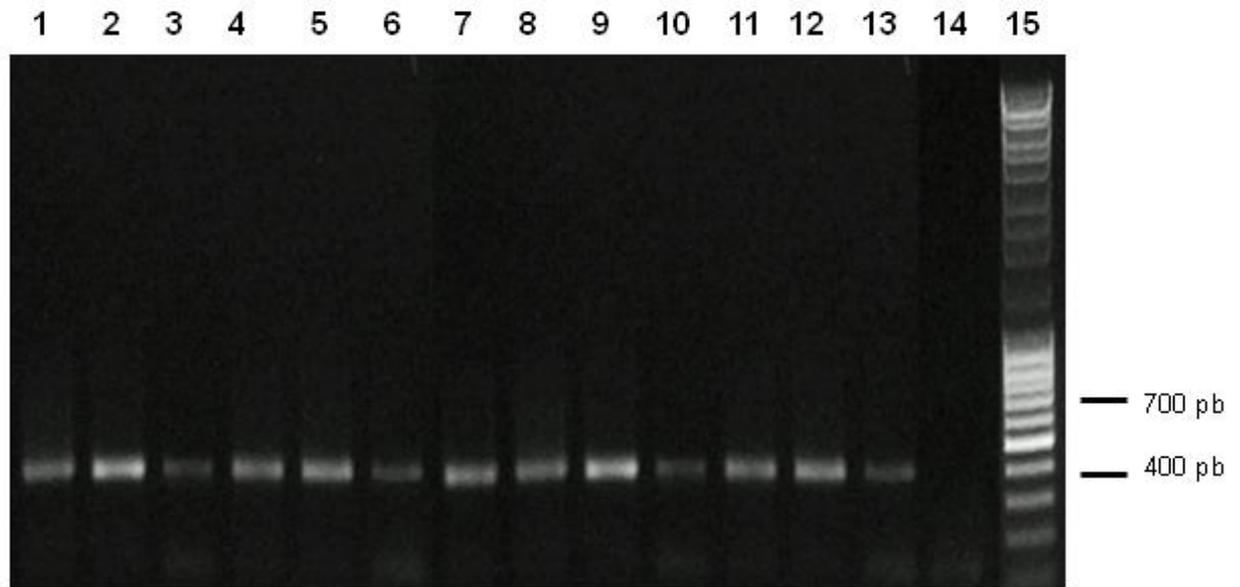
1. ARNm de la región determinante del sexo masculino de la cepa HNI de *Oryzias latipes* (nº de acceso en el GenBank AY129241.1, Nanda y col. 2002) (16% de identidad, E=0.043)
2. ARNm de la proteína Dmy de *Oryzias latipes* (nº de acceso GenBank NM_001104680.1, Herpin y col. 2010) (8% de identidad, E= 0.043)
3. grupo de genes *hox* de *Oryzias latipes* que contienen a *hoxba* (homólogo de *evx*) (nº de acceso GenBank, AB232920.1, Kurosawa y col. 2006)(17%, E=0.16)
4. cadena pesada miosina de *Oryzias latipes* (nº de acceso GenBank NM001161756.1, Ono y col. 2006) (7%, E=2.3).

La búsqueda de similitud del fragmento traducido mediante el programa MEGA y la base de datos del NCBI mediante el programa BLAST (Altschul y col.1990) mostró que la proteína deducida no presenta similitud significativa con ninguna secuencia publicada en los 3 marcos de lectura.

Análisis filogenéticos

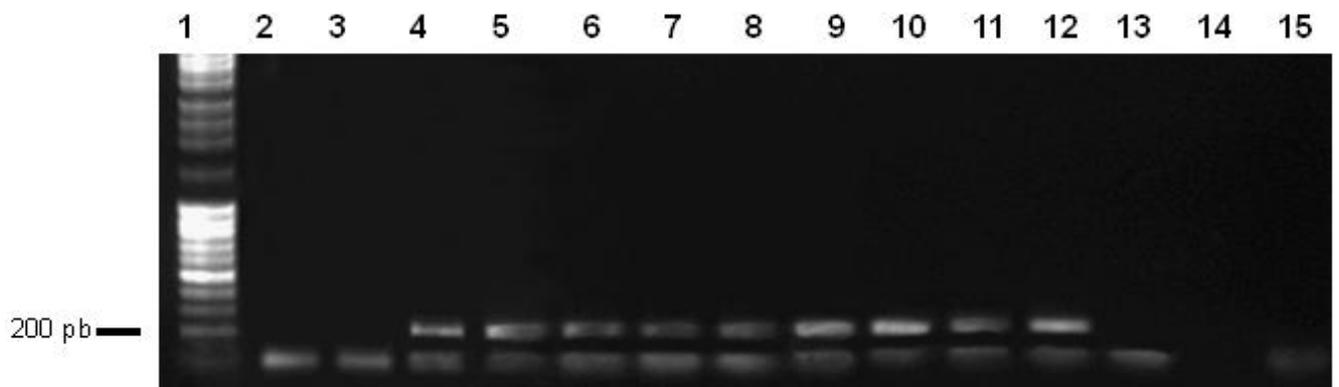
Para determinar la relación entre las secuencias aisladas del genoma y el ADNc obtenido a partir del transcriptoma de *Austrolebias charrua*, se realizaron análisis filogenético utilizando el algoritmo de “unión de vecinos” basado en el número de diferencias y distancia p, y además, el método de máxima parsimonia (búsqueda heurística). Las topologías obtenidas resultaron concordantes indicando que la secuencia expresada presenta mayor similitud con los fragmentos de menor tamaño identificados a nivel genómico (Fig. III.9).

Figura III.5 Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los productos amplificados utilizando los oligonucleótidos de actina (Barralo y col. 1999) y los ADNc sintetizados.



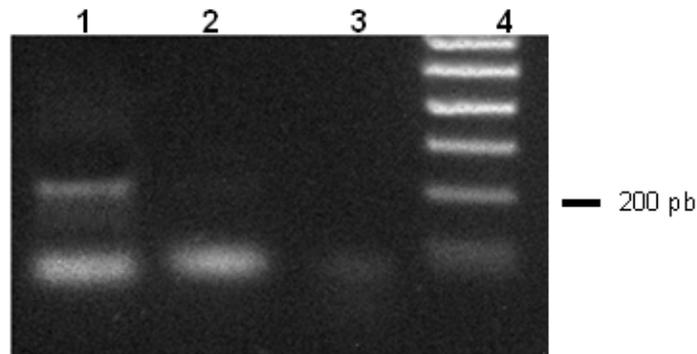
Carriles: 1 al 9: estadios embrionarios (1. blástulas; 2. dispersión; 3. reagregación; 4. 0 a 10 somites; 5. 10 a 20 somites; 6. 20 a 30 somites; 7. 3 semanas post-fecundación; 8. 1 mes post-fecundación; 9. pre-eclosión); 10. juvenil macho; 11. juvenil hembra; 12. testículo adulto; 13. ovario adulto; 14. control negativo de la reacción. 15. Marcador de pares de bases (Mass Ruler DNA ladder Fermentas)

Figura III.6 Electroforesis en un gel de agarosa al 2% de los productos amplificados de los ADNc de los estadios embrionarios y juveniles utilizando los oligonucleótidos DMTYh-DMTYi (Nanda y col. 2002).



Carriles: 1. Marcador de pares de bases (Mass Ruler DNA ladder Fermentas); 2 al 9: estadios embrionarios (2. 1 a 128 células; 3. blástulas tempranas; 4. dispersión; 5. reagregación; 6. 0 a 10 somites; 7. 10 a 20 somites; 8. 20 a 30 somites; 9. 3 semanas post-fecundación; 10. 1 mes post-fecundación; 11. pre-eclosión); 12. juvenil macho; 13. juvenil hembra; 14. pocillo vacío; 15. control negativo de la reacción.

Figura III.7 Electroforesis en un gel de agarosa al 2% de los productos amplificados de los ADNc de las gónadas adultas utilizando los oligonucleótidos DMTYh-DMTYi (Nanda y col. 2002).



Carriles: 1.testículo adulto; 2 ovario adulto; 3. control negativo de la reacción. 4. Marcador de pares de bases (MassRuler DNA ladder Fermentas)

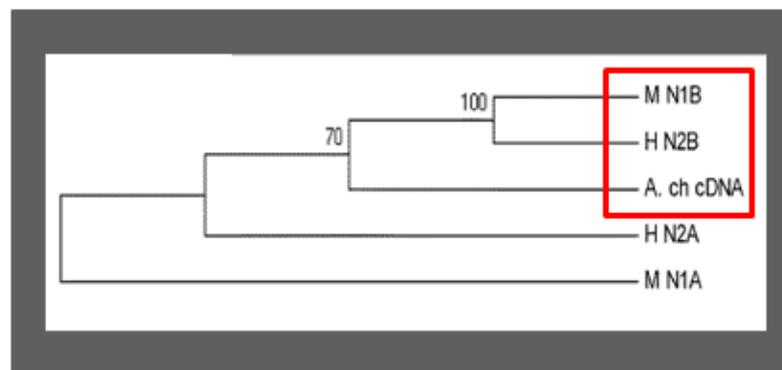
Figura III.8

```

5' GCCTGCAGCTTCCTCACCTCGCCCTCCAACCACAAGCCCTCCAGAGCTCTCTGGATCTTAAAA
ATAAAAAATAAATGTCACATTTTGTGTCATCTGTGTATGTTTCCATACTTGACAGACGAAATTTGTCTC
TGCATTTAACCCAACCACCACCAGGTGGTGCAGTGGGCAGCCGTGGTCAGCGGCCCGGGGAGCTC
AGCAGA 3'
    
```

Secuencia nucleotídica obtenida de *A. charrua* (en negro). En rojo se indica la secuencia correspondiente al cebador DMTYi y en azul DMTYh (antisentido).

Figura III.9



Árbol filogenético resultante utilizando el método de máxima parsimonia, búsqueda heurística, que evidencia las relaciones entre las secuencias obtenidas a nivel genómico y la secuencia expresada en los testículos de *A. charrua*. Se muestran los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas mayores al 50 %.

En base a las relaciones evolutivas evidenciadas entre las secuencias genómicas aisladas de *Austrolebias charrua* y la familia de genes *dmrt* (Fig.III.4) se realizó el análisis filogenético utilizando el algoritmo de “unión de vecinos” basado en el número de diferencias y distancia p incluyendo 24 secuencias nucleotídicas de ARNm de *dmrt1* y sus duplicados, seleccionadas del GenBank (Tabla III. 2) y la secuencia obtenida de *Austrolebias charrua*. Este análisis evidenció la existencia de 2 grupos principales con un soporte de 66% (Grupo 1 y 2) (Fig.III.10). A su vez, en el Grupo 1 de secuencias, es posible identificar 2 subgrupos con un soporte de 85%: 1) integrado por las secuencias correspondientes al ARNm de *dmrt1* autosómico de *Oryzias* (*O. latipes*, *O. luzonensis*, *O. curvinotus*, *O. mekognensis*, *O. marmoratus*, *O. celebensis*), *dmrt1bY* (la duplicación macho específica perteneciente a *Oryzias latipes* y *Oryzias curvinotus*) y las versiones de procesamiento alternativo descritas para éste en *Oryzias latipes*; 2) integrado por las secuencias correspondientes al ARNm de *dmrt1* de *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus maculatus*, *Monopterus albus*, *Odontesthes (bonariensis, hatcheri)* y *Kryptolebias marmoratus*. En el Grupo 2, con un soporte de 93% se agrupan dos versiones de procesamiento alternativo del gen *dmrt1* autosómico de *Oryzias latipes*, la secuencia obtenida en *Austrolebias charrua* y basalmente a éstas la secuencia perteneciente al ARNm de *dsx* de *Drosophila*.

El análisis de máxima parsimonia (búsqueda heurística) realizado, utilizando la misma matriz de datos, reveló una topología que demuestra una politomía basal no resuelta en la que es posible visualizar 2 clados (Clado 1 y Clado 2) (Fig. III.11): uno mayor y otro menor con un soporte de 68%. El clado mayor está, a su vez, subdividido en 4 sub-clados: 1) integrado por las secuencias correspondientes al ARNm de *dmrt1* autosómico de *Oryzias* (*O. latipes*, *O. luzonensis*, *O. curvinotus*, *O. mekognensis*, *O. marmoratus*, *O. celebensis*), *dmrt1bY* (duplicación macho específica) y las versiones de procesamiento alternativo descritas para éste en *Oryzias latipes* y *curvinotus* con un soporte de 98%; 2) integrado por las secuencias correspondientes al ARNm del gen *dmrt1* de *Odontesthes bonariensis* y *hatcheri* con un soporte de

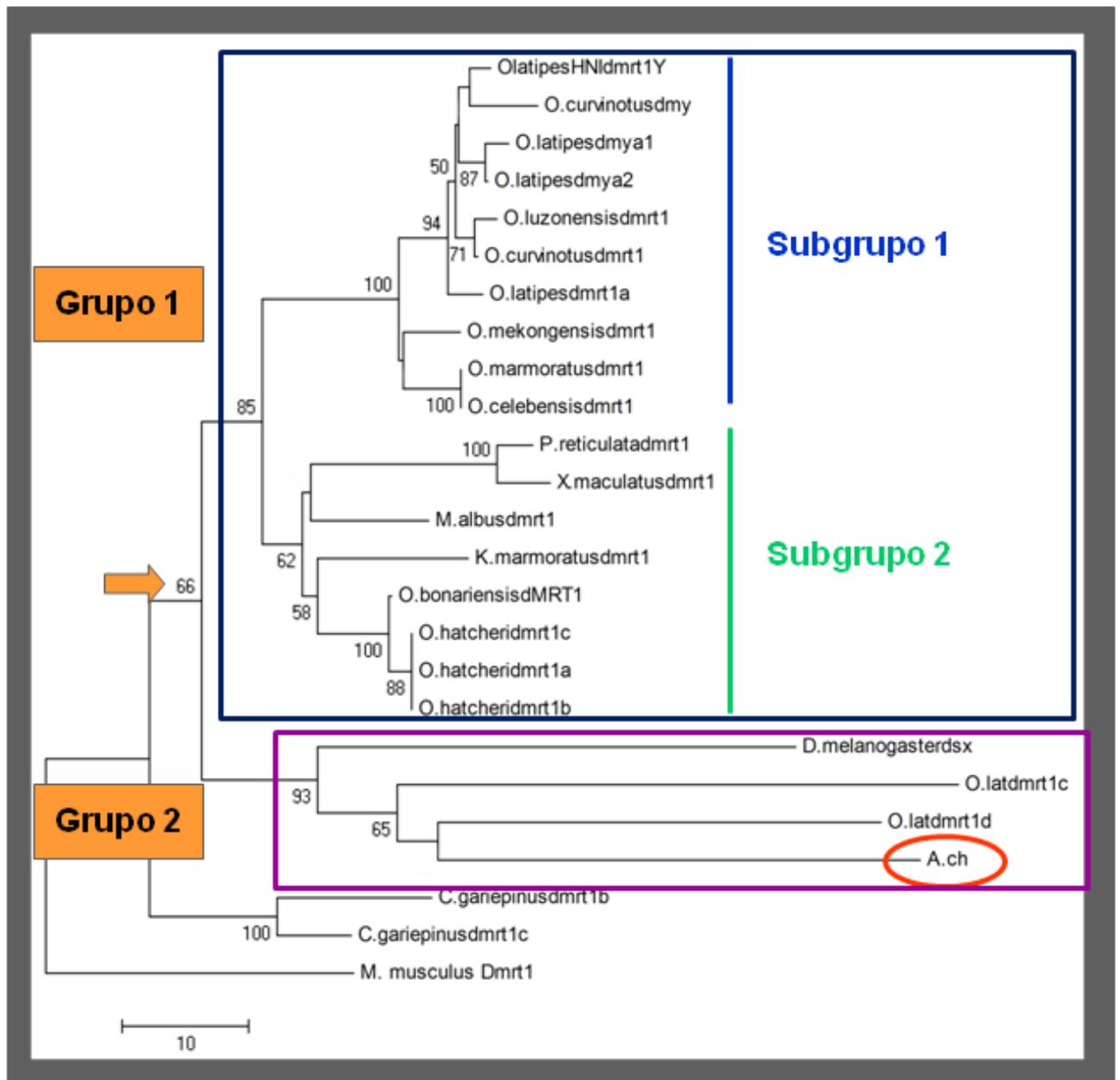
97%; 3) integrado por la secuencia del ARNm del gen *dsx* de *Drosophila*, dos versiones de procesamiento alternativo del gen *dmrt1* autosómico de *Oryzias latipes* y la secuencia obtenida en *Austrolebias charrua*, con un soporte de 84% y 4) integrado por la secuencia de ARNm del gen *dmrt1* de *Poecilia reticulata* y *Xiphophorus maculatus*, con un soporte de 99%. El clado menor, integrado por las versiones de procesamiento alternativo del gen *dmrt1* de *Clarias gariepinus*, no presenta soporte en el nodo basal. Este análisis ubica a la secuencia del ARNm del gen *dmrt1* de *Mus musculus* como la secuencia más divergente (sin soporte estadístico) de la matriz de datos.

Análisis estadísticos

El estudio de las tasas de sustitución nucleotídica entre las 25 secuencias analizadas (Tabla III.2) evidenció que existe mayor número de transiciones con respecto a transversiones en las tres posiciones de los codones ($R= 1.173$)

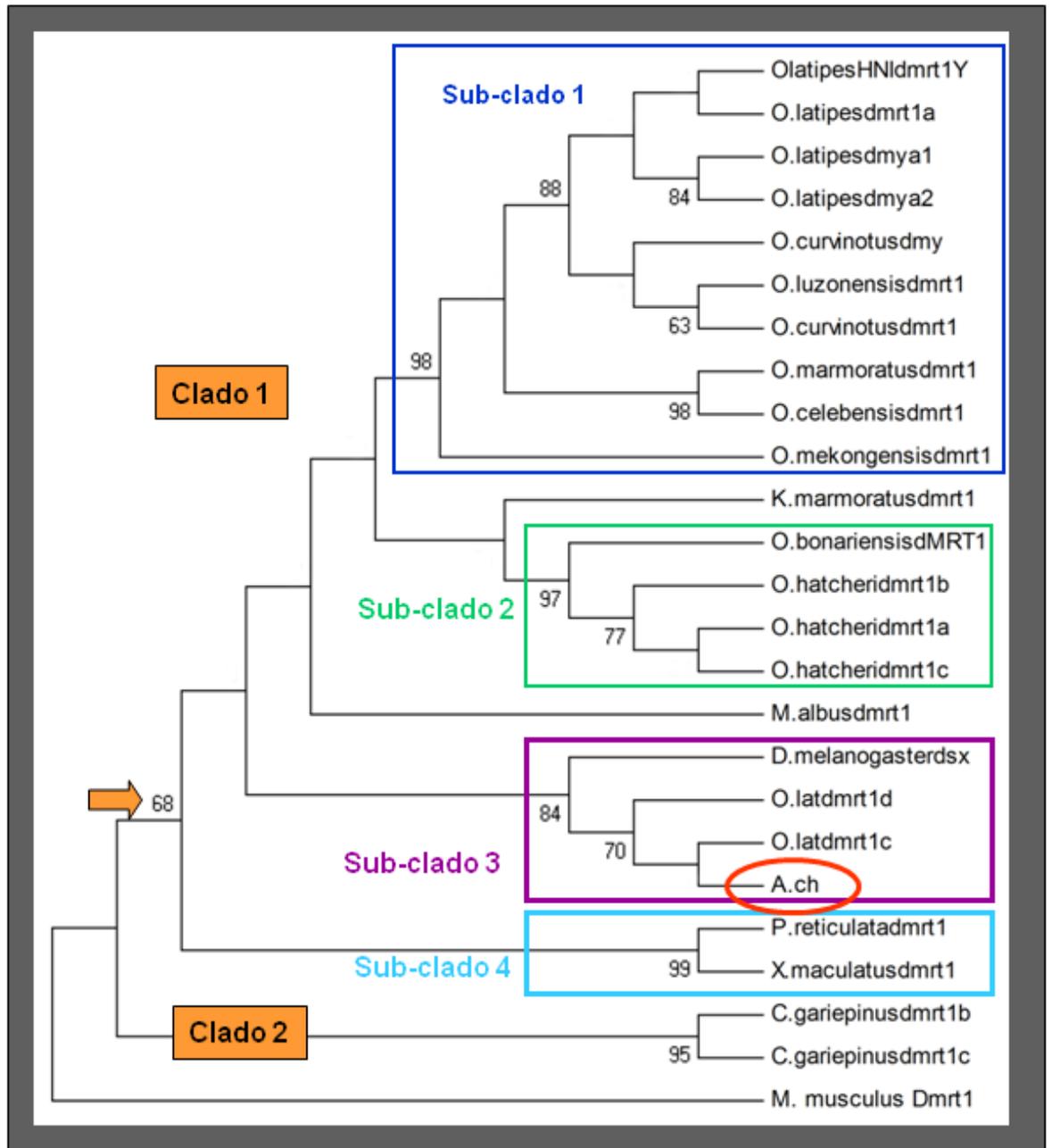
La aplicación de la prueba exacta de Fisher al mismo conjunto de secuencias evidenció, para la secuencia de 200 pares de bases de *Austrolebias charrua*, selección purificadora con respecto a 11 secuencias dentro de las que se encuentran *dmrt1b* y de *Oryzias latipes* y evolución neutra con respecto a 2 secuencias (Tabla III.5).

