

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE *amh*
DURANTE EL PERIODO DE DIFERENCIACION
DEL SEXO EN EL ESTURION SIBERIANO:
*Acipenser baerii***

TESISTA
Santiago Di Landro Francis

ORIENTADORA
Dra. Denise Vizziano Cantonnet

**Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces.
Instituto de Biología. Facultad de Ciencias.**



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudio de la expresión de la *amh* durante el
período de diferenciación del sexo en el esturión
siberiano, *Acipenser baerii***

Santiago Daniel Di Landro Francis

Denise Vizziano Cantonnet

*Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces,
Facultad de Ciencias, UdelaR*

Tribunal

Dra. Gabriela Bedo

Dra. Daniella Agrati

Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Agosto de 2014

Algunos agradecimientos:

Quisiera agradecerle a la Dra. Denise Vizziano Cantonnet por permitirme desarrollar y orientarme en este trabajo de Licenciatura así como también a Anabel Martínez y Claudio Pérez por haber compartido su conocimiento y afecto durante el desarrollo de esta Tesis. También agradecerle al Ec. Facundo Márquez gerente de Estuarios del Plata por colaborar con el FREP en el estudio del esturión y especialmente al Doctor Veterinario Andrés Ryncowski por su generosidad durante los muestreos. Haber podido culminar esta etapa en Facultad de Ciencias también se lo debo a mis amigos y compañeros que me han acompañado a lo largo de la carrera así como también a mi familia y novia por apoyarme en todo momento.

Resumen

Introducción: En peces el rol de la hormona anti-Mülleriana (*amh*) en el proceso de diferenciación sexual del macho no es bien comprendido. Para determinar si la *amh* puede estar involucrada en el proceso de diferenciación del sexo del *Acipenser baerii* se amplificó y caracterizó el transcrito para poder estudiar la expresión antes y después del período de diferenciación.

Materiales y Métodos: Se amplificó la *amh* a partir de testículos inmaduros utilizando cebadores heterólogos diseñados sobre la secuencia de una especie cercana (*Acipenser fulvescens*). La secuencia nucleotídica obtenida fue verificada mediante *blastn* y *blastx*, del NCBI y el análisis filogenético se realizó usando secuencias proteicas de *amh* de peces y tetrápodos encontradas en Ensembl. Para la caracterización tisular se determinó la expresión de *amh* en gónada, y en 10 tejidos más. El análisis histológico y de expresión fue realizado en gónadas de 3, 4, 8, 9, 10, 11, y 14 meses.

Resultados y discusión: Caracterizada a nivel filogenético, se demostró que además de la gónada la *amh* es bien expresada en branquia, hígado y cerebro. Durante el desarrollo gonadal, *amh* experimenta un patrón de expresión bimodal presentando los mayores niveles en dos momentos: a) durante el período indiferenciado; y b) durante la gametogénesis temprana, donde se observa una expresión diferencial respecto al sexo ($p < 0.05$) que más tarde se pierde.

Conclusión: Los resultados sugieren que la vía de diferenciación masculina es precedida por un aumento en la expresión de *amh* al igual que se describe en peces teleósteos, con una posible implicancia en la regulación de la gónada ya diferenciada.

Índice

Introducción

Los Esturiones: *Acipenser baerii* – Acuicultura, Página 7

Determinación y diferenciación del Sexo, Página 10

Diferenciación sexual de la gónada, Página 12

Algunos antecedentes, Página 13

¿Por qué la hormona anti-Mülleriana?, Páginas 16

Expresión de AMH durante el desarrollo del testículo y ovario, Página 16

Expresión de AMH durante el periodo de diferenciación del sexo gonadal, Página 20

Hipótesis de trabajo, Página 24

Materiales y métodos

Animales Experimentales, Página 24

Histología, Página 26

Extracciones de ARN y transcripción reversa, Página 26

Pureza y calidad del ARN, Página 27

Síntesis de ADN copia, Página 28

Diseño de cebadores para amplificar amh, Página 34

Cebadores heterólogos, Página 34

Amplificación de amh, Página 35

Caracterización filogenética, Página 36

Expresión relativa de *amh* por PCR cuantitativa, Página 37

Puesta a punto de la reacción, Página 37

Expresión relativa de *amh*, Página 40

Análisis estadístico, Página 41

Transcriptómica de la gónada del esturión siberiano, Página 41

Resultados

Estudio morfológico de la gónada e identificación del período de diferenciación sexual, Página 42

Amplificación y validación de una secuencia parcial de ARNm de la *amh* , Página 48

Análisis filogenético de la secuencia parcial del ARNm de *amh* Página 49

Caracterización tisular de la expresión de *amh*, Página 51

Expresión de *amh* durante el desarrollo gonadal , Página 51

Expresión individualizada de *amh* durante el período indiferenciado, Página 53

Expresión de *amh* en machos y hembras durante el período diferenciado, Página 54

Secuenciado masivo (NGS), Página 56

Discusión, Página 58

Introducción

Los Esturiones: *Acipenser baerii* - Acuicultura

Los Peces, definidos como todos los descendientes del ancestro común de los vertebrados a excepción de los tetrápodos, conforman el grupo más numeroso de vertebrados (Nelson 2006). De las casi 28.000 especies vivientes descritas el 95 % son peces óseos; las restantes se agrupan en peces sin mandíbula y tiburones cartilaginosos (Volf 2005).

Formando parte de los peces óseos, los *Acipenseriformes* son actinopterigios primitivos que han existido desde al menos 200 millones de años y conforman un grupo monofilético derivado de los peces “paleonisciformes” (un grado de actinopterigios no-neopterygios primitivos según Gardiner 1993) vía reducción paedomórfica del esqueleto (esto quiere decir que el adulto mantiene característica larvaria) y la especialización del sistema de alimentación (Bemis et al 1996).

Dentro de los *Acipenseriformes* se han descrito cuatro familias, dos extintas (*Chondrosteidae* y *Peipiaosteidae*) y dos aún existentes (*Polyodontidae* y *Acipenseridae*). Considerando la localización geográfica de los primeros, se sugiere como el lugar y momento más plausible para el origen de los *Acipenseriformes* el oeste de Europa en el Triásico, cuando aún estaba formado el supercontinente Pangea. Posteriormente, durante el Jurásico tardío y Cretácico temprano el orden habría experimentado una diversificación hacia Asia Central en concordancia con la gran diversidad actual de especies encontrada en la región comprendida entre el mar Negro

y el mar Caspio, y la más tardía aparición en Norteamérica en el Cretácico tardío (Bemis et al 1996; Bemis & Kynrad 1996).

La familia Acipenseridae (Bonaparte 1831) se compone de los géneros *Huso*, *Scaphirhynchus*, *Pseudoscaphirhynchus* y *Acipenser*, que se caracteriza por ser el vertebrado más antiguo en la escala evolutiva en compartir con mamíferos y aves el modo en que se desarrollan sus conductos de Müller (Wrobel 2003). El esturión Siberiano *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) especie modelo en la presente tesis, ampliamente distribuída en los ríos de Siberia y el Océano Ártico en sus orígenes (Bemis & Kynrad 1996), en la actualidad encuentra su población salvaje restringida (más del 80% del total) a la cuenca del río Ob de aproximadamente unos 2.972.497 km² (Chen 2007) considerándose una especie amenazada (CITES, 1998). Por otra parte, siendo una de las especies que generan el caviar más cotizado a nivel comercial (caviar negro), su producción acuícola se ha intensificado en los últimos 12 años (FAO) siendo cultivado actualmente en un gran número de países (Gisbert & Ruban 2003) incluyendo al Uruguay donde existen a la fecha dos emprendimientos piscícolas de cultivo intensivo y superintensivo.

Los esturiones son especies gonocóricas donde los casos de inter-sexo son considerados patológicos y suceden en baja frecuencia (Rzepakowska et al 2014). El tiempo al que aparecen los primeros signos de diferenciación morfológica de la gónada es variable: desde 4 meses post eclosión en *Acipenser baerii* (Rzepakowska & Ostaszewska 2013) hasta poco menos de 18 meses en *Acipenser transmontanus*

(Doroshov et al 1997). Más allá de estas variaciones, incluso en una misma especie bajo distintas condiciones ambientales de cría se han registrado tiempos distintos (revisado por Rzepkowska Ostaszewska 2013), si se los compara con otras especies de interés comercial por ejemplo *Oncorhynchus mykiss* donde a los 63 días post eclosión se puede reconocer el testículo de la gónada en (Vizziano et al 2007) es tardío. Dado que no existe dimorfismo sexual fiable (Williot 2011) y en condiciones de acuicultura estos peces alcanzan la madurez sexual en el entorno de los 7 - 8 las hembras y 3 - 4 años los machos (Billard & Lecointre 2001), surge de las granjas de cultivo orientadas a la producción de caviar gran interés en generar poblaciones monosexo hembra (Yamazaki 1983) o disponer de un método confiable que permita distinguir los sexos cuando la gónada se encuentre aun morfológicamente indiferenciada; ya que hasta el momento los métodos más efectivos requieren de una gónada inmadura o en gametogénesis para el reconocimiento de los sexo. Estos métodos son la cirugía con biopsia, ecografía o ultrasonografía (Williot 2011).

Las poblaciones monosexo hembra podrían producirse mediante manipulación cromosómica o tratamiento hormonal al igual que se ha alcanzado en otras especies de interés comercial (Pandian & Sheela 1995). La otra alternativa es el sexado temprano de los ejemplares que podría realizarse utilizando marcadores moleculares del sexo. Uno de esos marcadores puede ser el gen determinante del sexo, siempre y cuando el mismo se encuentre restringido al genoma de uno de los sexos.

Determinación y diferenciación del Sexo

A la fecha, además de conocerse el gen que determina el sexo en mamíferos placentarios: *SRY* (Sinclair et al, 1990); en aves: *Dmrt1* (Smith et al 2009) (aunque desde antes es cuestionado Nakagawa 2004), en el anfibio *Xenopus laevis* *DmrtW* (Yoshimoto et al 2008) y recientemente el sugerido *amhY* para monotremas (Cortez et al 2014); se han encontrado 5 genes determinantes del sexo en peces con una variabilidad interespecífica importante: *dmrt1Y* en *Oryzias latipes* y *Oryzias curvinotus* (Matsuda 2002) pero no así en otras especies del género (Kondo et al. 2003; Veith et al. 2003); *gsdfY* en *Oryzias luzonensis* (Myosho et al 2012); *sdY* en *Oncorhynchus mykiss* (Yano et al 2012); *amhY* en *Odontesthes hatcheri* (Hattori et al. 2012) y *amhr2* en *Takifugu rubripes* (Kamiya et al 2012) todos Teleósteos.

Esta diversidad se cree que está asociada con la reinversión (turnover) de los cromosomas sexuales (eje fusión de un cromosoma sexual con un autosoma), que parecería ser más frecuente en peces (y otros poiquilotermos) que en los mamíferos placentarios y aves (Kikuchi & Hamaguchi 2013; Kitano & Peichel 2012)

Se ha visto que cuando el sexo no es determinado por factores ambientales (ESD) como temperatura (*Odontesthes bonariensis*, Strüssmann et al 1996), pH del medio (*Apistogramma* sp, Römer & Beisenherz 1996), o factores sociales (*Gobiodon erythrospilus*, Hobbs et al 2004) los sistemas de determinación genética del sexo encontrados en peces son varios, incluso pudiendo coexistir con sistemas de determinación ambiental (Yamamoto et al 2014). Pese a que la mayoría de los

cromosomas sexuales son homomórficos (Ohno 1974), lo que se ha propuesto como una de las causas posibles para la combinación viable de diferentes sistemas de cromosomas sexuales (Heule et al 2014), distintos procedimientos han permitido reportar sistemas de determinación monofactoriales (involucrando el gen determinante) con la hembra representando el sexo homogamético (XX/XY) o heterogamético (ZW/ZZ). También sistemas polifactoriales donde factores menores de determinación del sexo se encuentran distribuidos en varios cromosomas se han reportado (Devlin & Nagahama 2002).

Respecto al esturión siberiano, de genoma tetraploide $4n$ con 245 cromosomas, no es claro qué tipo de sistema de determinación del sexo posee, aunque se sugiere al igual que para otros del género un sistema donde cromosomas sexuales heterogaméticos determinan la hembra (ZZ/ZW) (Fopp-Bayat 2010).

Una posible estrategia para la búsqueda del gen determinante del sexo en el esturión, cuando no se dispone de marcadores fenotípicos y genotípicos (Wuertz et al 2006) ligados al sexo que permitan realizar un mapeo génico como el que permitió identificar el gen determinante *dmrt1Y* en *Oryzias latipes*, es una aproximación basada en la comparación del transcriptoma gonadal entre animales indiferenciados, hembras y machos que permita detectar genes potencialmente determinantes del sexo en la medida de que tengan un patrón de expresión diferencial durante el período de diferenciación molecular del sexo gonadal.

La presente tesis está enmarcada en un estudio de estas características el cual ha sido denominado “Estudio de la determinación del sexo en el esturión siberiano *Acipenser baerii* usando las nuevas metodologías de secuenciado masivo (NGS)” y actualmente es financiado por CSIC-Sector Productivo.

Pese a no depender de marcadores ligados al sexo, esta aproximación requiere de marcadores moleculares del sexo que permitan diferenciar de manera fiable la gónada morfológicamente indiferenciada como “en vía de diferenciación masculina” o “en vía de diferenciación femenina” partiendo de la base que existe un proceso de diferenciación molecular del sexo previo al morfológico (Vizziano et al 2007). La misma estrategia permitió identificar el gen determinante del sexo en trucha arcoíris *sdY* (Yano et al 2012), donde al disponer de poblaciones monosexo macho y hembra los marcadores del sexo únicamente fueron indispensables para determinar el inicio del período de diferenciación molecular también fundamental para este abordaje (Vizziano et al 2007; Cavileer et al 2009). Por lo que no solo para comprender la regulación del proceso de diferenciación de la gónada hacia el testículo en el esturión siberiano sino en vista del buen desarrollo del proyecto de investigación se puso como objetivo de esta tesis la búsqueda de un marcador molecular del desarrollo testicular.

Diferenciación sexual de la gónada

Mientras que el gen que desencadena el proceso de diferenciación del sexo gonadal (formación de un ovario o testículo a partir de la cresta gonadal) es variable,

los genes clave requeridos en el mecanismo que subyace al proceso se encuentran conservados entre los vertebrados aunque sus posiciones relativas en las cascadas moleculares difieran entre especies. (Cutting et al 2013; Piferrer & Guiguen 2008; Herpin & Schartl 2011). Dentro de los actores implicados en la diferenciación molecular del testículo, incluso entre vertebrados hay un grupo de genes conservados entre otros *dmrt1*, *sox9*, *dax1*, *sfi*, *fgf9*, *amh* (Bowles & Koopman 2001; Brennan & Capel 2004 Piferrer & Guiguen 2008).

Particularmente en los peces Teleósteos, fruto de la disponibilidad de poblaciones monosexo e información genética disponible, se han podido identificar como genes clave en la vía de diferenciación masculina a *Sox9*, *Dmrt1*, *Amh*, *Nr5a1* (*Sf1*), *NrOb1* (*Dax1*) y *Wt1* (Baron et al. 2005). Dentro de este grupo *dmrt1*, (Marchand et al 2000; Guan et al 2000), *sox9*, (Yokoi et al 2002; Zhou et al 2003; Vizziano et al 2007), *tbx1* (Yano et al 2011) entre otros, se encontraron sobre-expresados previo a la diferenciación masculina.

Algunos antecedentes

Los primeros estudios de la diferenciación molecular del testículo en *Acipenser baerii* fueron realizados usando genes candidatos elegidos de la literatura de peces teleósteos (Berbejillo et al 2012, 2013). En esos estudios se observa que en la peridiferenciación el *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar* y *lh* están sobre expresados en machos. Sin embargo en ese trabajo no se pudo identificar el período de

diferenciación molecular del sexo, porque en ese momento no se pudo acceder a animales durante el desarrollo temprano.

Los genes sugeridos como marcadores testiculares en peri-diferenciación del esturión corresponden a la hormona gonadotrópica de naturaleza glicoproteica (*lh*); a factores de transcripción (*dmrt1*, *sox9*), y a factores implicados en la síntesis y captación de esteroides sexuales (*star*, *cyp17a1*, *ar*).

