Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA opción Ciencias Fisiológicas

"Búsqueda de marcadores de la diferenciación ovárica en el esturión siberiano, *Acipenser baerii*"

Lic. Anabel Lee Martinez Bengochea

Orientadora: Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces (FREP) 2013

Maestría PEDECIBA en Ciencias Biológicas opción Ciencias Fisiológicas

“Búsqueda de marcadores de la diferenciación ovárica en el esturión siberiano, *Acipenser baerii*”

Lic. Anabel Lee Martinez Bengochea

Orientadora: Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces (FREP) 2013

Agradecimientos: *Quisiera agradecer a mi familia por su apoyo constante y perseverante (Martha Bengochea, Fernando Martinez y Mariana Martinez), a mis 4 abuelos (Amelia, Aida, Nelson y Robustiano), a mi hermano del alma Leonardo Delgado. A Y en especial a Agustín Campanella y Alf por su amor y apoyo incondicional. A todas mis amigas por estar conmigo y apoyarme.*

Agradecimientos especiales: *Quisiera agradecer en primer lugar a la Dra. Denise Vizziano por aceptarme en su laboratorio y por todo su apoyo en el día a día y en la realización de la tesis, a la Dra. Gabriela Bedó ya que fue una co-tutora, siempre brindo su apoyo, ayuda y opiniones. Al Dr. Waler Norbis por su ayuda en todo el soporte estadístico. A la gente del Instituto Pasteur Montevideo: Gabriela Libisch, Gonzalo Grief y Cecilia del Servicio de secuenciación IP, muchas gracias!!.*

A Mis compañeros de laboratorio: Agustín Carnikian, Santiago di Landro, Maite Letamendia, Julio Berbejillo, Lucia Mergel, Mariela Fontaiña, Valeria Camarero y a mis grandes colegas y amigos extranjeros Claudio Peréz y Talita Mazzoni, por su apoyo, ayuda en la realización, compañía, amistad y buena onda, muchas gracias por haber compartido con migo esta tesis.

A todos mis compañera/os de Oceanografía y Genética Evolutiva Muchas Gracias por el apoyo y ayuda que me dieron todo el tiempo!!.

Gracias a todos mis colegas y compañeros de Facultad de Ciencias de los pisos 5,7 y 3 que siempre me dieron siempre para adelante y me dieron su ayuda.

Muchas gracias a todos por tus ayuda y apoyo!!

Gracias a la ANII, PEDECIBA y esturiones del Río Negro

Trabajos presentados en congresos

Presentaciones a Congresos:

2012- 7th International Symposium of Fish Endocrinology (7ISFE), 3-6 de Septiembre, Buenos Aires, Argentina. Trabajo seleccionado para disertación oral "*Foxl2* expression during early gonad development in the Siberian sturgeon: *Acipenser baerii*".

Autores: **Martinez-Bengochea**, AL, Bedó G, Brunet F, Volff JN, Vizziano-Cantonnet D.

Nota: Obtuve beca para el congreso otorgada por: The Local Organizing Committee of the 7th ISFE, entre los diez estudiantes de doctorado premiados por University of Calgary y financiación PEDECIBA.

2013- IV Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos – LAQUA13_ Villavicencio, Meta-Colombia. 8-11 de Octubre 2013. Trabajo seleccionado para disertación oral "Avances sobre la diferenciación del sexo en esturiones cultivados en Uruguay"**.**

Autores: Vizziano-Cantonnet D, Berbejillo J, **Martínez-Bengochea A,** Di Landro S.

Índice General

Agradecimientos **1**

Trabajos presentados en congresos **2**

Resumen del Proyecto **6**

Lista de abreviaturas **8**

1. Introducción general **10**

1.1. El esturión siberiano: Acipenser baerii, una breve descripción *10*

1.2. Diferenciación sexual en esturiones *11*

1.3. Desarrollo del aparato genital y morfología del ovario *12*

1.3.1. Desarrollo del aparato genital en esturiones *12*

1.3.2. Diferenciación gonadal *13*

1.3.3. Ovario y Ovogénesis *14*

1.3.4. Desarrollo ovárico del esturión *16*

1.4. Diferenciación sexual en peces *18*

1.5. foxl2 en vertebrados y peces *21*

1.5.1 foxl2 en vertebrados *21*

1.5.2. foxl2 en peces *23*

1.6. wnt4, r-spondina e yy1 *25*

1.6.1. wnt4 *25*

1.6.2. r-spondina *26*

1.6.3. yy1 *28*

2. Hipótesis de trabajo **30**

3. Objetivos **30**

3.1. Objetivo general 30

3.2. Objetivos específicos 30

4. Materiales y métodos **31**

4.1. Animales experimentales y procedimientos de crianza 31

4.2. Histología 32

4.3. Extracción de ARN y Transcripción reversa 32

4.4. Amplificación de genes por PCR en tiempo final 32

4.5. PCR en tiempo real (qPCR) 34

4.6. Cultivo de tejidos 35

4.7. Hibridación in toto 36

4.8. Análisis estadístico 37

5. Resultados **43**

5.0. Morfología gonadal 43

5.1. Caracterización microscópica de las gónadas durante el momento de peri-diferenciación 43

5.1.1. Morfología de los ovarios en desarrollo 43

5.2.1. Morfología de los testículos en desarrollo 46

5.3. Caracterización del gen foxl2 y estudio de su expresión en las gónadas en desarrollo 47

5.3.1. Análisis filogenético de foxl2 47

5.3.2. Caracterización tisular de foxl2 50

5.3.3. Análisis de expresión de foxl2 durante el desarrollo gonadal 51

5.3.4.1. Efecto in vitro de los estrógenos sobre la expresión gonadal de foxl2 53

5.3.4.2. Efecto in vitro de la 11β-hidroxiandrostenediona

sobre la expresión gonadal de foxl2 54

5.3.5. Hibridación in toto de foxl2 en gónadas de A. baerii 55

5.4. Ensayos de amplificación de otros genes potencialmente involucrados en el desarrollo ovárico. 57

5.4.1. Caracterización del gen femenino de la esteroidogenésis (cyp19a1) 57

5.4.2. Caracterización de yy1 57

5.4.2.1. Ensayos de expresión de yy1 durante la peri-diferenciación 59

5.4.3. Caracterización de wnt4 61

5.4.3.1. Ensayos de expresión de wnt4 durante la peri-diferenciación 62

5.4.4. Caracterización de r-spondina 64

5.4.4.1. Ensayos de expresión de r-spondina durante la peri-diferenciación 64

6. Discusión **67**

6.1. Diferenciación morfológica y cinética de diferenciación 67

6.2. Diferenciación molecular 69

7. Conclusiones **74**

8. Bibliografía **75**

Resumen

Existen muy pocos estudios sobre los mecanismos moleculares que preceden la diferenciación sexual de la gónada de los esturiones. Cuando se comenzó esta tesis no existían antecedentes sobre los genes potencialmente involucrados en la diferenciación del ovario del esturión siberiano. Se eligieron algunos genes estipulados como participantes en la vía de diferenciación ovárica de peces teleósteos y se intentó amplificarlos, caracterizarlos y estudiar su expresión en el desarrollo gonadal en el momento de la diferenciación en el esturión siberiano (*Acipenser baerii*).