Figura III.10



Árbol filogenético resultante utilizando el algoritmo "unión de vecinos" que evidencia las relaciones entre las secuencias *dmt1* / *dmt1bY* y la secuencia obtenida en *A.charrua* comparadas. Se muestran los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas mayores al 50 %. En rojo se señala a la secuencia perteneciente a *A.charrua*. La escala de barra indica distancias.

Figura III.11



Árbol filogenético resultante utilizando el método de máxima parsimonia, búsqueda heurística, que evidencia las relaciones entre las secuencias *dmt1* / *dmt1bY* y la secuencia obtenida en *A.charrua* comparadas. Se muestran los valores de bootstrap basados en 1000 réplicas mayores al 50 %. En rojo se señala a la secuencia perteneciente a *A.charrua*.

Tabla III.5 Prueba exacta de Fisher de selección aplicada al conjunto de secuencias expresadas. (Hipótesis nula: selección neutral; hipótesis alternativa: selección positiva)

En rojo se señalan valores p no calculados. En verde los valores p para *A. charrua*.

Valores p menores a 0.05: selección positiva

Valores p iguales a 1: selección purificadora

Valores p entre 1 y 0.05: evolución neutral.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. O.lajpeiHIdmTY											
2. O.lajpedhya1	1.000										
3. O.lajpedhya2	0.711	1.000									
4. O.cuvvobudny	0.496	1.000	0.516								
5. K.mamoraakudm1	1.000	1.000	1.000	1.000							
6. O.lajpedm1a	0.570	1.000	1.000	0.516	1.000						
7. O.lajdm1c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000						
8. O.lajdm1d	1.000	1.000	1.000	0.541	1.000	1.000	0.219				
9. O.lazorenoidm1	1.000	1.000	1.000	0.366	1.000	1.000	1.000	1.000			
10. O.cuvvobudm1	0.570	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
11. O.mekongensidm1	0.476	1.000	1.000	0.557	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
12. O.mamoraakudm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13. O.celebensidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14. A.ch	1.000	1.000	1.000	0.587	1.000	1.000	1.000	0.572	1.000	1.000	1.000
15. O.bonaresidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	0.645	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16. O.hatchem1a	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17. O.hatchem1b	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18. O.hatchem1c	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
19. P.reiculaidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
20. X.masculaidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
21. C.gajepusidm1b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
22. C.gajepusidm1c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
23. D.melanogastidm1	1.000	1.000	1.000	0.289	0.495	0.306	n/a	0.359	0.242	1.000	1.000
24. M.abudm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
25. M.garruchaDm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	n/a	1.000	1.000	1.000	1.000
1. O.lajpeiHIdmTY											
2. O.lajpedhya1											
3. O.lajpedhya2											
4. O.cuvvobudny											
5. K.mamoraakudm1											
6. O.lajpedm1a											
7. O.lajdm1c											
8. O.lajdm1d											
9. O.lazorenoidm1											
10. O.cuvvobudm1											
11. O.mekongensidm1											
12. O.mamoraakudm1											
13. O.celebensidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14. A.ch	1.000	1.000	1.000	0.587	1.000	1.000	1.000	0.572	1.000	1.000	1.000
15. O.bonaresidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	0.645	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16. O.hatchem1a	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17. O.hatchem1b	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18. O.hatchem1c	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
19. P.reiculaidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
20. X.masculaidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
21. C.gajepusidm1b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
22. C.gajepusidm1c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
23. D.melanogastidm1	1.000	1.000	1.000	0.289	0.495	0.306	n/a	0.359	0.242	1.000	1.000
24. M.abudm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
25. M.garruchaDm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	n/a	1.000	1.000	1.000	1.000
1. O.lajpeiHIdmTY											
2. O.lajpedhya1											
3. O.lajpedhya2											
4. O.cuvvobudny											
5. K.mamoraakudm1											
6. O.lajpedm1a											
7. O.lajdm1c											
8. O.lajdm1d											
9. O.lazorenoidm1											
10. O.cuvvobudm1											
11. O.mekongensidm1											
12. O.mamoraakudm1											
13. O.celebensidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14. A.ch	1.000	1.000	1.000	0.587	1.000	1.000	1.000	0.572	1.000	1.000	1.000
15. O.bonaresidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	0.645	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16. O.hatchem1a	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17. O.hatchem1b	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18. O.hatchem1c	1.000	1.000	1.000	1.000	0.567	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
19. P.reiculaidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
20. X.masculaidm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
21. C.gajepusidm1b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
22. C.gajepusidm1c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
23. D.melanogastidm1	1.000	1.000	1.000	0.289	0.495	0.306	n/a	0.359	0.242	1.000	1.000
24. M.abudm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
25. M.garruchaDm1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	n/a	1.000	1.000	1.000	1.000

11.4 Discusión

Búsqueda de marcadores moleculares sexo-específicos a nivel genómico

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son similares a los descritos por Nanda y col. (2002) en *Oryzias latipes* (línea HNI) a nivel del genoma masculino. Utilizando el mismo abordaje estos autores han identificado 2 bandas: una de 1289 nucleótidos (*dmrt1*) y otra de 965 nucleótidos (*dmrt1bY*: versión duplicada macho específica). Los fragmentos de amplificación obtenidos a partir del genoma de los machos de *Austrolebias charrua* coinciden con éstos (M N1A de 1.000 pb y M N1B de 900 pb). La diferencia fundamental entre ambas especies radica en que este patrón no es exclusivo de los machos, verificándose también en el genoma de las hembras de *Austrolebias charrua* analizadas. Cabe señalar que las secuencias M N1B y H N2B presentan un 99% de similitud a nivel de secuencia demostrando que efectivamente la misma secuencia está presente en el genoma de ambos sexos.

Diversidad a nivel de las secuencias *dmrt1bY*

La comparación entre las secuencias *dmrt1bY* de *Oryzias latipes* (Nanda y col. 2002) y *Oryzias curvinotus* (Matsuda y col. 2003) luego de su alineación evidencia la existencia de diferencias a nivel nucleotídico entre ambas. Asimismo, se han detectado diferencias intraespecíficas a este mismo nivel, entre los *dmrt1bY* pertenecientes a diferentes líneas de *Oryzias latipes* (Nanda y col. 2002). Estudios genómicos en poblaciones naturales de esta especie demuestran la existencia de 3 grupos divergentes según los coeficientes de distancia genética calculados para 16 loci que codifican diferentes proteínas (Sakaizumi, 1986). En estas poblaciones naturales se ha confirmado la presencia del gen *dmrt1bY* presentando fragmentos de diferentes

tamaños según la población. En algunas el producto de amplificación contiene aproximadamente 1000 pb, en otras aproximadamente 800 pb y existen otras que contienen ambos fragmentos, de los cuales el más pequeño es el que finalmente se expresa durante el estadio de diferenciación sexual (Shinomiya y col. 2004). Por consiguiente, el bajo porcentaje de similitud entre las secuencias aisladas en *Austrolebias charrua* y *dmrt1bY* se explicaría por la alta variabilidad ya demostrada en la propia especie *Oryzias latipes* siendo un resultado esperable.

Los fragmentos obtenidos en *Austrolebias charrua* a nivel genómico indican que el patrón de bandas en esta especie se asemeja al observado en las poblaciones naturales de *Oryzias latipes* que contienen ambos fragmentos. A la semejanza en el patrón se suma la similitud en lo referente a tamaños ya que en ambas especies los segmentos se encuentran entre aproximadamente 1000 y 800 pares de bases.

Análisis estadísticos

Durante la evolución de las secuencias de ADN la tasa de sustituciones transicionales difiere de la tasa de sustituciones transversionales siendo las transiciones más frecuentes que las transversiones. Esta diferencia se conoce como sesgo transicional y la estimación del mismo es de interés dado que su conocimiento aporta datos sobre los patrones de evolución molecular. El sesgo transicional es variable en diferentes organismos e incluso en diferentes genes de un mismo organismo. Se han propuesto varios métodos para la estimación de la proporción de transiciones: transversiones de un grupo de secuencias. Los más apropiados son los métodos de máxima verosimilitud y Bayesianos ya que los métodos basados en distancia y parsimonia subestiman el valor real de esta proporción (Strandberg y Salter, 2004).

Se ha postulado que las secuencias no funcionales estarían libres de condicionamientos por selección mostrando tasas de sustitución equivalentes en las tres posiciones del codón, acumulación de codones de terminación y mutaciones que alteran el marco de lectura. Se ha sugerido que el sesgo transicional observado en metazoarios estaría causado por un sesgo

mutacional debido a propiedades intrínsecas del ADN. Otra alternativa sería que, en las regiones codificantes, el sesgo se explicaría por selección (Keller y col. 2007). Las transiciones y transversiones pueden cambiar la composición aminoacídica de la proteína correspondiente pero la diferencia bioquímica en el producto tiende a ser mayor en las transversiones (Zhang, 2000). Por este motivo, ocurriría selección purificadora en contra de las transversiones. La selección favorecería sistemas de reparación del ADN particularmente eficientes en impedir las transversiones que, a su turno, afectarían los patrones de sustitución observados de manera global en el genoma, incluso en regiones no codificantes. La intensidad de la selección purificadora es altamente variable entre los genes que codifican para proteínas. Por ejemplo, en un estudio realizado en 10 genes de *Plasmodium falciparum*, 6 de ellos exhiben un mayor número de transversiones que de transiciones mientras que en 3 de ellos las tasas son equivalentes (Escalante y col. 1998)

El valor (R) de la proporción transiciones : transversiones obtenido a partir del conjunto de secuencias analizadas en este trabajo (genómicas R = 1.227) indica que el patrón de sustitución nucleotídica observada involucra mayor cantidad de transiciones en relación a las transversiones en concordancia con lo reportado en la bibliografía, sugiriendo que se trata de un conjunto de secuencias que podrían ser codificantes.

Otro parámetro importante en el estudio de los mecanismos de evolución molecular surge de la comparación entre las tasas de sustitución sinónimas (silenciosas) y no sinónimas (alteran la composición aminoacídica) (Kimura, 1983). Las mutaciones sinónimas serían invisibles a la selección natural mientras que las no sinónimas podrían estar bajo una fuerte presión de selección. En este sentido, conocer las tasas de fijación de éstas provee una herramienta útil para entender el efecto de la selección natural en la evolución de las secuencias. La proporción de sustituciones no sinónimas y sinónimas por sitio (w) mide la presión selectiva a nivel proteico. Esta proporción se calcula como un promedio de todos los codones que conforman el gen. Un valor w mayor que 1 indica que la mutación no sinónima ofrece ventajas adaptativas a la proteína (selección positiva). En la mayoría de las proteínas se

ha demostrado que una alta proporción de aminoácidos permanece invariable debido a fuertes restricciones funcionales (Yang y col. 2000). Asimismo, se ha establecido claramente que los sitios no sinónimos en secuencias codificantes están sujetos a selección purificadora y que la selección positiva afecta una minoría de los genes (Li, 1997). De esta manera, la evolución proteica es el resultado del interjuego entre los procesos mutacionales y las fuerzas de selección actuando a nivel molecular. Se ha concluido entonces que los elementos funcionales del genoma (codificantes o no) muestran secuencias conservadas entre especies cercanas debido a la selección purificadora (Dermitzakis y col. 2002).

Durante la evolución, estos elementos génicos presumiblemente han alcanzado su funcionalidad óptima por la vía de la evolución adaptativa (selección positiva) y luego la mayoría de las mutaciones que modifican su función podrían haber sido descartadas mediante selección purificadora. En este sentido, genes con una baja tasa evolutiva deben ejercer funciones centrales de manera óptima de modo que la probabilidad de una mejor performance es muy baja a menos que la red de interacción a la que pertenece sea modificada. La selección purificadora es la principal fuerza evolutiva que actúa sobre este tipo de genes. En mamíferos al menos el 75% de las sustituciones no sinónimas son removidas por la selección purificadora (Mikkelsen y col. 2005; Eyre-Walker y col. 2006) al igual que en los peces *Tetraodon* y *Takifugu* (Montoya-Burgos, 2011). Por el contrario, genes que desarrollan funciones secundarias tienden a evolucionar a tasas más altas y una fracción de éstos podrían experimentar selección positiva. Apoyando este principio, se ha sugerido que la tasa evolutiva de los genes que codifican proteínas depende de la dispensabilidad (Hirsh y col. 2001) o del número de interacciones entre la proteína y sus pares (Fraser y col. 2004). Los genes de expresión constitutiva relacionados con el mantenimiento basal de las células cumplen funciones esenciales, lo que explicaría por qué evolucionan a tasas más lentas que los genes tejido específicos (Zhang y col. 2004). Existe un mayor número de genes que exhiben selección positiva en las fracciones de genes duplicados o parálogos con información redundante que en la fracción

de genes única copia (Han y col. 2009). La probabilidad de experimentar selección purificadora o positiva está altamente correlacionada con la función biológica que desempeña el producto del gen o su redundancia funcional.

Aunque los análisis de presiones selectivas actuando sobre el genoma completo han proporcionado información acerca de los principales patrones de evolución positiva todavía carecen del soporte estadístico adecuado para discriminar entre selección positiva y evolución neutral. En la mayoría de los estudios de la selección actuando en genes que codifican para proteínas la aproximación metodológica ha sido el uso del criterio Ka/Ks (relación entre el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo) en la secuencia codificante completa para inferir el patrón de selección. La estimación de la relación Ka/Ks para determinar la presión selectiva es un método conservador dado que la selección positiva actuaría sólo en un subconjunto de codones. Las regiones genómicas cuya evolución es neutra experimentan más sustituciones no sinónimas que las regiones genómicas sometidas a la selección purificadora. Por lo tanto, se ha sugerido que una proporción sustancial de regiones sujetas a selección positiva emergieron de una región genómica ancestral cuyo patrón de evolución era neutro (Montoya-Burgos, 2011).

El análisis pareado entre las secuencias genómicas aisladas de *Austrolebias charrua* y el conjunto de datos obtenidos del GenBank determinó que, en la mayoría de los casos, estaría actuando la selección purificadora sobre las secuencias de *Austrolebias charrua* el cual sería un argumento a favor de la hipótesis de que estos fragmentos aislados pertenecerían a genes activos, que se están transcribiendo.

Estudio de la expresión de genes candidatos sexo-específicos durante la ontogenia

Evaluación de la síntesis de ADNc

La decisión de usar la pareja de oligonucleótidos específicos que amplifican una región codificante del gen de la actina β del pez *Danio rerio* (número de acceso del GenBank AF057040, Barralo y col. 1999) demostró ser una aproximación experimental válida para evaluar si efectivamente se produjo la síntesis de ADNc a partir de una población de ARN total proveniente de embriones, juveniles y gónadas adultas y evaluar la calidad del mismo. La detección de la contaminación del ARN obtenido con trazas de ADN genómico es posible con el método usado ya que estos oligonucleótidos amplifican una región que contiene un intrón generando una banda de aproximadamente 700 pb. Dada la ausencia de una banda a ese nivel es posible concluir que las muestras no contenían contaminación con ADN genómico. El elevado nivel de homología observado entre la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo y la actina beta de peces pertenecientes a diferentes órdenes permite concluir que la misma corresponde al mensajero de esta proteína presente en *Austrolebias charrua*.

Identidad de la secuencia aislada utilizando los oligonucleótidos DMTYh-DMTYi

Como ya se ha mencionado anteriormente, las secuencias *dmrt1bY* presentan alta variabilidad, en especial, destacamos que se han evidenciado diferencias a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica entre los *dmrt1bY* identificados en distintas líneas de *Oryzias latipes* (Nanda y col. 2002). Por lo tanto, al existir diferencias incluso entre líneas pertenecientes a una misma especie, es esperable que la secuencia obtenida en *Austrolebias charrua* sea divergente, con un bajo porcentaje de similitud, ya que ésta pertenece a otro orden. Los resultados obtenidos confirmaron esta divergencia. Asimismo, se ha descrito que esta familia de secuencias presenta muy poca conservación entre

los diferentes taxa fuera del dominio DM (Volf, 2003), principalmente a nivel del extremo carboxilo terminal de la proteína (Lutfalla y col. 2003; Yoshimoto y col. 2008). En el fragmento obtenido en *Austrolebias charrua* no fue posible identificar ningún dominio conservado, hecho que podría explicarse por tres motivos:

- a) falta de información, ya que la secuencia parcial obtenida representaría aproximadamente un 11% del total con respecto a las secuencias de ARNm *dmrt1bY/dmrt1* completas publicadas en la base de datos del GenBank (largo promedio de 1.800 pb).
- b) ausencia del dominio DM al igual que sucede en la isoforma *dmrt1c* de los peces *Clarias gariepinus* y *Clarias batrachus* (Raghuveer y Senthilkumaran, 2009) así como en una isoforma de *dmrt1* gonadal de ratón (Lu y col. 2007).
- c) el fragmento amplificado representa una región exclusiva de *Austrolebias* como se ha descrito para el cocodrilo *Crocodylus palustris* cuyas isoformas *dmrt1a1*, *b1*, *d* y *e* presentan regiones específicas de esta especie, no reportadas en *Xenopus*, *Gallus* y *Homo sapiens* (Anand y col. 2008)

Con respecto a la similitud reportada entre la secuencia de *Austrolebias charrua* y la cadena pesada miosina de *Oryzias latipes*, Veith y col. (2003) mencionan una similitud del 68% en secuencia aminoacídica ($E=0.043$) entre *dmrt1* de *Xiphophorus maculatus* y una proteína similar a la cadena pesada de miosina de *Takifugu rubripes* argumentando que los genes *dmrt1* y cadena pesada de la miosina son muy cercanos (Brunner y col. 2001)

En relación a la existencia de codones de terminación en la traducción de este fragmento, las interpretaciones que planteamos son:

- 1) que se deba a que el mismo está incompleto.
- 2) a la existencia de mutaciones a nivel del ARNm que generan codones de terminación prematuros impidiendo que el fragmento efectivamente se traduzca a proteína.

En apoyo a la primera propuesta recordamos que las secuencias codificantes no contienen codones de terminación pero éstos pueden aparecer fuera del marco de lectura. Este tipo de codones de terminación se conocen como codones ocultos de terminación. La hipótesis de ‘ambush’ (Seligmann y Pollock, 2004) en relación a los codones ocultos de terminación y su aparición en un marco de lectura incorrecto sugiere que los mismos impiden una lectura errónea del gen induciendo la terminación de la traducción. Esta hipótesis implica además que este tipo de codones pueden ser seleccionados y que esta selección, a su vez, se refleja en las secuencias génicas. Datos provenientes de análisis a nivel genómico y mitocondrial revelaron la existencia de este evento adaptativo de selección de codones cuyo mayor impacto se ha observado en bacterias y virus, lo que sugiere que habría sido utilizado desde etapas tempranas de la evolución (Singh y Pardasani, 2009).

Análisis filogenéticos

La topología obtenida a partir del análisis mediante el método de distancia (algoritmo “unión de vecinos” basado en el número de diferencias y distancia p) al igual que el método de máxima parsimonia (búsqueda heurística) indican que la secuencia expresada presenta mayor similitud con los fragmentos de menor tamaño identificados en ambos genomas. Este hecho indica que, a este nivel, *Austrolebias charrua* también se asemeja a las poblaciones naturales de *Oryzias latipes* que presentan los dos fragmentos, de los cuales el más pequeño es el que evidencia expresión (Shinomiya y col. 2004).

Según Volff y col. (2003), en vertebrados, las relaciones filogenéticas entre los genes que contienen dominios DM no son obvias ya que, como se ha mencionado anteriormente, existe muy poca conservación de secuencias entre los diferentes taxa fuera del dominio DM. Aún dentro de la misma especie, existe relativamente poca similitud fuera de este dominio entre las distintas proteínas que integran esta familia. Asimismo, en nematodos, también ha sido reportado un muy alto nivel de diversidad aún dentro del dominio DM. Este

hecho tal vez permita explicar la imposibilidad de generar un árbol filogenético utilizando una matriz de datos que incluya todas las secuencias de ARNm de los distintos componentes de la familia *dmrt* del grupo peces disponibles en la base de datos del GenBank.