En etapas tempranas del desarrollo del *Acipenser baerii* aún no hay estudios expresión ni estudios bioquímicos que indique actividad esteroidogénica. Sin embargo en otra especie del género (*Acipenser transmontanus*) se demostró la presencia de esteroides sexuales maternos en el ovulo sin fecundar y su síntesis endógena (análisis de cuerpo completo) luego de la eclosión sugiriendo el rol de los esteroides como los inductores de la diferenciación del sexo gonadal en los esturiones (Simontacchi et al 2009). Estudios anteriores con estradiol-17 β y 17 α -metilttestosterona habían demostrado en etapas tempranas de la diferenciación sensibilidad a los esteroides en otras especies del género *Acipenser* (Omoto et al 2002). En algunos teleósteos la diferenciación de las células de Leydig ocurre antes que la diferenciación morfológica del testículo, con sobre-expresión y/o activación de enzimas y factores que controlan la síntesis de esteroides. Esto fue observado en trucha con la sobre-expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de andrógenos 11-oxigenados, aunque el patrón de expresión sugiere que estos no participarían en la diferenciación temprana del testículo, al menos los de síntesis endógena gonadal (Vizziano et al 2007). En contraste,

en pejerrey si se considera que los andrógenos 11-oxigenados están implicados en etapas tempranas de la diferenciación testicular (Blasco et al 2011); se propone su síntesis (particularmente 11-KT) como un posible mecanismo de masculinización producido por la inactivación del cortisol inducido por diferentes factores ambientales de estrés como lo es la temperatura para el *O. bonariensis* (Fernandino et al 2013). En los esturiones, células esteroideogénicas se han detectado en la gónada indiferenciada (Fedorov et al 1990), reafirmando el rol de los esteroides en el proceso de diferenciación. Respecto al cortisol implicado en el proceso de diferenciación no se encontró registro de estudios sobre la metabolización del cortisol y la producción de esteroides 11-oxigenados en los esturiones. Tampoco se encontró registros de que la temperatura afecte el proceso de diferenciación sexual de la gónada.

Otros genes sobre-expresados previo al inicio de la diferenciación morfológica del testículo en teleósteos son *gsdf* (Shibata et al 2010), *igf1* (Baron et al 2005) y *amh* (Yoshinaga et al 2004) los cuales codifican para factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia TGF-B. El *igf1* no presenta patrones dimórficos de expresión previo a la diferenciación morfológica en el esturión siberiano (Berbejillo et al. 2012).

Esta tesis se encuentra enfocada en el estudio de expresión del gen (*amh*) que codifica la hormona anti- Mülleriana (*amh*) intentando determinar si al igual que en varias especies de peces teleósteos y otros vertebrados su expresión en *A. baerii* antecede la diferenciación morfológica del testículo lo que permitiría suponer su

implicancia en el mecanismo de diferenciación y de ser sobre-expresado en esta vía ser utilizado como marcador del sexo en estudios de transcriptómica.

¿Por qué la hormona anti-Mülleriana?

La hormona anti-Mülleriana, al igual que el factor de crecimiento transformante beta, activinas, inhibinas, y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) forman parte de la superfamilia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β) los cuales actuando como ligando extracelular están implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación, apoptosis y otros comportamientos de la célula que ayudan a coordinar su fisiología en pos del desarrollo del testículo en su totalidad (Fan et al 2012).

La AMH es una hormona de composición glicoproteica (Picard & Josso, 1984), por lo que su estructura esta codificada a nivel genético por el gen *AMH* (Cate et al 1986). Ha sido estudiada en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces teleósteos encontrándose en todos los casos una expresión diferencial durante el período de diferenciación sexual o al menos en gónadas diferenciadas de juveniles (Rodríguez-Marí et al 2005; Smith et al 2007; Western et al 1999; Piprek et al 2013).

Expresión de AMH durante del desarrollo del testículo y ovario

La hormona fue descubierta por primera vez en mamíferos al ser asociada a la regresión de los conductos paramesonéfricos o de Müller durante el desarrollo del

macho en etapas fetales (Jost 1953). De no expresarse AMH, los conductos de Müller de ambos sexos se desarrollan dando origen al útero, los trompas de Falopio y la porción superior de la vagina (Mishina et al 1996; Behringer et al 1990). El mismo efecto cumple en aves, reptiles y anfibios cuando estos desarrollan (Josso et al 1998). En peces teleósteos no cumple esta función por no desarrollar estos conductos (Hoar 1957), las hembras poseen vías ováricas y excretoras separadas. Los conductos eferentes en teleósteos se cree se originan a partir del tejido somático de la gónada o el epitelio celómico (Van Tienhoven 1968; Nagahama 1983). Algunos estudios de caracterización espacio temporal de la expresión génica de *amh* en teleósteos sugieren que en etapas tempranas del desarrollo del testículo su expresión estaría relacionada con la formación de estos ductos. Estos casos incluyen platina japonesa (Yoshinaga et al 2004), trucha arcoíris (Baron et al 2005), pez cebra (Rodríguez-Mari et al 2005), anguila japonesa (Miura et al 2002) y pejerrey (Fernandino et al 2008). En todos estos casos al igual que en humanos se localizó *amh* (hibridación *in situ*) en células de Sertoli rodeando la espermatogonia pero ya no aquellas que rodean los espermatoцитos o estados más avanzados de la espermatogénesis. El descenso de la expresión de *amh* en la pubertad previo al inicio de la espermatogénesis (diferenciación de la espermatogonia) en peces fue visto por primera vez en anguila japonesa. De hecho ese fue el primer trabajo de caracterización de *amh* en peces (Minura et al 2002). En este pez al igual que en mamíferos la hormona folículo estimulante (FSH) induce el inicio de la espermatogénesis vía producción de andrógenos (Ohta et al 2007). A nivel funcional

la *amh* detiene el inicio del proceso de diferenciación espermatogonial (afectando de manera directa o indirecta la espermatogonia) y el andrógeno 11-ketotestosterona producido por la célula de Leydig reprime la producción de *amh* por la célula de Sertoli (cuando esta expresa el receptor *ar*) permitiendo así el inicio del proceso. El desarrollo de la espermatogénesis tras la supresión de la expresión de *amh* por el andrógeno 11-beta-androstenediona sugiere una vez más el papel de *amh* como sustancia inhibitoria de la espermatogénesis (Vizziano et al 2008). En modelo mamaliano (rata) se propone la hormona tiroidea T3 como mayor regulador transcripcional de *Amh* en el testículo postnatal (*in vivo*), que con un efecto pleiotrópico sobre la célula de Sertoli en sinergia con FSH (vías independientes) causa una mayor supresión de la expresión de *Amh* (Arambepola et al 1998a), y un aumento de la expresión del receptor de andrógenos (Arambepola et al 1998b) sensibilizando la célula de Sertoli a los mismos. Por lo contrario Rey (1998) y Al-Attar et al (1997) sugieren que únicamente cuando el receptor de andrógenos (*ar*) es expresado en Sertoli, la expresión de *Amh* disminuye mientras que en ausencia de *ar* la FSH estimula sensiblemente la expresión de *Amh* en lugar de inhibirla como se sugiere en Arambepola et al (1998).

Además de detener el inicio de la espermatogénesis la *Amh* también afecta la célula de Leydig. Estudios proponían que la *Amh* bloquea la diferenciación de las células precursoras de Leydig (Racine et al 1998) e inhibe la expresión de *Cyp17* (Teixeira et al 1999). Resultados recientes sugieren lo contrario. Aparentemente *Amh* durante la pubertad contribuiría con el proceso de diferenciación de la célula de Leydig

al inhibir la proliferación de sus células progenitoras y así inducir su diferenciación (Wu et al 2005; Wu et al 2012). La Amh también participaría en el proceso maduracional de las células de Leydig diferenciadas controlando el declive de la expresión de las enzimas 5 α -reductasa y 3 α -HSD que degradan e inactivan la testosterona ya que al inhibir su señal estas se vieron sobre-expresadas retardando el proceso de maduración (Wu et al 2005; Wu et al 2012). Respecto a la expresión de *Cyp17*, a diferencia de lo encontrado por Teixeira et al (1999) (Amh inhibe la expresión de *Cyp17*), los resultados obtenidos por Wu et al (2005) sugieren que Amh no afecta su expresión génica (northern blot) y tampoco su expresión proteica (inmunohistoquímica). Si se hace referencia a que la producción de testosterona también estaría regulada por Amh indirectamente a través de eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en concordancia con que Amh potencia el promotor de *lh-B* (Bédécarrats et al 2003).

En la hembra de mamíferos, la AMH se sintetiza en el ovario desde el nacimiento hasta el final de la vida reproductiva por células de la granulosa de folículos pre-antrales y pequeños folículos antrales, su producción disminuye en etapas posteriores de la maduración del folículo (Weenen et al 2004).

Pruebas *in vitro* demostraron que su expresión es estimulada por la acción de FSH (Taieb et al 2011). A nivel funcional, la AMH inhibe el reclutamiento inicial de los folículos primordiales al reducir su sensibilidad a la FSH lo cual se traduce en una disminución de la expresión de aromatasa en los folículos impidiendo su desarrollo (comparado a cuando FSH estimula), pero sin afectar la producción basal de aromatasa.

Esta es la manera de conservar un pool de folículos primordiales en el ovario de mamíferos (Pellatt et al 2010; Chang et al 2013). En el testículo fetal (*in vitro*) la *Amh* inhibe la expresión del gene de la aromatasa por el mismo mecanismo (Rouiller-Fabre et al 1998). Retornando al ovario, el estradiol reprime la expresión de AMH actuando a través del receptor ER- β , mientras que la estimula a través del receptor ER- α . Esto concuerda con que los cambios de expresión de los receptores a los estrógenos, en donde el receptor ER- β se expresa durante la maduración de los folículos y ER- α durante su luteinización (Grynberg et al 2012).

La expresión de *Amh* también se detectó en ovarios de otros vertebrados como anfibios (Piprek et al 2013) y entre los peces teleósteos medaka (Klüver et al 2007) y pez zebra (Rodríguez-Marí et al 2005) pero no así en platija japonesa (Yoshinaga et al 2004). Cuando se determinó la expresión para cada estadio de desarrollo del ovocito (Rodríguez-Marí et al 2005) se encontró que durante el proceso de maduración del ovocito la expresión de *aromatasa* aumenta mientras que la de *amh* disminuye que concuerda con lo visto en mamíferos. Sin embargo la caída de la expresión de *aromatasa* en ausencia de expresión de *amh* sugiere que otro factor está implicado en lugar de la *amh* en su desregulación (Rodríguez-Marí et al 2005).

Expresión de *amh* durante el período de diferenciación del sexo gonadal

A diferencia de mamíferos donde la *amh* comienza a expresarse en la célula de Sertoli recién diferenciada en concordancia con el inicio de la formación de los

cordones testiculares (Tilmann & Capel 2002), es frecuente observar en los demás vertebrados una expresión de *Amh* anterior a la diferenciación morfológica de la gónada. Por ejemplo, en la platija japonesa (Yoshinaga et al 2004), pez cebra (Rodríguez-Mari et al 2005) y trucha arco iris (Vizziano et al 2007) *amh* se expresa en las gónadas indiferenciadas de ambos sexos y posteriormente es sobre-expresada en las gónadas masculinas respecto a las femeninas durante el proceso de diferenciación sexo gonadal. Lo mismo sucede en gallina (Oréal et al 1998, 2002) y ciertos anuros (Piprek et al 2013). Por el contrario en el caimán solo se expresa cuando el embrión es incubado a una temperatura que determina al macho (Western et al 1999). Los vertebrados no mamalianos en su conjunto comparten una sensibilidad por los estrógenos los cuales en altos niveles actúan como inductores de la diferenciación ovárica (Devlin & Nagahama 2002; Smith & Sinclair 2004). Hay una hipótesis que propone que la presencia/ausencia de estrógenos controla el sexo en los peces teleósteos lo que se traduce en una supra regulación de la *aromatasa gonadal* para iniciar y mantener la producción de estrógenos que a su vez inducen la diferenciación ovárica. Por el contrario en un organismo masculino habría una supresión de la *aromatasa* y la concomitante producción de andrógenos como elemento necesario para inducir la vía de diferenciación masculina (Guiguen et al 2009). Actualmente se sabe que en peces con sistema de determinación sexual genético de tipo XX/XY, es el gen determinante del sexo el que desencadena la vía masculina (Matsuda 2002; Hattori et al. 2012; Yano et al 2012; Myosho et al 2012; Kamiya et al 2012) lo cual

posiblemente involucre la represión de la *aromatasa* y la sobre expresión entre otros de la *amh*. Todavía no hay trabajos que muestren que fenómenos ocurren cuando se inhiben los genes determinantes del sexo en peces.

Comparando entre vertebrados los patrones de expresión espacio-temporales de *Amh* así como estudios funcionales se entiende que pese a que muchos de los efectos de *Amh* a nivel celular se conservan de peces a mamíferos su efecto fisiológico a nivel de la gónada depende del momento o el contexto celular, pudiendo verse afectado o no la vía de diferenciación del sexo gonadal. Esto se reafirma al comparar el gen determinante *amhY* y su duplicado *amh* donde la única diferencia es el momento en que se expresan ya que se co-localizan, el primero se expresa 6 días post fertilización y el segundo 12 semanas post fertilización (Hattori et al 2012). Como señalan los autores, la inserción de *amhY* corriente arriba de *amh* en la cascada de diferenciación molecular del sexo tal vez haya conducido a una sub-funcionalización de los genes *amh* pudiendo *amhY* cumplir la función de gen determinante y *amh* de inducir la maduración y/o espermatogénesis testicular. Se entiende que la cascada molecular de diferenciación es diferente a la de los demás peces teleósteos debido a que en este modelo (*Odontesthes hatcheri*) *amh* presenta un patrón dimórfico de expresión antes que la *aromatasa* (Hattori et al 2013).

Otra característica interesante de la *amh* respecto a su rol en la diferenciación sexual de los peces es que su efecto ha sido vinculado a funciones de las células germinales en la diferenciación sexual de la gónada. Como se plantea en Kurokawa et al

(2007) existe una interacción entre las células somáticas que están predispuestas a desarrollar las características masculinas, y las células germinales capaces de canalizar el desarrollo por las vías femeninas. Aparentemente esta interacción es necesaria para la expresión de *amh*. La hormona, antes de la eclosión de los embriones actúa como un iniciador indirecto de la proliferación de las células germinales de ambos sexos inmediatamente después que las células germinales primordiales alcanzan el primordio gonadal (Shiraishi et al 2007), y luego de la eclosión en el control de la proliferación de las células germinales, que en este modelo de pez ocurre 4 semanas después de la eclosión en el macho, y al momento de la eclosión en las hembras (Morinaga et al 2007). Una función similar es propuesta en fugu (Kamiya et al 2012) y pejerrey Patagónico (Hattori et al 2012).

Dado que las funciones de la hormona-anti Mülleriana están altamente conservadas entre los vertebrados, como reguladora del desarrollo del testículo, actuando como supresora de la vía femenina, sobre expresándose en peces teleósteos durante el período de diferenciación molecular del sexo, se considera *amh* un buen candidato a expresarse de modo diferencial previo a la diferenciación morfológica de la gónada del *Acipenser baerii* siendo así un buen marcador temprano de la vía masculina de diferenciación.

Hipótesis de trabajo

amh en el *Acipenser baerii* al igual que otros teleósteos estaría implicada en la cascada molecular de diferenciación del sexo gonadal previa a la diferenciación morfológica de la gónada, presentando un patrón de expresión diferencial con mayor expresión en futuros machos que en futuras hembras.

Objetivos y estrategia experimental

Caracterizar una secuencia parcial del ARNm de *amh* del *A. baerii* a nivel tisular en distintos tejidos del esturión y establecer la relación filogenética de *amh* respecto a otros vertebrados.

Estudiar la expresión de *amh* gonadal durante el período de diferenciación del sexo estableciendo una cinética de expresión en las gónadas previo y posterior a la diferenciación sexual.

Materiales y métodos

Animales experimentales

Los esturiones muestreados utilizados provinieron de la granja piscícola Estuario del Plata (San Gregorio de Polanco, Tacuarembó, Uruguay).

Se colectaron gónadas de esturión siberiano en distintos estados de desarrollo así como muestras de ejemplares de 15 meses de cerebro (C), branquia (Br), corazón (Cor), estomago (E), intestino (I), bazo (B), riñón (R), interrenal (Int), piel (P), hígado (H).

Para la obtención de tejido gonadal se implementaron muestreos aprovechando tres cohortes disponibles con lo cual se cubrió los primeros 14 meses de desarrollo del esturión siberiano *Acipenser baerii*. De la cohorte 1 se colectaron muestras de gónada correspondientes a 3, 4 y 6 meses; de la cohorte 2 correspondientes a 8, 9, 10 y 11, y de la cohorte 3 correspondientes a 14 meses de edad.

Durante el muestreo se priorizó obtener muestras de tejido gonadal aptas para extraer ARN de excelente calidad, por lo que luego de sacrificar a los ejemplares mediante el método establecido en el protocolo de experimentación animal previamente evaluado por la comisión honoraria de experimentación animal (C.H.E.A.) se procedió inmediatamente a la extirpación de la gónada, su fraccionamiento y su preservación en nitrógeno líquido. Además, una parte de cada muestra se fijó en formol 10 % para realizar los cortes histológicos utilizados en el análisis morfológico gonadal. Cada muestra de gónada colectada fue identificada con un número correspondiente al individuo del cual fue extraída, y todos los individuos fueron pesados y medidos (Tabla 1).