Dadas las dificultades en obtener el material biológico, solo se pudieron obtener peces de *A. baerii*, de 16 y 18 meses de edad, que estaban supuestamente en diferenciación. El estudio de la morfología de la gónada mostró la presencia de ovarios y testículos presuntivos, además de la presencia de ovarios y testículos bien diferenciados. Entre estos animales hubo muy escasos individuos considerados como indiferenciados. Se utilizaron también individuos de 3 años que si bien ya estaban diferenciados completamente, aún no habían comenzado su pubertad. Finalmente, se accedió a hembras de 5 años que ya habían comenzado su vitelogénesis y presentaban ovocitos redondos y grisáceos y bien visibles que corresponden a lo descripto como individuos en vitelogénesis.

En una primera instancia se eligieron dos genes claves en la diferenciación ovárica de los teleósteos: el *foxl2* y la *aromatasa* (*cyp19a1a*). Solo se logró amplificar y caracterizar al *foxl2* con el cual se realizó la mayor parte de este trabajo. En una segunda instancia se decidió realizar la búsqueda de otros genes considerados como importantes en la vía femenina (*wnt4*, *r-spondina1* e *yy1*).

El trabajo se centró fundamentalmente en la amplificación y caracterización del *foxl2*.

Los trabajos de filogenia nos permitieron establecer que el fragmento de *foxl2* que trabajamos corresponde al *foxl2a*, es decir al parálogo que es considerado como ancestral y que se encuentra en todos los vertebrados. La caracterización tisular nos permitió visualizar que por lo menos en los individuos de 3 años de edad, el *foxl2a* no mostraba una expresión dimórfica femenina como era de esperar. Cuando se realizó la comparación entre ovarios y testículos de

animales recién diferenciados (16 y 18 meses) se comprobó que al igual que en los individuos de 3 años, no había dimorfismo sexual en la expresión de *foxl2a*. Así fue que decidimos explorar si había un aumento en la expresión del *foxl2* en el desarrollo ovárico comparando los individuos de 16 meses con los de 5 años. En este caso la expresión de *foxl2a* aumentó claramente en los individuos de 5 años (en vitelogénesis) con respecto a los recién diferenciados (16 y 18 meses), lo que sugiere que tal vez el *foxl2a* podría estar involucrado en el desarrollo de las células foliculares como se plantea en mamíferos. Lamentablemente, los resultados obtenidos en las hibridaciones *in situ* no permitieron concluir sobre la localización celular del *foxl2a*. Se realizaron estudios complementarios con el fin de comprender si el *foxl2a* expresado en la gónada de esturiones está regulado por los esteroides (estrógenos y andrógenos) como se ha observado en teleósteos, pero en las condiciones experimentales usadas no se observaron cambios en la expresión frente al tratamiento esteroideo.

Finalmente, se logró amplificar y confirmar la identidad de *wnt4, r-spondina1* e *yy1* y se comenzó su caracterización tisular.

En suma, el *foxl2*a no aparece como un gen dimórfico femenino en estos peces basales, como ocurre en los peces teleósteos y ello sugiere que no estaría involucrado en la vía de diferenciación sexual del ovario. Sin embargo, antes de concluir nada al respecto deben investigarse estadios más tempranos del desarrollo gonadal. Nuestro trabajo abre la pista de investigación sobre un posible papel del *foxl2a* en la regulación de las células foliculares como se propone en mamíferos, y deja abierta la posibilidad de explorar otros genes durante el proceso de diferenciación ovárica (*wnt4*, *r-spondina1*, *yy1*).

Lista de abreviaturas

En esta tesis se siguió la presente denominación en peces: los genes fueron expresados en estilo de fuente itálica y en minúscula (ej: *foxl2*), las proteínas fueron expresadas en un estilo de fuente normal y en minúscula (ej: foxl2). Por otro lado, en genes duplicados se le adiciona al símbolo del gen las letras a para ortólogo y b al parálogo (ej. *foxl2a* y *foxl2b*).

En mamíferos las proteínas se expresaron en estilo de fuente normal y mayúscula la primera letra (ej Foxl2).

Adaptado de *Zebrafish Nomenclature Guidelines* en: https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines.

Amh: hormona anti-Mülleriana

Amhr2: receptor de la hormona anti-Muleriana tipo II

Amhy: gen parálogo de amh ligado al cromosoma Y.

Ar: androgen receptor

ATD: androstenetriona

BPES: síndrome de inversus blefarofimosis-ptosis-epicanto

CCND2: ciclina D2

CHO: ovocito de hamster chino

Cyp11a1: citocromo P450

Cyp11b2: citocromo P450, familia 11, subfamilia B, polipéptido 2

Cyp17a1: citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1

Cyp19a1: citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1.

Cyp19a1b: citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1b

Dax1: receptor nuclear huérfano dax1

Dmrt1bY: Gen con dominio DM ligado al cromosoma Y.

Dmrt1: doublesex and mab-3-related transcription factor 1

Dm-W: gen parálogo de dmrt1 ligado al cromosoma W.

Dnmt1: ADN metiltransferasa (citosina 5)

E2: estradiol, 17β estradiol

ESD: determinación sexual por temperatura, o Temperature Dependent Sex Determination

Foxl2: foxl2 forkhead box L2

Fst: folistatina

GSD: determinación sexual genética, o Genetics Sex Determination

GsdfY: Factor de crecimiento gonadal derivado del soma asociado a Y

Hsd3b1: hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta y esteroide-delta isomerasa 1

Nr0b1: receptor nuclear de la subfamilia 0, grupo B, miembro 1

Nr5a1: receptor nuclear de la subfamilia 5, grupo A, miembro 1.