Debido a la alta diversidad existente, y de acuerdo a las relaciones filogenéticas encontradas a nivel genómico (Fig.III.4), se trabajó con matrices de datos por separado. Se comparó la secuencia expresada en *Austrolebias charrua* con: 1) el grupo de secuencias *dmrt1/dmrt1bY*, 2) el grupo de secuencias *dmrt2*, 3) el grupo de secuencias *dmrt3*, 4) el grupo de secuencias *dmrt4* y 5) el grupo de secuencias *dmrt5*. En concordancia con los análisis filogenéticos a nivel genómico, la única matriz de datos que permitió generar un árbol cuyas relaciones evolutivas presentaron soportes estadísticamente robustos fue la secuencia expresada de *Austrolebias charrua* y el conjunto de secuencias *dmrt1/dmrt1bY*. Este resultado sugiere que el fragmento aislado en *Austrolebias charrua* integraría la familia *dmrt1*. Es importante destacar que ambas aproximaciones filogenéticas (métodos de distancia y máxima parsimonia) son concordantes. La secuencia perteneciente a *Austrolebias charrua* se agrupa con las versiones de procesamiento alternativo (c y d) del gen *dmrt1* autosómico de *Oryzias latipes* (Orden Beloniformes) y no con las pertenecientes a especies más cercanas (*Kryptolebias marmoratus*, *Xiphophorus maculatus* y *Poecilia reticulata*) incluidas en el mismo Orden que *Austrolebias charrua*.

Las principales causas que pueden explicar discordancias en las relaciones filogenéticas entre los taxa son: 1) mantenimiento de polimorfismos ancestrales y 2) homoplasia. Ésta última se refiere a la adquisición de similitud, en cierto carácter, generada por reversión a la condición ancestral o por evolución independiente. La evolución independiente, a su vez, puede deberse al proceso de convergencia (similitud de estado de cierto carácter resultante de modificaciones en diferentes mecanismos genéticos del desarrollo) o paralelismo (similitud de estado de cierto carácter resultante de modificaciones análogas en mecanismos genéticos de desarrollo equivalentes que evolucionaron independientemente). En general, la evolución de caracteres

homoplásicos resulta de adaptaciones, de diferentes linajes, en respuesta a presiones de selección ambientales similares (Futuyma, 2005; Wake y col. 2011).

Las relaciones filogenéticas en el grupo peces son controversiales como ya se ha mencionado en la Introducción de esta tesis. En este sentido, particularmente en la Serie Atherinomorpha (órdenes Atheriniformes, Beloniformes y Cyprinodontiformes *sensu* Nelson, 2006), varios estudios basados en datos morfológicos (Parenti, 2005) y moleculares (utilizando secuencias del genoma mitocondrial completo) (Setiamarga y col. 2008) han sugerido que la Serie Atherinomorpha es monofilética. Asimismo, dentro de Atherinomorpha, los Beloniformes son considerados grupo hermano de los Cyprinodontiformes y los Atheriniformes representarían el grupo basal (Nelson, 2006; Setiamarga y col. 2008). Este escenario sugiere que los mecanismos operantes más probables para explicar la discordancia encontrada podrían ser el mantenimiento de polimorfismos ancestrales o bien la reversión hacia la condición ancestral debido a que, en la topología obtenida mediante los análisis filogenéticos realizados (Fig. III.10 y 11), se agrupa a las secuencias de *Austrolebias charrua* y las versiones de procesamiento alternativo *dmrt1 c y d* de *Oryzias latipes* junto con *dsx* de *Drosophila* y a su vez, este grupo o clado se lo relaciona de manera basal a las secuencias *dmrt1* de *Odontesthes* (Atheriniformes) Orden que, según Setiamarga col. (2008), se relaciona de manera basal con Cyprinodontiformes y Beloniformes (Fig. 1, Sección Introducción general).

Esta falta de correspondencia entre la agrupación de secuencias *dmrt1* de los peces acantopterigios y la sistemática basada en caracteres morfológicos (Nelson, 1994) también se evidenció en el caso del gen *pjdmrt1* perteneciente al pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Orden Atheriniformes). El gen *pjdmrt1* evidencia mayor similitud con el gen *dmrt1* de *Oreochromis niloticus* (Orden Perciformes) que con las secuencias *dmrt1* del grupo Smegmamorpha que nuclea a los órdenes Atheriniformes, Beloniformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes, Mugiliformes, Gasterosteiformes y la familia Elasmobranchiidae (Fernandino y col. 2006).

Es interesante mencionar que aunque las relaciones de homología de los miembros de la familia génica *dmrt* en los metazoarios no se ha establecido claramente, para vertebrados se ha demostrado que el prototipo de la familia génica, *dmrt1*, es el miembro más cercanamente relacionado en estructura y función con los genes *dsx* de *Drosophila* y *mab-3* de *Caenorhabditis elegans* (Herpin y Schartl, 2011). En concordancia con este hecho, los análisis filogenéticos realizados en la presente Tesis relacionan a *dsx* de *Drosophila* junto con las versiones de procesamiento alternativo (c y d) del gen *dmrt1* de *Oryzias latipes* y la secuencia de *Austrolebias charrua* con altos valores de soporte estadístico.

Análisis estadísticos

El valor (R) de la proporción transiciones : transversiones obtenido a partir del conjunto de secuencias analizadas en este trabajo (ARNm R = 1.173) indica que el patrón de sustitución nucleotídica observada involucra mayor cantidad de transiciones en relación a las transversiones en concordancia con lo reportado en la bibliografía para secuencias codificantes. Asimismo, el análisis pareado entre la secuencia que se expresa en *Austrolebias charrua* y el conjunto de datos obtenidos del GenBank determinó que, en la mayoría de los casos, estaría actuando la selección purificadora en el fragmento de *Austrolebias charrua* incluso en relación a la secuencia *dmrt1bY* de *Oryzias latipes* y sus isoformas a1 y a2. Este hecho argumenta a favor de la hipótesis de que el fragmento que se expresa en *Austrolebias charrua* es parte de un gen que ejerce una función esencial durante la ontogenia de este pez.

Patrón de expresión

A) Desarrollo embrionario

El desarrollo temprano de varios organismos está caracterizado por divisiones celulares rápidas y sincrónicas producto de un ciclo celular bifásico, independiente del genoma cigótico, que consiste en rondas sucesivas de fase

M y síntesis de ADN (fase S). Como resultado, aumenta el número total de células pero su tamaño disminuye debido a la ausencia de las fases de crecimiento celular G1 y G2. Una vez agotados los componentes citoplásmicos que permiten el progreso de este ciclo celular bifásico, el núcleo comienza a sintetizarlos *de novo*. Esta etapa se define como la transición de la blástula media en la cual, además de la incorporación de las fases de crecimiento celular, se pierde la sincronidad en las divisiones celulares, se activa el genoma cigótico y las células adquieren movilidad, especialmente evidenciable en el proceso de gastrulación (Gilbert, 2010).

Los análisis de expresión al inicio del desarrollo de *Austrolebias charrua* mostraron la presencia del fragmento de 200 nucleótidos a partir del estadio de dispersión (blástula tardía) y su ausencia en los estadios previos de 2 a 128 células y blástulas tempranas. Este patrón sugiere que la expresión de esta secuencia no corresponde a genes maternos sino que la misma comenzaría una vez transcurrida la transición de la blástula media (activación del genoma cigótico). En los peces anuales no se ha definido aún en qué momento del desarrollo ocurre este proceso. Sin embargo, basándonos en la descripción del mismo en un Cyprinodontiforme no anual *Fundulus heteroclitus* (Trinkaus, 1992) que la establece al final de la segmentación (comienzo de la epibolia) es posible inferir que en *Austrolebias charrua* la misma sucede en el comienzo del estadio de dispersión (las blastómeras comienzan a migrar activamente desde el polo animal hacia el polo vegetal del embrión) momento en que se inicia la epibolia en peces anuales.

Debe considerarse también la posibilidad de que las muestras de los estadios en que no aparece expresión hubieran estado compuestas por el 100 % de hembras. La probabilidad de que esto haya ocurrido es de 0,004% en el estadio de 2 a 128 células y 0,008% en el estadio de blástulas tempranas. Se trata de un tipo de probabilidad compuesta (probabilidad de ocurrencia simultánea de dos o más eventos independientes) que se calcula como el producto de las probabilidades de cada evento independiente (Canavos, 1992). Por lo tanto, consideramos que la ausencia de banda en estos estadios

del desarrollo sumado a la baja probabilidad de que las muestras hubieran contenido solo hembras apoya la hipótesis de que esta secuencia comienza a expresarse una vez activado el genoma del cigoto.

El gen *dmrt1bY* de *Oryzias latipes* comienza a expresarse durante el estadio de néurula (1 día post fecundación) persistiendo en los adultos mientras que *dmrt1a* comienza su expresión más tardíamente (aproximadamente en el día 20 post-eclosión durante la diferenciación testicular) (Iwamatsu, 1994; Nanda y col. 2002; Kobayashi y col. 2004). En *Austrolebias charrua* se constató expresión de la secuencia aislada en un estadio del desarrollo embrionario aún más temprano (blástula tardía). Este hecho contrasta con los datos relevados en diferentes especies de vertebrados en los que la expresión del gen *dmrt1* se evidencia más tardíamente en la ontogenia, concretamente cuando ya es posible observar un primordio gónadal aún no diferenciado o en diferenciación temprana (ratón, Raymond y col. 1999; tortugas, Kettlewell y col. 2000; pollo, Smith y col. 2003)

Particularmente en todas las especies de peces en las que se analiza el momento de inicio de la expresión del gen *dmrt1*, se ha reportado que la misma ocurre en estadios post-eclosión previo al inicio de la diferenciación gónadal excepto en *Danio rerio* (Tabla III.6). En este grupo la expresión del gen *dmrt1* se detectó a partir del primer día post fecundación (Schulz y col. 2007). Cabe mencionar que, si bien el comienzo de la expresión de este gen se verifica antes de la eclosión, el desarrollo embrionario de esta especie se completa en 48 horas post fecundación por lo que al momento del inicio de la expresión el embrión se encuentra en plena morfogénesis presentando 30 somites, comienzo de la pigmentación a nivel de la retina y de la piel y tiene vesículas óticas (Kimmel y col. 1995)

Por lo tanto, el hallazgo de expresión en un estadio muy temprano del desarrollo apoyaría la hipótesis de que esta secuencia posiblemente ejerza una función esencial en la cascada de determinación sexual en *Austrolebias charrua* ubicándose al inicio de la misma.

Tabla III.6Expresión del gen *dmrt1* durante la ontogenia.

Especie	Expresión <i>dmrt1</i>
<i>Clarias gariepinus</i>	40 días post eclosión Diferenciación gonadal: Ovario 45 días post eclosión testículo 52 días post eclosión. (Raghuveer y col. 2011)
<i>Oreochromis niloticus</i>	5 días post eclosión Diferenciación gonadal Ovario y testículo: 23- 26 días post eclosión (Ijiri y col. 2008).
<i>Sparus auratus</i>	Asociado a la diferenciación del tejido testicular Diferenciación gonadal : hermafrodita protándrico (Liarde y col. 2007)
<i>Gobiocypris rarus</i>	1 día post eclosión (Zhang y col. 2008)
<i>Oryzias latipes</i>	<i>dmrt1bY</i> : néurula (24 horas post-fecundación) (Iwamatsu, 1994; Nanda y col. 2002) <i>dmrt1a</i> : 20-30 días post eclosión. Diferenciación gonadal: Ovario: día 8 post fecundación (día previo la eclosión) (Kobayashi y col. 2004) Testículo: día 40 post eclosión (Sato y Egami, 1972)
	Asociado al tejido testicular

<i>Epinephelus coloides</i>	Diferenciación gonadal: hermafrodita protogínico (Xia y col. 2007)
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Asociado al tejido testicular Diferenciación gonadal: hermafrodita protándrico (He y col. 2003)
<i>Monopterus albus</i>	<i>dmrt1 a y b</i> : Asociado al tejido testicular Diferenciación gonadal: hermafrodita protogínico (Huang y col. 2005)
<i>Odontesthes bonariensis</i>	4 semanas post eclosión (Fernandino y col. 2008) Diferenciación gonadal: Ovario: 49 días post eclosión Testículo: 100 días post eclosión (Strüssman y col. 1996)
<i>Takifugu rubripes</i>	70 días post eclosión Diferenciación gonadal: Ovario 42 días post eclosión Testículo 178 días post eclosión (Yamaguchi y col. 2006)
<i>Squalius alburnoides</i>	2 días post eclosión Diferenciación gonadal: 6 días post eclosión (Pala y col. 2009).
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	4 días post eclosión, Diferenciación gónadal: Ovario: 60 días post eclosión Testículo: 80 días post eclosión (Marchand y col. 2000, Ninness y col. 2006).
<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Coincidente con la diferenciación testicular (Kanamori y col. 2006) Diferenciación gónadal: similar a un hermafrodita protogínico (desarrollo de gónadas femeninas y luego adquisición de

	tejido gonadal masculino) pero sin pérdida de la función femenina (Cole y col.1997)
<i>Halichoeres tenuispinis</i>	Asociado al tejido testicular Diferenciación gonadal: hermafrodita protogínico (Jeong y col. 2009)
<i>Danio rerio</i>	1 día post fecundación (pre-eclosión) (Schulz y col. 2007) Diferenciación gonadal: Ovario 19 días post eclosión Testículo 40 días post eclosión (Maack y col. 2003)

B) Juveniles y adultos

Hasta el presente, se han reportado dos posibles patrones de expresión del gen *dmt1* en las gónadas adultas de los peces estudiados (revisado por Herpin y Schartl, 2011): expresión exclusivamente a nivel testicular y expresión en ambas gónadas. En estos últimos, generalmente se evidencia mayor nivel de expresión del gen en testículos que en ovarios (Tabla III.7).

El patrón de expresión observado únicamente en juveniles machos y testículos adultos posiciona a *Austrolabias charrua* como integrante del grupo de peces que sólo presentan expresión a nivel de las gónadas masculinas.

Tabla III.7

Patrón de expresión del gen *dmrt1* en gónadas adultas.

Expresión testicular	Expresión en ambas gónadas
<i>Clarias gariepinus</i> (Raghuveer y Senthilkumaran, 2009)	<i>Acipenser fluvescens</i> (Hale y col. 2010)
<i>Oreochromis niloticus</i> (Kobayashi y col. 2008)	<i>Danio rerio</i> (Guo y col. 2005)
<i>Gobiocypris rarus</i> (Zhang y col. 2008)	<i>Gadus morhua</i> (Johnsen y col. 2010)
<i>Oryzias latipes</i> (Kobayashi y col. 2004)	<i>Monopterus albus</i> (Huang y col. 2005)
<i>Paralychthys olivaceus</i> (Jo y col. 2007)	<i>Odontesthes bonariensis</i> (Fernandino y col. 2008)
<i>Kryptolebias marmoratus</i> (Kanamori y col. 2006)	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i> (Amberg y col. 2009)
<i>Epinephelus coloides</i> (Xia y col. 2007)	<i>Silurus meridionalis</i> (Liu y col. 2010)
<i>Halichoeres tenuispinis</i> (Jeong y col. 2009)	<i>Takifugu rubripes</i> (Yamaguchi y col. 2006)
<i>Sparus auratus</i> (Liarte y col. 2007)	<i>Squalius alburnoides</i> (Pala y col. 2009)
<i>Xiphophorus maculatus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

(Veitth y col. 2006)	(Marchand y col. 2000)
	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>
	(He y col. 2003)

En suma, el conjunto de estos resultados indican que, si bien el fragmento aislado en *Austrolebias charrua* claramente pertenece a la familia *dmrt1*, la información que contiene el mismo en las 205 pb no permite determinar si esta secuencia corresponde a parte del ARNm, a una versión de procesamiento alternativo de éste o a una clase de ARNs no codificantes denominados “long non-coding RNAs (lncRNAs)”. Esta clase de ARNs son abundantes, se caracterizan por presentar estructuras típicas de ARNm y contienen entre 100 y 1.000 nucleótidos. Se ha documentado que determinadas isoformas de procesamiento alternativo de ARNs transcritos de varios genes se traducen en la proteína funcional mientras que otras isoformas específicas de este tipo de procesamiento actúan como ARNs regulatorios que presentan, a su vez, especificidad tisular y un patrón de expresión dinámico durante el desarrollo (Amaral y col. 2008, 2010). Este patrón de expresión concuerda con el observado durante la ontogenia de *Austrolebias charrua*.

III. 5 Conclusiones

Los análisis realizados en el presente trabajo mediante reconstrucciones filogenéticas relacionan a las secuencias genómicas obtenidas en *Austrolebias charrua* con el grupo de genes *dmrt1*. A nivel de expresión, el fragmento aislado se agrupa junto con dos versiones de procesamiento alternativo del gen *dmrt1* de *Oryzias latipes* y *dsx* de *Drosophila*. Asimismo, el patrón de expresión sexo-específico observado (restringido a nivel testicular) argumenta a favor de que esta secuencia pertenezca al grupo de genes *dmrt1* ya que este miembro de la familia *dmrt* es el componente más conservado “río abajo” implicado en el desarrollo sexual masculino de los vertebrados en la evolución. Sin embargo, no es posible afirmar con estos datos si la secuencia obtenida es un fragmento del ARNm de este gen, una versión de procesamiento alternativo del mismo o un ARN no codificante involucrado en su regulación.

El hallazgo de expresión en un estadio muy temprano del desarrollo embrionario sumado al hecho de que el patrón de evolución molecular encontrado se corresponde con el de selección purificadora apoyaría la hipótesis de que esta secuencia posiblemente ejerza una función esencial en la cascada de determinación sexual masculina durante la ontogenia de *Austrolebias charrua* ubicándose posiblemente muy próximo al inicio de la misma.

III.6 Perspectivas

Con el fin de dilucidar la identidad del fragmento que presenta el patrón de expresión sexo-específico observado, en primera instancia, es esencial obtener mayor información de este gen a nivel de secuencia. Para ello se propone la realización de la técnica RACE (rapid amplification of cDNA ends) con el fin de extender la secuencia hacia los extremos 5' y 3'.

A su vez se plantea la necesidad de generar anticuerpos para evaluar si efectivamente el ARN aislado se traduce a proteína y definir el patrón espacio-temporal de expresión de la misma mediante inmunodetección durante la ontogenia de *Austrolebias charrua*.

Se propone además continuar con la puesta a punto de las condiciones de PCR óptimas utilizando oligonucleótidos degenerados especialmente diseñados para aislar *dmrt1* en esta especie de pez anual.

III. 7 Anexo

Soluciones

STE 1X

10mM Tris-Cl

100mM NaCl

1mM EDTA pH 8.0

Solución tampón de lisis

50mM Tris-HCl

50mM EDTA

1%SDS

100mM NaCl pH 8

TE 1X

Tris-Cl 10mM pH 8.0

EDTA 1mM

Solución de Yamamoto pH 7.3

NaCl 7,5 g

KCl 0,2 g

CaCl₂·2H₂O 0,3 g

Agua MiliQ enrasar a 1000 ml

Almacenar a 4°C

Solución tampón Tris-Acetato EDTA (TAE) stock 50x

Tris-base 242 g

Ácido acético glacial 57,1 ml

E.D.T.A. 0.5M, pH 8 100 ml

Hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH 8

NaOH 10M	40µl
SDS 10%	200µl
Agua MiliQ	1,760 ml

Solución III

Acetato de Potasio 5M	6 ml
Ácido Acético Glacial	1,15 ml
Agua MiliQ	2,85 ml
Almacenar a	4°C

Tratamiento ADNasa: solución tampón 10X

200mM Tris-HCl pH8,4

20mM MgCl₂

500mM KCl

Contribución al conocimiento de la biología de los peces anuales

En la presente tesis y a fin de explorar los mecanismos de determinación y diferenciación sexual en el pez anual *Austrolebias charrua*, definimos una serie de abordajes cuyas conclusiones y aportes se resumen a continuación.

En el **Capítulo I** de este trabajo, como objetivo primario y habilitador de los siguientes, reconstruimos el patrón de diferenciación gonadal a escala morfológica y temporal y la estrategia sexual de *Austrolebias charrua*. Inicialmente identificamos a la población de células germinales primordiales presuntivas mediante inmunodetección *in toto* y ensayos de expresión *in vivo* obteniendo resultados que permiten sugerir que el mecanismo de especificación de este linaje celular sería el de preformación. Asimismo, mediante histología, caracterizamos la diferenciación gonadal durante la ontogenia de esta especie estableciendo que la misma comienza antes de la eclosión y que la estrategia de diferenciación sexual corresponde al patrón “gonocórico diferenciado”. A su vez, identificamos el patrón de desove que presentan los adultos (tipo asincrónico) y la organización de la gónada masculina corresponde al patrón testicular restringido.

En el **Capítulo II** estudiamos la posible incidencia de la temperatura como factor determinante del sexo en *Austrolebias charrua*. La generación de una familia de hermanos totales provocó una gran disminución en la viabilidad de los embriones provenientes de la filial 3 sugiriendo una baja tolerancia a la endogamia en esta población de peces. Si bien este hecho no resultó de utilidad para concretar el objetivo original planteado, el conocimiento de la tolerancia a la endogamia es uno de los factores más importantes de

evaluación genética de una especie (Falconer, 1989) siendo información relevante para la implementación de programas de conservación (Nakadate y col. 2003). Alternativamente se trabajó con embriones, provenientes de diferentes parejas salvajes, sometidos a un régimen de dos temperaturas de cultivo para posteriormente analizar la existencia o no de un desbalance en la proporción sexual. Los resultados obtenidos en relación a los ensayos de temperatura evidencian una ausencia de termosensibilidad en la determinación sexual en la población analizada. Este hecho coincide con nuestra hipótesis de trabajo en la cual planteábamos que las especies del género *Austrolebias*, al encontrarse sometidas a un ambiente extremadamente variable en el que los juveniles presentan un rápido crecimiento y maduración sexual, el mecanismo de determinación del sexo debía implicar un fuerte componente genético, independiente de claves ambientales altamente variables. Asimismo, en apoyo a esta hipótesis se suman datos sobre cruzamientos interespecíficos que sugieren que las hembras de *Austrolebias charrua* serían el sexo heterogamético (Rovira, 2008; Oviedo, 2009).