Tabla I Promedio de valores de peso , largo e índice gonadosomatico para cada estadio de desarrollo estudiado en <i>Acipenser baerii</i>								
	3 M	4 M	6 M	8 M	9 M	10 M	11 M	14 M
Peso (Kg)	0.014 ± 0.00	0.027 ± 0.01	0.072 ± 0.021	0.33 ± 0.08	0.26 ± 0.07	0.6 ± 0.20	0.63 ± 0.20	0.77 ± 0.20
Largo (cm)	16.915 ± 0.72	21.09 ± 1.51	30.09 ± 2.80	48.18 ± 3.50	43.48 ± 3.21	56.9 ± 4.38	55.27 ± 3.49	61.97 ± 5.07
IGS	-	-	-	0.24 ± 0.13	0.11 ± 0.08	0.53 ± 0.35	0.73 ± 0.32	0.53 ± 0.31

valores expresados como media más desviación standard, M = meses

Histología

Para el análisis histológico las gónadas fueron fijadas en formol al 10%. Luego fueron deshidratadas, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 5 µm de espesor. Se utilizó la coloración de hematoxilina de Mayer y eosina (Gabe 1968).

Extracciones de ARN y transcripción reversa

Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción. Se extrajo ARN total siguiendo dos protocolos distintos. En una primera instancia mediante un protocolo basado en el principio fenol-cloroformo utilizando TRIzol Invitrogen. Dado que los ARN obtenidos también serían utilizados para secuenciado masivo (NGS) se optó por utilizar el kit de extracción RNASpin Mini ilustra General Electric para mejorar la calidad. En algunos casos se volvió a extraer ARN de la muestra, mientras que en otros se preservó el ARN extraído con TRIzol o se utilizó el kit

únicamente para la purificación del ARN extraído por el método más tradicional (Tablas 2 al 9).

Las extracciones se realizaron en condiciones libres de RNAsas trabajando sobre hielo, dentro de una campana estéril, guantes, túnica y material esterilizado mediante autoclave y etanol 95°. Los ARNs fueron disueltos en agua libre de nucleasa y preservados a -80°C.

Pureza y calidad del ARN

Además de medir la concentración, se evaluó mediante Nano Drop ND-1000 la pureza de los ARNs obtenidos. Respecto a la relación 260/280 (estimación de la contaminación por proteínas) la totalidad de las muestras presentó un valor mayor o igual a 1.8, mientras que respecto a la relación 260/230 (estimación de otros contaminantes) los resultados fueron variados (Tablas 2 al 9). La calidad del ARN se evaluó mediante la plataforma Agilent 2100 bioanalyzer (Instituto Pasteur de Montevideo) que clasifica la muestra de ARN analizada dentro del rango 1 (perfil más degradado) a 10 (perfil más intacto) en base al número de integridad del ARN (RIN) calculado a partir de la relación entre las subunidades ribosomales 18S y 28S (Figura 1).

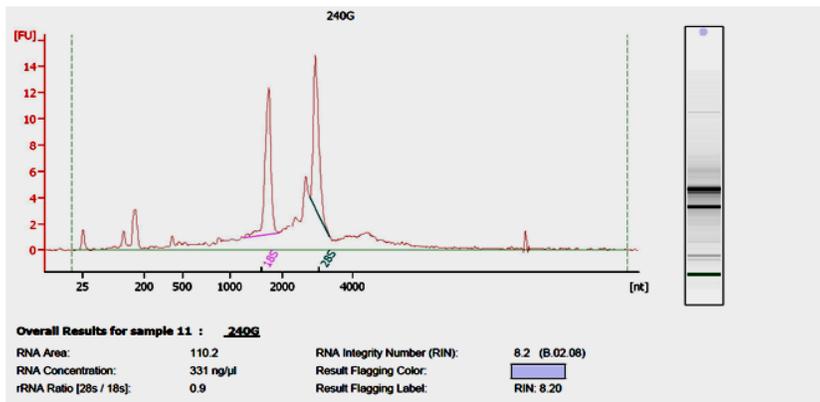


Figura 1: Electroferograma del ARN correspondiente a una muestra biológica en particular con un RIN = 8.20

El gráfico muestra un análisis de distribución por tamaño.

. La calidad de las muestras fue evaluada por Bioanalyzer. En el laboratorio la calidad del ARN de parte de las muestras se evaluó de manera tradicional usando la electroforesis en gel de agarosa para detectar la integridad de las bandas correspondientes a subunidades 18S y 28S. Serviría para comparar los resultados obtenidos con por Bioanalyzer y así validar el trabajo en el laboratorio para futuros controles de calidad (Tablas 2 al 9).

Síntesis de ADN copia

La síntesis fue realizada usando las enzimas SuperScript™ II RT de Invitrogen y M-MLV RT de Promega, Madison, WI. Las retrotranscripciones se desarrollaron partiendo

de 1, 1,5 o 2 μg de ARN y en un volumen final de reacción de 20 μl . Para ello el ARN fue desnaturalizado a 65°C por 5 minutos en presencia de cebadores aleatorios (random primers) a una concentración de 200 ng/ μl . En los casos en que la concentración de las muestras era muy baja se partió de un volumen mayor de hasta 10 μl de ARN y se utilizaron desoxinucleotidos (dNTPs) 10 mM para respetar la proporción de cada componente dentro de la reacción. De lo contrario se utilizaron dNTPs a 2 mM y un volumen de ARN de hasta 6 μl . La transcripción reversa fue realizada a 37 °C (o 42°C, dependiendo la enzima utilizada) durante 50 minutos, con 200 unidades de transcriptasa reversa como lo indica el fabricante. Posteriormente el ADN copia (de concentraciones entre 300 y 400 ng/ μl) fue controlado realizando una PCR de ciclos cortos (30 ciclos) usando cebadores para el gen constitucional de la 18S. Se puso especial atención al ADNc correspondiente a muestras de ARN que habían sido extraídas con el método de TRIzol (Tablas 2 al 9).

Tabla 2: Muestras individuos 3 y 4 meses de edad.															
ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa							Edad Esturion (Gónada)	
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh				Ct blanco reacción
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión				
Tm1	Tm2	Tm3		Tm1	Tm2	Tm3									
239	Mini ilustra	2.17	1.95	/	7.6	17-set	84,73	-	-	6,26	85,72	-	-	5,24	3 M
							84,9	-	-	6,41	85,72	-	-	4,95	
240	Mini ilustra	2.18	2.25	/	8.2	17-set	85,24	-	-	6,51	86,25	-	-	ind	
							85,24	-	-	6,21	86,07	-	-	ind	
241	Mini ilustra	2.15	1.96	/	8.1	17-set	84,9	-	-	6,13	85,72	-	-	5,76	
							84,73	-	-	6,45	85,72	-	-	5,98	
242	Mini ilustra	2,18	2,12	/	6.4	17-set	84,73	-	-	6,42	85,54	-	-	5,79	
							84,56	-	-	6,66	85,72	-	-	5,61	
264	Mini ilustra	2.16	2.32	/	6.4	17-set	84,73	-	-	7,16	85,72	-	-	5,89	4 M
							84,73	-	-	6,97	85,72	-	-	7,2	
265	Mini ilustra	2.18	0.77	/	7.4	17-set	84,73	-	-	5,99	86,42	-	-	5,18	
							84,56	-	-	6,27	85,9	-	-	8,63	
266	Mini ilustra	1.8	7.23	/	6.5	17-set	84,73	-	-	7,24	85,72	-	-	9,96	
							84,56	-	-	7,69	85,37	-	-	11,9	
267	Mini ilustra	2.16	1.97	/	7.5	17-set	84,23	-	-	6,74	85,02	-	-	8,92	
							81,36	-	-	7,15	84,67	-	-	22,47	
268	Mini ilustra	2.18	1.68	/	7.9	17-set	84,06	-	-	5,68	86,07	-	-	9,59	
							84,23	-	-	5,52	86,07	-	-	6,75	

Tabla 3: Continuación muestras individuos 4 meses de edad.															
ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa							Edad Esturion (Gónada)	
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh				Ct blanco reacción
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión				
Tm1	Tm2	Tm3		Tm1	Tm2	Tm3									
269	Mini ilustra	2.07	0.78	/	8.7	17-set	84,73	-	-	7,51	85,54	-	-	23,37	4 M
							85,07	-	-	6,82	85,9	-	-	23,81	
270	Mini ilustra	2.26	2	/	4.9	17-set	84,56	-	-	6,76	85,02	-	-	17,69	
							84,73	-	-	8,51	84,49	-	-	20,62	
271	Mini ilustra	2.2	1.3	/	7.6	17-set	84,73	-	-	7,46	85,54	-	-	6,71	
							84,39	-	-	7,93	86,07	-	-	8,26	
272	Mini ilustra	2.19	2.01	/	6.4	17-set	84,23	-	-	6,85	86,42	-	-	4,41	
							84,06	-	-	7,44	85,72	-	-	6,27	
273	Mini ilustra	2.16	2.10	/	7.1	18-set	83,86	-	-	7,89	85,13	-	-	24,28	
							82,26	-	-	7,85	84,77	-	-	25,66	
274	Mini ilustra	2.16	2.31	/	8	18-set	84,57	-	-	6,25	86,04	-	-	11,48	
							84,39	-	-	6,66	85,13	-	-	13,95	
275	Mini ilustra	2.11	0.94	/	7	18-set	84,57	-	-	5,84	85,5	-	-	14,94	
							84,39	-	-	6,14	85,13	-	-	15,91	
276	Mini ilustra	2.16	0.97	/	7.4	18-set	85,1	-	-	6,18	85,31	-	-	11,7	
							84,92	-	-	7	85,68	-	-	13,09	
277	Mini ilustra	1.81	0.63	/	6.8	18-set	84,92	-	-	7,85	84,95	-	-	21,61	
							84,75	-	-	8,26	84,77	-	-	23,88	

Tabla 4: Muestras individuos 8 meses de edad.

ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa							Edad Esturion (Gónada)	
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh				
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión				Ciclo umbral (Ct)
							Tm1	Tm2	Tm3	Tm1	Tm2	Tm3			
152	TRizol + Mini ilustra	2.17	1.25	OK	6.9	13-ago	84,56	-	-	9,62	85,72	-	-	23,46	
							84,23	-	-	10,27	85,19	-	-	23,24	
153	TRizol	1.88	0.6	OK	/	13-ago	84,23	-	-	6,74	85,37	-	-	17,04	
							84,06	-	-	7,4	85,54	-	-	24,62	
154	TRizol + Mini ilustra	2.14	2.28	OK	6.5	13-ago	82,37	-	-	9,28	85,19	-	-	23,25	
							78,66	-	-	9,89	81,86	-	-	24,48	
155	TRizol	1.86	0.58	OK	/	13-ago	83,55	-	-	12,5	84,67	-	-	24,43	
							84,23	-	-	12,7	85,37	-	-	24,48	
156	TRizol	1.84	0.5	OK	/	13-ago	84,39	-	-	10,94	84,49	-	-	23,58	
							84,39	-	-	10,9	84,67	-	-	23,67	
157	TRizol	1.87	0.4	OK	3.7	13-ago	84,39	-	-	10,47	85,19	-	-	24,02	
							84,39	-	-	10,92	85,37	-	-	24,21	
160	TRizol	1.85	0.5	OK	/	13-ago	85,07	-	-	8,97	84,31	-	-	26,38	
							84,73	-	-	9,43	84,31	-	-	26,43	

Ct blanco reacción 26.6

Tabla 5: Muestras individuos 9 meses de edad.

ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa							Edad Esturion (Gónada)	
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh				
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión				Ciclo umbral (Ct)
							Tm1	Tm2	Tm3	Tm1	Tm2	Tm3			
171	Mini ilustra	/	/	/	8.1	13-ago	84,23	-	-	8,32	85,02	-	-	26,4	
							84,06	-	-	8,86	84,84	-	-	25,95	

Gen de referencia: 18S		Gen de estudio: amh		Ct blanco (reacción)	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	Edad Esturion (Gónada)
Curva de fusión	Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión	Ciclo umbral (Ct)								
Tm1	Tm2	Tm3	Tm1	Tm2	Tm3						
84,23	-	-	8,32	85,02	-	-	26,4				
84,06	-	-	8,86	84,84	-	-	25,95				

Tabla 6: Muestras individuos 10 meses de edad.																
ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa							Edad Esturion (Gónada)		
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh				Ct blanco reacción	
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión					Ciclo umbral (Ct)
							Tm1	Tm2	Tm3		Tm1	Tm2	Tm3			
253	Mini ilustra	2.19	0.57	/	7	17-set	84,73	-	-	7,53	85,37	-	-	8,46	10 M	
							84,73	-	-	7,56	85,19	-	-	10,07		
254	Mini ilustra	2.22	2.12	/	8	17-set	84,9	-	-	6,55	84,84	-	-	11,28		
							84,9	-	-	6,93	85,19	-	-	11,58		
255 bis	Mini ilustra	2.14	1.9	/	6.7	17-set	84,9	-	-	6,27	86,07	-	-	4,86		
							84,73	-	-	6,87	85,54	-	-	4,74		
256 bis	Mini ilustra	2.15	1.55	/	7.3	17-set	84,56	-	-	6,36	86,25	-	-	4,52		
							84,56	-	-	6,44	86,07	-	-	4,76		
257	Mini ilustra	2.27	0.30	/	8.10	17-set	84,9	-	-	8,94	84,67	-	-	25,6		
							84,56	-	-	9,43	84,49	-	-	25,54		
258	Mini ilustra	2.02	0.24	/	NA	17-set	83,55	-	-	11,83	81,15	-	-	25,03		
							84,39	-	-	11,97	81,86	-	-	16,23		
263	Mini ilustra	2.2	1.8	/	7.2	17-set	84,56	-	-	6,21	86,25	-	-	7,93		
							84,56	-	-	6,33	85,72	-	-	5,77		

Tabla 7: Muestras individuos 11 meses de edad.																
ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa							Edad Esturion (Gónada)		
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh				Ct blanco reacción	
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión					Ciclo umbral (Ct)
							Tm1	Tm2	Tm3		Tm1	Tm2	Tm3			
289	Mini ilustra	2.13	2.25	/	7.1	18-set	84,21	-	-	5,98	84,58	-	-	19,02	11 M	
							80,84	-	-	7,53	81,48	-	-	19,39		
290	Mini ilustra	2.19	1.61	/	7	18-set	84,04	-	-	10,20	84,04	-	-	25,93		
							84,92	-	-	8,84	84,95	-	-	25,72		
291	Mini ilustra	2.14	2.29	/	7.4	18-set	85,10	-	-	6,33	85,31	-	-	11,02		
							85,10	-	-	6,83	85,68	-	-	12,59		
292	Mini ilustra	2.12	2.35	/	6.5	18-set	84,57	-	-	6,08	85,68	-	-	14,67		
							84,75	-	-	5,90	85,68	-	-	18,49		
293	Mini ilustra	2.14	1.61	/	NA	18-set	85,46	-	-	5,98	85,68	-	-	12,71		
							85,28	-	-	6,76	86,22	-	-	15,10		
294	Mini ilustra	2.14	2.26	/	5.7	18-set	84,57	-	-	6,98	85,68	-	-	15,57		
							84,39	-	-	6,81	85,68	-	-	20,20		

Tabla 8: Continuación muestras individuos 11 meses de edad.																										
ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa								Edad Esturion (Gónada)											
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh															
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)												
							Tm1	Tm2	Tm3	Ct	Tm1	Tm2	Tm3	Ct												
295	Mini ilustra	2.13	2.20	/	7.9	18-set	84,92	-	-	6,44	85,86	-	-	14,90	Ct blanco reacción 36.9	11 M										
							82,61	-	-	6,94	84,58	-	-	13,30												
296	Mini ilustra	2.15	1.76	/	6.8	18-set	84,39	-	-	6,80	85,68	-	-	12,82			Ct blanco reacción 36.9	11 M								
							84,57	-	-	6,97	85,86	-	-	13,70												
297	Mini ilustra	2.09	2.08	/	7	18-set	84,75	-	-	6,68	85,68	-	-	11,38					Ct blanco reacción 36.9	11 M						
							84,92	-	-	6,61	86,22	-	-	13,27												
298	Mini ilustra	2.14	2.28	/	6.9	18-set	85,28	-	-	5,25	85,31	-	-	13,00							Ct blanco reacción 36.9	11 M				
							84,75	-	-	6,14	85,31	-	-	14,17												
299	Mini ilustra	2.10	2.13	/	6.2	18-set	84,75	-	-	6,68	85,68	-	-	14,19									Ct blanco reacción 36.9	11 M		
							84,57	-	-	7,33	85,68	-	-	16,92												
300	Mini ilustra	2.14	2.22	/	6.4	18-set	84,92	-	-	6,39	86,04	-	-	12,00											Ct blanco reacción 36.9	11 M
							84,74	-	-	6,97	85,86	-	-	14,67												

Tabla 9: Muestras individuos 14 meses de edad.																										
ID	Método de extracción de ARN	280 /230	260 /230	calidad ARN (18S y 28S)	RIN	RT fecha 2013	PCR Cuantitativa								Edad Esturion (Gónada)											
							Gen de referencia: 18S				Gen de estudio: amh															
							Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)	Curva de fusión			Ciclo umbral (Ct)												
							Tm1	Tm2	Tm3	Ct	Tm1	Tm2	Tm3	Ct												
163	TRizol	1.92	0.60	OK	/	13-ago	84,39	-	-	9,58	85,37	-	-	24,95	Ct blanco reacción 26.6	14 M										
							84,23	-	-	9,61	85,54	-	-	25,27												
164	TRizol	1.9	0.48	OK	/	13-ago	84,23	-	-	6,96	85,19	-	-	25,93			Ct blanco reacción 26.6	14 M								
							80,85	-	-	7,35	84,31	-	-	26,10												
165	TRizol	1.93	0.68	OK	4.9	13-ago	84,39	-	-	7,42	85,54	-	-	19,68					Ct blanco reacción 26.6	14 M						
							84,39	-	-	7,56	85,90	-	-	18,90												
167	TRizol + Mini ilustra	2.14	2.05	OK	5.3	13-ago	84,56	-	-	9,26	85,90	-	-	21,71							Ct blanco reacción 26.6	14 M				
							84,73	-	-	9,34	85,90	-	-	21,72												
168	TRizol + Mini ilustra	2.13	2.03	OK	6.5	13-ago	85,07	-	-	7,94	86,25	-	-	22,54									Ct blanco reacción 26.6	14 M		
							84,90	-	-	8,56	86,60	-	-	21,73												
169	TRizol	2.0	0.58	OK	6.1	13-ago	84,90	-	-	6,82	86,60	-	-	16,40											Ct blanco reacción 26.6	14 M
							84,73	-	-	7,60	86,60	-	-	16,41												
170	TRizol + Mini ilustra	1.77	1.28	OK	6.6	13-ago	84,90	-	-	7,62	85,54	-	-	21,68	Ct blanco reacción 26.6	14 M										
							84,73	-	-	7,91	85,72	-	-	21,83												

Diseño de cebadores para amplificar *amh*

Los trabajos anteriores realizados en el *Acipenser baerii* mostraron que la secuencia nucleotídica del ARNm de ciertos genes implicados en la diferenciación del sexo está conservada dentro del género *Acipenser* (Berbejillo et al 2012). Es por ello que se diseñaron cebadores específicos a la secuencia nucleotídica parcial (681 pb) del ARNm de *amh* de *Acipenser fulvescens* obtenida en un intercambio de información entre colegas para ser utilizados en *Acipenser baerii*.