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PGC: células germinales primordiales

PIS: síndrome polled/intersex

POF: falla ovárica prematura

R-spo: r-spondina

sdY: gen especifico masculino del cromosoma Y

Sf1: factor esteroidogénico 1

Sox9: gen 9 conteniendo al SRY-box

SRY: región del cromosoma Y determinante del sexo

Star: proteína reguladora aguda esteroidogénica

TSR-1: superfamilia de trombospondina tipo 1

Wnt4: wingless-type MMTV integration site family member 4

Yy1: yin yan factor 1

11-KT: 11-ceto-testosterona

18S: 18S ribosomal RNA gene

20β-HSD: 20β-hidroxiesteroide

1. Introducción general

1.1. El esturión siberiano: Acipenser baerii, una breve descripción

Figura 1. *Acipenser baerii*

Los esturiones pertenecen al filo de los *Cordados*, clase *Actinopterygii*, subclase *Chondrostei*, orden *Acipenseriformes*, Familia *Acipenseridae*, Subfamilia *Acipenserinae*, Género *Acipenser* (Brandt 1869) (Fig. 1).

La familia *Acipenseridae* es una familia ancestral de peces, que aparecieron en la Tierra hace alrededor de 200-250 millones de años (período Jurásico inferior) (Carmona et al. 2009; Kunz et al. 2009), estableciéndose en poblaciones abundantes en el hemisferio norte (Carmona et al. 2009). Se encuentran muy cerca de la divergencia entre los peces que evolucionaron hacía en los animales terrestres, y los que se desarrollaron en especies de peces teleósteos modernos (Bidwell & Carlson 1995). Dicha familia consiste en 25 especies que continúan existiendo en nuestros días, a pesar de ser ancestrales y de estar en peligro de extinción (19 especies de *Acipenseridae* y 6 especies de *Scaphirhynchinae*) (Nelson 2006; Kunz et al. 2009). En la presente tesis se utilizará como modelo de estudio al esturión siberiano; *Acipenser baerii* (Fig. 1).

El cultivo de esta especie comenzó en la antigua URSS en los 1970s. Fue también en aquel tiempo que los primeros individuos (de padres que se habían originado en el Río Lena) llegaron a Francia, como un modelo biológico en el contexto de un programa Franco-Soviético de cooperación científica. Desde entonces, la dispersión de la especie se ha acelerado y además de la Federación Rusa (su país de origen), se sabe que está presente en Europa (Bélgica, Francia, Italia, Alemania, Hungría, Polonia y España), América (Estados Unidos, Uruguay) y Asia (China) (Datos

de la FAO). La especie también se ha liberado al ambiente en Uruguay según lo reportan los representantes del sector productivo (Vizziano, com. pers.).

Los esturiones son muy longevos, con una pubertad y madurez sexual muy tardía (Kunz et al. 2009). Algunas especies viven 100 años y pueden alcanzar un peso de 1000 kg (Billard & Lecointre 2001; Kunz et al. 2009). El esturión siberiano llega a su pubertad los 11 y 13 años en condiciones naturales, mientras que en cautividad los machos llegan a la pubertad entre los 3 y 4 años y las hembras la alcanzan entre los 7 y 8 años en las condiciones de cultivo del sur de Francia (Billard & Lecointre 2001). Su crecimiento lento también se evidencia en el momento de diferenciación sexual que ocurre en la fase juvenil.

1.2. Diferenciación sexual en esturiones

Existen pocos artículos dedicados al estudio de la morfología de la diferenciación sexual gonadal de esturiones a diferencia de lo que ocurre en teleósteos para los cuales se han realizado revisiones exhaustivas (Brusle & Brusle 1983; Nakamura et al. 1998).

Se tienen datos sobre la diferenciación gonadal del esturión del Adriático (*Acipenser naccarii*) (Grandi et al. 2007; Grandi & Chicca 2008), del esturión chino (*Acipenser sinensis*); (Chen et al. 2006; Chen et al. 2011) y en este año se publicó un estudio sobre el esturión siberiano (*Acipenser baerii*, Rzepkowska & Ostaszewska 2013).

En *Acipenser sinensis* se vieron los primeros signos de diferenciación sexual en las gónadas a la edad de 9 meses (0.6 ~ 1.1 kg de peso corporal), las gónadas entraron en la etapa de madurez en el estadio I, donde la mitosis de las espermatogonias y ovogonias fueron primeramente observados. A los 22 meses (1.55 a 5.6 kg de peso corporal) los testículos y los ovarios alcanzaron el estadio II (Chen et al. 2006). En *Acipenser naccarii* a los 6 meses de edad se observan los ovarios presuntivos con un epitelio gonadal con invaginaciones y los testículos presuntivos. A los 7 meses de edad se observó la proliferación activa de células germinales desarrollándose en un ovario presuntivo, mientras que los testículos presuntivos todavía contenían unas pocas células germinales. El inicio de la meiosis y la reorganización del estroma se produjeron en los ovarios de 9 meses de edad. Los ovarios con lamelas se desarrollan reuniendo grupos de ovocitos y folículos

tempranos con ovocitos peri-nucleolares se produjeron a los 19 meses. Los testículos no mostraron mitosis de las células germinales hasta los 14 meses de edad (Grandi et al. 2007; Grandi & Chicca 2008). Para el esturión siberiano se reportó la presencia de ovarios y testículos presuntivos a los 4 meses basados en la presencia de invaginaciones en el epitelio germinal (Rzepkowska & Ostaszewska 2013). En el presente trabajo se realizó una descripción detallada del desarrollo gonadal a nivel morfológico a partir de individuos de 16 a 18 meses.

1.3. Desarrollo del aparato genital y morfología del ovario

1.3.1. Desarrollo del aparato genital en esturiones

Es importante conocer primero el desarrollo del aparato genital femenino ya que la presente tesis se enfoca en el estudio de los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación y estructuración del ovario del esturión siberiano durante el desarrollo embrionario. El conducto de Müller de las hembras tiene su origen en las células cúbicas o columnares de la parte inferior del espacio infundibular. Estas células crecen formando un túbulo con un extremo sólido en la dirección caudal, en paralelo al conducto de Wolff, pero sin una contribución de las células de este último. En *Acipenser*, el conducto de Müller está presente también en el macho adulto. Tanto en los machos como en las hembras, el extremo caudal del conducto de Müller se divide en dos o tres terminales más pequeños que terminan en el conducto de Wolff en diferentes niveles, pero siempre desde la zona craneal hacia el seno urogenital.

En la mayoría de los animales indiferenciados y en todos los machos, los extremos de los terminales de Müller están cerrados y cubiertos por una fina capa de epitelio proveniente del conducto de Wolff. En las hembras adultas, los conductos de Müller finalizan con terminales abiertas. En ambos sexos, el conducto de Müller de los adultos está revestida por un epitelio columnar pseudoestratificado, que consiste en células libres ciliadas, no ciliadas y basales (Wrobel 2003).