El conocimiento generado mediante esta aproximación permitió definir la estrategia experimental desarrollada en el siguiente Capítulo de este trabajo relativo a la búsqueda de expresión de un gen candidato sexo-específico.

En el **Capítulo III** planteábamos la existencia de al menos un gen relacionado con la determinación sexual masculina en este grupo de peces. Aplicamos la estrategia de búsqueda del “gen candidato” como primera aproximación experimental a esta temática utilizando como herramientas oligonucleótidos específicos, PCR, RT-PCR, clonado, secuenciación y reconstrucciones filogenéticas. Los resultados obtenidos relacionan a las secuencias aisladas de *Austrolebias charrua* con el grupo de genes *dmrt1*, componente más conservado “río abajo” implicado en el desarrollo sexual masculino de los vertebrados en la evolución. La detección de expresión de este fragmento en estadios embrionarios muy tempranos sumado al patrón de evolución molecular evidenciado argumenta a favor de que esta secuencia ejerce una función relevante en la cascada de determinación del sexo

masculino en esta especie, ubicándose posiblemente muy próxima al inicio de la misma. Este hecho también es coincidente con nuestra hipótesis de trabajo en la cual postulábamos la existencia de genes candidatos sexo-específicos presentando patrones de expresión con dimorfismo sexual que comenzarían a expresarse durante el desarrollo embrionario de este pez anual.

En suma, el presente trabajo de tesis contribuyó a ampliar el conocimiento de la biología de los peces anuales en relación a su estrategia reproductiva e incluyó el diseño y puesta a punto de diferentes técnicas que han sido utilizadas de manera exitosa en este grupo de vertebrados.

Los conocimientos originales generados en este marco permitieron la publicación de un artículo que recapitula los resultados y conclusiones obtenidos en el Capítulo I relativos al patrón de diferenciación sexual de *Austrolebias charrua* (Arezo y col. 2007) y el aporte de datos relevantes para otros dos artículos y una revisión en los que participo en carácter de co-autora (García y col. 2009; Berois y col. 2011; Berois y col. 2012). Asimismo, los resultados obtenidos en los Capítulos I, II y III que aún permanecen en el terreno de la hipótesis plantean nuevas preguntas que serán retomadas aplicando los abordajes especificados en la sección Perspectivas de cada Capítulo en particular con el fin de profundizar en el conocimiento de esta temática en los peces anuales habitantes de nuestro país.

Referencias bibliográficas

Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. 2004. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International, 11. 36-42.

Altschul, S.F., Gish W., Miller, W., Myers, EW., Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. 215. 403-410.

Alves, D., Specker, J.P., Bengtson, D.A. 1999. Investigations into the causes of early larval mortality in cultured summer flounder *Paralichthys dentatus* L. Aquaculture 176. 155–172.

Amaral, P.P., Mattick, J.S. 2008. Noncoding RNA in development. Mamm Genome. 19.454–492.

Amaral, P.P., Michael, B.C., Dennis, K.G., Marcel, E.D., John, S.M. 2010. IncRNAdb: a reference database for long noncoding RNAs. Nucleic Acids Res. 39.D146–D151.

Amato, L.H., 1986. Seis especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876 de Uruguay y Paraguay (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Com.Zool.Mus. Montevideo 1. 1-27.

Amberg, J.J., Goforth, R., Stefanavage, T., Sepulveda, M.S. 2009. Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*). Fish Physiol Biochem 36. 923–932.

Anand, A., Patel, M., Lalremruata, A., Singh, A.P., Agrawal, R., Singh, L., Aggarwal, R. 2008. Multiple alternative splicing of *Dmrt1* during gonadogenesis in Indian mugger, a species exhibiting temperature-dependent sex determination. Gene. 425. 56–63.

Arezo, M.J., Pereiro, L., Berois, N. 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias varius* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). J Fish Biol. 66. 1357-1370. DOI: 10.1111/j.0022-1112.2005.00688.X.

Arezo, M.J., D'Alessandro, S., Papa, N., de Sà, R., Berois, N. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Tissue Cell. 39. 89-98.

Ausubel, F.M. 1992. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Brooklyn, NY New York, NY, Greene Pub. Associates; Wiley.

Baroiller, J. F., D. Chourrout, A. Fostier, and B. Jalabert. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J Exp Zool. 273. 216–223.

Barrallo, A., Gonzalez-Sarmiento, R., Garcia-Isidoro, M., Ciudad, P., Porteros, A. y Rodriguez, R.E. 1999. Differential brain expression of a new beta-actin gene from zebrafish (*Danio rerio*). Eur. J. Neurosci. 11. 369-372.

Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lowis, R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. Aquaculture. 197. 283-301.

- Belote, D.F, Costa WJEM. 2004.** Reproductive behavior patterns in three 15 species of the South American annual fish genus *Austrolebias* Costa, 16 1998 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Boletim do Museu Nacional, Nova 17 Serie, Rio de Janeiro. 514. 1-7.
- Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N. 2011.** Gamete interactions in teleost fishes: the egg envelope. Basic knowledge and perspectives as environmental biomonitor. Biol Res. 44.119-124.
- Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N., Clivio, G. 2012.** Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. WIREs Dev Biol 1. 595-602.
- Braat, A.K., van de Water, S., Goos, H., Bogerd, J., Zivkovic, D. 2000.** Vasa protein expression and localization in the zebrafish. Mech. of Dev. 95. 271-274.
- Brunner, B., Hornung, U., Shan, Z., Nanda, I., Kondo, M., Zend-Ajusch, E., Haaf, T., Ropers, H., Shima, A., Schmid, M., Kalscheuer, V.M., Schartl, M. 2001.** Genomic organization and expression of the *doublesex* related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *dmrt1*. Genomics. 77. 8–17.
- Bunn, N.A., Fox, C.J., Webb, T. 2000.** A literature review of studies of fish egg mortality: implications for the estimation of spawning stock biomass by the annual egg production method. Sci.Ser.Tech.Rep.CEFAS, Lowestof. 111. 1-37.
- Burger, J., R. T. Zappalorti. 1988.** Effects of incubation temperature on sex ratios in pine snakes: differential vulnerability of males and females. Amer Nat. 132. 492–505.
- Canavos, G. 1992.** Probabilidad y estadística. Método y aplicaciones. Ed. McGraw Hill.
- Capel, B. 2002.** The battle of sexes. Mech Dev. 92. 89–103.
- Carrasco, L.A.P., D.J. Penman & N. Bromage, 1999.** Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. Aquaculture. 173. 207–218.
- Charnov, E.L., Bull, J. 1977.** When is sex environmentally determined?. Nature. 266. 828- 830.
- Chen, W.J., Bonillo, C., Lecointre, G., 2003.** Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. Mol. Phylogenet. Evol. 26. 262–288.
- Cheng, H.H., Ying, M., Tian, Y.H, Guo, Y., McElreavey, K., Zhou, R.J. 2006.** Transcriptional diversity of *DMRT1* (*dsx-* and *mab3-related transcription factor 1*) in human testis. Cell Res. 16. 389–393.
- Cinalli, R.M., Rangan, P., Lehmann, R. 2008.** Germ cells are forever. Cell. 132.559-562.
- Clinton, W.L., Burney, J., Le Boeuf, J. 1993.** Sexual selection effects on male life history and the pattern of male mortality. Ecology. 74. 1884-1892.
- Cole , K. S., Noakes, D. L. 1997.** Gonadal Development and Sexual Allocation in Mangrove Killifish, *Rivulus marmoratus* (Pisces: Atherinomorpha). Copeia. 3. 596-600.
- Colombo, G., Grandi, G. 1996.** Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. J. Fish Biol. 48. 493–512.
- Conover, D.O., Kynard, B.E. 1981.** Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. Science. 213. 577-579.

- Conover, D.O., Heins, S.W. 1987.** Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature*. 326. 496-498.
- Corish, P., Tyler-Smith, C. 1999.** Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* . 12. 1035–1040.
- Cornejo, A.M. 2003.** Esterilidad en el pejerrey *Odontesthes bonariensis* en ambientes naturales. *Biol Acuát* .20. 19–26.
- Costa, W. E. J. M. 1998.** Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in Rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *J Comp Biol*. 3. 33-94.
- Costa, W. E. J. M. 2002.** Monophyly and phylogenetic relationships of the Neotropical annual fish genera *Austrolebias* and *Megalebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*. 4. 916-927.
- Costa WJEM. 2006.** The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*. 1213. 1–162.
- Costa, W.J.E.M., Cheffe, M.M., 2001.** Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Laguna dos patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (AHL) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Comun. Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Sér. Zool., Porto Alegre*. 14. 179-200.
- Costello, D.P., Davidson, M.E., Eggers, A., Fox, M.H., Henley, C., 1957.** Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. Marine Biological Laboratory. Lancaster Press, Inc. Woods Hole, Massachusetts. Lancaster, Pennsylvania. 15. 1-124.
- D'Anatro, A., Loureiro, M. 2005.** Geographic variation in the annual killifish *Austrolebias luteoflamulatus* Vaz Ferreira, Sierra & Scaglia (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *J Fish Biol*. 67. 849-865.
- Darwin, C. 1859.** On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. Ed. John Murray. United Kingdom.
- De la Piedra, S. 2007.** "Peces anuales del Género *Cynolebias* como modelo vertebrado para el estudio del fenómeno de diapausa". Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Orientador: Dr. Miguel Concha.
- Dermitzakis, E.T., Clark, A.G. 2002.** Evolution of Transcription Factor Binding Sites in Mammalian Gene Regulatory Regions: Conservation and Turnover *Mol. Biol. Evol*. 19. 1114–1121.
- Devlin, R. H. and Nagahama, Y. 2002.** Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208. 191-364
- El-Mogharbel, N., Wakefield, M., Deakin, J. Tsend-Ayush, E., Grützner, F., Alsop, A., Ezaz, T., Marshall Graves, J.A. 2007.** *DMRT* gene cluster analysis in the platypus: New insights into genomic organization and regulatory regions. *Genomics*. 89. 10–21
- Emslie, M.J., Jones, J.P. 2000.** Patterns of embryo mortality in a demersally spawning coral reef fish and the role of predatory fishes. *Environ Biol Fishes*. 60. 363–373.
- Errea, A., Danulat, E. 2001.** Growth of the annual fish, *Cynolebias varius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environ Biol Fishes*. 61. 261-268.

- Escalante, A.A., Lal, A.A., Ayala, F.J. 1998.** Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics*. 149. 189–202.
- Extravour, C.G., Akam, M. 2003.** Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*. 130. 5869-5884.
- Eyre-Walker, A., Woolfit, M., Phelps, T. 2006.** The distribution of fitness effects of new deleterious amino acid mutations in humans. *Genetics*. 173. 91–900.
- Falconer, D.S. 1983.** Parecido entre parientes. Introducción a la genética cuantitativa. Cía. Editorial Continental, México. 185-200.
- Falconer, D.S., 1989.** Introduction to Quantitative Genetics, 3rd Ed. Longman, New York.
- Felsenstein, J., 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39. 783-791.
- Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., 2011.** Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neuroscience*. 189. 12-24.
- Fernandino, J.I., Guilgur, L.G., Somoza, G.M. 2006.** *Dmrt1* expression analysis during spermatogenesis in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem*. 32. 231–240.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Shinoda, T., Kimura, H., Strobl-Mazzulla, P.H., Strussmann, C.A., Somoza, G.M. 2008.** Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev*. 2. 316–324.
- Fitch, W. M. 1971.** Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool*. 20. 406-4 16.
- Flores, J. A., Burns, J.R., 1993.** Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Cell Tissue Res*. 271. 263-270.
- Fossum, P. 1988.** A tentative method to estimate mortality in egg and early first larval stage with special reference to the cod (*Gadus macrocephalus*). *J Fish Res Bd. Canada*. 23. 319-340.
- Fraser, H.B., Hirsh, A.E. 2004.** Evolutionary rate depends on number of protein protein interactions independently of gene expression level. *Bmc Evol Biol*. 4. 14.
- Fujimoto, T.; Kataoka, T.; Sakao, S.; Saito, T.; Yamaha, E.; Arai, K., 2006.** Developmental stages and germ cell lineage of the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Zool Sci*. 23. 977–989.
- Futuyma, D.J. 2005.** Evolution. 3th Edition. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Gamo, H. 1961.** The origin of germ cells and formation of gonad primordial in the medaka, *Oryzias latipes*. *Jpn. J. Zool*. 13. 101–115.
- Ganter, P., Jolles, G., 1970.** Histochemie normale et pathologique. Gauthier-Villars. Paris.
- García G. 2006.** Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *J Zool Syst Evol Res*. 44. 75-87.
- García, G., Scvortzoff, E., Máspoli, M.C., Vaz-Ferreira, R. 1993.** Analysis of karyotypic evolution in natural Population of *Cynolebias* (Pisces: Cyprinodontiformes, Rivulidae) using banding techniques. *Cytologia*. 58. 85-94.

- García, G., Scvortzoff, E., Hernández, A. 1995.** Karyotypic heterogeneity in South American annual killifishes of the Genus *Cynolebias* (Pisces, Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Cytología*. 60. 103-110.
- García, G., Wlasiuk, G., Lessa, E. 2000.** High levels of mitochondrial cytochrome B divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zool. J. of the Linnean Soc.* 129. 93-100.
- García, G., Lalanne A.I., Aguirre, G., Cappetta, M. 2001.** Insights of chromosome evolution in annual killifish genus *Cynolebias* through mitochondrial phylogenetic analysis. *Chrom. Res.* 9. 437-448.
- García, G., Alvarez-Valin, F., Gómez, N. 2002.** Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biol. J. of the Linnean Soc.* 76. 49-59.
- García D, Loureiro M, Tassino B. 2008.** Reproductive Behavior in the 4 annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 5 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Neotrop Ichthyol.* 6. 243-248.
- García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M.J., Casanova, G., Clivio, G., Olivera, A. 2009.** Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes; Rivulidae) from a Biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biol. J. of the Linnean Soc.* 98. 620-635.
- Gilbert S. F. 2010.** Developmental biology. 9th edition. Sinauer Associates, USA.
- Godwin, J., Luckenbach, A., Borski, R.J. 2003.** Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *Evol. Dev.* 51.40-49 Grier, H. J., 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer.Zool.* 21. 345-357.
- Grier, H.J., 1981.** Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.* 21. 345–357.
- Grier, H. 2000.** Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: centropomidae). *J Morphol.* 243. 265–281.
- Grutzner, F. , Rens, W. E. , Tsend-Ayush, N. El-Mogharbel, P.C. O'Brien, R.C. Jones, et al 2004.,** In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature.* 432. 913–917.
- Guan, G., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. 2000.** Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*).*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272. 662-666.
- Guerrero-Estévez, S., Moreno-Mendoza, N. 2010.** Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fisheries* . 20.101–121.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., Chang, C. F. 2010.** Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165. 352–366
- Guo, Y, Li, Q, Gao, S, Zhou, X, He, Y, Shang, X, Cheng, H., Zhou, R. 2004.** Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of *Dmrt5* of zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 324. 569–575.

- Guo, Y., Cheng, H., Huang, X., Gao, S., Yu, H., Zhou, R. 2005.** Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochem Biophys Res Commun.* 330. 950–957.
- Gutiérrez, V., Arezo, M.J., García, G. 2007.** Characterization of partial *Hox* genes in annual fishes of the Cynolebiatinae subfamily (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genet Mol Biol.* 30. 494-503.
- Hale, MC., Jackson, J.R., Dewoody, J.A. 2010.** Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica.* 138. 745–756.
- Hamaguchi, S. 1982.** A light and electron microscopy study on the migration of the primordial germ cells in the teleost *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res.* 227. 139-151.
- Hamaguchi S, Toyazaki Y, Shinomiya A, Sakaizumi M. 2004.** The XX-XY sex-determination system in *Oryzias luzonensis* and *O. mekongensis* revealed by the sex ratio of the progeny of sex-reversed fish. *Zool Sci.* 21.1015–1018.
- Han, M.V., Demuth, J.P., McGrath, C.L., Casola, C., Hahn, M.W. 2009** Adaptive evolution of young gene duplicates in mammals. *Genome Res.* 19. 859–867.
- Hawkes, L.A., Broderick, A.C., Godfrey, M.H., Godley, B.J. 2007.** Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biol.* 13. 923–932.
- Hay, B., Jan, L., Jan, Y., 1988.** A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases *Cell.* 55. 577-587
- He, C.L., Du, J.L., Wu, G.C., Lee, Y.H., Sun, L.T., Chang, C.F. 2003.** Differential *Dmrt1* transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Cytogenet Genome Res.* 101. 309–313.
- Heath, M.R. 1992.** Field investigations of the early life stages of marine fish. *Avd.Mar.Biol.* 28. 1- 174.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., Scharlt, M. 2007.** Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev Biol.* 7. 3.
- Herpin, A., Nakamura, S., Wagner, T.U., Tanaka, M., Scharlt, M. 2009.** A highly conserved *cis*-regulatory motif directs differential gonadal synexpression of *dmrt1* transcripts during gonad development. *Nucleic Acid Res.* 37. 1510-1520.
- Herpin, A., Braasch, I., Kraeussling M., Schmidt, C., Thoma, E.C., Nakamura, S., Tanaka, M., Scharlt, M. 2010.** Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene duplicate by transposable elements. *Plos Genetics.* 6. Issue 2. e100844.
- Herpin, A, Scharlt, M. 2011.** *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS Journal.* 278. 1010-1019.
- Hirsh, A.E., Fraser, H.B. 2001.** Protein dispensability and rate of evolution. *Nature.* 411. 1046–1049.
- Hoar, W.S. 1969.** Reproduction. En: *Fish Physiology*, Vol. III. Reproduction and Growth, Bioluminescence, Pigments, and Poisons. Eds. W.S. Hoar y D.J. Randall. Academic Press, New York, USA.
- Hodgkin, J., 2002.** The remarkable ubiquity of DM domain factors as regulators of sexual phenotype: ancestry or aptitude? *Genes Dev.* 16, 2322–2326.

- Hornung, U., Herpin, A., Schartl, M. 2007.** Expression of the male determining gene *dmrt1bY* and its autosomal orthologue *dmrt1a* in Medaka. *Sex dev.* 1. 197-206.
- Hosmer, D.W. Lemeshow, S.1998.** Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons.
- Huang, X., Cheng, H., Guo, Y., Liu, L. Gui, J., Zhou, R. 2002.** A conserved family of *doublesex*-related genes from fish. *J. Exp. Zool.* 294. 63-67.
- Huang, X., Guo, Y., Shui, Y., Gao, S., Yu, H., Cheng, H., Zhou, R. 2005.** Multiple alternative splicing and differential expression of *dmrt1* during gonad transformation of the rice field eel. *Biol. Reprod.* 73. 1017–1024.
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y. 2008.** Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.* 78.333–341.
- Iwamatsu, T., 1994.** Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 11. 825–839.
- Janzen, F.J. 1994.** Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91. 7487–7490.
- Jensen, G.L., Shelton, W.L. 1983.** Gonadal differentiation in relation to sex control of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Pisces: Cyprinidae). *Copeia.* 3. 749–755.
- Jeong, H.B., Park, J.G., Park, Y.J., Takemura, A., Hur, S.P., Lee, Y.D., Kim, S.J. 2009.** Isolation and characterization of *DMRT1* and its putative regulatory region in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Gen. e* 438. 8–16.
- Jo, P.G., An, K.W., Kim, N.N., Choi, Y.A., Cho, S.H., Min, B.H., Lim, H.K., Choi, C.Y. 2007.** Induced expression of *doublesex*- and *mab-3*-related transcription factor-1 (*DMRT-1*) mRNA by testosterone in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* ovary. *J. Aquac.* 20. 199–202.
- Johnsen, H., Seppola, M., Torgersen, J.S., Delghandi, M., Andersen, O. 2010.** Sexually dimorphic expression of *dmrt1* in immature and mature Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 156. 197–205.
- Johnson, N. 2008.** Haldane's rule: the heterogametic sex. *Nature Education* 1(1). 1144.
- Johnston, P. M., 1951.** The embryonic history of the germ cells of the large mouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacepede). *J. Morphol.* 88. 471–542.
- Kanamori, A., Yamamura, A., Koshiba, S., Lee, J.S., Orlando, E.F., Hori, H. 2006.** Methyltestosterone efficiently induces male development in the self-fertilizing hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Genesis.* 44. 495-503.
- Kedde, M.; Strasser, M. J.; Boldajipour, B.; Oude Vrielink, J. A.; Slanchev, K.; le Sage, C.; Nagel, R.; Voorhoeve, P. M.; van Duijse, J.; Ørom, U. A.; Lund, A. H.; Perrakis, A.; Raz, E.; Agami, R., 2007.** RNA-binding protein *Dnd1* inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell.* 131. 1226–1237.
- Keller, I., Bensasson, D., Nichols, R.A. 2007.** Transition-transversion bias is not universal: A counter example from grasshopper pseudogenes. *PLoS Genet* 3(2): e22. doi:10.1371/journal.pgen.0030022
- Kettlewell, J.R., Raymond, C.S., Zarkower, D., 2000.** Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis.* 26. 174–178.