Cebadores heterólogos

Se diseñaron dos juegos de cebadores en base a regiones conservadas de la secuencia sentido del ARN mensajero de *amh* de *A. fulvescens* respecto a otras especies de peces. Todas las secuencias utilizadas en el alineamiento se obtuvieron del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y estos fueron realizados utilizando Multalin. Los cebadores se diseñaron con AmplifX teniendo en cuenta características tales como contenido en GC mayor al 50 %, evitar A o T en el extremo 3', longitud entre 20 y 30 nucleótidos y hasta 2 °C de diferencia entre la temperatura de fusión (T_m) que fueron controladas con la herramienta OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies (IDT), compañía donde fueron sintetizados los mismos. Los cebadores se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para el estudio de expresión génica y caracterización tisular de *amh*.

			Secuencia nucleotídica	Tamaño	Origen	Función
<i>amh</i>	Fw st 189	Secuencia Forward	5'CTTCCACCTGACACAGGGAC 3'	147 pb	Heterólogos	qPCR
	Rv st 335	Secuencia Reverse	5' TCG GTTTT CTG TCT CTG CCC 3'			
<i>amh</i>	Fw st 26	Secuencia Forward	5' TTTCTGAGCGCCATGCTG 3'	610 pb	Heterólogos	PCR
	Rv st 635	Secuencia Reverse	5' TGGCAGTTACCGATGGACAG 3'			
β-actina		Secuencia Forward	5' TATCCTGACCCTGAAGTACCC 3'	903 pb	Heterólogos	qPCR
		Secuencia Reverse	5' CTCATCGTACTCCTGCTTGCT 3'			PCR
		Nºacceso GenBank	JX027376.1			
18S		Secuencia Forward	5' GAGGTGAAATTC TTGGACCGG 3'	200 pb	Heterologos	qPCR
		Secuencia Reverse	5' GGTGCCCTT CCGTCAATTCC 3'			PCR
		Nºacceso GenBank	AY904445.1			

Amplificación de *amh*

Para amplificar *amh* tanto por PCR en tiempo final como por PCR cuantitativa se utilizó ADN copia de testículo recién diferenciado de *A. baerii*.

Para amplificar *amh* mediante PCR en tiempo final se utilizó el ciclador Corbett Research Palm Gradient. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo 1 μ l de ADNc, 2.5 μ l de buffer de reacción 10X, 2.5 μ l de dNTPs 2 mM, 0.8 μ M de ambos cebadores y 1.25 unidades de Taq polimerasa Roche. El ciclado consistió

en 2 min a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 40 seg a 94 °C, 30 seg a 58 °C y 1 min a 72 °C.

Por ultimo 7 min a 72°C.

Tras reiteradas amplificaciones, se aisló el producto de tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (100 V, 200mA durante 60 min) (BrEt 0.5µg/ml durante 30 minutos). El mismo fue purificado mediante un kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, illustra™ y enviado a secuenciar al Servicio Secuenciador de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo). El análisis bioinformático de la secuencia se realizó usando en una primera instancia BioEdit Sequence Alignment Editor. Una vez que se obtuvo una secuencia nucleotídica corregida en base a diferentes secuenciaciones en los extremos 5' y 3' la identidad de la misma fue verificada mediante blastX del NCBI que usa bases de datos de tetrápodos y no tetrápodos.

Caracterización filogenética

Una vez obtenida una secuencia parcial de *amh* los colegas del Instituto de Genómica Funcional de Lyon realizaron un estudio filogenético usando secuencias proteicas de la proteína en peces y tetrápodos (ENSM00250000019125 and ENSFM00600000921621) encontradas en Ensembl. El árbol de mayor verosimilitud se calculó utilizando PhyML.

Expresión relativa de *amh* por PCR cuantitativa

Puesta a punto de la reacción

Previo al estudio de expresión, y utilizando material biológico colectado en el año 2008 se validó la especificidad de los cebadores heterólogos en la reacción de PCR cuantitativa y se determinó la concentración de los mismos y del ADNc más adecuada. Para esto último se estudió el nivel de expresión obtenido (valor bruto de Ct) en función de las respectivas concentraciones generando una curva de dilución para ambos casos. Se encontró que entre 300 y 400 ng/ μ l (ADNc diluido 1/5) es la mejor concentración de ADNc y 0.2 μ M la mejor concentración de cebadores dentro de la reacción para el estudio de la expresión de *amh*.

El proceso de validación de la especificidad de los cebadores consistió en comparar el número de picos de la curva de fusión (T_m secuencia parcial de *amh* = 85 $^{\circ}$ C) y el ciclo umbral (Ct) de cada muestra analizada por qPCR con el resultado de la electroforesis del producto de dicha reacción (gel de poliacrilamida 6 % por su alta sensibilidad). A su vez se tuvo en cuenta el momento en que se realizó la retrotranscripción y el estado del ADN copia utilizado (PCR con gen constitutivo).

Como se observa en la Tabla 11, en prácticamente la totalidad de los casos la presencia de banda de tamaño esperado concordó con un único pico a la temperatura esperada (T_m) y con un Ct menor al del blanco de la reacción; mientras que los casos en que no hubo banda en el gel correspondieron con varios picos en la curva de fusión y un Ct superior o similar al del blanco. Por tanto se consideró que los cebadores

heterólogos podrían ser utilizados para el estudio de expresión de *amh* en el esturión siberiano.

Recientemente y habiendo obtenido una secuencia de *amh* a partir de estudios de transcriptómica, se validó la secuencia amplificada como se describió y los cebadores utilizados.

Tabla 11. Validación de la especificidad de reaccion de PCR Cuantitativa con cebadores específicos para *amh Acipenser baerii* (heterologos). Se utilizaron muestras colectadas durante el año 2008.

ID	Extracción de ARN	RT fecha	Gel agarosa PCR 18S	Gel poliacrilamida qPCR amh	Curva de fusion	PCR Cuantitativa			Ciclo umbral (Ct)
						Tm 1	Tm 2	Tm 3	
67c	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	85,69			24,55
66c	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	85,54	91,36		26,05
						85,54			23,37
						85,39			23,55
ov5	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda <i>amh</i> ,otra más arriba	dos picos	84,35	68,66		26,35
						84,49	75,53		26,15
ov6	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda fina <i>amh</i>	varios picos	75,68	68,96	84,64	26,11
						68,96	74,04		26,36
72c	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	85,54			21,50
						85,24			21,53
ov9	TRlzol	/	/	banda fina <i>amh</i>	varios picos	74,04	68,36	79,86	26,67
						80,76	74,34	68,51	26,28
ov8	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda <i>amh</i>	dos picos	84,20	75,23		25,92
						84,64	75,38		25,63
ov3	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	no hay banda	varios picos	76,28	68,36		25,82
						84,49	68,96	74,79	26,23
ov10	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda <i>amh</i> tenue	varios picos	74,49	69,26	85,39	26,47

						69,26	74,19	84,94	26,39
ov4	TRlzol	13/09/2012	NO HAY	no hay banda	varios picos	81,21	69,11	74,04	26,24
						75,83	69,11		26,09
ov11	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	banda amh tenue	varios picos	85,69	68,96	74,19	26,41
						85,69	68,81	74,34	26,22
35G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,49	68,96	73,74	26,54
						76,13			25,20
34G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,79	68,96	74,04	26,47
						84,79	69,41		26,19
32G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	69,26	84,49	74,19	26,29
						69,26	84,79	74,19	26,26
12G	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,64	68,96	74,19	26,34
						74,79	85,09	68,66	26,81
10G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,79	73,89		26,19
						84,64	75,53		25,80
8G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	68,81	74,34		26,44
						68,66	74,64		26,49
28G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,64	68,81	73,89	26,27
						84,35	68,51	73,74	27,91
27G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,64	68,81	74,79	26,28
						83,90	75,53		25,88
13G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	69,26	74,49	81,81	26,29
						68,96	74,34	84,94	26,50
11G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	69,41	74,34		26,14
						68,81	74,19		26,33
14G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	69,41	74,19	84,35	26,23
						69,11	74,04	84,94	26,26
16G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda	varios picos	84,20	68,81	73,74	26,27
						84,20			26,24
15G	TRlzol	13/09/2012	banda 18S	no hay banda*	pico definido	84,94			26,29
						85,09			26,05
120	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda amh	pico definido	85,54			23,53
						85,54			23,75
122	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda amh	pico definido	85,24	81,21		25,81
						84,94			26,12
123	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda amh	pico definido	85,54			21,72
						85,69			21,75
117	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda amh	pico definido	85,99			21,68

						85,24			21,92
126	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	85,24			22,12
						85,24			22,12
127	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda <i>amh</i> tenue	pico definido	84,64	69,11	74,04	26,55
						85,84			21,12
129	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	85,99			22,55
						85,99			22,43
130	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	85,99			21,87
						85,39			25,36
70c	TRlzol	11/04/2013	banda 18S	banda <i>amh</i>	pico definido	86,14			21,88
						85,99			21,91
	Blanco reaccion PCR			no hay banda	varios picos	74,49	69,11		26,36
						69,11	85,24		27,98

Expresión relativa de *amh*

Se midió la expresión cuantitativa de la *amh* respecto al gen constitutivo *18S* usando el PCR en tiempo real. Todas las reacciones fueron realizadas en la plataforma ABI 7500 (Software Versión 2.0.6) utilizando placas de 96 pocillos. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo 0,2 μ M de ambos cebadores, 10 μ l de Kappa Universal Sybr qPCR master mix; 7.2 μ l de H₂O nucleasa free y 2 μ l de ADNc de entre 300 y 400 ng/ μ l; con un ciclado que consistió en 5 min a 95°C más 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60 °C. El ciclado para la curva de fusión se compuso de 15 seg a 95°C, 1 min a 60 °C, 30 seg a 95° y 15 seg a 60 °C.

Los valores de ciclo umbral (Ct) y temperatura de fusión (Tm) de cada reaccion pueden verse en las Tablas 2 al 9.

Análisis estadístico

Intentando dar apoyo estadístico a las tendencias de expresión de *amh* observadas gráficamente se aplicó estadística a valores de expresión correspondientes a ejemplares ya diferenciados respecto al sexo. Los valores de expresión de *amh* correspondientes a ejemplares indiferenciados no fueron analizados ya que en estos casos no se conoce el sexo de cada ejemplar utilizado. Para comparar la expresión de *amh* entre los sexos, se llevó a cabo el análisis comparativo de la expresión para machos y hembras de 9, 10, 11 y 14 meses post eclosión. Dada la homogeneidad de varianzas entre las muestras indicada por el test de Levene, se utilizó el test paramétrico ANOVA.

Transcriptómica de la gónada del esturión siberiano

Como se mencionó en la Introducción, la presente Tesis está enmarcada en el proyecto CSIC I +D "Estudio de la determinación del sexo en el esturión siberiano *Acipenser baerii* usando las nuevas metodologías de secuenciado masivo (NGS)". Para su realización una vez determinado el grado de desarrollo morfológico de la gónada del *A. baerii* mediante histología clásica se realizó secuenciado masivo (2x100 pb) en la plataforma Illumina Hiseq2000 (Plataforma Genómica INRA Auzeville, Francia) de ARN extraído de gónadas indiferenciadas, recién diferenciadas y diferenciadas con un mayor grado de desarrollo. Estos datos son muy recientes y aún no han sido analizados para

evaluar su expresión diferencial. Sin embargo, se obtuvieron secuencias nucleotídicas identificadas como *amh* mediante blastN y blastX del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ellas nos sirvieron para validar el fragmento que amplificamos, así como los cebadores usados para la qPCR.

Resultados

Estudio morfológico de la gónada e identificación del período de diferenciación sexual.

El estudio morfológico se basó en la descripciones previamente realizadas para la especie por parte de nuestro laboratorio (Tesis de Anabel Martínez, 2013) así como en una publicación reciente sobre la morfología gonadal de la especie (Rzepakowska & Ostaszewska 2013). Todas las muestras histológicas examinadas muestran que las gónadas de los ejemplares de esturión siberiano con los que se trabajó permanecen morfológicamente indiferenciadas desde los 3 a los 6 meses de edad inclusive. Los primeros signos de diferenciación sexual aparecen a los 8 meses de edad. El criterio utilizado para reconocer un ovario fue la presencia de grupos o clusters de células germinales que habían iniciado la meiosis (Figura 2A). Mientras que el testículo presuntivo pudo ser identificado debido a una distribución homogénea de las espermatogonias y un epitelio liso que recubre la gónada en desarrollo (Figura 2B).

Para los 9, 10, 11 y 14 meses de edad la totalidad de los ejemplares estaban diferenciados pero los testículos aún no presentan células germinales en meiosis. Por el contrario en los ovarios se observaron células germinales en meiosis y ovocitos primarios.

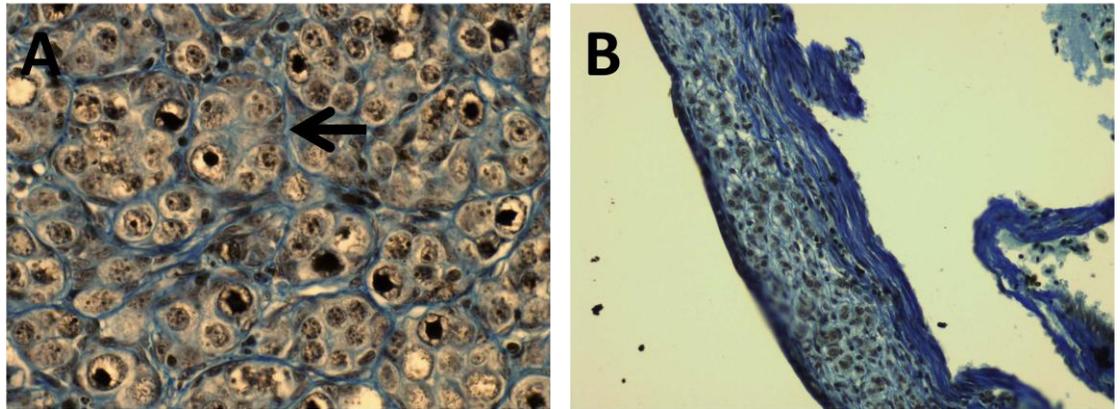


Figura 2 A.- Ovario recién diferenciado. Imagen de una sección de una gónada en donde se observan los grupos de células germinales en meiosis (flecha), que son una característica que indica que esa gónada se desarrollará como ovario. B.- Testículo presuntivo. Imagen de una sección de una gónada en donde se observan las células germinales que aún no iniciaron la meiosis y que se disponen en forma homogénea en el interior de la misma.

Los estadíos identificados para cada edad de muestreo se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Características morfológicas de las gónadas utilizadas para determinar el período de diferenciación morfológica del sexo en *Acipenser baerii*.