1.3.2. Diferenciación gonadal

En los peces al igual que en el resto de los vertebrados las células germinales primordiales se diferencian a partir de células del saco vitelino en regiones extra-gonadales. Esas células denominadas células primordiales germinales (PGC) migran luego por el mesenterio dorsal hasta la cresta genital. La cresta genital se forma por un espesamiento del mesodermo que se proyecta ventralmente para la cavidad celómica del embrión y queda delimitada por el mesotelio (Devlin & Nagahama, 2002). Dichas PGC se pueden distinguir por la expresión de VASA una proteína que se expresa en la línea germinal.

Una vez que las PGC se localizan en el primordio gonadal el mismo queda constituido por células germinales y células somáticas que van a multiplicarse durante el período de crecimiento del mismo hasta transformarse en una gónada indiferenciada (Brusle & Brusle 1983) La gónada indiferenciada a su vez sufre una serie de cambios estructurales que darán lugar a las gónadas femeninas y masculinas (Brusle & Brusle 1983; Devlin & Nagahama 2002). La diferenciación sexual gonadal ocurre básicamente por una estructuración especial de las células somáticas que darán lugar a los folículos en los ovarios y túbulos o lóbulos en los testículos. Esto va acompañado de divisiones mitóticas de las células germinales (Bruslé & Bruslé 1983). Durante el desarrollo se pueden formar o no una cavidad ovárica y ductos espermáticos que permiten identificar las gónadas en diferenciación (Nakamura et al. 1998).

Muy recientemente fue publicada una descripción de la gonadogénesis y diferenciación del esturión siberiano, analizando el desarrollo gonadal entre 1 y 439 post-eclosión (Rzepkowska & Ostaszewska 2013). La migración de las células germinales (PGC) fue observada desde el primer día después de la eclosión, mientras que los primordios gonadales aparecieron a los 25 días post eclosión. Las autoras distinguen dos tipos de gónadas juveniles a los 4 meses post-eclosión consideradas como ovarios y testículos presuntivos. Las gónadas femeninas presuntivas se distinguen por la presencia de invaginaciones del epitelio germinativo. Otro de los criterios utilizados para el diagnóstico fue la aparición temprana de células meióticas en los potenciales ovarios (197 post-eclosión, 6.5 meses), mientras que en los posibles testículos se observaron las primeras divisiones meióticas mucho más tarde (439 días post-eclosión o sea a los casi 15 meses).

Se encontró mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de la proteína Vasa confirmada exclusivamente en las células germinales durante la gonadogénesis, lo que indica que Vasa es un buen marcador de células germinales también en *Acipenseridae* (Rzepkowska & Ostaszewska 2013). En las gónadas de las dos especies de esturión en las cuales se investigó la proliferación celular a través del PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), primero se observó una reacción positiva en ovogonias (25 días post-eclosión) sugiriendo una proliferación temprana de las mismas, mientras que la proliferación de las espermatogonias fue observada más tardíamente, a los 115 días después de la eclosión. (Rzepkowska & Ostaszewska 2013).

1.3.3. Ovario y Ovogénesis

Los ovarios de peces son en general órganos pares recubiertos por una pared fibro-muscular, y cuya unidad estructural es la lamela ovígera. Dicha lamela se encuentra constituida por un eje de tejido fibro-muscular que se desprende de la pared y está recubierta por el epitelio germinativo que se continúa con el epitelio que tapiza la pared del ovario. El epitelio germinativo está constituido por células epiteliales en las cuales se enclavan las células germinales ovogoniales que proliferan en dicho epitelio. Cuando la ovogonia comienza a transcurrir hacia el proceso de meiosis en forma paralela va independizándose del epitelio germinativo e ingresando al interior de la lamela ovígera. Esta célula germinal abandona el epitelio germinativo rodeado por células foliculares de origen epitelial y es luego rodeada por células de tipo conjuntivo que constituirán la teca (Grier & Lo Nostro 1999). De este modo el interior de la lamela estará constituido por células germinales en distintas etapas de la ovogénesis.

Las principales etapas de la ovogénesis son: formación de células germinales primordiales (PGC, etapa embrionaria), transformación de PGC en ovogonias (momento de la diferenciación sexual gonadal), transformación de las ovogonias en ovocitos primarios junto al inicio de la meiosis (etapa juvenil), crecimiento secundario o vitelogénesis endógena (etapa juvenil), crecimiento masivo durante la vitelogénesis (pubertad y ciclo ovárico del adulto), maduración ovocitaria e hidratación, ovulación y liberación al exterior del pez (madurez) (Lubsenz et al. 2010).

Durante la embriogénesis temprana, se produce un pequeño número de células PGC que no se dividen. Las PGC contienen componentes conocidos como plasma germinal que se caracteriza por la presencia de gránulos polares o estructurales electrón-denso asociado con la mitocondria, ARN y proteínas conocidas como "nuage" o "ciment". Las PGC se pueden distinguir de las células somáticas (utilizando microscopía óptica) por su tamaño mayor, una gran relación núcleo-citoplasmática y uno o dos nucléolos prominentes. Su forma no es regular. La transformación de las PGC en ovogonias involucra divisiones mitóticas y formación de nidos de ovognias en asociación con las células pre-granulosa. Cada ovogonia en su proceso de transformación en ovocito primario (inicio de la meiosis) se rodea de una mono-capa de células granulosas, secretando una lamina basal que lo separa de las células del estroma del ovario. Las células pre-tecales forman una capa fuera de lámina basal estando asociada con los vasos sanguíneos. El ovocito rodeado de las células somáticas, lamina basal y la teca constituye el folículo primario. Después de la entrada en meiosis, las células pre-foliculares envuelven un cisto de ovocitos diploténicos. Al final del paquiteno las células pre-foliculares invaden el cisto e individualizan cada uno de los ovocitos, formando el folículo ovariano (Lubzens et al. 2010).

El crecimiento primario abarca el período de desarrollo del crecimiento del ovocito desde la fase meiótica hasta la formación del alvéolo cortical, estando íntimamente vinculado al desarrollo de las capas foliculares que rodean al ovocito. Los alvéolos se sintetizan antes o al mismo tiempo con el inicio de la entrada de vitelogenina. La transición hacia crecimiento secundario comienza con el engrosamiento del ovocito, asociado con la aparición de los alvéolos corticales que llenan la periferia del ovocito, denominándose también como vitelogénesis temprana. Los alvéolos corticales son vesículas de membrana con tamaños variables localizándose de forma cercana al complejo de Golgi. A medida que el ovocito crece, aumentan en número y tamaño llenando el citoplasma del ovocito. Durante las últimas etapas de desarrollo de los ovocitos los alveolos corticales son desplazados hacia la periferia.