- Kim, S., Kettlewell, J.R., Anderson, R.C., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2003.** Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr. Patterns.* 3. 77–82.
- Kim, S., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2007.** Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for *Dmrt1* in postnatal testis differentiation. *Dev. Biol.* 307. 314–327.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann B., Schilling, T. 1995.** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203. 253-310.
- Kimura, M., 1983** The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., and Nüsslein-Volhard, C. 2000.** Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149. 875–888.
- Knaut, H.; Steinbeisser, H.; Schwarz, H.; Nüsslein-Volhard, C., 2002.** An evolutionarily conserved region in the *vasa* 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Curr. Biol.* 12. 454–466.
- Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H, Suzuki A, Saito N, Nakamoto M, Shibata N, Nagahama Y. 2004.** Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn.* 231. 518–526.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., Nagahama, Y. 2008.** Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev Dyn.* 237. 297–306.
- Kondo-M., Nanda-I., Hornung, U., Schmid, M., Schartl, M. 2004.** Evolutionary Origin of the Medaka Y Chromosome. *Curr Biol.* 14. 1664-166.
- Köprunner M, Thisse C, Thisse B, Raz E. 2001.** A zebrafish *nanos* related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* 15. 2877–2885.
- Koumoundouros, G., Pavlidis, M., Anezaki, L., Kokkari, C., Steriote, A., Divanach, P., Kentouri, M. 2002.** Temperature sex determination in the european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.,1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenetic phase. *J. Exp. Zool.* 292. 573-579.
- Koya, Y., Fujita, A., Niki, F., Ishihara, E., Piyama, H., 2003.** Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.* 20.1231-1242.
- Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D. et al. 2009.** The DM domain protein *DMRT1* is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106. 22323–22328.
- Kriventseva, E.V., Koch, J., Apweiler, R., Vingron, M., Bork, P., Gelfand, M.S., Sunyaev, S. 2003.** Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends Genet.* 19.124–128.
- Kunwar, P.S., Siekhaus, D.E., Lehmann, R. 2006.** *In vivo* migration: a germ cell perspective. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 22. 237-265.

- Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, Ebe Y, Kobayashi D, Tanaka M. 2006.** Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ.* 48. 209-221.
- Kurosawa,G., Takamatsu,N., Takahashi,M., Sumitomo,M., Sanaka,E.,Yamada,K., Nishi,K., Matsuda,M., Asakawa,S., Ishiguro,H., Kurosawa,Y., Shimizu,N., Kohara,Y. and Hori,H. 2006.** Organization and structure of hox gene loci in medaka fish genome and comparison with those of pufferfish, zebrafish and human genomes. *Gene.* 370. 75-82.
- Laufer, G., Arim, M., Loureiro, M., Piñeiro_guerra, J.M., Clavijo-Baquet, S., Fagúndez, C. 2009.** Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. *Neotrop Ichthyol.* 7. 77-86.
- Lepori, N.G. 1980.** Sex differentiation, Hermaphroditism and Intersexuality in Vertebrates Including Man. Piccin Medical Books, Padua.
- Lesseps, R. J., Geurts van Kessel, A. H. M., Denuce, J. M. 1975.** Cell patterns and cell movements during early development of an annual fish *Nothobranchius neumanni*. *J. Exp. Zool.* 193. 137–146.
- Li, W.H., 1997.** Molecular Evolution. Sinauer Associates, Sunderland. MA
- Li, S.Z. 2001.** On the position of the suborder Adrianichthyoidei. *Acta Zootax Sin* 26. 583-588.
- Li ,Q., Zhou, X., Guo, Y., Shang, X., Chen, H., Lu, H., Cheng, H., Zhou, R. 2008.** Nuclear localization, DNA binding and restricted expression in neural and germ cells of zebrafish *Dmrt3*. *Biol Cell.* 100. 453–463.
- Liarte, S., Chaves-Pozo, E., Garcia-Alcazar, A., Mulero, V., Meseguer, J ., Garcia-Ayala, A. 2007.** Testicular involution prior to sex change in gilthead seabream is characterized by a decrease in *DMRT1* gene expression and by massive leukocyte infiltration. *Reprod Biol Endocrinol.* 5. 20.
- Liu, Z.H., Zhang, Y.G., Wang, D.S. 2010.** Studies on feminization, sex determination, and differentiation of the Southern catfish, *Silurus meridionalis* – a review. *Fish Physiol Biochem.* 36. 223–235.
- Loureiro, M. 2004.** Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). Tesis de Doctorado. PEDECIBA-Biología.
- Loureiro, M., de Sá, R.O., 1996.** External Morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia.* 4. 1016-1022.
- Loureiro, M., de Sá, R.O., 1998.** Osteological analysis of the Killifish Genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *J. Morphol.* 238. 245-262.
- Loureiro, M., R. O. de Sá. 2000.** Ornamentación del corion en los huevos de especies de *Austrolebias* y *Symptonichthys* (Rivulidae: Cynolebiatinae). *FACENA.* 16. 85-91.
- Loureiro, M., García, G. 2004.** *Cynolebias reicherti* a new annual fish (Rivulidae: Cynolebiatinae) from southern Laguna Merim basin. *Acta Zoológica Lilloana.* 48.13-25.
- Loureiro M, García G. 2008.** *Austrolebias reicherti* a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa.* 1940. 1–15.

- Loureiro, M., Azpelicueta, M., García, G. 2004.** *Austrolebias arachan* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), a new species of annual fish from northeastern Uruguay. *Rev suisse Zool.* 111. 21-30.
- Loureiro, M., Duarte, A., Zarucki, M. 2011.** A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotrop Ichthyol.* 9. 335-342.
- Lu, H., Huang, X., Zhang, L., Guo, Y., Cheng, H., Zhou, R. 2007.** Multiple alternative splicing of mouse *Dmrt1* during gonadal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 352. 630–634.
- Ludwig, D., Rowe, L. 1990.** Life history strategies for energy gain and predator avoidance under time constraints. *Amer Nat.* 135. 686-707.
- Lutfalla, G. Crollius, H.R. Brunet, F. Laudet, V. Robinson-Rechavi, M. 2003.** Inventing a Sex-Specific Gene: A Conserved Role of *DMRT1* in Teleost Fishes Plus a Recent Duplication in the Medaka *Oryzias latipes* Resulted in *DMY*. *J Mol Evol.* 57. S148–S153.
- Maack, G., Segner, H., Tyler, C.R. 2001.** Ontogeny of sexual differentiation in different strains of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol Biochem.* 28. 125–128.
- Maegawa, S.; Yasuda, K.; Inoue, K., 1999.** Maternal mRNA localization of zebrafish *DAZ*-like gene. *Mech. Dev.* 81, 223–226.
- Mank, J.E, Promislow, D.E.L., Avise, J.C. 2006.** Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biol J Linnean Soc.* 87. 83-93.
- Marchand, O., Govoroun, M., D'Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J., Bernot, A., Laudet, V., Guiguen, Y. 2000.** *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys Acta.* 1493. 180-187.
- Marin, I., Baker, B. S. 1998.** The Evolutionary Dynamics of Sex Determination. *Science.* 281. 1990-1994.
- Markofsky, J., Matías, J.R., 1977.** The effects of temperature and season collection on the onset and duration of diapause in embryos of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *J. Exp. Zool.* 202. 49-56.
- Marshall-Graves, J.A., Peichel, C. 2010.** Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options?. *Genome Biology.* 11. 205.
- Maspoli, M.C., García, G. 1988.** Estudio comparativo del cariotipo de especies del género *Cynolebias* Steidachner, 1876 (Cyprinodontiformes, Rivulidae) del Uruguay. *Bol.Soc.Zool. Uruguay, 2ª época.* 4. 27-33.
- Matsuda, M., Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, C. Matsuda y col. 2002.** *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature.* 417. 559–563.
- Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. 2003.** *Oryzias curvinotus* has *DMY*, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zool.Sci.* 20. 159-161.
- Matsuda, M. Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Nagahama, Y. 2007.** *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104. 3865-70.

- Medrano, J.F., Aasen, E., Sharrow, L. 1990.** DNA extraction from Nucleated Red Blood Cells. *BioTechniques*. 8. 43.
- Merchant-Larios H, Villalpando I. 1981.** Ultrastructural events during gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *Anat Rec*. 199. 349–360.
- Michelsen ,B. K. 1995.** Transformation of Escherichia coli Increases 260-Fold upon Inactivation of T4 DNA Ligase. *Anal Biochemistry*. 225.172-174.
- Mikkelsen, T.S., Hillier, L.W., Eichler, E.E., Zody, M.C., Jaffe, D.B., et al. 2005.** Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*. 437. 69–87.
- Miller, D., Summers, J., Silber, S. 2004.** Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction? *Fertil. Steril*. 81. 954–964.
- Mitchel, N.J., Janzen, F.J. 2010.** Temperature-Dependent Sex Determination and Contemporary Climate Change. *Sex Dev*. 4. 129–140.
- Mittwoch, U. 2000.** Three thousand years of questioning sex determination. *Cytogenet cell genet*. 91. 186-191.
- Mittwoch, U. 2005.** Sex determination in mythology and history. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 49. 7-13.
- Montoya-Burgos, J. 2011.** Patterns of Positive Selection and Neutral Evolution in the Protein-Coding Genes of Tetraodon and Takifugu. *PLoS ONE* 6(9): e24800. doi:10.1371/journal.pone.0024800
- Mülhardt, C. 2007.** *Molecular Biology and Genomics*. Academic Press. Elsevier Inc. MA. USA.
- Murphy, M.W., Sarver, A.L., Rice, D., Hatzi, K., Ye, K., Melnick, A., Heckert, L.L., Zarkower D, Bardwell, V.J. 2010.** Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian *Doublesex* homolog *DMRT1* in the juvenile testis. *Proc Natl Acad Sci USA*.107. 13360-13365.
- Murua, H., Saborido-Rey, F. 2003.** Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *J. Northw. Atl. Fish. Sci*. 33. 23-31.
- Nakadate, M., Shikano T., Taniguchi, N.2003.** Inbreeding depression and heterosis in various quantitative traits of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture* 220. 219 – 226.
- Nakamoto, M., Muramatsu, S., Yoshida, S., Matsuda, M., Nagahama, Y., Shibata, N. 2009.** Gonadal Sex Differentiation and Expression of *Sox9a2*, *Dmrt1*, and *Foxl2* in *Oryzias luzonensis*. *Genesis*. 47. 289–299.
- Nakamura, M. 2009.** Sex determination in amphibians. *Sem Cell Dev Biol*. 20. 271–282.
- Nakamura, M., Takahashi, H. 1973.** Gonadal sex differentiation in tilapia, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ*. 24. 1–13.
- Nakamura, M., Nagahama, Y. 1985.** Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia *Sarotherodon niloticus*. *Dev. Growth. Differ*. 27. 701–708.
- Nakamura, M., Nagahama, Y. 1989.** Differentiation and development of Leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem*. 7. 211–219.

- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., Nagahama, Y. 1998.** Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp Zool.* 281. 362-372.
- Nanda, I., M. Kondo, U. Hornung, S. Asakawa, and C. Winkler y col. 2002.** A duplicated copy of *DMRT1* in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99. 11778-11783.
- Naruse, K., Hori, H., Shimizu, N., Kohara, Y., Takeda, H. 2004.** Medaka genomics: a bridge between mutant phenotype and gene function. *Mech Dev.* 121. 619–628.
- Nei, M. Gojobori, T. 1986.** Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 3. 418-426.
- Nei, M., Kumar, S. 2000.** Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press Inc. New York.
- Nelson, J.S. 1994.** Fishes of the world, 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Nelson, J. S. 2006.** Fishes of the world. 4th Edition. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Ninness, M.M., Stevens, E.D., Wright, P.A. 2006.** Energy expenditure during hatching in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Can J Fish Aquat Sci.* 63.1405–1413.
- Nordeide, J.T. 2007.** Is there more in 'gamete quality' than quality of the gametes? A review of effects of female mate choice and genetic compatibility on offspring quality. *Aquaculture Res.* 38. 1-16.
- O'Connor, M.I., Bruno, J.F., Gaines, S.D., Halpern, B.S., Lester, S.E., et al. 2007.** Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104. 1266–1271.
- Ono, Y., Liang, C., Ikeda, D. and Watabe, S. 2006.** cDNA cloning of myosin heavy chain genes from medaka *Oryzias latipes* embryos and larvae and their expression patterns during development. *Dev. Dyn.* 235. 3092-3101.
- Opsina-Alvarez, N. Piferrer, F. 2008.** Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PlosOne.* 3:e2837.
- Otake, H., Shinomiya, A., Kawaguchi, A., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. 2008.** The Medaka Sex-Determining Gene *DMY* Acquired a Novel Temporal Expression Pattern After Duplication of *DMRT1*. *Genesis* 0. 1–5.
- Otani, S.; Maegawa, S.; Inoue, K.; Arai, K.; Yamaha, E., 2002.** The germ cell lineage identified by vas-mRNA during embryogenesis in goldfish. *Zool. Sci.* 19. 519–526.
- Oviedo, S. 2009.** Posibles mecanismos genómicos de aislamiento postcigótico en especies del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. Pasatía de Grado. Opción: Genética. Tutora: Dra. Graciela García. Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias. UDELAR.
- Pala, I.; Scharl, M., Thorsteinsdóttir, S., Coehlo, M. 2009.** Sex determination in the *Squalius alburnoides* complex: an initial characterization of sex cascade elements in the context of a hybrid polyploid genome. *PlosOne.* 4: e6401.

- Parenti, L.R., Grier, H.J., 2004.** Evolution and phylogeny of gonad morphology in bone fishes. *Integ. Comp. Biol.* 44. 333–348.
- Parenti, L.R., 2005.** The phylogeny of atherinomorphs: evolution of a novel fish reproductive system. En: Uribe, M.C., Grier, H.J. (Eds.), *Viviparous Fishes*. New Life Publications, Homestead, Florida.
- Parker, K. 1980.** A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. *Fish Bull.* 78. 541–544.
- Pavlidis, M., Koumoundouros, G., Steriotti, A., Somarakis, S., Divanach, P Kentouri, M. 2000.** Evidence of temperature-dependent sex determination in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 287. 225-232.
- Peichel, C. L., J. A. Ross, C. K. Matson, M. Dickson, J. Grimwood et al., 2004.** The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr. Biol.* 14. 1416–1424.
- Pen, I., Uller, T., Feldmeyer, B., Harts, A., While, G.M., Wapstra, E. 2010.** Climate-driven population divergence in sex-determining systems. *Nature.* 468. 436-438.
- Penman, D.J., Piferrer, F. 2008.** Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev Fisheries Sci.* 16. 14-32.
- Perry, A.L., Low, P.J., Ellis, J.R., Reynolds, J.D. 2005.** Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science.* 308. 1912–1915.
- Piferrer, F., Navarro-Martín, L., Ospina-Álvarez, N., Blázquez, M., Viñas, J., 2008.** Temperature-dependent sex determination in fish, effects of temperature on gonadal aromatase gene expression, and epigenetic regulation after early exposure to high water temperature. *Proc. Sixth Int. Symp. Fish Endocrinol.* Calgary, June 22–27, p. 63
- Pokorná, M., Kratochvil, L. 2009.** Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap?. *Zool J Linnean Soc.* 156. 168–183.
- Povh, J.A., Lopera Barrero, N.M., Ribeiro, R., Lupchinski, E., Gomes, P., Lopes, T. 2008.** Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.* 35. 5-15.
- Raghuveer, K., Senthilkumaran, B. 2009.** Identification of multiple *dmrt1s* in catfish: localization, dimorphic expression patter, changes during testicular cycle and after methyltestosterones treatment. *J Mol. Endocrinol.* 42. 437-448.
- Raghuveer, K., Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Sridevi, P., Rajakumar, A., Singh, R., Muruganankumar, R., Majumdar, K.C, 2011.** Dimorphic Expression of Various Transcription Factor and Steroidogenic Enzyme Genes during Gonadal Ontogeny in the Air-Breathing Catfish, *Clarias gariepinus*. *Sex Dev.* 5. 213–223.
- Rasband, W.S. 1997-2009.** ImageJ, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Rasotto, M.B., Shapiro, D.Y .1998.** Morphology of gonoducts and male genital papilla, in the bluehead wrasse: implications and correlates on the control of gamete release. *J Fish Biol.* 52. 716–725.

- Raymond, C. S. , Shamu, C. E. , Shen, M. M. , Seifert, K. J. , Hirsch, B. , Hodgkin, J. & Zarkower, D. 1998.** Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*. 391. 691-695.
- Raymond, C. S. , Parker, E. D. , Kettlewell, J. R. , Brown, L. G. , Page, D. C. , Kusz, K. , Jaruzelska, J. , Reinberg, Y. , Flejter, W. L. , Bardwell, V. J. 1999.** A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum. Mol. Genet.* 8. 989-996.
- Raymond, C.S., Kettlewell, J.R., Hirsch, B., Bardwell, V.J. Zarkower, D.1999.** Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol.* 215. 208–220.
- Raymond, C.S., Murphy, M.W., O’Sullivan, G., Bardwell, V.J., Zarkower , D. 2000.** *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14. 2587-2595.
- Raz, E. 2000.** The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biol.* 1. 1017.1-1017.6
- Raz, E. 2002.** Primordial germ cell development in zebrafish. *Cell Dev Biol.* 13. 489-495.
- Redding, J.M., Patiño, R. 1993.** Reproductive physiology: The physiology of fishes. In: Evans D.H., Editor. Boca Ratón, FL:CRC Press. 503-531.
- Reichwald, K., Lauber, C., Nanda, I., Kirschner, J. , Hartmann, N., Schories, S., Gausmann, U., Taudien, S., Schilhabel, M.B., Szafranski, S. , Glöckner, G., Schmid, M., Cellerino, A., Schartl, M., Englert, C., Platzer, M. 2009.** High tandem repeat content in the genome of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*: a new vertebrate model for aging research. *Genome Biol.* 10: R16.
- Richardson’ B.E., Lehmann, R. 2010.** Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature. Rev Mol Cell Biol.* 11. 37-49.
- Rosen, D.E., 1964.** The relationships and taxonomic position of the halfbeaks, killifishes, silversides and their relatives. *Bull. Am. Mus. Nat. His.* 127. 217–268.
- Rosen, D.E., Parenti, L.R., 1981.** Relationships of *Oryzias*, and the groups of Atherinomorph fishes. *Am. Mus. Novit.* 2719. 25 pp.
- Ross, R.M .1990.** The evolution of sex-change mechanisms in fishes. *Environ Biol Fishes.* 29. 81–93.
- Rovira, M. 2008.** Posibles mecanismos genómicos de aislamiento reproductivo en especies hermanas del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. Pasatía de Grado. Opción: Biología Molecular. Tutora: Dra. Graciela García. Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias. UDELAR.
- Saito, T., Otani, S., Nagi, T., Nakatsuji, T., Arai, K., Yamaha, E. 2002.** Germ Cell lineage from a single blastomere at 8-cell stage in Shiro-uo (ice goby). *Zool.Sci.* 19. 1027-1032.
- Saito, T.; Otani, S.; Fujimoto, T.; Suzuki, T.; Nakatsuji, T.; Arai, K.; Yamaha, E., 2004.** The germ-line lineage in ukigori, *Gymnogobius species* (Teleostei: Gobiidae) during embryonic development. *Int.J. Dev. Biol.* 48. 1079–1085.
- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue. K., Tananka, M., Arai, K., Yamaha, E. 2006.** Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-*nos1* 3’UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50. 691-899.