Tabla 12.- 3 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
8	3 M	243	Indiferenciada
8	3 M	248	Indiferenciada
8	3 M	249	Indiferenciada
8	3 M	251	Indiferenciada

Tabla 12.- 4 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
8	4 M	278	Indiferenciada
8	4 M	279	Indiferenciada
8	4 M	280	Indiferenciada
8	4 M	281	Indiferenciada
8	4 M	282	Indiferenciada
8	4 M	283	Indiferenciada

Tabla 12.- 6 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
8	6 M	315	Indiferenciada
8	6 M	316	Indiferenciada
8	6 M	317	Indiferenciada
8	6 M	318	Indiferenciada
8	6 M	319	Indiferenciada
8	6 M	320	Indiferenciada

Tabla 12.- 8 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
7	8 M	151	Posible hembra
7	8 M	152	Macho putativo
7	8 M	154	Macho putativo
7	8 M	156	Hembra. Gonias en clúster y ovocitos previtelogénicos
7	8 M	157	Macho putativo

Tabla12.- 9 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
7	9 M	171	Hembra. Recién diferenciada. Clusters de células germinales. Ovocitos previtelogénicos. Gónada constituida por grasa y epitelio germinativo
7	9 M	172	Macho presuntivo

7	9 M	173	Hembra: células germinales en clusters. No ovocitos
7	9 M	174	Hembra. Recién diferenciada. Clusters de células germinales. Ovocitos pre-vitelogénicos. Gónada constituida por grasa y epitelio germinativo
7	9 M	175	Macho presuntivo
7	9 M	176	Macho presuntivo
7	9 M	177	Macho presuntivo
7	9 M	179	Macho presuntivo
7	9 M	180	Macho presuntivo
7	9 M	181	Macho presuntivo

Tablas 12.-10 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
7	10 M	252	Macho presuntivo
7	10 M	253	Hembra clusters células germinales, ovocitos pre-vitelogénicos
7	10 M	254	Hembra clusters células germinales, ovocitos pre-vitelogénicos
7	10 M	255	Macho presuntivo
7	10 M	256	Macho presuntivo
7	10 M	257	Hembra clusters células germinales
7	10 M	263	Macho presuntivo

Tabla 12.- 11 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
7	11 M	290	Hembra. Clusters de células germinales
7	11 M	292	Hembra. Clúster de células germinales
7	11 M	293	Hembra. Clusters de células germinales y ovocitos
7	11 M	294	Hembra. Clúster de células germinales
7	11 M	295	Hembra. Clusters de células germinales y ovocitos
7	11 M	296	Macho presuntivo
7	11 M	297	Macho presuntivo
7	11 M	298	Hembra. Clúster de células germinales y ovocitos
7	11 M	299	Hembra. Clúster de células germinales y ovocitos
7	11 M	300	Hembra. Clúster de células germinales y ovocitos

Tabla 12.- 14 meses (M)

Lote	Edad	Nº	Características gónada
6	14 M	162	Macho presuntivo
6	14 M	165	Macho presuntivo
6	14 M	166	Hembra. Células germinales en clusters alguno ovocitos
6	14 M	167	Hembra. Ovocitos pre-vitelogénicos
6	14 M	168	Macho presuntivo
6	14 M	169	Macho presuntivo
6	14 M	170	Macho presuntivo

Amplificación y validación de una secuencia parcial de ARNm de la *amh*

Como resultado de la amplificación de la realizada con distintos juegos de cebadores se obtuvieron bandas específicas de testículos con los cebadores de 147 pb (Figura 3 a la izquierda) diseñados para PCR en tiempo real y con los cebadores de 610 pb (Figura 3 a la derecha) diseñados para levantar un fragmento mayor de *amh*.

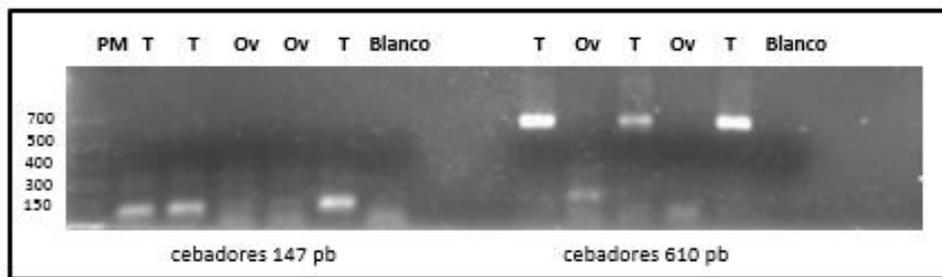


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa: amplificación de *amh* en *A. baerii*. Se realizó en PCR cuantitativa utilizando cebadores para amplificar 610 y 147 pb. Tabla 2 T (testículo) ; Ov (ovario).

Las bandas obtenidas se enviaron a secuenciar y se confirmó su identidad usando en una primera instancia las secuencias brutas sin modificar y contrastándolas en BLAST contra la base de datos de NCBI que incluye peces y tetrápodos. Después de realizar varias secuenciaciones reverse y forward de las distintas bandas obtenidas y de corregirlas con Bioedit y compararlas en Mulatlin se obtuvo una secuencia validada de 482 pb que fue explorada en BLAST (NCBI). Esta secuencia resultó ser un fragmento parcial del ARNm de *amh* ortóloga de peces y tetrápodos.

El buscador de dominios conservados mostró que la secuencia parcial obtenida codifica una región del dominio conservado AMH-N terminal de la proteína.

En forma muy reciente (junio de 2014) se obtuvieron los primeros datos de secuenciación masiva de gónadas del esturión siberiano. Entre ellas se obtuvo una secuencia que corresponde a la *amh* según los estudios que realizamos en BLASTX.

Esta secuencia presenta un 100% de homología con la secuencia de 482 pb que habíamos amplificado por PCR. A su vez se confirmó que los cebadores utilizados presentaban una homología del 100% en el caso del cebador forward y de 99% en el caso del cebador reverse, con respecto a la secuencia obtenida por transcriptómica. Dicha secuencia se liberará en el GenBank cuando se realice la publicación correspondiente. El número asignado por GenBank es KM258121.

Análisis filogenético de la secuencia parcial del ARNm de *amh*

El análisis filogenético confirma que la secuencia obtenida y validada de 482 pb en el *Acipenser baerii* corresponde a un fragmento del gen ortólogo de la *amh*.

En la filogenia se distinguen dos grupos monofiléticos: en rojo los tetrápodos con la especie *Latimeria chalumnae* representando la clase Sarcopterygii que le dio origen, y en azul a los peces Actinopterygios (Figura 4). Se observa como *amh* del esturión siberiano presenta mayor similitud con sus homólogos en especies pertenecientes a los Actinopterygios más basales.

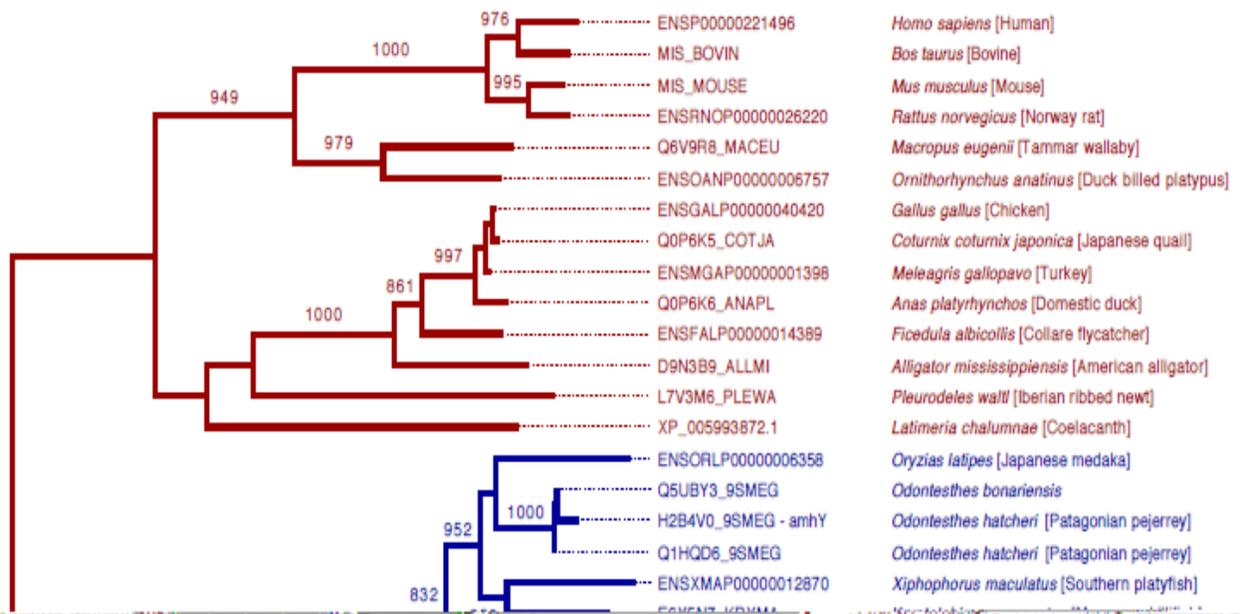


Figura 4. Análisis filogenético del ARNm de *amh* en *Acipenser baerii*

Caracterización tisular de la expresión de *amh*

De los tejidos analizados se determinó que a los 15 meses de edad es en el testículo donde hay más expresión de *amh*; a este le sigue hígado, branquia y riñón (Figura 5).

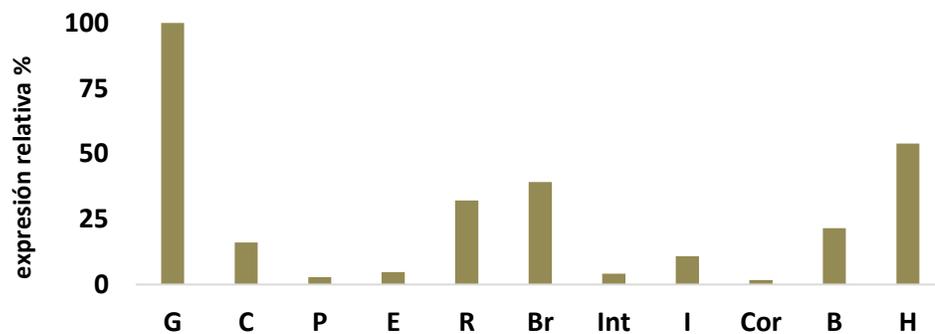


Figura 5. Expresión relativa de *amh* respecto al gen 18S en distintos tejidos de *A. baerii*: cerebro (C), branquia (Br), corazón (Cor), estomago (E), intestino (I), bazo (B), riñón (R), interrenal (Int), piel (P), hígado (H) y testículo (G).

Expresión de *amh* durante el desarrollo gonadal

En la Figura 6 se muestran los niveles globales de expresión de *amh* por edad. Esto implica que se sumaron los niveles de expresión de todos los animales muestreados con el fin de identificar si había momentos de mayor expresión.

Se encontró que durante el período de diferenciación del sexo la *amh* tiene un patrón de expresión bimodal: a los 3 y 4 meses de edad, cuando a nivel morfológico las gónadas aún son indiferenciadas, la *amh* presenta el nivel de expresión elevados. A los 8 meses, cuando aparecen los primeros signos de diferenciación ovárica los niveles de expresión descienden drásticamente (se registran valores 6000 veces menores) y se mantienen así hasta los 10 meses donde hay un nuevo incremento de expresión. Pasados los 10 meses la expresión decae nuevamente alcanzando valores similares a los registrados a los 8 y 9 meses (Figura 6).

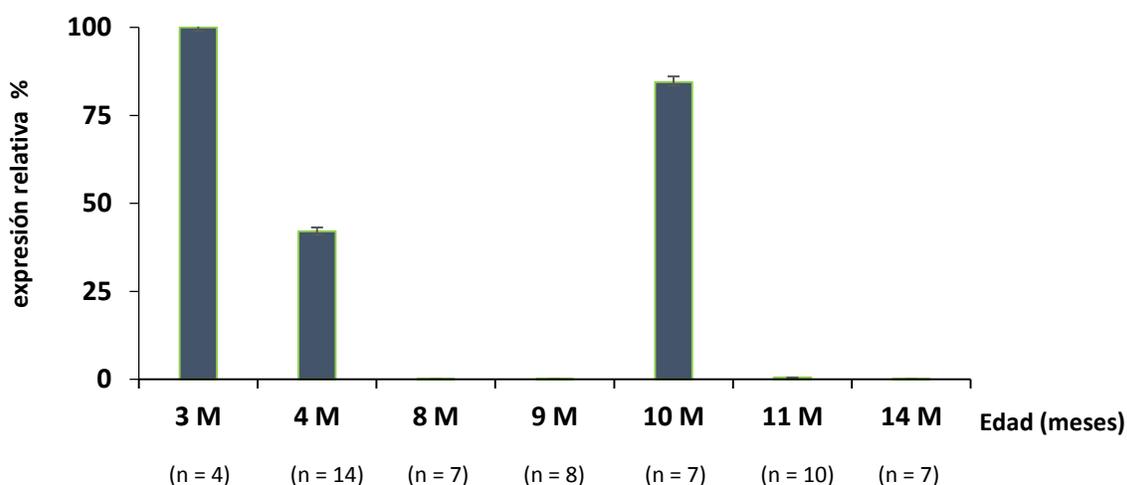


Figura 6. Expresión relativa de *amh* respecto al gen 18S en la gónada de *A. baerii*. El valor de expresión de *amh* para 3, 4, 8, 9, 10, 11 y 14 meses corresponde al promedio de los valores de expresión de todas las muestras analizadas para cada estadio. n corresponde al número de individuos.

Expresión individualizada de *amh* durante el período indiferenciado

Durante el período en que la gónada permanece aún indiferenciada a nivel morfológico encontramos que para los 3 y 4 meses de edad existen dos grupos de animales respecto al nivel de expresión de *amh*, los de “alta expresión” y los de “baja expresión” (Figura 7) Así en los animales de 3 meses (n=4, verde oscuro en Figura 8) se observan tres individuos con alta expresión de *amh* y uno con una expresión casi nula. En los individuos de 4 meses (verde claro en Figura 8) de los 14 animales evaluados, 4 mostraron niveles elevados de expresión y los demás mostraron niveles bajos o casi nulos.

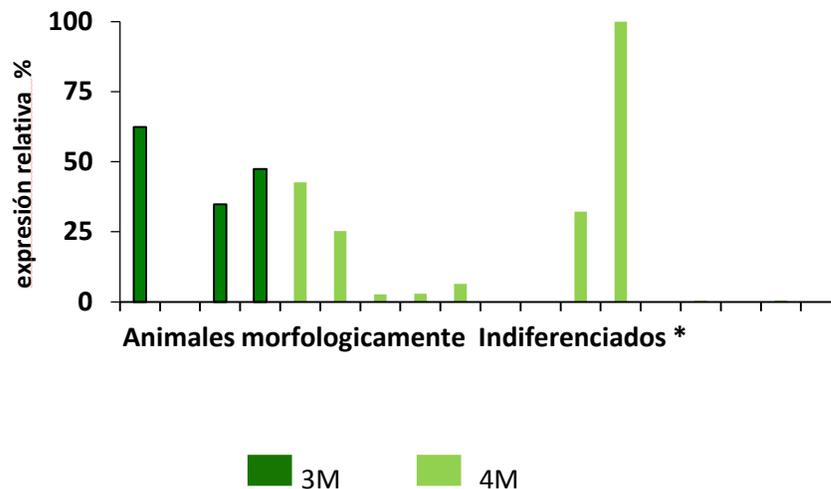


Figura 7. Expresión relativa de *amh* respecto al gen 18S en gónadas de 3 y 4 meses (M) de *A. baerii*.

*Para 3 meses cada muestra analizada corresponde a un pool de gónadas de dos individuos.

Expresión de *amh* en machos y hembras durante el período diferenciado

Entre los 8 y los 14 meses las gónadas ya estaban diferenciadas como lo analizamos previamente en el estudio morfológico. Esto permitió realizar un análisis para verificar si había una expresión diferencial de *amh* entre machos y hembras. A los 8 meses de edad no todas las muestras obtenidas se pudieron identificar histológicamente. En las 4 muestras estudiadas (una hembra y tres machos) parece haber una expresión similar (Figura 8). Sin embargo, hay que trabajar con un mayor número de ejemplares para poder realizar test estadísticos. A los 9 y 10 meses las gónadas presentaron un dimorfismo sexual en la expresión de *amh*. La expresión es significativamente mayor en los machos con respecto a las hembras ($p < 0.05$) siendo en los primeros entre 3 y 10 veces mayor que en hembras de la misma edad. Como se observa en la Figura 8 se trata de un dimorfismo sexual parcial ya que las hembras expresan en sus gónadas niveles detectables de *amh*. A los 11 meses se pierde el dimorfismo sexual respecto a la expresión de *amh*.