La vitelogénesis generalmente se describe como la incorporación de vitelogenina por el ovocito, así como también otras moléculas como ser lípidos y vitaminas. Al final de este proceso el ovocito se vuelve competente para la fecundación, conteniendo ARNm materno, proteínas, lípidos,

carbohidratos y hormonas para el desarrollo del embrión. El principal evento asociado con la finalización de la vitelogénesis es la reanudación de la meiosis (maduración del ovocito). El proceso de hidratación del ovocito es único entre vertebrados, contribuyendo como un reservorio de agua para la supervivencia y dispersión. Después de reanudar la meiosis, se libera el ovocito en metafase II desde el folículo. Siendo la ovulación la liberación del ovocito maduro desde el folículo piloso en la cavidad del ovario o en la cavidad abdominal (dependiendo de la especie) (Lubzens et al. 2010).

1.3.4. Desarrollo ovárico del esturión

El desarrollo ovárico, es asincrónico durante la gametogénesis, es decir, los ovocitos no crecen todos juntos. Esto significa que en cualquier momento dado pueden observarse ovocitos con muy diferentes tamaños y estadio de desarrollo (Williot et al. 2011). Al final del desarrollo de los ovarios hay sólo dos tamaños de ovocitos, los de mayor tamaño (3.4 mm) que son los que se acercan a la madurez, presentan un color pigmentado, y una generación menos avanzada conformada por ovocitos pre-vitelogénicos de color blanco. A su vez y además del asincronismo en el interior del ovario, existe un asincronismo dentro de una misma cohorte de esturiones lo cual implica que estos peces no exhiben un ciclo gonadal similar, observándose en peces adultos de la misma edad etapas muy diferentes del desarrollo (Williot et al. 2011).

El esturión siberiano (*A. baerii*) es una especie gonocórica, por lo tanto posee sus sexos separados. En esta especie, el ciclo ovogenético ha sido descripta por diferentes autores (Le Menn & Pelissero 1991; Doroshov et al. 1997; Williot et al. 2011). Vamos a describir la ovogénesis según Le Menn & Pelissero 1991.

Ovogonias

Miden entre 8 y 15 µm y la relación núcleo-citoplasmática es mayor a 1. Ellas se encuentran en clusters de 10 a 20 células, rodeadas por tejido adiposo. Cada cluster está rodeado de una sola capa de células pre-foliculares con una lámina basal.

Estadio I

La ovogonia se transforma en ovocito, luego de dividirse, formar clusters y rodearse de las células foliculares y membrana basal. Dichas ovogonias inician el proceso de meiosis para transformarse en ovocito. Se pueden observar las etapas leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno de la primera profase meiótica. El ovocito rodeado por las células foliculares forma el folículo primario. En *A.baerii* en cultivo en el sur de Francia, este estadio ocurre a un año de edad en animales de 40 cm y 800 g de peso. Se trata de la etapa de formación del folículo primario (Lubsenz et al. 2010).

Estadío II

El ovocito en esta etapa mide entre 80 y 120 µm, presenta múltiples nucléolos en el núcleo, y se observan en su citoplasma glóbulos lipídicos. Esto ocurre en esturiones siberianos de 3 años de edad y 2 kg de peso, cultivados en el sur de Francia.

Estadío III

El diámetro ovocitario varía entre 120 y 600 µm. En su citoplasma se observan glóbulos lipídicos y se observan alvéolos corticales. En esta etapa se observa la deposición de la membrana pelúcida entre las microvellosidades interdigitadas de la membrana ovocitaria y las células foliculares. Esto ocurre en hembras de 3.5 años de edad y 4 kg de peso (Williot et al. 2011). Se correspondería con el proceso de crecimiento secundario llamado también vitelogénesis primaria (Lubsenz et al. 2010). Los ovocitos más pequeños (estadios I, II y III) son de color blanco (Williot & Brun 1998).

Estadío IV

En esta etapa ocurre un rápido crecimiento del ovocito por la incorporación del vitelo cuya deposición se observa en la periferia citoplásmica en forma de glóbulos. La zona radiata sigue engrosándose. En este estadio, los ovocitos poseen un diámetro de 0.9-2.8 mm, en hembras de 5 años de edad y de 5 kg en condiciones de cultivo del sur de Francia. Este estadio corresponde al proceso de vitelogénesis (Lubsenz et al. 2010). En esta etapa cuando los ovocitos llegan a un

diámetro entre 1,2 y 1,6 mm comienzan a adquirir una pigmentación más oscura (Williot & Brun 1998).

Estadío V

En este estadío ocurren los eventos que conducen a la maduración y ovulación ovocitaria. El núcleo migra hacia la periferia del ovocito hacia el polo animal y los glóbulos de vitelo y lipídico se agregan en el polo vegetal. El diámetro de los ovocitos es de 2.8-3.4 mm en hembras de 6 años y 5.5 kg en condiciones de cultivo del sur de Francia (Williot et al. 2011). Esto corresponde a la etapa de maduración ovocitaria descripta en Lubsenz et al. 2010. En esta etapa los ovocitos adquieren una coloración gris oscura a negra.

Figura 2. Ejemplares de la especie *Acipenser baerii.* **A-** Ejemplar juvenil **B-** Ejemplar adulto

1.4. Diferenciación sexual en peces

La determinación del sexo en vertebrados aún no ha sido comprendida en su globalidad

En los mamíferos terios (masurpiales y euterios) la determinación sexual esta controlada genéticamente por la presencia o ausencia del cromosoma Y portador del gen determinante del sexo que en este caso es masculino (sistema XX/XY) (Koopman 1999; Loffler & Koopman 2002).

En los peces se han descubierto diferentes genes determinantes del sexo en sistemas de determinación sexual XX/XY. En el 2002, se descubre el primer gen determinante del sexo en peces, en dos medakas (*Oryzias latipes* y *Ozyzias curvinotus*) (Nanda et al. 2002; Matsuda et al. 2002). Se trata del *dmrt1b-Y* o *dm-Y*, y es un parálogo del *dmrt1* (gen muy importante en el desarrollo testicular de vertebrados e invertebrados) que adquiere una nueva funcionalidad estando ligado al cromosoma Y. Sin embargo, *dmY* no ha podido ser confirmado como un gen ligado al sexo en otras especies de peces e inclusive en otras especies del mismo género (Volff et al. 2003). Los estudios filogenéticos muestran que habría aparecido mucho más tardíamente que SRY (Zhang 2004). En 2012, se reportan otros dos genes mayores determinantes del sexo: el *amhY* en el pejerrey (Hattori et al. 2012), el *gsdfY* en otra especie de medaka (*Oryzias luzonensis*) (Myosho et al. 2012), *amhr2* en el Fugu (*Takifugu rubipes*) (Kamiya et al. 2012) y *sdY* en trucha arcoíris (*Oncorhnchus mykiss*) (Yano et al. 2012).