- Saitou, N., Nei, M. 1987.** The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4. 406-425.
- Sakaizumi, M. 1986.** Genetic divergence in wild populations of the medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae) from Japan and China. *Genetica.* 69. 119-125.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarre, S.D., Georges, A., Quinn, A . 2004.** The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays.* 26. 639–645.
- Satoh, N., Egami, N. 1972.** Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *J. Embryol. exp. Morph.* 28. 385-395.
- Saura, M., P. Caballero, A. Caballero y P. Morán. 2006.** Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. *ICES J Marine Science.* 63.1290-1296.
- Schultheis, C., Böhne, A., Schartl, M., Volff, J.N., Galiana-Arnoux, D. 2009.** Sex Determination Diversity and Sex Chromosome Evolution in Poeciliid Fish. *Sex Dev.* 3. 68–77.
- Schulz, R.W., Bogerd, J., Male, R., Ball, J., Fenske, M., Olsen, L.C., Tyler, C.R. 2007.** Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol.* 41. 6305–6310.
- Schupbach T., Wieschaus, E. 1986.** Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Poux's Arch Dev.Biol.* 195. 302-317.
- Seligmann, H., Pollock, D.D., 2004.** The ambush hypothesis: hidden stop codons prevent off-frame gene reading. *DNA Cell Biol.* 23. 701–705.
- Setiamarga D.H.E, Miya, M., Yamanoue, Y., Mabuchi, K., Satoh, T.P., Inoue, J. G. Nishida, M. 2008.** Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 49. 598–605.
- Seydoux, G. Strome, S. 1999.** Launching the germ line in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development.* 126. 3275-3283.
- Shan, Z., Nanda, I., Wang, Y., Schmid, M., Vortkamp, A., Haaf, T. 2000.** Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, *DMRT1*, in birds. *Cytogenet Cell Genet.* 89. 252-257.
- Shetty, S., Kirby, P., Zarkower, D. & Graves, J. A. 2002.** *DMRT1* in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element. *Cytogenet. Genome Res.* 99. 245–251.
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S. 2000.** The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Develop. Growth Differ.* 42. 317-326.
- Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. 2004.** Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing in wild populations. *Zool sci.* 21. 613-619.

- Silber, S., Geisler, J.H., Bolortsetseg, M. 2011.** Unexpected resilience of species with temperature dependent sex determination at the Cretaceous–Palaeogene Boundary. *Biol. Lett.* 7. 295–298.
- Singh, T.R., Pardasanic. K.R. 2009.** Ambush hypothesis revisited: Evidences for phylogenetic trends. *Comp Biol Chem.* 33. 239–244.
- Smith, C. A. , McClive, P. J. , Western, P. S. , Reed, K. J. & Sinclair, A. H. 1999.** Conservation of a sex-determining gene. *Nature (London)* 402. 601-602.
- Smith, C. A., Katz, M., Sinclair, A. H. 2003.** *DMRT1* is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol. Reprod.* 68. 560–570.
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., Sinclair, A.H. 2009.** The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature.* 461. 267–271.
- Solari, A. J. 1994.** Sex chromosomes and sex determination in fishes. En: Solari, A.J. (Eds), *Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates.* CRC Press, Tokyo.
- Sprechmann, P. 1980.** Paleoeología, paleogeografía y estratigrafía de la región costera del Uruguay durante el Neogeno y el Cuaternario. *Resúmenes Actas I Congreso Latinoamericano de Paleontología.* 3. 237-256.
- Sreenivasulu, K., Ganesh, S., Raman, R .2002.** Evolutionarily conserved, *DMRT1*, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor*. *Mech Dev.* 119S. S55-S64.
- Strandberg A.K. , Salter, L.A. 2004.** A comparison of methods for estimating the transition:transversion ratio from DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 32. 495–503.
- Strüssmann,C.A., Takashima, F. , Toda, K. 1996.** Sex differentiation and hormonal feminisation in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture.* 139. 31–45.
- Strüssmann C.A., Saito, t., Usui, M., Yamada H., Takashima, F. 1997.** Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatcheri*. *J.Exp.Zool.* 278. 167-177.
- Strüssman, C.A., Nakamura, M., 2002.** Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol.* 26. 13-29.
- Sutou, S., Mitsui, Y., Tsuchiya, K. 2001.** Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis spp.* *Mamm Genom* 12. 17– 21.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. 2004.** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101.11030-11035.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24.1596-1599.
- Tanaka M, Kinoshita M, Kobayashi D, Nagahama Y. 2001.** Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98. 2544-2549.

- Timmermans, L. P. M.; Taverne, N., 1989.** Segregation of primordial germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchonius* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by 3Hthymidine incorporation. *J. Morphol.* 202. 225–237.
- Trinkaus, J.P. 1992.** The midblastula transition, the YSL transition and the onset of gastrulation in *Fundulus*. *Development. Supplement*, 75-80.
- Tripathi, N., M. Hoffmann, D. Weigel and C. Dreyer, 2009.** Linkage analysis reveals the independent origin of Poeciliid sex chromosomes and a case of atypical sex inheritance in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Genetics.* 182. 365–374.
- Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. 2002.** Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol.* 205. 711-718.
- Valenzano, D.R., Kirschner, J., †Kamber, R., Zhang, E., †Weber, D., Cellerino, A., Englert, C., Platzer, M., Reichwald, K., Brunet, A. 2009.** Mapping Loci Associated With Tail Color and Sex Determination in the Short-Lived Fish *Nothobranchius furzeri*. *Genetics.* 183.1385–1395.
- Valenzuela N., Adams D.,C, Janzen, F.J . 2003.** Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined?. *Amer Nat.* 161. 676–683.
- Van Haarlem, R., 1983.** Early ontogeny of the annual fish genus *Nothobranchius*. Cleavage plane orientation and epiboly. *J. Morphol.* 176. 31–42.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra, B., 1971.** Especies del género *Cynolebias* Steindachner 1876, en el Uruguay. *Bol.Soc.Zool. Uruguay.* 1. 24-44.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra, B. 1973 a.** Los géneros de Cyprinodontidae de aguas temporales Sudamericanas. *Bol. Soc. Zool. Uruguay.* 2. 36-42. Montevideo.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra, B. 1973 b.** El género *Cynolebias* Steindachner, 1876 (Atheriniformes, Cyprinodontidae): Caracteres, especies y distribución. *Trab. V Congr. Latinoam. Zool.* 1. 245-260. Montevideo.
- Vaz-Ferreira R, Sierra B, Scaglia S. 1964.** Eco-etología de la 26 reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. 27 Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo. 26. 44-49.
- Vaz-Ferreira, R., Sierra de Soriano, B. y Scaglia de Paulete, S.1964.**Tres especies nuevas del Género *Cynolebias* Steindachner 1876 (Teleostomi, Cyprinodontidae). *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo* 8, N° 102. 1-36.
- Veith, A.M., Froschauer, A., Körting, C., Nanda, I., Hanel, R., Schmid, M., Scharl, M., Voff, J. 2003.** Cloning of the *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: *dmY/dmrt1Y* is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene* 317. 59-66.
- Veith, A.M., Schafer, M., Kluver, N., Schmidt, C., Schultheis, C., Scharl, M., Winkler, C. Voff, J.N. 2006.** Tissue specific expression of *dmrt* genes in embryos and adults of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Zebrafish.* 3. 325–337.
- Vizziano-Cantonnet, D., Baron, D., Mahe, S., Cauty, C., Fostier, A. Guiguen, Y. 2008.** Estrogen treatment upregulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *J Mol Endocrinol.* 41. 277–288.
- Vogel W, Jainta S, Rau W, Geerkens C, Baumstark A, et al. 1998.** Sex determination in *Ellobius lutescens*: The story of an enigma. *Cytogenet Cell Genet.* 80. 214–221.

- Volff, J.N. 2005.** Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*. 94. 280-294.
- Volff, J.N., Zarkower, D., Bardwell, J., Schartl, M. 2003.** Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol*. 57. S241–S249.
- Volff, J.N., Nanda, I, Schmid, M., Schartl, M. 2007.** Governing sex determination in fish: regulatory putches and ephemeral dictators. *Sex dev*. 1. 85-99.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981.** Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool*. 21. 325-343.
- Wake, D.V., Wake, M.H., Specht, C.D. 2011.** Homoplasy: From Detecting Pattern to Determining Process and Mechanism of Evolution. *Science*. 331. 1032-1035.
- Wang, S., Hard J.J., Utter, F. 2002.** Salmonid inbreeding: a review. *Rev Fish Biol Fisheries*. 11. 301-319.
- Warner, D. A., Uller, T., Shine, R. 2009.** Fitness effects of the timing of hatching may drive the evolution of temperature-dependent sex determination in short-lived lizards. *Evol. Ecol*. 23. 281–294.
- Wedekind, C., Muller, R., Spicher, H. 2001.** Potential genetic benefits of mate selection in whitefish. *J Evol Biol*. 14. 980-985.
- Weidinger, M.; Stebler, J.; Slanchev, K.; Dumstrei, K.; Wise, C.; Lovell-Badge, R.; Thisse, C.; Thisse, B.; Raz, E., 2003.** *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol*. 13. 1429– 1434.
- Wen, A., You, E.F., Tan, E.X., Sun, E.P., Ni, E.J., Zhang, E.Y., Xu, E.D., Wu, E.Z., Xu, E.Y., Zhang, E.P. 2009.** Expression pattern of *dmrt4* from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in adult gonads and during embryogenesis. *Fish Physiol. Biochem*. 35. 421–433.
- Westerfield, M. 2000.** The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 4th edn. Eugene, OR: University of Oregon Press.
- Wilson, K., Hardy, I.C.W. 2002.** Statistical analyses of sex ratios: an introduction. *Sex Ratios: Concepts and Research Methods*. Cambridge. University Press. New York, USA.
- Winkler, C., Hornung, U., Kondo, M., Neuner, C., Duschl, J., Shima, A., Schartl, M. 2004.** Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech Dev*. 121. 997–1005.
- Withler, R.E. 1988.** Genetic consequences of fertilizing chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs with pooled milt. *Aquaculture*. 68. 5-25.
- Wittbrodt, J., Shima, A., Schartl, M. 2002.** Medaka – a model organism from the Far East. *Nat Rev Genet*. 3. 53–64.
- Wolke, U., Weidinger, G., Köprunner, M., Raz, E. 2002.** Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr. Biol*. 12. 289-294.
- Wourms, J.P. 1964.** Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* and *Aplocheilichthys pumilis* with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in Teleost fishes. *Eastafrican Freshwater Fish. Res. Org. Appendix H* 68-73.

Wourms, J.P. 1967. Annual Fishes. Methods in Developmental Biology. Wilt Fred H., Wessels, N. (Eds.) Thomas and Crowell Company. N.Y.

Wourms, J.P.1972 a. The Developmental Biology of Annual Fishes I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi*. Dahl. J. Exp. Zool. 182. 143-168.

Wourms, J.P. 1972 b. The Developmental Biology of Annual Fishes II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomeres during the development of annual fish eggs. J. Exp. Zool. 182. 169-200.

Wourms, J.P. 1972 c. The Developmental Biology of Fishes III. Pre-embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. J.Exp.Zool. 182. 389-414.

Xia, W., Zhou, L., Yao, B., Li, C.J., Gui, J.F. 2007. Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. Mol Cell Endocrinol. 263. 156–172.

Yamaguchi, A., Lee, K.H., Fujimoto, H., Kadomura, K., Yasumoto, S. , Matsuyama, M. 2006. Expression of the *DMRT* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. Comp Biochem Physiol D 1. 59–68.

Yamaha, E., Goto-Kazeto , R., Saito, T., Kawakami, Y., Fujimoto T., Adachi, S. , Arai, K.. 2010. Primordial germ cell in teleost fish with special references to its specification and migration. J. Appl. Ichthyol. 26. 816–822.

Yamamoto, T. 1955. Progeny of artificially induced sex-reversals of male genotype (XY) in the medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to YY-male. Genetics. 40. 406–419.

Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. Fish Physiology, Vol. III. In Hoar WS, Randall DJ (Eds). Academic Press, New York.

Yang, Z., Nielsen R., Goldman, N., Krabbe Pedersen, A.M. 2000. Codon-Substitution Models for Heterogeneous Selection Pressure at Amino Acid Sites Genetics. 155. 431–449.

Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4- cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. Development. 124. 3157-3166.

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishikida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., Ito, M. 2008. A W-linked DM-domain gene, *DM-W*, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proc Natl Acad Sci USA. 105. 2469–2474.

Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T. 2000. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. Mol Reprod Dev. 55. 364–371.

Yoshizaki, G. Tago, Y., Takeuchi, Y., Sawatari, E., Kobayashi, T., Takeuchi, T. 2005. GFP-labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its application for germ cell transplantation in Salmonidae. Biol. Reprod. 73. 88-93.

Zhang, J. 2000. Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. J Mol Evol. 50. 56–68.

Zhang, L.Q., Li, W.H. 2004. Mammalian housekeeping genes evolve more slowly than tissue-specific genes. Mol Biol Evol. 21. 236–239.

Zhang, X., Zha, J., Wang, Z. 2008. Influences of 4-nonylphenol on doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 gene expression and vitellogenin mRNA induction of adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environ Toxicol Chem.* 27. 196–205.

Zhao, Y., Lu, H., Yu, H., Cheng, H. , Zhou, R. 2007. Multiple alternative splicing in gonads of chicken DMRT1. *Dev Genes Evol.* 217. 119–126.

Zhou, X., Li, Q., Lu, H., Chen, H., Guo, Y., Cheng, H., Zhou, R. 2008. Fish specific duplication of *dmrt2* : characterization of zebrafish *dmrt2b*. *Biochimie.* 90. 878-887.

Zhu, L. , Wilken, J. , Phillips, N. B. , Narendra, U. , Chan, G. , Stratton, S. M. , Kent, S. B., Weiss, M. A. 2000. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev.* 14. 1750-1764.

Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

M.J. Arezo^a, S. D'Alessandro^a, N. Papa^a, R. de Sá^b, N. Berois^{a,*}

^a *Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay*

^b *Department of Biology, University of Richmond, Richmond, USA*

Received 30 December 2006; received in revised form 25 January 2007; accepted 26 January 2007

Available online 30 March 2007

Abstract

Sex differentiation process, determination of sexual strategy, and gametogenesis of the annual fish *Austrolebias charrua* are established. Evidence of histological sex differentiation in an antero-posterior gradient was observed in pre-hatching stages. Sexual strategy corresponds to the “differentiated gonochoric” pattern. Histological analyses of adult gonads showed an asynchronous spawning mode for females and continuous spawning for males. Mature oocytes presented fluid yolk. Testis organization corresponded to a restricted spermatogonial model. Herein, we report the ultrastructural organization of the vitelline envelope and the main features of the sperm of *A. charrua*. Taking together these results also contribute to phylogenetic studies and provide base line data to propose *A. charrua* as a biomonitor of contamination in a protected area. © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Gonadal development; Annual fishes; *Austrolebias*

1. Introduction

Successful reproduction of an individual depends on events that begin early in its life. Sex determination and differentiation are fundamental components of the genetic information passed on from generation to generation. Teleosts are an attractive group of organisms for the study of the evolution of these events because members of this class exhibit a broad range of sexual strategies ranging from hermaphroditism to gonochorism and from environmental to genetic sex determination (Devlin and Nagahama, 2002).

Although zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*) have been the most used teleost models in developmental biology studies, species of annual fishes are excellent organisms for comparative analyses as they show unique reproductive and developmental characteristics. Annual fishes are exposed to an extremely variable environment. They inhabit temporary ponds that undergo drying during summer resulting in the death of the entire adult population.

The developing embryos remain buried in the bottom mud and hatch, after the pond is flooded, in the next rainy season (Wourms, 1964, 1967). In contrast with other teleosts, annual fishes exhibit a unique developmental pattern (Myers, 1952). Epiboly is temporally and spatially separated from organogenesis and embryos undergo one or more reversible arrests (diapauses) at three different stages (Wourms, 1972a,b,c). These developmental adaptations are closely related to their life cycle.

Teleosts are becoming increasingly important indicators of environmental health. Considerable information exists suggesting that pollutants may cause serious impacts on fish reproduction: sex differentiation, gonad morphology, rates of gametogenesis and sex phenotypes (reviewed by Devlin and Nagahama, 2002; Arukwe and Goksøyr, 2003). Moreover, *Cynopoecilus melanotaenia*, an annual fish species, was suggested as a sensitive model organism to assess the impact of environmental pollution (Arenzon et al., 2003).

Critical to the understanding of sex-determination processes are studies examining the origin and development of cells involved in the formation of the gonad (Devlin and Nagahama, 2002). There is any evidence about sex deter-

* Corresponding autor. Tel.: +598 2 5258618/145; fax: +598 2 5258617.
E-mail address: berois@fcien.edu.uy (N. Berois).



Fig. 1. Map of Uruguay showing *Austrolebias charrua* collecting area (black zone).

mination and differentiation mechanisms in annual fishes. In this study, as a first comprehensive approach, we determine primary sex differentiation (both at morphological and temporal scales) from early embryos to adults of the annual fish *Austrolebias charrua* (Costa and Cheffe, 2001). In addition, we present the adult gonad organization and the main characteristics of oogenesis and spermatogenesis.

2. Materials and methods

Adult females and males of *A. charrua* were collected during the rainy season (May to August) in temporary ponds from Departamento de Rocha, Uruguay (Fig. 1). They were kept in the laboratory in 30 l aquaria, filled with continuously aerated and dechlorinated tap water (pH 7–7.5), and exposed to natural light. Water was partially changed every 5 days. Water temperature was $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$. Specimens were fed once a day with live *Tubifex* sp. Spawning occurred daily from fish pairs or groups of one male and two females isolated in aquaria that had containers with peat moss on the bottom. Early embryos were collected from the peat moss, raised, and developmental stages were classified according to Arezo et al. (2005).

2.1. Hatching

Containers with peat moss were maintained in the aquaria for 1 month; subsequently, they were dried in darkness for at

least 2 months. For hatching, each peat moss container was placed in a 10 l aquarium and covered with dechlorinated water. After 6–12 h hatched fry were observed. They were fed with freshly hatched *Artemia* sp. nauplii for the first 15 days and then with *Daphnia* sp.

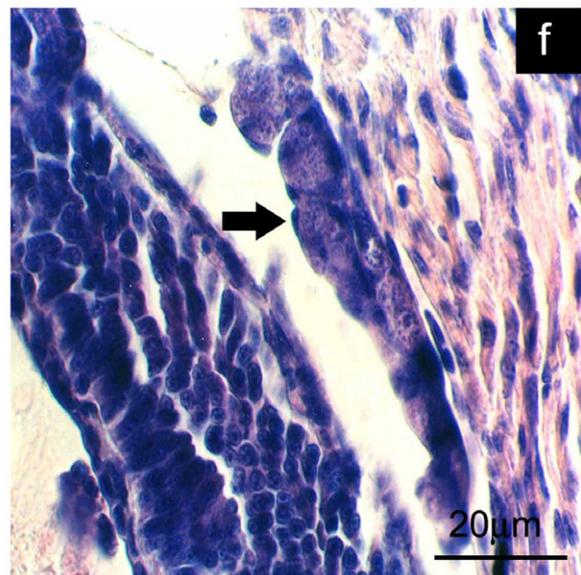
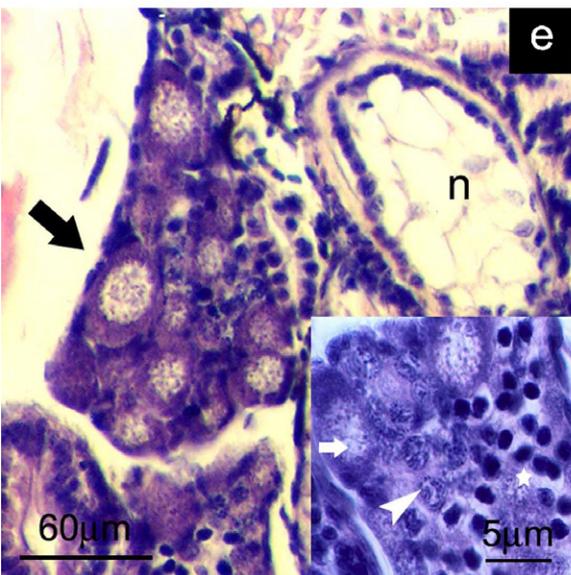
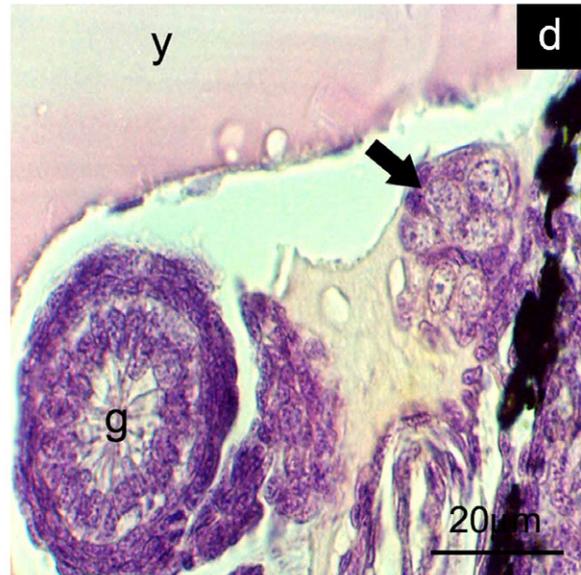
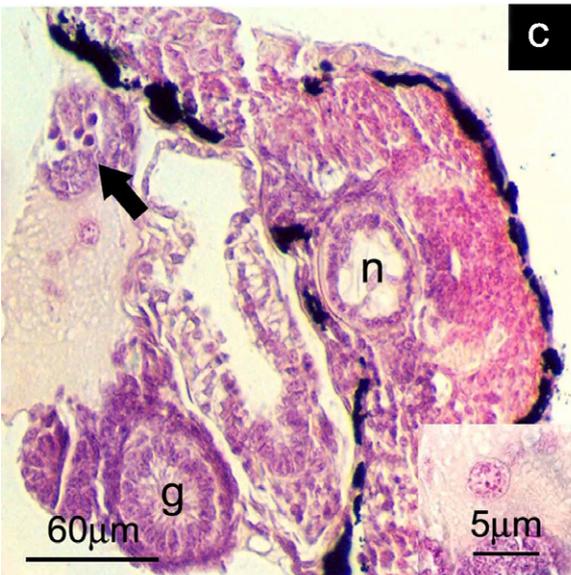
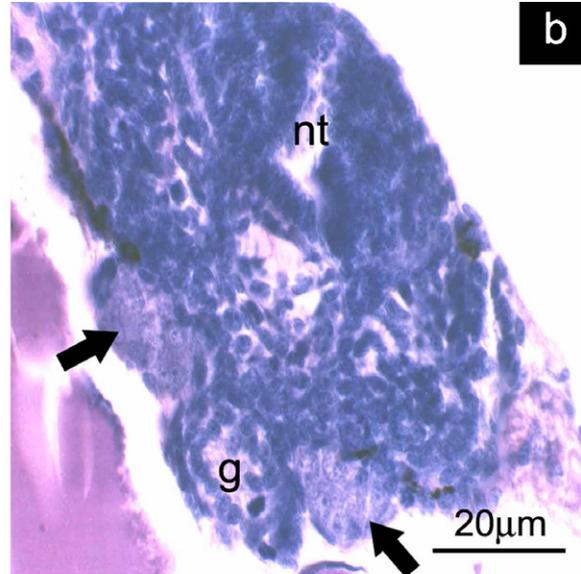
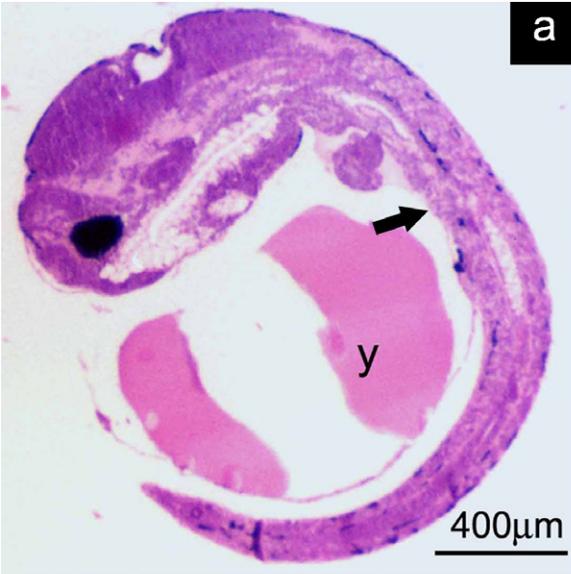
2.2. Histological studies