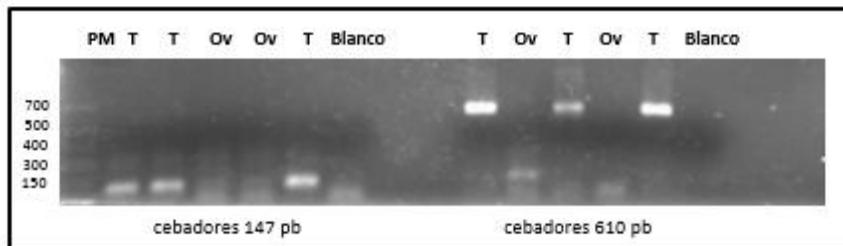
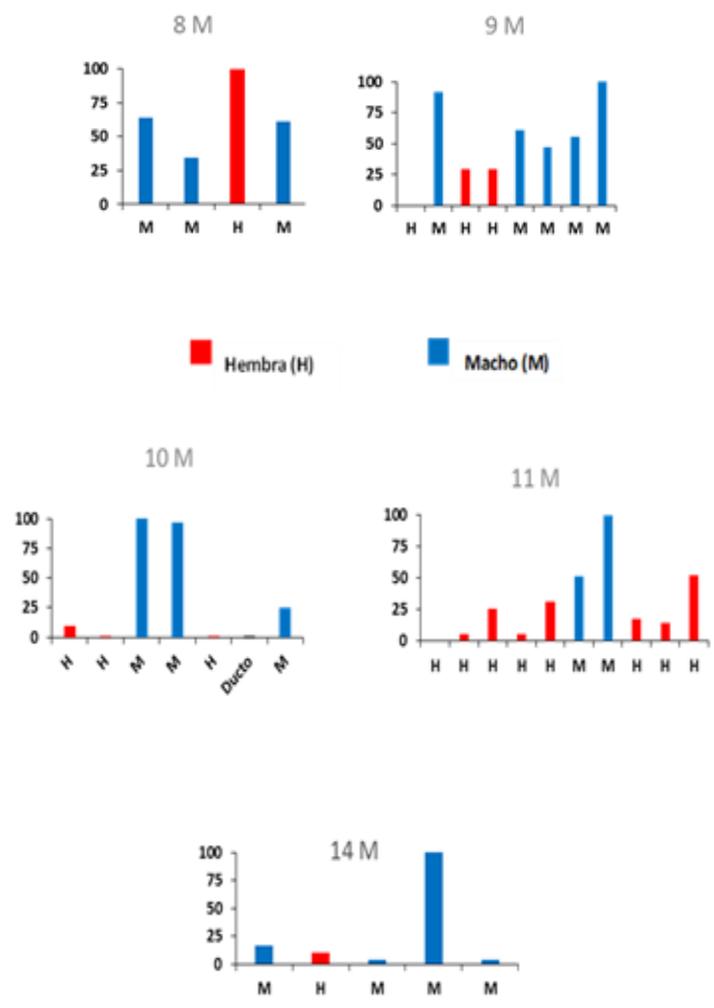


Figura 8. A

Expresión relativa de *amh* respecto al gen 18S en gónadas de 8, 9, 10, 11 y 14 meses.

Ex
pr
es
i
ó
n
re
la
ti
vi



Animales individuales morfológicamente diferenciados

Secuenciado masivo (NGS)

Se obtuvieron tres secuencias nucleotídicas a partir de ARN extraído de las muestras de gónadas en diferentes estadios de desarrollo. Cada una de las secuencias tiene un marco abierto de lectura (ORF) completo que codifica una proteína reconocida como la hormona anti-Mülleriana.

A nivel nucleotídico:

Se encontraron tres grandes diferencias entre las 3 secuencias (descontando polimorfismos de un solo nucleótido existentes, SNP): 1- la secuencia III tiene un inserto de 604 pares de bases respecto a las secuencias I y II. 2- la secuencia I tiene un inserto de 32 pares de bases respecto a las secuencias II y III. 3- la secuencia III sin el inserto de 604 pb es más corta que las secuencias I y II.

Respecto al inserto de 604 pb, la secuencia que conforma sus primeros 8 nucleótidos, y los 7 nucleótidos previos a su inicio (conservados en las tres secuencias, fue reconocida en dos oportunidades como un sitio dador de Splicing alternativo (sitio de Splicing al inicio del intron)(Figura 9).



Figura 9. Sitio dador de splicing alternativo.

A nivel proteico:

	Dominios conservados en la proteína codificada			
	Pares de bases	AA codificados en el ORF	Superfamilia AMH -N – terminal	Superfamilia TGF-B
Secuencia I	2596	620	SI (8.09e-60)*	SI (4.22e-15)*
Secuencia II	2537	460	SI (2.15e-25)*	AUSENTE
Secuencia III	2813	ORF1: 432	SI (2.38e-49)*	SI (5.10e-15)*
		ORF2: 298	SI (2.25e-07)*	AUSENTE

* Cuanto más cercano a cero es el valor E más contundente es la afirmación de la existencia del dominio conservado.

La proteína codificada por la secuencia II no posee el dominio conservado TGF-B ubicado en el extremo C-terminal. Se vio que la ausencia de los 32 pb que la diferencia de la secuencia I genera un ORF con un codón stop «TGA», no llegándose a codificar el dominio TGF-B.

La secuencia III contiene dos marcos abiertos de lectura que codifican proteínas reconocidas como AMH, pero solo un marco codifica el dominio TGF-B. De los 432 aminoácidos que conforman la proteína completa de AMH (la que contiene los dos dominios conservados), 42 están codificados en el inserto de 604 pares de bases.

Además de la ausencia del dominio conservado TGF-B, se encontró entre las secuencias aminoácidas codificadas sustitución de aminoácidos. Algunas sustituciones

fueron conservativas en el sentido de que ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo funcional (ej. Arginina/Lisina) mientras que en otras no (ej. Prolina/Leucina).

Localización de la secuencia parcial de *amh*

La secuencia parcial de *amh* de 482pb *amplificada* mediante PCR fue localizada en los tres transcritos obtenidos (secuencia I, II, y III) con una homología del 100 % respecto a las tres secuencias. Asimismo tomando como referencia la secuencia I volvió a confirmar que se ubica en la región del marco abierto de lectura que codifica el dominio conservado AMH -N terminal de la proteína.

Discusión

En este trabajo se caracterizó por primera vez para esturiones en general el gen de la *amh*, así como sus patrones de expresión durante una amplia ventana del desarrollo que involucra el período indiferenciado y el diferenciado. Los resultados permiten suponer que la *amh* juega un papel importante en la diferenciación sexual masculina. A su vez se logra identificar con mayor precisión el período de diferenciación del sexo del esturión siberiano en Uruguay con respecto a trabajos previos (Berbejillo et al 2012, 2013) realizados en nuestro laboratorio.

Período de diferenciación sexual

La morfología gonadal de los estadios tempranos del desarrollo fueron descritos en pocas especies de esturiones: el esturión del Adriático (*Acipenser naccarii*) (Grandi et al 2007; Grandi & Chicca 2008), el esturión chino (*Acipenser sinensis*) (Chen et al 2006), el esturión trompa corta (*Acipenser brevirostrum*) (Flynn & Benfey 2007) y más recientemente para el esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (Rzepakowska & Ostaszewska, 2013). En dos de estos trabajos (Grandi & Chicca 2008; Rzepakowska & Ostaszewska, 2013) se considera que el primer criterio que permite distinguir un macho de hembras presuntivas es la forma de la superficie gonadal. Cuando se observan indentaciones en la superficie gonadal se trataría de hembras presuntivas mientras que cuando la superficie es lisa se trataría de machos presuntivos. En nuestra experiencia no siempre puede ser claramente distinguido cuando se hace el análisis histológico de un gran número de muestras. Un segundo criterio más claro a nuestro entender es la detección de grupos de células germinales que forman 'clusters' o canastas de células germinales que entraron en meiosis y que son fácilmente detectables en los estudios histológicos que realizamos. Este es un criterio utilizado por los autores mencionados para distinguir con total certeza la presencia de hembras (Grandi et al 2007; Grandi & Chicca 2008; Chen et al 2006; Flynn & Benfey 2007; Rzepakowska & Ostaszewska, 2013). Este patrón de distribución espacial de las células germinales es característico de las hembras. De hecho estamos seguros de ello porque este pez al tener un desarrollo ovárico lento conserva las características de la diferenciación temprana (clusters de células meióticas) en forma concomitante a la aparición de los primeros ovocitos

(ovocitos primarios). En los machos las células germinales entran en meiosis muchos meses después que las hembras y las espermatogonias presentan una distribución espacial homogénea. Es así que basándonos en este último criterio en nuestras muestras observamos los primeros signos de diferenciación a los 8 meses de edad. Hay que destacar que no se pudo realizar el muestreo de 7 meses, y que a los 6 meses los animales explorados aún estaban indiferenciados. De modo que es posible que la diferenciación comience hacia el séptimo mes en las condiciones de cultivo del Uruguay. Los resultados obtenidos son coherentes con los resultados previos en otros esturiones que muestran que el período de diferenciación sexual puede ocurrir entre los 6 y 9 meses (Grandi et al 2007; Grandi & Chicca 2008; Chen et al 2006; Flynn & Benfey 2007).

De todas formas, las condiciones de cultivo pueden influir en el proceso de diferenciación de los animales ya que no es la primera vez que una misma especie de esturión criada en condiciones distintas se desarrolla en tiempos distintos (Rzepakowska & Ostaszewska 2013).

A partir de los 8 meses la totalidad de los ejemplares que pudieron ser evaluados por histología, estaban diferenciados. Al igual que se describe en Rzepakowska & Ostaszewska (2013) se encontró que las hembras inician la meiosis antes que los machos los cuales hasta los 14 meses inclusive no la habían iniciado.

***amh* durante el período morfológicamente indiferenciado**

Durante el período de indiferenciación morfológica (3 y 4 meses) se observan altos niveles de expresión de *amh* respecto del momento de la diferenciación (8 meses). Esto sugiere una participación de la *amh* en el proceso de diferenciación sexual molecular. Cuando se analizan los animales en forma individual se observan dos patrones de expresión de *amh*: los animales con altos niveles de expresión y aquellos con bajos niveles de expresión. Teniendo en cuenta que para algunas especies de teleósteos la *amh* se sobre-expresa en las futuras gónadas masculinas respecto de las femeninas (Yoshinaga et al 2004; Rodríguez-Mari et al 2005; Vizziano et al 2007) podemos suponer que los individuos indiferenciados que sobreexpresan *amh* estarían en vías de diferenciación masculina y los que subexpresan en vías de diferenciación femenina. En el caso de los peces teleósteos mencionados la *amh* no es el primer gen en la gónada bipotencial en expresarse y su expresión al inicio es detectada en ambas gónadas (el futuro fenotípico de la gónada se sabe de antemano) pero posteriormente su expresión se incrementa en los futuros machos y decrece en las futuras hembras. Dado que esta cinética comienza a los 3 meses cuando ya se observan los dos “grupos de expresión” queda por saber si hay expresión diferencial de *amh* desde el inicio de su expresión o si al igual que los casos mencionados todos los individuos la expresan por igual. También sería interesante evaluar la relación entre la expresión de *amh* y la de *aromatasa* por su rol central en la feminización de la gónada de muchos Teleósteos

(Guiguen et al 2009) o su relación con la proliferación de las células germinales como se vio en medaka (Shiraishi et al 2007; Morinaga et al 2007).

De todas maneras como respuesta a la hipótesis planteada se encontró que *amh* se expresa en la gónada indiferenciada sobre expresándose en algunos individuos y en otros no, lo que sugiere que puede estar implicada en el proceso de diferenciación gonadal del *Acipenser baerii*. Los datos obtenidos sugieren que este podría ser un buen marcador del sexo en etapas tempranas del desarrollo de la gónada.

Conducto de Müller

Como se mencionó en la introducción, el género *Acipenser* se caracteriza por desarrollar conductos paramesonéfricos o de Müller de igual modo que aves y mamíferos, sin embargo una característica que los distingue es su permanencia en el macho adulto. En los machos como en las hembras, la extremidad caudal del conducto de Müller generalmente se divide en dos o tres terminales más pequeñas que terminan a diferentes niveles del conducto de Wolff, pero siempre craneales al seno urogenital. En los animales indiferenciados y machos adultos, las puntas de las terminales de Müller están cerrados y cubiertos por una fina capa de epitelio de Wolff. En las hembras adultas los ductos de Müller terminan con terminales abiertas (Wrobel 2003).

Dado que en mamíferos *Amh* es la responsable de la regresión de los conductos de Müller (Mishina et al 1996; Behringer et al 1990) se considera pertinente emitir una

opinión al respecto de las causas que podrían ocasionar su permanencia en el estado adulto del esturión macho.

La ventana crítica de la regresión del conducto de Müller depende del patrón de expresión de receptor serina/treonina kinasa de tipo II de AMH (específico para AMH) AMHR2 (revisado por Josso et al 2001) el cual se expresa en las células mesenquimatosas que envuelven el conducto de Müller (di Clemente et al 1994; Baarends et al 1994; Teixeira et al 1996). Teniendo en cuenta el síndrome del conducto Mülleriano persistente (SCMP) en humanos que se caracteriza por el desarrollo de la genitalia interna femenina en individuos machos a partir de conducto de Müller que se conserva debido a la incapacidad de la célula de Sertoli de sintetizar o secretar AMH, o a alteraciones en el receptor AMH tipo II (Nishi et al 2012) podría suponerse que la persistencia del conducto en el esturión macho adulto tenga la misma causa. También podría deberse a, un desfasaje entre la expresión de la *amh* y su receptor *amhr2*. Para el esturión siberiano se ha estudiado e identificado los niveles de expresión de la *amh* en una amplia ventana temporal que permitió identificar que durante el período indiferenciado existen niveles muy elevados de expresión de *amh*. Para poder estudiar los patrones de expresión de *amh* y *amhr2* en el esturión siberiano habría que realizar un estudio temporal más corto, con una mayor frecuencia de muestreo y focalizado en las primeras etapas del desarrollo.

Otra posible explicación para la permanencia del ducto de Müller en machos radica en el amplio repertorio intracelular capaz de transducir la señal de Amh. Pese a

que toda acción biológica de la hormona depende del receptor específico Amh tipo II (Mishina et al 1999), se puede hablar de tres vías de señalización: dos específicas de AMHR2 y una tercera en la que AMHR2 interacciona con un amplio repertorio de receptores tipo I y factores de transcripción usados por la familia de proteínas BMP también pertenecientes a la superfamilia TGF- β (Josso & di Clemente 2003). Tantas vías posibles de señalización dan lugar a suponer que en el género *Acipenser* alguno de los factores implicados en la(s) vía(s) que conduce(n) a la regresión de los conductos de Müller se vea(n) afectado(s) sin comprometer esto otras funciones inducidas por amh.

***amh* durante el período morfológicamente diferenciado**

Al igual que a los 8 meses, a los 9 la expresión de *amh* se encuentra en los niveles más bajos de toda la cinética (3M, 4M, 8M, 9M, 10M, 11M, 14M). Sin embargo su expresión en machos es significativamente mayor que en hembras de la misma edad. Lo mismo sucede a los 10 meses pero con un incremento en la expresión de *amh* muy importante en ambos sexos (Figura 7).

Dada la presencia de ovocitos pre-vitelogénicos en la mayoría de las hembras recién diferenciadas se interpreta la expresión de *amh* como parte del proceso de regulación de la foliculogénesis. Se entiende que la hormona desarrolla un rol importante al promover el mantenimiento de los folículos primordiales (Pellatt et al 2010; Chang et al 2013). Su expresión en el ovario además de mamíferos se vio en medaka y pez cebra (Klüver et al 2007; Rodríguez-Marí et al 2005) sugiriendo que allí

desarrolla una función conservada en el desarrollo de la gónada femenina de varios vertebrados.

La expresión de *amh* en el macho recién diferenciado de esturión concuerda con los demás vertebrados (Klüver et al 2007). Probablemente en esta etapa del desarrollo *amh* esté actuando como sustancia inhibitoria de la espermatogénesis (Miura et al 2002) proceso de diferenciación que en esturión siberiano es inicia aproximadamente a los 14 meses de edad (Rzepakowska & Ostaszewska, 2013). *amh* también está implicada en el control de la proliferación de las células germinales según lo observado en medaka (Morinaga et al 2007). Al igual que en el teleósteo en el esturión las células germinales de las hembras inician la proliferación rápida y continua (tipo II) antes que los machos (Rzepakowska & Ostaszewska, 2013). Por lo que como sugiere Morinaga et al (2007) para el medaka, una función de *amh* en el testículo en desarrollo del esturión podría ser la inhibición de la proliferación rápida de las células germinales (tipo II) en el esturión retardando así la entrada en meiosis.

Teniendo en cuenta los procesos que acontecen en el testículo y en el ovario durante esta etapa del desarrollo se entiende que *amh* estaría cumpliendo funciones distintas en la gónada. Mientras que en la hembra *amh* podría estar regulando la foliculogénesis, en el macho la proliferación de las células germinales (descontando efectos posibles en la diferenciación y proliferación de la célula de Leydig). Por esto, se considera que la sobre expresión en machos pueda deberse a una baja en la expresión

en las hembras debido al a priori elevado nivel de estrógenos durante el proceso de crecimiento folicular. Se entiende que el proceso de renovación de las células germinales en el macho también requiere de estrógenos (Miura et al 1999) pero probablemente en menor cantidad que los sintetizados durante la pre-vitelogénesis de las hembras por lo que en el macho la expresión de *amh* sería menos afectada como se observa (Figura 9).

A los 10 meses de edad se detecta un pico de expresión de *amh* tanto en machos como en hembras, manteniéndose igual la expresión diferencial preexistente. Dado que machos y hembras atraviesan como se dijo, periodos diferentes del desarrollo es difícil encontrar una relación que explique la sobreexpresión de *amh* en ambos sexos en el mismo estadio.