En los esturiones no se ha descubierto aún el gen determinante del sexo. Teniendo en cuenta que en varios esturiones se ha postulado la presencia de un sistema de determinación sexual del tipo ZZ/ZW, existen dos posibilidades: a) la presencia de un gen que en doble dosaje (ZZ) de lugar a una macho con un sistema similar al de aves (Smith et al. 2009), b) que exista un gene determinante femenino localizado en el cromosoma W, como se ha descripto en anfibios (Yoshimoto et al. 2008).

La determinación sexual ocurre en individuos genéticamente determinados en el momento de la fecundación, sin embargo la diferenciación sexual solo puede ocurrir después de la aparición de la gónada. Tanto los ovarios como los testículos, se desarrollan a partir de un mismo primordio, luego los tejidos se comienzan a diferenciar en tejidos específicos para el desarrollo fenotípico del ovario o del testículo (Brennan & Capel 2004; Braske & Capel 2008; Penman & Piferrer 2008; Baroiller et al 2009; Capel & Tanaka 2013). Previo a la diferenciación morfológica ocurre la diferenciación molecular del sexo que son los eventos moleculares que distinguen la vía de diferenciación femenina de la vía masculina (Vizziano et al 2007). Análisis recientes, tienden a demostrar que las redes que subyacen a la diferenciación sexual gonadal, no están tan conservadas como se lo consideraba (Volff 2005).

En peces teleósteos, se han realizado múltiples análisis de los genes implicados en la diferenciación gonadal del ovario, encontrándose que muchos de ellos se encuentran implicados en la esteroidogenesis. En la diferenciación ovárica en peces, se ven implicados los genes; *foxl2a y b, fst* y *cyp19a1a* (aromatasa) (Baron et al. 2005; Vizziano et al. 2007), mientras que en la diferenciación testicular en peces son; *sox9, nr5A1 (Sf1), nr0b1, dax1, dmrt1* y *amh* (Vizziano et al. 2007; Ijiri et al. 2008). Otros genes importantes que codifican enzimas implicadas en la producción de estrógenos y andrógenos son: *cyp11a1, hsd3b1 y, cyp17a1*, mientras que en la producción de estrógenos están implicados: c*yp19a1a* y*cyp11b2*. También son importantes los factores de transcripción *nr5a1b* y *nr0b1*en la producción de enzimas esteroideas, así como la proteína Star es capaz de transferir el colesterol al interior de la mitocondria (Vizziano et al. 2007; Ijiri et al. 2008).

Es interesante enfocarse en los genes implicados en la diferenciación ovárica, ya que pueden ser buenos marcadores genéticos del ovario por tener un patrón de expresión claramente dimórfico. Algunos de estos genes son; *cyp19a1a, foxl2a*, y *fst* pudiendo actuar de una manera concertada lo cual induce la vía femenina de la gónada en peces teleósteos (Baron et al. 2005; Vizziano et al. 2007; Vizziano-Canntonet et al. 2008; Wang et al. 2007). Centrándonos en el *foxl2*, este es uno de los pocos genes considerados como posible determinante ovárico en vertebrados (Baron et al. 2005; Baron et al. 2004; Govoroun et al. 2004; Pannetier et al. 2006; Wang et al. 2007; Nakamoto et al. 2006; Ottolenghi et al. 2005).

Otro gen muy importante para la diferenciación temprana hacia la vía femenina es la aromatasa (*cyp19a1*), ya que transforma la testosterona en estradiol (Vizziano et al.2011). Esta consideración está basada en estudios con tratamientos anti-aromatasa, que provocan una masculinización de la gónada. Estos tratamientos inhiben la enzima aromatasa y por consiguiente produce la ausencia de estradiol, lo cual permitiría que el pez tenga una diferenciación masculina (Baroiller et al. 1999; Nagahama 2005; Vizziano et al. 2007).

Sin embargo, todos los genes anteriormente mencionados, representan sólo una parte de los muchos genes que pueden estar potencialmente implicados en la diferenciación sexual. Se sospecha que quedan muchos más genes por descubrir y la genómica funcional sería una herramienta de gran importancia estratégica para su investigación (Piferrer & Guiguen 2008).

1.5. foxl2 en vertebrados y peces

1.5.1 foxl2 en vertebrados

Foxl2 es un factor de transcripción llamado winged helix/forkhead, cuya proteína participa en la regulación de la transcripción del ADN activando otros genes. Se encuentra en una amplia gama de especies, siendo un gen expresado de forma dimórfica en hembras. El gen *foxl2*está muy conservado en vertebrados y se encuentra expresado en el núcleo de las células de la granulosa del ovario (Cocquet et al. 2002; Maiese 2009; Kuo et al. 2012).

La familia Forkhead (FOX) de factores de transcripción comparte un dominio de unión a ADN común de hasta 110 aminoácidos, su estructura hélice-giro-hélice se asemeja a una mariposa, de ahí el nombre alternativo "alas hélice- wingled helix". Fuera del dominio forkhead conservado, existe poca similitud entre los miembros de la familia que incluyen activadores de la transcripción, así como también participan en actividades represoras (Uhlenhaut et al. 2006).

En vertebrados, una de las principales funciones de la proteína Foxl2 consiste en la diferenciación de las células somáticas del ovario, preservando la identidad de las células de la granulosa (Pisarska et al. 2011; Caburet et al. 2012), incluso hasta la etapa adulta. En estudios en ratones se ha encontrado que es un factor muy importante para la foliculogénesis (Ottolenghi et al. 2005; Uhlenhaut et al. 2009), ya que se encuentra implicado en el desarrollo y mantenimiento del folículo (Cocquet et al. 2002; Pisarska et al. 2011; Kuo et al 2012).

En mamíferos, se sugiere que estaría implicado en la regulación de la homeostasis del colesterol, metabolismo esteroideo, apoptosis de las células de la granulosa, desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno y en el proceso de inflamación (Maiese 2009).