Embryos were placed in Stockard solution (formalin, glacial acetic acid, glycerine, distilled water, 5:4:6:85; Costello et al., 1957) for 48 h, then dechlorinated using fine tweezers and fixed in Bouin's solution for 30 min. Fry were killed in a 10 min exposure to a solution of 1% 2-phenoxyethanol (Sigma) and directly fixed in Bouin's solution for 2 h. Ovaries and testes were obtained from adult fish from May to December (10 females and 10 males each month), killed by immersion in freshwater containing 5% of 2-phenoxyethanol (Sigma) until death. The gonads were removed and fixed in Bouin's solution for 3 h. After washing and dehydration in increasing concentrations of alcohol series, the embryos, fry, and adult gonads were embedded in paraplast. Semiserial sections of $7\ \mu\text{m}$ thickness were stained with hematoxylin and eosin and mounted in Entellan (synthetic medium) (Ganter and Jolles, 1970). Sections were examined and photographed using an Olympus-Vanox light microscope. Measurements were carried out directly under the microscope using an ocular micrometer (E. Leitz 1/100 mm). Micrographs were taken using Ilford PANF-50 ASA film.

2.3. Ultrastructural studies

Ovulated oocytes and testes for scanning electron microscope analysis (SEM), were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 2 h at room temperature, dehydrated in acetone series, dried at the CO_2 critical point and coated with gold using a Pelco 90000 sputter-coater. Samples were examined with a JEOL JSM 25 S II scanning electron microscope. For transmission electron microscope studies (TEM), pieces of fresh ovaries were fixed overnight at 4°C in a solution of 4% paraformaldehyde and 2, 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7. Tissues were then washed six times in 0.1 M phosphate buffer and post-fixed in a 1% solution of osmium tetroxide prepared in phosphate buffer, pH 7.4, for 1 h and 30 min. After six washes in phosphate buffer, dehydration was accomplished in an increasing acetone series with a final wash in 100% acetone. The samples were included in araldite (Durcupan ACM, Fluka). Gold and silver sections obtained from a RMC MT-X ultramicrotome were stained with uranyl acetate followed

Fig. 2. Gonadal differentiation: embryonic stages (hematoxylin and eosin). (a) Longitudinal section of 3 weeks post-fertilization embryo: arrow: gonadal primordia area; y, yolk. (b) Transverse section of gonadal primordia in the same stage: arrows, gonadal primordia; g, gut; nt, neural tube. (c) Thirty days post-fertilization embryo showing gonadal type I (arrow). Germ cells undergoing mitosis are recognized by basophilic nuclei with condensed chromatin: g, gut; n, notochord; square, high magnification of a germ cell arriving to the developing gonad. (d) Thirty days post-fertilization embryo showing gonadal type II (arrow): y, yolk; g, gut. (e) Pre-hatching embryo: developing ovary (arrow); n, notochord; square, high magnification of the gonad; star, oogonia population; arrowhead, chromatin nucleolar stage oocytes; arrow, perinucleolar stage oocytes. (f) Pre-hatching embryo: presumptive male; arrow: undifferentiated gonad.



by lead citrate standard conditions. Observations were made with a JEOL JEM-1010 transmission electron microscope.

Stages of embryonic development were determined in relation to post-fertilization time and morphological features. Stages of oocyte maturation and testicular organization were defined according to Wallace and Selman (1981) and Grier (1981), respectively.

3. Results

3.1. Gonadal differentiation

About 3 weeks post-fertilization, *A. charrua* embryos ($n=36$) occupied more than a half the distance around the yolk, the eyes were slightly pigmented, few blood cells were circulating, and otic vesicles contained no otholiths. Paired gonad primordia were observed dorso-laterally to the gut and ventrally to the notochord in the mid region of the embryo's antero-posterior axis (Fig. 2a and b). They consisted of clusters of germ cells with no signs of differentiation that were surrounded by flattened somatic cells (undifferentiated stage) (Fig. 2b). Germ cells were recognized based on their morphological features: round shape, large cell size (12 ± 2 , $5 \mu\text{m}$), high nucleus/cytoplasm ratio, darkly stained nucleoli, and hyaline cytoplasm (Fig. 2b and c).

Thirty days post-fertilization, embryos ($n=43$) were fully extended around the perimeter of the yolk, the eyes were heavily pigmented, blood circulation was apparent and contained many blood cells, otic vesicles possessed two otholiths, and few melanophores were scattered over the body. At this stage, two kinds of gonadal tissue were observed in different individuals. Gonadal tissue type I consisted of two different populations of germ cells. One type of cell exhibited morphological characteristics resembling undifferentiated germ cells as described in the previous stage whereas the other type (cells showing basophilic nuclei with condensed chromatin) was undergoing mitosis (Fig. 2c). Gonadal tissue type II showed fewer cells and all of them had characteristics similar to those observed in the undifferentiated stage (Fig. 2d).

In pre-hatching embryos (about 38 days post-fertilization, $n=42$), the tip of the tail touched the margin of the eyes and the skin was darkly pigmented. Some individuals had a true developing ovary in which oogonia and pre-vitellogenic oocytes were observed. Oogonia showed large euchromatic nuclei and scarce cytoplasm (some of them undergoing mitosis). Early meiotic oocytes presented nuclei with thin chromatin strands while chromatin nucleolar-stage oocytes were identified by having scarce cytoplasm and eccentric basophilic nucleus. Perinucleolar-stage oocytes were

characterized by the occurrence of peripheral nucleoli and basophilic cytoplasm (Fig. 2e). Other individuals presented germ cells in a morphological undifferentiated state; these were classified as presumptive males (Fig. 2f).

At hatching (at least 98 days post-fertilization, $n=40$) and 7 days post-hatching ($n=10$), the ovaries had increased in size, exhibited the same cell populations as the previous stage (Fig. 3a), and showed an antero-posterior gradient of sex differentiation (data not shown). The presumptive testes remained undifferentiated (Fig. 3b). In fry of 30 days post-hatching ($n=15$), the ovaries mostly consisted of perinucleolar stage oocytes (Fig. 3c). In other individuals of the same age, true developing testes containing meiotic spermatocyte cysts were found (Fig. 3d).

In juveniles (45 days post-hatching, $n=10$), some individuals had ovaries showing the pre-vitellogenic oocyte types described above and putative cortical-alveolar stage oocytes. These oocytes are bigger than the perinucleolar stage oocytes and presented putative cortical alveoli. The ovaries also showed vitellogenic oocytes (Figs. 3e and 4a). Other individuals had testes in which all the cellular stages of spermatogenesis were seen, including free spermatozoa (Fig. 3f). Vitellogenic oocytes and spermatogenic stages are described below.

3.2. Morphology of the adult gonads

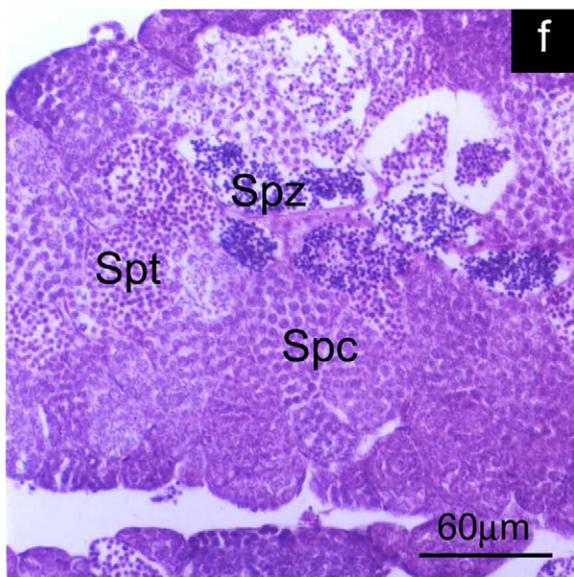
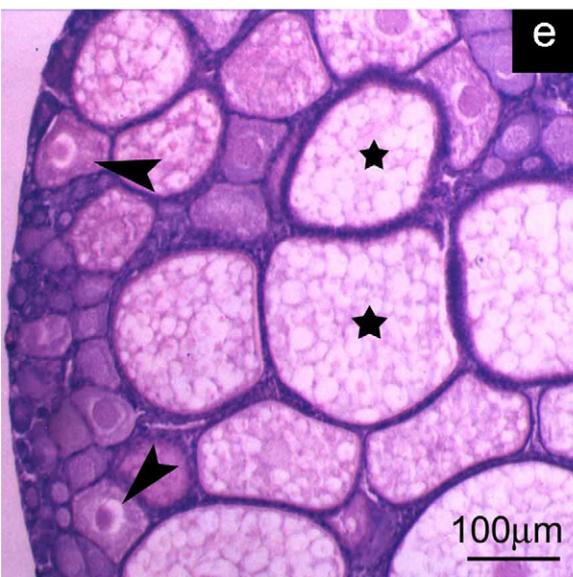
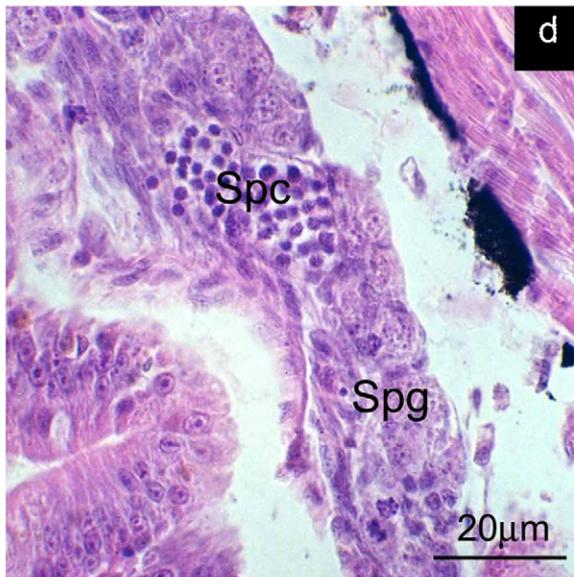
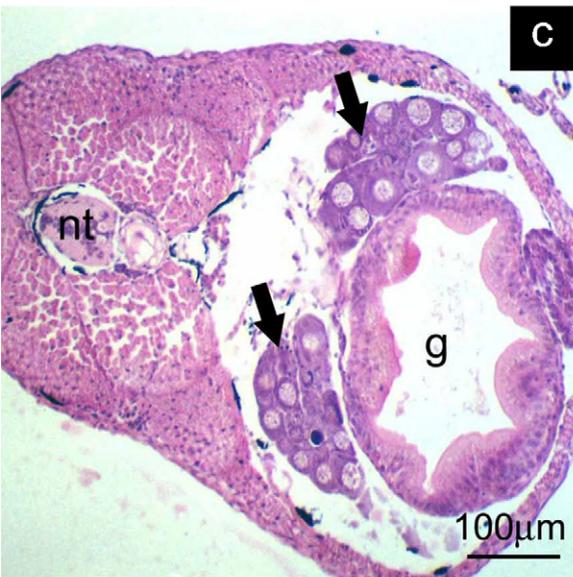
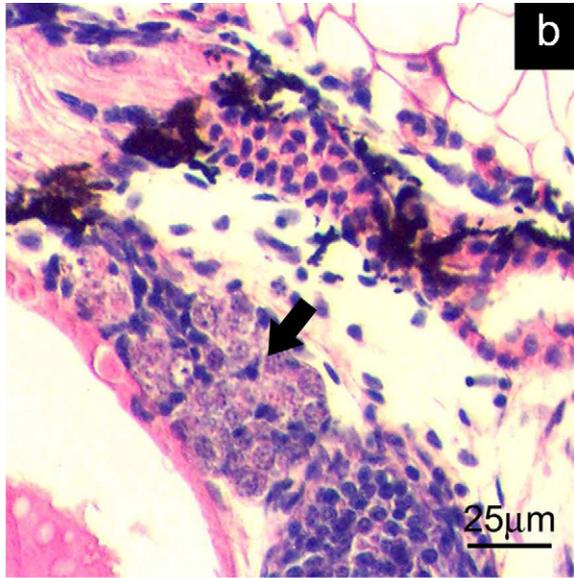
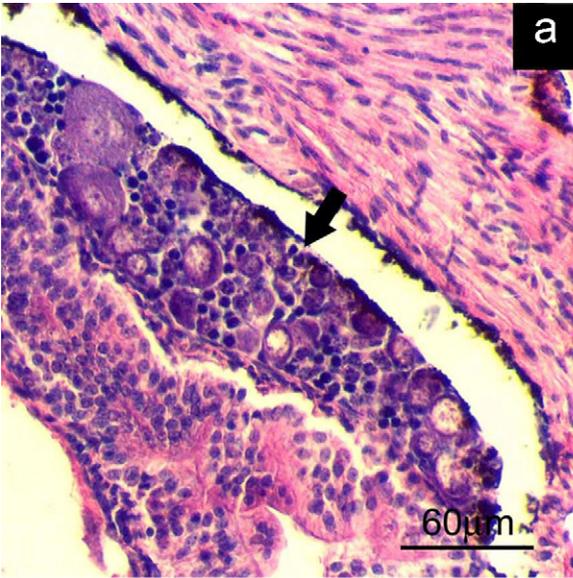
3.2.1. Female

The female reproductive system of *A. charrua* consisted of two elongated ovaries (7–12 mm long) covered by a pigmented visceral peritoneum and attached to the dorsal body wall by a mesovarium. The ovaries were located ventrally to the swim bladder and dorsally to the gut. The ovarian wall consisted of smooth muscle fibres and connective tissue. The ovarian parenchyma consisted of different kinds of developing follicles that almost filled the entire organ. Among the follicles, particularly central in the gonad, we found ducts of different diameter that exhibited a stratified and folded epithelium. Neither an ovarian cavity nor ovigerous lamellae were observed.

Female germ cells were classified into four groups: oogonia, pre-vitellogenic, vitellogenic, and fully grown oocytes according to their size, nuclear and cytoplasmic morphology, and presence and structure of the vitelline envelope. All stages were observed from sexual maturation (May) to senescence (December).

The oogonia were the smallest germinal cells and they were grouped in clusters (data not shown). The pre-vitellogenic oocytes generally were found in the periphery of the ovary. They were associated with follicle cells in the

Fig. 3. Gonadal differentiation: post-hatching stages (hematoxylin and eosin). (a) Hatching day fry: arrow, ovary. (b) Hatching day fry: arrow, presumptive testis. (c) Thirty days post-hatching fry: arrows, ovaries; g, gut; nt, neural tube. (d) Thirty days post-hatching fry: Spg, spermatogonia; Spc, spermatocyte cysts. (e) Forty-five days post-hatching juvenile: arrowheads, putative cortical-alveolar stage oocytes; star, vitellogenic oocytes. (f) Forty-five days post-hatching juvenile: Spc, spermatocytes; Spt, spermatids; Spz, spermatozoa.