En mamíferos la hormona folículo estimulante contribuye al aumento del ARNm de *amh* en el testículo, al promover la multiplicación de las células de Sertoli inmaduras (Hirobe et al., 1992), o directamente al inducir su expresión en ausencia del rol inhibitorio de los andrógenos, según se describe en Rey 1998; y en el ovario de las hembras al inducir directamente su expresión (Taieb et al 2011). Teniendo en cuenta este control desde el eje hipotalámico-hipofisario a través de la FSH sobre *amh* se podría ver la sobreexpresión como respuesta a un pico de FSH. Sin embargo dado que en otro esturión (Moberg et al 1995) los niveles de FSH en esta etapa recién comienzan a elevarse parecería poco probable.

Por otra parte resulta interesante ver como estudios de transcriptómica en trucha revelaron expresión de *lhb* (gen que codifica subunidad β de la hormona luteinizante) en el ovario durante la primera meiosis de los ovocitos (Baron et al 2005) así como estudios más recientes demostraron que LH es capaz de incrementar la expresión de *amh* (además de *lhr*, *ar* y *sox9*) en la célula granulosa (Lan et al 2013). Teniendo en cuenta esto, y que el homodímero subunidad β (β - β) de la hormona gonadotrópica coriónica humana puede actuar a través del receptor para LH (Lobel 1999), que en humanos es el mismo que para hCG aunque con diferente señal intracelular (Casarini et al 2012), se puede suponer que la formación del homodímero subunidad β específico de LH tendría también afinidad a su receptor específico pudiendo tener un efecto autocrino /paracrino (en Baron et al (2005) no se caracterizó a nivel tisular el ARNm de *lhb*) incrementando la expresión de *amh* en el ovario de la hembra.

Estudios en mamíferos demostraron también que LH causa un incremento en la producción de estradiol en el ovario (Lan et al 2013), por lo que por su efecto supresor de la expresión de *amh* (Grynberg et al 2012) podría explicarse el marcado descenso en la expresión pasados los 10 meses.

El consenso está en que la Lh es secretada desde la hipófisis para inducir la reanudación de la meiosis (Heinrichs 2005) y la expresión de *lhb* encontrada por Baron et al (2005) fue interpretada como un factor anti-apoptotico por los autores. Sin embargo si alguna relación existiese entre *lhb* y el pico de *amh* como se está

planteando para el esturión hembra, donde la expresión de *lhb* en la gónada femeninas en peridiferenciación fue comprobada (Berbejillo et al 2012), podría ser que la presencia de *amh* se deba a un rol en el mantenimiento de la sincronidad del desarrollo de los ovocitos, (hasta que no haya terminado la primera meiosis de todo el pool sincrónico estos no deberían empezar a crecer). La sobreexpresión de *amh* podría tener ese efecto en la medida que inhibe la síntesis de estradiol (Pellatt et al 2010; Chang et al 2013) necesario para el crecimiento folicular. Esto concuerda con que en Baron et al 2005 la expresión de *lhb* comienza a disminuir en el mismo estadio en que termina la primera meiosis en el ovario de la hembra. El estudio reciente de aromatasa en el periodo de diferenciación de *A. baerii* (Vizziano et al, no publicado) muestra que a los 10 meses, cuando el pico de *amh*, la *aromatasa* tiene un notorio descenso de expresión (aunque no se corrobora estadísticamente) con respecto a los meses 9 y 11, siendo las hembras las de mayor expresión. Esto concuerda con la idea de que el pico de *amh* a los 10 meses afecta la síntesis de estrógenos (expresión de *aromatasa*) para retardar el crecimiento de los ovocitos hasta que todos terminen la primera meiosis. Es interesante ver como en el estudio realizado por Baron et al (2005), al siguiente estadio después de terminada la primera meiosis ciertos genes son desregulados en el ovario, entre ellos *igfbp2*, *inhba*, *smad7*, *sox9a.2*. Sorprendentemente todos estos genes codifican para factores que potencialmente pueden detener el crecimiento celular directamente (*inhba*, *igfbp2*) o contribuir a la desregulación de la expresión de *amh* que como se propone está implicada en detener el crecimiento de los ovocitos

contribuyendo con la sincronización del pool (*sox9a.2*, *smad7*). *sox9* es reconocido como potenciador de la expresión de *amh* y *smad7*, por ser un factor Smad podría estar implicada en su vía de señalización intracelular (Josso et al 2003).

Por el lado del macho estudios previos en el esturión siberiano (Berbejillo et al 2012) muestran que *lh* es expresado en el testículo en peridiferenciación pero dado que el receptor para LH solo se encuentra presente en la célula de Leydig el mecanismo de retroalimentación propuesto para las hembras es más difícil de explicar en el testículo además de que no se espera que *amh* desarrolle la misma función propuesta para la hembra. De todas formas para explicar su sobreexpresión (*amh*) cabe la posibilidad de que si se generasen cantidades suficientes del homodímeros subunidad β de LH como se propone, la hormona pueda estimular el receptor de fsh en Sertoli. Como se comentó anteriormente fsh puede provocar el aumento del ARNm de *amh* en el testículo. Sin embargo la acción de lh a través de fshr solo ha sido observada cuando se generan grandes cantidades de lh en plasma durante los eventos de desove (Schulz & Nóbrega), pero dado que se propone la síntesis del homodímeros β en la gónada probablemente puede que los niveles de expresión necesarios no sean tan elevados.

A los 11 meses la expresión de *amh* no es dimórfica respecto al sexo y ha decrecido en comparación con los 10 meses pero sigue siendo significativamente más elevada (9 veces) respecto a los 8 y 9 meses (no se muestra el gráfico). Esto podría indicar que tras el pico de expresión de 10 meses la expresión fue decayendo

gradualmente pero dado que los individuos de 14 meses pertenecen a otro lote esto no puede observarse.

Expresión de *amh* en el cerebro

Este estudio demostró que al menos en individuos de 15 meses de edad la *amh* se expresa en el cerebro de *A. baerii*. La expresión de *amh* fue descrita en el cerebro e hipófisis de machos adultos de la lubina europea donde se sugiere la posibilidad de un control autócrino de la síntesis de gonadotropinas y esteroides de *amh* en estos tejidos (Halm et al 2007).

No se descarta la expresión de *amh* en etapas más tempranas del desarrollo de *A. baerii*, cuando la gónada se mantiene morfológicamente indiferenciada. Esto ocurre en tilapia, en donde la *amh* se expresa de manera dimórfica en el macho antes de la diferenciación sexual de la gónada sugiriendo una orientación sexual del cerebro previa (Poonlaphdecha et al 2011). Esto también fue descrito en rata sugiriendo los autores que la *amh* podría estar implicada en un proceso de masculinización/feminización del cerebro (Wang et al 2009).

Discusión *amh* secuenciado masivo (NGS)

Los estudios preliminares de tres secuencias encontradas en los estudios de transcriptómica muestran que en la gónada del esturión se podrían estar generando diferentes *amhs*: una con los dominios dominio conservado TGF- β que le da su

actividad biológica y el dominio amh N-terminal que al menos en mamíferos potencia su actividad (Wilson et al 1993); le segunda amh sin el dominio conservado TGF- β por lo tanto en teoría sin actividad biológica. De hecho en la lubina europea se caracterizaron dos transcritos alternativos de *amh* (Halm et al 2007), aunque se aclara que otras variantes también existen. Uno de los transcritos caracterizados conserva 5 pares de bases de un intron lo que conlleva a la modificación del marco de lectura y la pérdida del dominio bioactivo de la proteína, (dominio TGF- β) tal como se supone sucede en la proteína codificada por la secuencia II del esturión. Los autores sugieren que las variantes podrían ejercer distintos efectos sobre la bioactividad de amh. Lo mismo podría suceder en el esturión siberiano.

Para saber más sobre cómo estos transcritos alternativos podrían afectar la funcionalidad de amh entre muchas otras cosas faltaría por explorar si en las secuencias aminoacídicas de amh generadas por las secuencias nucleotídicas se encuentra conservado el sitio de clivaje, ya que la amh al igual que otros miembros de la familia TGF- β , se sintetiza como un gran proteína precursora con un sitio de clivaje a aproximadamente 110 amino ácidos del extremo C-terminal el cual genera la pro-región del dominio N-terminal (Ingraham et al 2000; Josso & Di Clemente 2003). Por ejemplo en anguila japónica, hay evidencia de que amh se produce como una proteína precursora de 60 kDa pero es secretada por proteólisis como un monómero de 30 kDa (Miura et al 2002).

También sería interesante explorar si las variantes encontradas conservan los sitios que permiten la dimerización del monómero ya que todos los integrantes de la superfamilia TGF- β comparten siete residuos de cisteína altamente conservados que formando tres enlaces disulfuro permiten una configuración anti paralela de los monómeros (Shi et al 2003).

Respecto al origen de estos transcritos no se descarta la posibilidad de que la secuencia I y la secuencia II sean producto de expresión de variantes alélicas de *amh* y que la secuencia III sea un transcrito alternativo de la secuencia II ya que ambas secuencias carecen de 32 pares de bases que están presentes en la secuencia I (ver resultados NGS página 57). Para contestar esta pregunta se plantea como prospectiva explorar a nivel genómico mediante amplificación por PCR la region nucleotídica en la que se encuentra la secuencia de 32 pares de bases. De encontrar amplicónes de ADN genómico que se diferencien por tener o no tener esos 32 pares de bases se estaría evidenciando dos *amh* distintas. Pudiendo ser variantes alélicas o tratarse de un duplicado de *amh*, un gen paralogo. Respecto a la secuencia III, no se descarta que pueda contener un intron por lo también se plantea explorarlo a nivel genómico. Dado que la secuencia nucleotídica que diferencia de la secuencia III de la I y la II es lo suficientemente extensa para ser cuantificada en un estudio de expresión génica sería interesante conocer en qué momento del periodo de diferenciación sexual del *A.baerii* este supuesto transcrito alternativo se expresa.

Bibliografía

- Arambepola N.K., Bunick D., Cooke P.S. 1998a. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *Journal of Endocrinology* 156 (1), 43–50.
- Arambepola N.K., Bunick D., Cooke P.S. 1998b. Thyroid Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Regulate Müllerian-Inhibiting Substance Messenger Ribonucleic Acid Expression in Cultured Neonatal Rat Sertoli Cells. *Endocrinology*. Vol. 139, No. 11.
- Al-Attar L., Noël K., Dutertre M., Belville C., Maguelone G., Paul F., Burgoyne S., Josso N., Rey R. 1997. Hormonal and Cellular Regulation of Sertoli Cell Anti-Müllerian Hormone Production in the Postnatal Mouse. *J. Clin. Invest* Volume 100, Number 6, September 1335–1343.
- Brandt J.F. 1869. Einige worte uber die europaich-asiatischen Störarten (Sturionides). *Bull. Acad. Imper. Sci. St.-Petersb.* 14: 171–175
- Bemis W.E., Kynard B. 1996. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Birstein V.J, Waldman J.R, Bemis W.E. Parte 2, páginas 167-183.
- Bemis W.E, Findeis E.K, Grande L. 1996. An overview of Acipenseriformes. *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Birstein V.J, Waldman J.R, Bemis W.E. Parte 1, páginas 25-71.
- Baarends W.M., van Helmond M.J., Post M., van der Schoot P.J., Hoogerbrugge J.W, De Winter J.P., Uilenbroek J.T., Karels B., Wilming L.G., Meijers J.H. 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. *Development* 120, 189–197.

- Baron D., Houlgatte R., Fostier A., Guiguen Y. 2005. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *BiolReprod* 73:959–966.
- Berbejillo J., Martínez-Bengochea A., Bedo G., Brunet F., Volff J.N., Vizziano-Cantonnet D. 2012. Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular Reproduction and Development* 79(8):504–16
- Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedo G, Brunet F, Volff JN, Vizziano-Cantonnet D. 2013. Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiology and Biochemistry*. DOI: 10.1007/s10695-012-9666-5.
- Billard R, Lecointre G. 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddle fish. *Rev Fish Biol Fish* 10:355–392.
- Bowles J., Koopman P. 2001. New clues to puzzle of mammalian sex determination. *Genome Biol.* 2: 1025.1- 1025.4.
- Brennan J., Capel B. 2004. One tissue, two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat. Rev. Genet.* 5: 509–521.
- Bédécarrats G.Y., O’Neill F.H., Norwitz E.R., Kaiser U.B., Teixeira J. 2003. Regulation of gonadotropin gene expression by Müllerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:9348–53.
- Blasco M., Somoza G.M., Vizziano-Cantonnet D. 2011. Undifferentiated gonads of pejerrey (*Odontotesthes bonariensis*) larvae exposed to masculinizing temperatures produce 11-

ketotestosterone when incubated a tritiated precursor. Indian J. Sci. Technol., 9th ISRPF Issue
Vol. 4 No. S8 ISSN: 0974- 6846.

Bukovsky, A., Chen T.T., Wimalasena J., Caudle M.R. 1993. Cellular localization of luteinizing hormone
receptor immunoreactivity in the ovaries of immature, gonadotropin-primed and normal cycling
rats. Biol Reprod. Jun; 48 (6): 1367-82.

Behringer R.R., Cate R.L., Froelick G.J., Palmiter R.D., Brinster R.L. 1990. Abnormal sexual development
in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. Nature 345, 167-170.

Bonaparte C.L. 1831. Saggio di una distribuzione metodico degli animali vertebrati. Giorn. Arc. Sci. Lett.
Arti 49: 1-77.

Casarini L., Monica Lispi., Longobardi S., Milosa F., La Marca., Tagliasacchi D., Pignatti E., Simoni S. 2012.
LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different
Intracellular Signalling. October 2012 | Volume 7 | Issue 10 | e46682.

Cutting A., Chue J., Smith C.A. 2013. Just How Conserved Is Vertebrate Sex Determination?
Developmental dynamics 242:380–387.

Cavileer T., Hunter S., Okutsu T., Yoshizaki G., Nagler J.J. 2009. Identification of novel genes associated
with molecular sex differentiation in the embryonic gonads of rainbow trout (*Oncorhynchus
mykiss*). Sex Dev. 3, 214–224.

Cortez D., Marin R., Toledo-Flores D., Froidevaux L., Liechti A., Waters P,D., Grutzner F., Kaessmann H.
2014. Origins and functional evolution of Y-chromosomes across mammals. NATURE | VOL 508
| 24 APRIL doi: 10.1038/nature13151.

Chang H.M., Klausen C., Leung P.C.K. 2013. Anti-Müllerian hormone inhibits follicle-stimulating
hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production
in human granulosa-lutein cells. Fertil Steril 100, 585-592.e1.

- Chen X., Wei Q., Yang D., Zhu Y. 2006. Observations on the formation and development of the primary germinal tissue of cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. J. Appl. Ichthyol. 22 (Suppl. 1): 358-360.
- Chen X. 2007. Biological characteristics and current situation of resource of species of Acipenseriformes [in Chinese]. Ocean Publishing House, Beijing.
- Calvello R., Cianciulli A., Panaro M.A. 2013. Conservation/Mutation in the Splice Sites of Cytokine Receptor Genes of Mouse and Human. International Journal of Evolutionary Biology Volume 2013, Article ID 818954, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/818954>.
- Cate R.L., Mattaliano R.J., Hession C., Tizard R., Farber N.M., Cheung A., Ninfa E.G., Frey A.Z., Gash D.J., Chow E.P., Fisher R.A., Bertonis J.M., Torres G, Wallner B.P., Ramachandran K.L., Ragin R.C., Manganaro T.F., MacLaughlin D.T., Donahoe P.K. 1986. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. Cell 45, 685–698.
- Cites 1998. Sitio web: <http://www.cites.org/eng/common/notif/1999/16-summary.shtml>
- Doroshov S., Moberg G., Van Eenennaam J. 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environmental Biology of fishes 48: 265-278.
- 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.
- di Clemente N., Wilson C., Faure E., Boussin L., Carmillo P., Tizard R., Picard J.Y., Vigier B., Josso N., Cate R. 1994. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. Mol. Endocrinol. 8, 1006–1020.
- Fopp-Bayat D. 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). Aquaculture 305 174 – 177.

- Fan Y.S., Hu Y.J., Yang W.X. 2011. TGF- β superfamily: how does it regulate testis development. *Mol Biol Rep* 39:4727– 4741.
- Fedorov K.Y., Zubova S.Z., Semenov V.V., Burlakov A.B. 1990 Secretary cells in the gonad of juvenile starlet sturgeon *Acipenser ruthenus*, during sexual differentiation. *J Ichthyol* 30:65–75
- Fernandino J.I., Hattori R.S., Kimura H., Strüssmann C.A., Somoza G.M. 2008. Expression profile of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 237:3192–3199.
- Fernandino J.I., Hattori R.S., Moreno Acosta O.D., Strüssmann C.A., Somoza G.M. 2013. Environmental stress-induced testis differentiation: Androgen as a by-product of cortisol inactivation. *Gen. Comp. Endocrinol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.024>.
- FAO. 2012. State of World Fisheries, Aquaculture Report – Fish Consumption
<http://www.thefishsite.com/articles/1447/fao-state-of-world-fisheries-aquaculture-report-fish-consumption#sthash.1XVpCZFJ.dpuf>.
- Flynn S.R., Benfey T.J. 2007. Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueur. *Journal of Fish Biology* 70: 1027-1044.
- Gisbert E., Ruban G.I. 2003 Ontogenetic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*: a synthesis between laboratory tests and field data. *Environmental Biology of Fish* 67: 311–319.
- Guan G., Kobayashi T., Nagahama Y. 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 662–666.
- Grynberg M., Pierre A., Rey R., Leclerc A., Arouche N., Hesters L., et al. 2012. Differential regulation of ovarian Anti-Müllerian hormone (AMH) by estradiol through and estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1649—57.