El gen *foxl2* se identificó por primera vez en ratones en el año 1998 (Treier et al. 1998), como un nuevo miembro de factores de transcripción forkhead, encontrándose que estaba implicado en el desarrollo de la glándula pituitaria. Recibió el nombre de forkhead pituitaria, ya que inicialmente, mostró una expresión diferencial en la parte más ventral de la bolsa de Rathke (Uhlenhaut et al. 2006). Por razones históricas, la participación de *foxl2* en la pituitaria y la función ovárica ha sido el foco de la mayor parte de la investigación actual (Caburet et al. 2012).

En humanos, se encontró que una mutación de *foxl2* o su mala regulación, provoca el síndrome BPES (enfermedad autosómica). BPES es un trastorno genético asociado con anomalías cráneo-faciales leves, a menudo asociados con la insuficiencia ovárica prematura. Existen dos formas de BPES: el tipo BPES II, en el que aparecen aislados estigmas cráneo-faciales (defectos en los ojos), mientras que en el tipo BPES I también hay una falla ovárica prematura (POF) (Cocquet et al, 2002; Caburet et al. 2012). Recientemente, se han asociado disfunciones de *foxl2* con el desarrollo de tumores de ovario de células de la granulosa (OGCT). Los OGCTs son neoplasias endócrinas, que representan entre el 2 y 5% de los cánceres de ovario, cuyo tratamiento sigue siendo un reto (Cocquet et al. 2002; Govoroun et al. 2004; Uhlenhaut et al. 2006; Caburet et al. 2012).

Por otro lado, en otros mamíferos, como las cabras, las mutaciones o mala regulación de *foxl2*estáasociada a la mutación PIS. Es responsable tanto de la ausencia de cuernos en machos y hembras, provoca también reversión sexual, que afecta exclusivamente a individuos XX. El modo de herencia, es dominante para el rasgo, y recesivo para la reversión sexual (Pailhoux et al. 2005).

En gallinas, se ha encontrado que *foxl2* es un regulador temprano del desarrollo de los ovarios, y puede estar implicado en la regulación de la transcripción de la aromatasa (Govoroun et al. 2004). El *foxl2* puede actuar como inductor del promotor de la aromatasa, ya que sus patrones de expresión se han visto correlacionadas en el periodo de diferenciación (Pannetier et al 2006; Govoroun et al. 2004; Pailhoux et al. 2005).

En ratones, estudios de knockout para eliminar la expresión de *foxl2*, provocó que se bloqueara la formación del folículo ovárico, conduciendo a la formación parcial de ovario a testículo, independientemente de los genes *wnt4*y *rspo1*. Dichos genes, están implicados en el desarrollo del ovario (Pisarska et al. 2011).

En otros estudios, realizados en hámster chino (CHO), se ha encontrado que las mutaciones de *foxl2* llevan a la pérdida de expresión de *cyp19* y *star*, por lo que se verifica insuficiencia ovárica prematura. Como ejemplo de la actividad represora de *foxl2,* se ha encontrado que esté reprime los promotores de varios genes clave implicados en la esteroidogénesis de las células de la granulosa y en la proliferación. Los estudios implicaron los promotores de *star, cyp19,* y *cyp11a*,

así como *ccnd2* (que controla la progresión del ciclo celular), son diferencialmente afectados por la proteína *foxl2* mutada. Cuando se elimina *foxl2* en células de la granulosa de CHO utilizando siRNA, se produce un aumento significativo de los niveles de expresión de *star*, *cyp19a1a* y *cyp11a1* pero no de *ccnd2*. Por el contrario, al aumentar los niveles de expresión de*foxl2*, los niveles de expresión de *star, cyp19a1a y cyp11a1* aumentaron, pero no los de *ccnd2*, los cuales en cambio disminuyeron significativamente. Estos datos confirman que en CHO, Foxl2 funciona como un represor transcripcional de genes claves en las células de la granulosa, influyendo en el desarrollo ovárico (Kuo et al 2012).

Finalmente, es importante destacar que *foxl2* interactúa con otros genes durante el desarrollo ovárico en mamíferos. Estas son las vías *foxl2* y *r-spo1/wnt4* siendo estas dos últimas independientes de *foxl2*. En los mutantes de cabra PIS, la expresión *r-spo1* parece no ser afectado. Mientras tanto en ratones, la delección selectiva de *foxl2, r-spo1* o *wnt4* no induce el desarrollo testicular (Cutting et al. 2013).

1.5.2. foxl2 en peces

En peces, se encontró que*foxl2*posee una expresión dimórfica, teniendo una expresión mayor en las hembras de diferentes especies y grupos taxonómicos (por ejemplo, la trucha arco iris (*Oncorhynchu smykiss*), bagre sur (*Silurus meridionalis*), y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en comparación con los machos (Baron et al 2005, 2008; Vizziano et al 2007; Ijiri et al. 2008; Liu et al 2007). A pesar de que se considera que *foxl2* tiene una expresión dimórfica, en algunas especies, como el *Gobiocypris rarus* (especie emergente utilizada en el área toxicológica acuática en China, ya que es sensible a los disruptores hormonales ambientales), se han reportado niveles de expresión bajos de *foxl2* en testículos, siendo en el ovario significativamente más alta, y por lo tanto se consideró una expresión dimórfica (Jiang et al. 2011).

Su dominio forkhead y la región C-terminal de *foxl2* están bien conservados. Por lo que puede esperarse que, las funciones de dicha región estén conservadas a través de la evolución (Cocquet et al. 2002; Wang et al. 2012).Su expresión se observa en las células somáticas que recubren las células germinales en el ovario. Esta expresión se mantiene en la granulosa a lo largo

del desarrollo del ovario (Nakamoto et al. 2006; Nakamoto et al. 2009), sin verse expresión en las células de la teca (Wang et al. 2004).

Es importante destacar que se han encontrado dos parálogos en trucha arco iris, *foxl2a* (ortólogo) y su parálogo *foxl2b* durante el desarrollo gonadal normal, así como también cuando se efectúan tratamientos masculinizantes y feminizantes (Baron et al. 2004; Kobayashi et al. 2010; Jiang et al. 2011). En trucha arcoíris, ambas *foxl2a* y *foxl2b* se expresan específicamente en el ovario, pero muestran diferentes patrones temporales en la expresión. La expresión de *foxl2a* es correlacionada con los niveles de aromatasa, enzima clave de la producción de estrógenos. El tratamiento con estrógenos utilizado para feminizar machos, aumenta la regulación de ambos parálogos. Por otro lado, los andrógenos o un inhibidor de aromatasa, pueden regular negativamente la expresión de *foxl2a* y *b* en hembras, durante el período en que la identidad de la gónada es sensible a los tratamientos hormonales (Baron et al. 2004; Vizziano-Cantonnet et al 2008, Kobayashi et al. 2010).