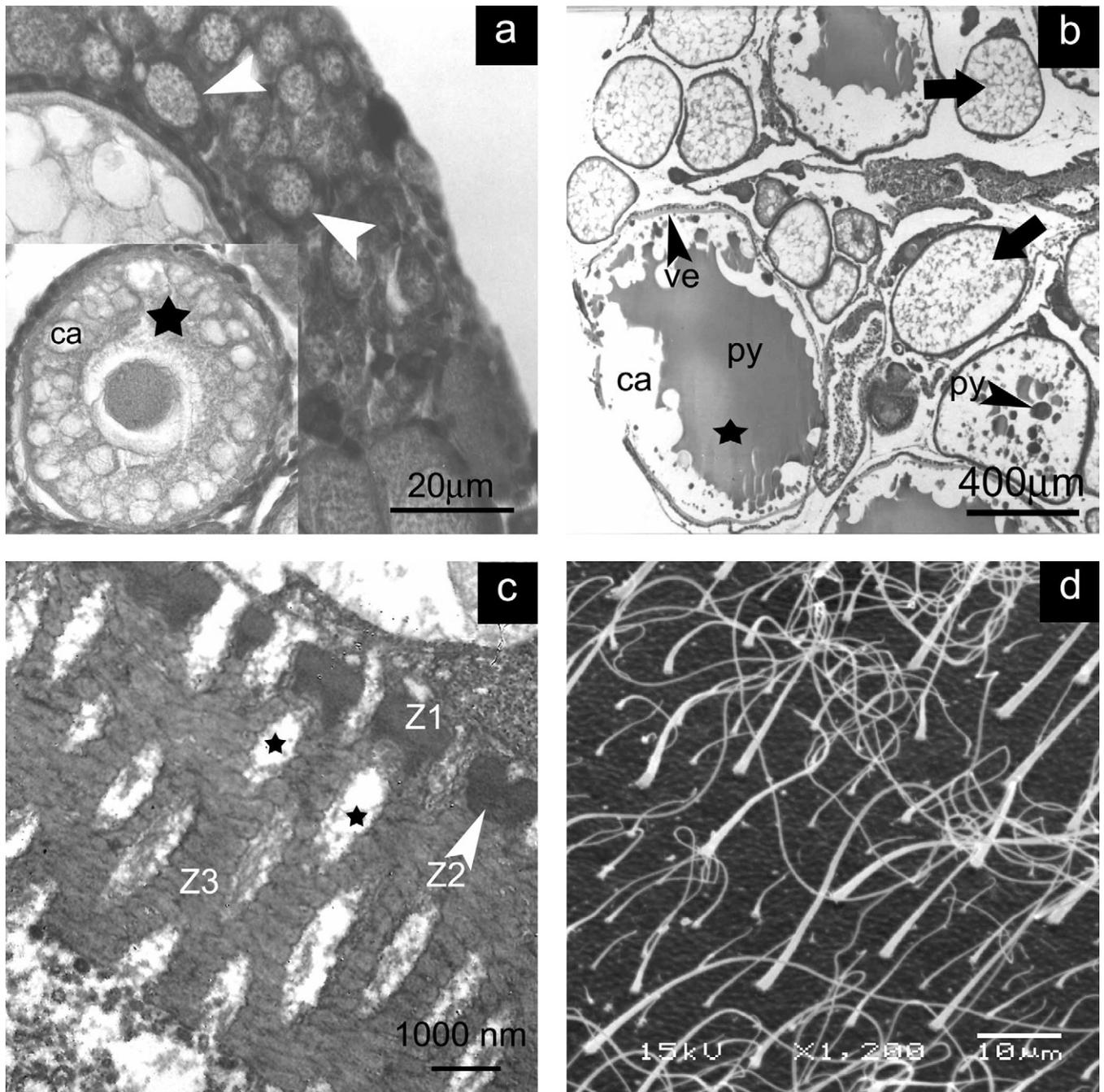
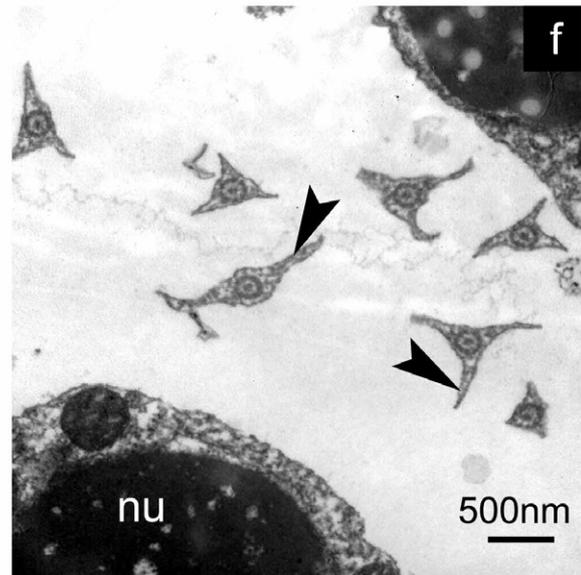
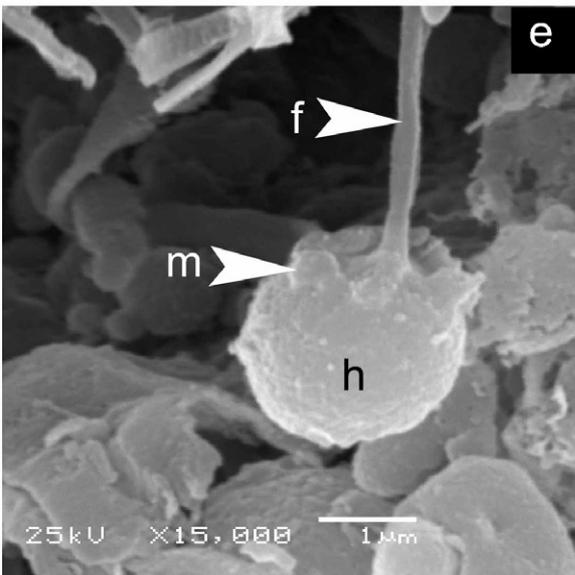
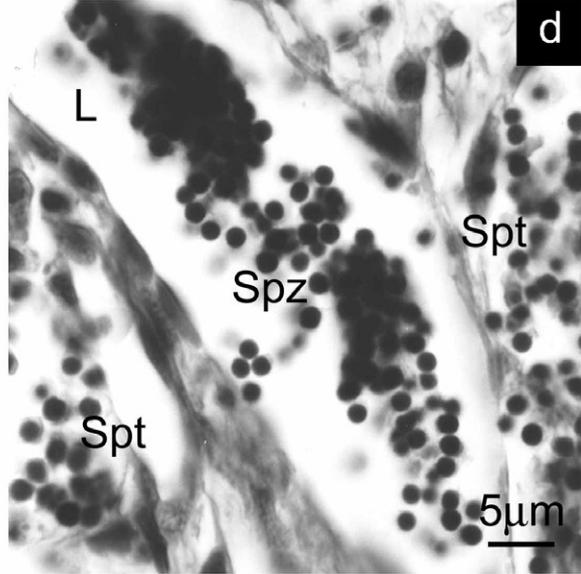
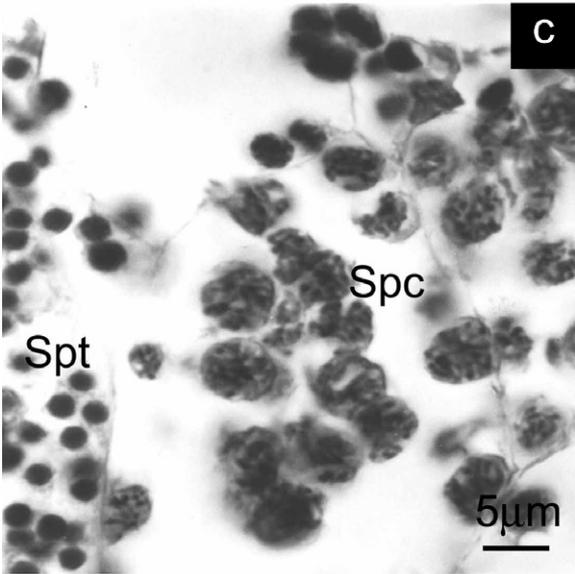
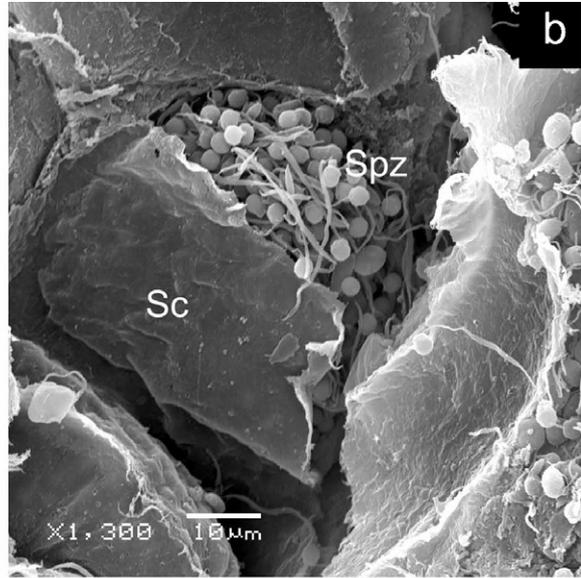
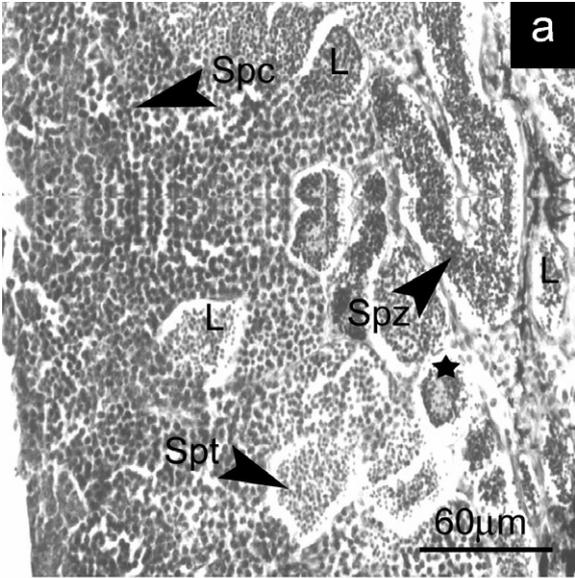


Fig. 4. Morphology of the adult gonads: ovaries. (a) Pre-vitellogenic oocytes: arrowheads, perinucleolar stage oocytes; star, putative cortical alveolar stage oocytes; ca, putative cortical alveoli (hematoxylin and eosin). (b) Vitellogenic oocytes (arrows) and fully grown oocyte (star); ve, vitelline envelope; py, protein yolk; ca, putative cortical alveoli (hematoxylin and eosin). (c) Ultrastructure of vitelline envelope: Z₁, zona radiata externa; Z₂, middle layer; Z₃, zona radiata interna; stars, channels (TEM). (d) Vitelline envelope surface showing the two kinds of filaments (SEM).

Fig. 5. Morphology of the adult gonads: testes. (a) Transverse section of testicular lobules showing cysts. Each cyst contained germ cells in the same stage of spermatogenesis. At left, testis periphery; at right, testis central zone; L, lobule; Spc, spermatocytes; Spt, spermatids; Spz, free spermatozoa; star, packed spermatozoa (hematoxylin and eosin). (b) Packed spermatozoa within a cyst: Spz, spermatozoa; Sc, Sertoli cell (SEM). (c) High magnification of a spermatocyte cyst (Spc): Spt, spermatids (hematoxylin and eosin). (d) High magnification of spermatozoa (Spz) and spermatids (Spt) cysts: L, lobule (hematoxylin and eosin). (e) Sperm surface: h, spherical head; m, mitochondria; f, flagellum (SEM). (f) Sperm tail lateral fins (arrowheads): nu, nucleus (TEM).



ovarian follicle and had a high nucleus/cytoplasm ratio. At the end of this stage, the oocytes were characterized by the presence of putative cortical alveoli beneath the cell membrane (Fig. 4a). Vitellogenic oocytes undergo successive stages during oogenesis. First, the cytoplasm had big vacuoles that appeared empty with the staining techniques used. The nucleus still showed several nucleoli in the periphery (data not shown). Subsequently, a fine granular acidophilic material began to accumulate among the vacuoles and progressively fused to form the yolk. Between the cell membrane of the oocyte and the follicle cells, the vitelline envelope was observed. Finally, fully grown oocytes were the largest cells and showed a large amount of acidophilic yolk fluid filling the cytoplasm. The putative cortical alveoli were visible without colour with the staining techniques used and the nucleus appeared displaced to one pole of the oocyte (data not shown). At this stage, there were no morphological changes related with the process of hydration (Fig. 4b).

The vitelline envelope showed radial striation and its thickness gradually increased to $6.0\ \mu\text{m}$ (± 1.0) for fully grown oocytes. TEM analyses of ovulated oocytes showed a vitelline envelope consisting of three layers: a zona radiata externa, formed by a homogeneous electron dense layer (Z_1), a middle electron-denser layer (Z_2), and a heterogeneous electron-dense zona radiata interna (Z_3). The latter was the widest and the last to appear during the deposition process. The entire vitelline envelope was crossed by channels (Fig. 4c). SEM analyses revealed a rough outer surface (sticky *in vivo*) that was ornamented by dense hair-like filaments. Based on their thickness and regular organization two kinds of filaments were recognized. Thick and thin filaments had an overall cone-shaped morphology (Fig. 4d).

3.2.2. Male

The male reproductive system consisted of a pair of elongated testes, triangular in transverse section, located between the swim bladder and the gut. They were covered by a darkly pigmented visceral peritoneum and both were connected with the genital papilla by a common deferent duct. The parenchyma was organized in lobules limited externally by a basal membrane. Within the lobules, spermatogenesis occurred in cysts. Among lobules, a vascular interstitial connective tissue and Leydig-like cells were observed. Lobules extended from the periphery to the central region of the gonad where they opened in a network of deferent ducts (Fig. 5a).

Within the lobule, each cyst consisted of clusters of germ cells in the same stage of spermatogenesis surrounded by Sertoli cells (Fig. 5b). Five spermatogenic stages were identified according to germ cell size and nuclear and cytoplasm characteristics: spermatogonia, spermatocytes I and II, spermatids, and sperms. All spermatogenic cysts were observed from sexual maturation (May) to senescence (December).

Spermatogonia were the largest cells and they were round cells with fine granular chromatin. They were located at the blind boundaries of the lobules at the periphery of the testis (data not shown). The morphology of the nuclei of spermatocytes

decreased in size as the cell proceeds through meiosis. Spermatids showed a small amount of acidophilic cytoplasm and a rounded nucleus with increasing chromatin condensation during spermiogenesis. Light microscopy analyses showed sperm packed in cysts and also free in the lumen of the deferent duct (Fig. 5a, c and d). In SEM and TEM analyses, the sperm exhibited a spherical head ($3.8 \pm 0.5\ \mu\text{m}$ diameter), a midpiece containing round mitochondria arranged in a single layer, and a flagellar tail. The tail had two, three, or four short lateral fins along almost the entire length (Figs. 5e and f).

4. Discussion

Gonadal differentiation, determination of sexual strategy, and gametogenesis have not previously been reported for annual fishes. These fish exhibit differences in timing of developmental stages and hatching (Wourms, 1972a; Lesseps et al., 1975; Van Haarlem, 1983). In addition, the possibility to undergo diapauses of variable length (Wourms, 1972c) increases their developmental asynchrony. Considering this developmental variability *A. charrua* embryos were classified using time post-fertilization in association with morphological features.

4.1. Sex differentiation

Previous studies showed that presence of gonadal structures (i.e., ovarian cavity and efferent duct formation), difference in germ cell number, and female precocious meiosis are valid criteria to determine gonadal sex at an early phase in development. However, which is the most reliable criterion varies depending on the studied species. A safe generalization is that, for most teleosts, germ cells in putative ovaries outnumbered those in putative testes (reviewed by Nakamura et al., 1998; Strüssman and Nakamura, 2002). Using the difference in germ cell number criterion, we observed the first evidence of histological sex differentiation in embryos at 30 days post-fertilization in *A. charrua*.

Sex differentiation has been shown to occur at different post-hatching times beginning earlier in females than in males in most gonochoric teleosts examined to date (reviewed by Nakamura et al., 1998; Strüssman and Nakamura, 2002). However, in *O. latipes* (Beloniformes, the sister Order to Cyprinodontiformes) and *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes) germ cells proliferate at a higher rate in presumptive ovaries during pre-hatching stages (Hamaguchi, 1982; Koya et al., 2003). This characteristic was also found in *A. charrua*.

Different sexual strategies are found among teleost fishes, ranging from species where testes and ovaries are in separate individuals (gonochorism) to species containing functional male and female tissues in the same individual (synchronous hermaphroditism) (reviewed by Devlin and Nagahama, 2002). Even among gonochorists, Yamamoto (1969) identified two patterns of gonadal development. In the

“differentiated” type, the early gonads directly develop into a testis or ovary whereas in the “undifferentiated” type the early gonads first pass through an ovary-like stage. By definition, transient occurrence of intersex gonads is not present in the differentiated gonochorists; sporadic intersexes would appear only in “undifferentiated” gonochorists (Yamamoto, 1969; Strüssman and Nakamura, 2002). Our histological analyses of gonadal differentiation from 3 weeks post-fertilization embryos to adults showed neither 100% ovary-like stage nor intersex gonads in the 341 individuals examined. Therefore, we conclude that *A. charrua* sexual strategy corresponds to a “differentiated gonochoric” pattern.

4.2. Adult gonads

Morphology of the gonads has traditionally been used to identify annual reproductive cycles, onset of reproductive maturity, spawning rhythms, and various other aspects of the reproductive biology. Histological analysis is considered an accurate method to determine the reproductive pattern in teleosts (Parenti and Grier, 2004).

A. charrua, spawn daily from the time they reach sexual maturity until senescence. Oocytes and spermatogenic cysts in all different stages of development were observed during the breeding months. These observations are in agreement with an asynchronous spawning pattern for females (reviewed by Wallace and Selman (1981)) and a continuous spawning for males.

Another aspect related to spawning is how ovulated oocytes are released to the environment. The different diameter ducts found in *A. charrua* accord with the description of an ovarian duct network that opens into a hollow structure, namely “oocyte chamber”, for this and other *Austrolebias* species. Since this “oocyte chamber” contained ovulated oocytes it was suggested that it could function as an oocyte storage compartment (Pereiro, personal communication). This structure seems to be similar to the “ovisac” described in the non-annual cyprinodontid *Fundulus heteroclitus* (Brummett et al., 1982).

The histological organization of the testes of *A. charrua* corresponds to the restricted lobular pattern because spermatogonia are confined to the distal end of the lobules (Grier, 1981). Fishes belonging to the Series Atherinomorpha (which include Cyprinodontiformes) uniquely present this type of testis whereas the unrestricted pattern (spermatogonia occurring along the testicular lobules) is present in most teleosts.

The main cellular aspects of gametogenesis in *A. charrua* can be summarised as: first, during vitellogenesis, the yolk appears as small globules that continuously fuse. This process of deposition results in a fluid mass that occupies almost entirely the mature oocyte. This supports the unique fluid yolk character previously identified for Atherinomorpha (Parenti and Grier, 2004). These authors attribute phylogenetic value to this condition that, along with the restricted spermatogonial pattern, appears to be unique derived characters for Atherinomorpha. Second, the eggs of *A. charrua* are laid in the

bottom mud (i.e., demersal condition). The lack of hydration and the ultrastructure of the outer surface of the vitelline envelope containing sticky and adhesive hair-like filaments accord to their demersal condition. The description of the ultrastructure of the vitelline envelope for *A. charrua* shows a trilaminar organization similar to the envelopes previously described for other ovipary fish species (Guraya, 1986; Berois et al., 2007). However, this vitelline envelope exhibit morphological differences at the inner zone (Z_3) when compared with other closely related species of *Austrolebias* (Casanova et al., unpublished). Finally, the main characteristics of *A. charrua* sperm were described. As in other teleostean fishes with external fertilization, this species presents the typical uniflagellate anacrosomal aquasperm (Jamieson, 1991). Current studies in sperm morphology comparing related species of *Austrolebias* suggest differences at ultrastructural level. These differential traits could be proposed as a useful tool for phylogenetic studies (Casanova et al. in preparation).

Considering that *A. charrua* inhabits the “Bañados del Este”, a Uruguayan area declared a Biosphere Reserve Area (UNESCO, 1976) and that the present study establishes base line data regarding sex differentiation under laboratory conditions, this species may represent a useful taxon to monitor the effects of contamination in a protected area.

Acknowledgments

The authors wish to thank MSc. Gabriela Casanova and Br. Alvaro Olivera for their technical support (TEM). We are grateful for the suggestions and improvements made by the reviewers of the Tissue & Cell. The financial support was provided by Facultad de Ciencias and PEDECIBA (Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas), Universidad de la República.

References

- Arenzon, A., Pinto, R.F., Colombo, P., Raya-Rodriguez, M.T., 2003. Assessment of the fresh water annual fish *Cynopocilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environ. Toxicol.* 22, 2188–2190.
- Arezo, M.J., Pereiro, L., Berois, N., 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *J. Fish Biol.* 66, 1357–1370.
- Arukwe, A., Goksøyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp. Hepatol.* 2, 4.
- Berois, N., Arezo, M.J., Chalar, C., Brauer, M.M., Barros, C., 2007. Ultrastructure and protein composition of the oocyte envelope in the whitemouth croacker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Sciaenidae, Perciformes). *J. Appl. Ichthyol.* 23, 34–39.
- Brummett, A.R., Dumont, J.N., Larkin, J.R., 1982. The ovary of *Fundulus heteroclitus*. *J. Morphol.* 173, 1–16.
- Costa, W.J.E.M., Cheffe, M.M., 2001. Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Lagoa Dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (AHL) (Cyprinodontiformes: Rivulidae) *Commun. Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Sér. Zool., Porto Alegre* 14, 179–200.

- Costello, D.P., Davidson, M.E., Eggers, A., Fox, M.H., Henley, C., 1957. Methods for Obtaining and Handling Marine Eggs and Embryos. Marine Biological Laboratory, Lancaster Press Inc., Woods Hole, Massachusetts, Lancaster, Pennsylvania, pp. 15 and 1–124.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- Ganter, P., Jolles, G., 1970. *Histochimie Normale et Pathologique*. Gauthier-Villars, Paris.
- Grier, H.J., 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21, 345–357.
- Guirya, S., 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. *Monogr. Dev. Biol.* 18, 1–233.
- Hamaguchi, S., 1982. A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res.* 227, 139–151.
- Jamieson, B.G.M., 1991. *Atherinomorpha. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 195–214.
- Koya, Y., Fujita, A., Niki, F., Ishihara, E., Piyama, H., 2003. Sex differentiation and puberty development of gonads in the viviparous mosquitofish *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.* 20, 1231–1242.
- Lesseps, R.J., Geurts van Kessel, A.H.M., Denuce, J.M., 1975. Cell patterns and cell movements during early development of an annual fish *Nothobranchius neumanni*. *J. Exp. Zool.* 193, 137–146.
- Myers, G.S., 1952. Annual fishes. *Aquar. J.* 23, 125–141.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 28, 362–372.
- Parenti, L.R., Grier, H.J., 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bone fishes. *Integ. Comp. Biol.* 44, 333–348.
- Strüssman, C.A., Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol.* 26, 13–29.
- UNESCO, 1976. The MAB Programme. UNESCO – MAB Biosphere Reserves Directory. <http://www.unesco.org/mabdb/br/brdir/directory/biores.asp?code=URU+01&mode=all>.
- Van Haarlem, R., 1983. Early ontogeny of the annual fish genus *Nothobranchius*. Cleavage plane orientation and epiboly. *J. Morphol.* 176, 31–42.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21, 325–343.
- Wourms, J.P., 1964. Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* (Hilgendorf) and *Aplocheilichthys pumilis* (Boulenger) with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in teleost fishes. Annual Report. E. Afr. Freshwat. Fish. Res. Organ. Appendix H, pp. 68–73.
- Wourms, J.P., 1967. Annual Fishes. *Methods in Developmental Biology*. Wilt F. H. and Wessels, N. Thomas and Crowell Company, New York, pp. 123–137.
- Wourms, J.P., 1972a. The developmental biology of annual fishes I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *J. Exp. Zool.* 182, 143–168.
- Wourms, J.P., 1972b. The developmental biology of annual fishes. II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomeres during the development of annual fish eggs. *J. Exp. Zool.* 182, 169–200.
- Wourms, J.P., 1972c. The developmental biology of fishes. III. Pre-embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* 182, 389–414.
- Yamamoto, T., 1969. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Sex differentiation. Fish Physiology*, vol. III. Academic Press, New York, pp. 117–175.