- Grandi G & Chicca M. 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei). *J Morphol.* 269 (10):1238-62.
- Grandi G., Giovannini S., Chicca M. 2007. Gonadogenesis in early developmental stages of *Acipenser naccarii* and influence of estrogen immersion on feminization. *J. Appl. Ichthyol.* 23: 3–8.
- Gabe, M. 1968. *Techniques Histologiques*. Ed. Masson and Cie. Paris.
- Guiguen Y., Alexis Fostier A., Piferrer F., Chang Ch-F. 2009. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.002.
- Halm S., Rocha A., Miura T., Prat F., Zanuy S. 2007. Anti-Müllerian hormone (*AMH/AMH*) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively - spliced isoforms. *Gene* 2007; 388:148—58.
- Hattori R., Murai Y., Oura M., Masuda S., Majhi S.K., Sakamoto T., Fernandino J., Somoza G.M., Yokota M., Strüssmann C.A. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *PNAS* Vol: 109, N°8, 2955-2959.
- Hattori R., Strüssmann C., Fernandino J., Somoza G.M. 2013. Genotypic sex determination in teleosts: Insights from the testis-determining *amhy* gene. *General and Comparative Endocrinology* 192 55–59
- Hobbs J.A., Munday P.L., Jones G.P. 2004. Social induction of maturation and sex determination in a coral reef fish doi:10.1098/rspb.2004.2845.
- Herpin A., Scharl M. 2011. Vertebrate sex determination: questioning the hierarchy. *FEBS J.* 278, 1001.
- Heule C., Salzburger W., Böhne A. 2014. Genetics of Sexual development: An Evolutionary Playground for Fish. *Genetics*, Vol. 196, 579–591

- Hirobe S., He W.W., Lee M.M., Donahoe P.K. 1992. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 131, 854–862.
- Heinrichs A. 2005. Meiosis Under arrest. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 96-96 doi: 10.1038/nrm1581.
- Hoar W.S. 1957. Endocrine organs. Pages 245 to 285 in M. E. Brown, Ed. *The Physiology of Fishes*, Vol. 1, Chap. VI. Academic Pres, New York.
- Ingraham H.A., Hirokawa Y., Roberts L.M., Mellon S.H., McGee E., Nachtigal M.W., Visser J.A. 2000. Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res.* 55:53-67; discussion 67-8.
- Jost A., 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm Res.* 8, 379–418.
- Josso N., Racine Ch., di Clemente N., Rey R., Xavier F. 1998. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145 3–7
- Josso N., Picard J.Y., Rey R., di Clemente N. 2006. Testicular Anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev PER* 3:347—58.
- Josso N., Di Clemente N. 2003. Transduction pathway of Anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol. Metab.*14, 91–97.
- Josso N., di Clemente N., Gouédard L. 2001. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 179 25–32.
- Jamin S.P., Arango N.A., Mishina Y., Hanks M.C., Behringer R.R. 2002. Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.* 32, 408–410.

- Kondo M., Nanda I., Hornung U., Asakawa S., Shimizu N., Mitani H., Schmid M., Shima A., Schartl M. 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. *Curr Biol* 13:416 – 420.
- Kikuchi K., Hamaguchi S. 2013. Novel Sex-Determining Genes in Fish and Sex Chromosome Evolution *Developmental Dynamics* 242:339 – 353.
- Kitano J., Peichel C.L. 2012 Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environ Biol Fish* 94:549–558. DOI 10.1007/s10641-011-9853-8.
- Kamiya T., Kai W., Tasumi S., Oka A., Matsunaga T., Mizuno N., Fujita M., Suetake H., Suzuki S., Hosoya S., Tohari S., Brenner S., Miyadai T., Venkatesh B., Suzuki Y., Kikuchi K. 2012. A Trans-Species Missense SNP in *Amhr2* Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifu gurbripes* (Fugu). *PLoS Genet* 8(7): e1002798. doi:10.1371/journal.pgen.1002798.
- Klüver N., Pfennig F., Pala I., Storch K., Schlieder M., Froschauer A., Gutzeit H.O., Schartl M. 2007. Differential Expression of Anti-Müllerian Hormone (*amh*) and Anti-Müllerian Hormone Receptor Type II (*amhr2*) in the Teleost Medaka *Developmental Dynamics* 236:271–281.
- Kurokawa H., Saito D., Nakamura S., Katoh-Fukui Y., Ohta K., Baba T., Morohashi K-i., Tanaka M. 2007. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 16958–16963.
- Lan K.C., Chang S.Y., Huang F.J., Lin H.J., Lin C.Y., Huang K.E., Kang H.Y. 2013. Analysis of androgen receptor and anti-Müllerian hormone pathways in human granulosa cells under luteinizing hormone treatment. *Reprod Biol Endocrinol* RBE 11:11.
- Lasala C., Carré-Eusébe D., Picard J.Y., Rey R. 2004. Subcellular and Molecular Mechanisms Regulating Anti-Müllerian Hormone Gene Expression in mammalian and Nonmammalian Species *CELL BIOLOGY* Volume 23, Number 9.

- Lareyre J.J., Ricordel M.J., Mahe S., Goupil A.S., Vizziano D., Bobe J., Guiguen Y., Le Gac F. 2008. Two new TGF beta members are restricted to the gonad and differentially expressed during sex differentiation and gametogenesis in trout. *Cybium* 32(2) suppl.: 202.
- Lobel L., Pollak S., Wang S., Chaney M., Lustbader J.W. 1999. Expression and Characterization of Recombinant β -subunit hCG Homodimer. *Endocrine* vol. 10 no. 3. 261-270
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C.E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559-563.
- Myosho T., Otake H., Masuyama H., Matsuda M., Kuroki Y., Fujiyama A., Naruse K., Hamaguchi S., Sakaizumi M. 2012. Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, Vol. 191, 163–170.
- Marchand O., Govoroun M., D’Cotta H., McMeel O., Lareyre J.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.
- Miura T., Miura Ch., Konda Y., Yamauchi K. 2002. Spermatogenesis preventing substance in Japanese eel. *Development* 129, 2689–2697.
- Miura T., Miura C., Ohta T., Nader M.R., Todo T., Yamauchi K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 264:230–234.
- Morinaga C., Saito D., Nakamura S., Sasaki T., Asakawa S, et al. 2007. The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 9691 – 9696.

- Mishina Y., Rey R., Finegold M.J., Matzuk M.M., Josso N., Cate., R.L., Behringer R.R. 1996. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10, 2577–2587.
- Moberg G.P., Watson J.G., Doroshov S., Papkoff H., Pavlick R.J Jr. 1995. Physiological evidence for two sturgeon gonadotrophins in *Acipenser transmontanus* *Aquaculture* 135 27-39.
- Nelson J.S. 2006. *Fishes of the world*. 4th Edition. John Wiley and Sons, New York.
- Nakagawa S. 2004. Is avian sex determination unique? : Clues from a warbler and from chickens *TRENDS in Genetics* Vol.20 No.10 October 2004.
- Nishi M.Y., Sorahia S., Maciel-Guerra A.T., Neto A.Z., Cavalaro M.A., da Silva P., Frade Costa E.M., Guerra-Junior G., de Mendonca B.B. 2012. Analysis of anti-Müllerian hormone (AMH) and its receptor (AMHR2) genes in patients with persistent Müllerian duct syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 56/8.
- Nagahama Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In “Fish Physiology vol 9 pt A”. Ed by Hoar W.S., Randall D.J., Donaldson E.M. Academic Press. New York. pp. 223–264.
- Ohno S. 1974. *Animal Cytogenetics*. Borntraeger, Berlin.
- Ohta T., Miyake H., Miura Ch., Kamei H., Aida K., Miura T. 2007. Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica* *Biology of Reproduction* 77, 970–977 DOI 10.1095/biolreprod.107.062299.
- Oréal E., Pieau C., Mattei M.G., Josso N., Picard J.Y., Carré-Eusèbe D., Magre S. 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn.* 212, 522–532.

- Oréal E., Mazaud S., Picard J.Y., Magre S., Carre-Eusebe D. 2002. Different patterns of anti-Müllerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads *Dev. Dyn.*, 225, pp. 221–232.
- Omoto N., Maebayashi M., Mitsuhashi E., Yoshitomi K., Adachi S., Yamauchi K. 2002. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries Science* 68: 1047–1054.
- Pandian T.J & Sheela S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138: 1–22.
- Picard J.Y & Josso N. 1984. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol. Cell Endocrinol.* 34, 23–29.
- Poonlaphdecha S., Pepey E., Canonne M., de Verdal H., Baroiller J.F., D’Cotta H. 2013. Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General and Comparative Endocrinology* 193 234–242.
- Piprek R., Pecio A. Laskowska-Kaszub K., Kubiak J.Z., Szymura J.M. 2013. Sexual dimorphism of AMH, DMRT1 and RSPO1 localization in the developing gonads of six anuran species *Int. J. Dev. Biol.* 57: 891–895 doi: 10.1387/ijdb.130192rp.
- Pellatt L., Rice S., Dilaver N., Heshri A., Galea R., Brincat M. 2011. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril* 96, 1246–1251.e1
- Piferrer F & Guiguen Y. 2008. Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev. Fish Sci.* 16 (S1), 35–55.
- Roemer U., Beisenherz W. 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *J. Fish Biol.* 48, 714– 725.

- Rzepakowska M & Ostaszewska T. 2013. Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture* 5, 1 –14.
- Rzepakowska M., Ostaszewska T., Gibala M., Roszko M.L. 2014. Intersex Gonad Differentiation in Cultured Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) Sturgeon. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 90(2):31, 1–10
- Racine C., Rey R., Forest M.G, Louis F., Ferré A., Huhtaniemi I., Josso N., di Clemente N. 1998. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Developmental Biology*. Vol. 95, pp. 594–599, January 1998.
- Rodríguez-Marí A., Yan Y.L., Bremiller R.A., Wilson C., Canestro C., Postlethwait J.H, 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (AMH) relative to *Sox9a*, *Sox9b*, and *CYP19a1a*, during gonad development. *Gene Expr. Patterns* 5, 655.
- Rey R. 1998. Endocrine, Paracrine and Cellular Regulation of Postnatal Anti-Müllerian Hormone Secretion by Sertoli Cells. Elsevier Science Ltd, TEM Vol. 9, No. 7.
- Rouiller-Fabre V., Carmona S., Merhi R.A., Cate R., Habert R., Vigier B. 1998. Effect of Anti-Mullerian Hormone on Sertoli and Leydig Cell Functions in Fetal and Immature Rats. *Endocrinology* Vol. 139, No. 3.
- Strüssmann C.A., Moritama C., Hanke E., Calsina Cota J., Takashima S. 1996. Evidence of thermolabile sex determination in Pejerrey. *J Fish Biol* 48:643–651.

- Shibata Y., Paul-Prasanth B., Suzuki A., Usami T., Nakamoto M., Matsuda M., Nagahama Y. 2010. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr Patterns* 10:283–289.
- Simontacchi C., Negrato E., Pazzaglia M., Bertotto D., Poltronieri C., Radaelli G. 2009. Whole-body concentrations of cortisol and sex steroids in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*, Richardson 1836) during early development and stress response. *Aquacult Int* 17:7–14 DOI 10.1007/s10499-008-9174-x
- Smith C., Roeszler K., Hudson Q., Sinclair A. 2007. Avian sex determination: what, when and where? *Cytogenet Genome Res* 117:165–173.
- Smith C.A & Sinclair A.H. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26:120–132.
- Smith C.A., Roeszler K.N., Ohnesorg Th., 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.
- Sinclair A.H., Berta Ph., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A-M., Lovell-Badge R., Goodfellow P. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
- Shi Y & Massague J. 2013. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus Cell, Vol. 113, 685–700, June 13.
- Shiraishi E., Yoshinaga N., Miura T., Yokoi H., Wakamatsu Y., Abe S., Kitano T. 2008. Müllerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149: 1813–1819.
- Schulz R.W & Nóbrega R.H. 2011. Regulation of Spermatogenesis. En: Encyclopedia of fish physiology: from Genome to Environment. Farrel A.P (627-634).

- Teixeira J., Fynn-Thompson E., Payne A.H., Donahoe P.K. 1999. Müllerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. *Endocrinology* 140: 4732–4738.
- Taieb J., Grynberg M., Pierre A., Arouche N., Massart P., Belville C., Hesters L., Frydman R., Catteau-Jonard S., Fanchin R., Picard J-Y, Josso N., Rey R.A., di Clemente N. 2011. FSH and Its Second Messenger cAMP Stimulate the Transcription of Human Anti-Müllerian Hormone in Cultured Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology* 25: 645–655.
- Tilman C & Capel B. 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res*, 57, 1-18.
- Veith A.M, Froschauer A, Korting C, Nanda I, Hanel R, Schmid M, Scharl M, Volff J.N. 2003. Cloning *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: *dmY/dmrt1Y* is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene* 317:59–66
- Volff J. N. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94: 280- 294
DOI:10.1038/sj.hdy.6800635.
- Vizziano D., Randuineau G., Baron D., Cauty Ch., Guiguen Y. 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn* 236:2198-2206.
- Vizziano-Cantonnet D., Baron D., Mahe S., Cauty C., Fostier A., Guiguen Y. 2008. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of molecular endocrinology* 41(5): 277-288.
- van Tienhoven A. 1968. Embryology. In “Reproductive Physiology of Vertebrates”. Ed by van Tienhoven, A. WB Saunders Company. London. pp. 8–28.

- Wuertz S., Gaillard S., Barbisan F., Carle S., Congiu L., Forlani A., Aubert J., Kirschbaum F., Tosi E., Zane L., Grillasca J.P. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* 258 685–688.
- Wu X., Zhang N., Lee M.M. 2012. Müllerian inhibiting substance recruits ALK3 to regulate Leydig cell differentiation. *Endocrinology* .Oct, 153 (10):4929-37. Epub 2012 Aug 7.
- Wang P.Y, Protheroe A, Clarkson AN, Imhoff F, Koishi K, McLennan IS. 2009. Müllerian inhibiting substance contributes to sex-linked biases in the brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:72038.
- Wrobel K.H. 2003. The genus *Acipenser* as a model for vertebrate urogenital development: the Müllerian duct. *Anat Embryol (Berl)*. Mar; 206(4):255-71.
- Western P.S., Harry JL., Graves J.A.M., Sinclair A.H. 1999. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn* 216:411–419.
- Wu X., Arumugam R., Baker S.P., Lee M.M. 2005. Pubertal and Adult Leydig Cell Function in Mullerian Inhibiting Substance-Deficient Mice. *Endocrinology* 146(2):589–595 doi: 10.1210/en.2004-0646
- Wu X., Zhang N., Lee M.M. 2012. Müllerian Inhibiting Substance Recruits ALK3 to Regulate Leydig Cell Differentiation. 2012. *Endocrinology*, October 153(10):4929–4937.
- Williot P. 2011. Sex Determination and Staging of Gonads Biology and conservation of the European sturgeon, *Acipenser sturio* L. 1758. The reunion of the European and Atlantic sturgeons. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. P369-382.
- Weenen Ch., Laven J.S.E., von Bergh A.R.M., Cranreld M., Groome N.P., Visser J.A., Kramer P., Fauser B.C.J.M., Themmen A.P.N. 2004. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human

ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction* Vol.10, No.2 pp. 77±83, 2004.

Wilson C.A., di Clemente N., Ehrenfels C., Pepinsky R.B., Josso N., Vigier B., Cate R.L. 1993. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol. Endocrinol.* 7, 247–257.

Yamazaki F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33: 329–354.

Yamamoto Y., Zhang Y., Sarida M., Ricardo S. Hattori R., Strüssmann C.A. 2014. Coexistence of Genotypic and Temperature-Dependent Sex Determination in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PLOS ONE* July | Volume 9 | Issue 7 | e102574.

Yano A., Guyomard R., Nicol B., Jouanno E., Quillet E., Klopp Ch., Cabau C., Bouchez O., Fostier A., Guiguen Y. 2012. An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* 22, 1–6.

Yano A., Nicol B., Guerin A., Guiguen Y. 2011. The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-box transcription factors 1, *tbx1a* and *tbx1b*, are up-regulated during testicular development. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 172–180.

Yoshinaga N., Shiraishi E., Yamamoto T., Iguchic T., Abee S., Kitano T. 2004. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 508–513.

Yoshimoto S., Okada E., Umemoto H., Tamura K., Uno Y., Nishida-Umehara C., Matsuda Y., Takamatsu N., Shiba T. 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.

- Yokoi H., Kobayashi T., Tanaka M., Nagahama Y., Wakamatsu Y., Takeda H., Araki K., Morohashi K., Ozato K. 2002. Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol Reprod Dev* 63:5–16.
- Zhou R., Liu L., Guo Y., Yu H., Cheng H., Huang X., Tiersch T.R., Berta P. 2003. Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol Reprod Dev* 66:211–217.
- .