Como fue mencionado anteriormente, los estrógenos podrían tener un papel crucial en la diferenciación del ovario de los vertebrados no mamíferos, incluidos los peces, en el cual es imprescindible la presencia de *foxl2*. Para ello, se ha investigado el papel que cumple *foxl2* en la diferenciación ovárica, utilizando alevines monosexo de tilapia. En su trabajo Wang et al. (2007), encontró que la expresión de *foxl2* estaba relacionada con la de aromatasa y de esta forma demostró su relación con los estrógenos y por ende con el desarrollo del ovario.

En estudios de regulación de *foxl2*con E2 en machos de trucha, se encontró que la gónada masculina tenía una feminización eficaz, encontrándose también niveles altos de mensajeros de*foxl2a* y *foxl2b*, al comparar con los detectados durante la diferenciación ovárica natural, pero con diferencias importantes en sus perfiles de expresión. En este tipo de tratamientos feminizantes, la gónada se convierte en un ovario y la expresión de *foxl2a* parece ser necesario para este proceso. *Foxl2b* también se vio sobre-regulado en comparación con los niveles basales masculinos. Finalmente, se encontró que luego del tratamiento con E2, los niveles de expresión de *foxl2* eran similares a los de las hembras normales. Se especuló con que existe una relación directa entre los

E2 y la expresión de *foxl2* en trucha, durante el período de la diferenciación de la gónada, ya que está es más sensible a los tratamientos hormonales (Baron et al. 2004).

Por otro lado, tratamientos con andrógenos (2-metil-testosterona) en la especie *Gobiocypris. rarus*, reprimió la expresión de *foxl2* (Jiang et al. 2011). Estos resultados fueron similares a estudios previos en otros animales, tales como la trucha arco iris (Baron et al. 2004, Vizziano et al 2008) y bagre (Liu et al. 2007). Los andrógenos podrían disminuir significativamente la expresión de *foxl2a* y *foxl2b* (Baron et al. 2004; Vizziano et al. 2008).

En resumen, E2 regula la expresión de *foxl2* en la trucha arco iris (Baron et al. 2004; Vizziano-Cantonnetet al. 2008) y el bagre (Liu et al., 2007), mientras que el inhibidor de aromatasa puede reprimir la expresión de *foxl2* en la trucha arco iris (Baron et al. 2004; Vizziano-Cantonnet et al. 2008), y bagre (Liu et al., 2007). En conjunto, la expresión de *foxl2* se regula a través de mecanismo de retroalimentación por parte de hormonas, estrógeno y andrógenos (Jiang et al. 2011).

En la especie *A. baerii* no hay datos específicos en ovarios. La especie más cercana de la cual se tiene datos bibliográficos es *Scaphirhynchus platorynchus*, en la cual la expresión de *foxl2* fue significativamente mayor en las hembras, encontrándose que era útil para la identificación del sexo. La variación en los niveles de expresión de *foxl2* en gónadas de peces intersexuales, limita su utilidad como un solo biomarcador para identificar esta condición. El uso de *foxl2* y *dmrt1* puede ser útil en la identificación de los peces intersexuales en otras especies. *Foxl2*para esta especie se puede utilizar para identificar el sexo, pero no esturión intersexuales (Amberg et al. 2010).

1.6. wnt4, r-spondina e yy1

1.6.1. wnt4

Pocas especies de peces han sido estudiadas en relación con *wnt4* (*wingless-type MMTV integration site family member 4*) en el desarrollo del ovario. Esté gen está asociado con el desarrollo del ovario expresándose en gónadas de machos y hembras, aunque la expresión en hembras es específica y clave para la determinación sexual (Nicol et al. 2012; Chung Wu & Chang

2009). Tiene un importante rol en el desarrollo tardío del ovario, como la proliferación de la ovogonia y la estructura de la lamela del ovario (Nicol et al. 2012).

Como ya se mencionó en vertebrados tiene una función en el desarrollo del ovario, donde se ha visto que su expresión aumenta a medida que el ovario se desarrolla desde ovocitos primarios a ovocitos vitelogénicos (Chung Wu & Chang 2009). Por lo tanto estaría implicado en la diferenciación sexual, ya que suprime la diferenciación sexual masculina, así como, la promoción de la diferenciación del conducto de Müller, y el mantenimiento de la calidad de los ovocitos. La expresión de *wnt4* en el ovario parece ser regulada por *r-spondina1* (Rspo1), una familia de proteínas del miembro trombo-spondina, mencionadas más adelante (Biason-Lauber 2012).

Se pueden encontrar dos parálogos de *wnt4: wnt4a* y *wnt4b*, para la trucha arco iris, así como en otros peces teleósteos que tuvieron 3 duplicaciones de su genoma (3R). Se ha encontrado también en trucha, un tercer gen *wnt4a2*, lo que fue probablemente fue consecuencia de la adicional duplicación que tuvo la familia de los salmónidos (4R). Ambos genes de *wnt4a1* y *wnt4a2*, se expresan en gónadas diferenciadas, con una expresión dimórfica leve en favor a los machos (Nicol et al. 2012).

Tratamientos con estradiol (E2) e inhibidores de aromatasa (ATD) en las primeras etapas del desarrollo, inducen un aumento en la transcripción de *wnt4*, resultando en el desarrollo de un ovario (Chung Wu& Chang 2009).

En estudios de hembras mutantes en peces para *wnt4*, se observó una pérdida de los ductos müllerianos, aumento en la migración de células en la esteroidogénesis y la activación de la biosíntesis de testosterona (Chung Wu & Chang 2009; Nicol et al. 2012), resultando en la masculinización de la gónada femenina (Nicol et al. 2012).

No existen antecedentes de estudio de la expresión de *wnt4* durante el desarrollo gonadal de los esturiones.

1.6.2. r-spondina

R-spondina1 es un miembro de una superfamilia de trombospondina tipo 1 (TSR-1). Fue descubierto en 1971(Baenziger et al. 1971) y se aisló a partir de plaquetas que habían sido

estimuladas con trombina, y por lo tanto se le denominó "proteína sensible a la trombina" (Lau et al. 2012).

No se ha encontrado bibliografía referente en peces, pero en otros vertebrados se ha reportado que *foxl2* conduce la vía de señalización y activación de *rspo1* promoviendo el desarrollo de ovario (aunque la expresión de *rspo1* parece ser independiente de la regulación de *foxl2*) (Auguste et al. 2011; Zhou et al. 2012; Chassot et al. 2008; 2011). La diferenciación del ovario estaría dada por un complejo funcionamiento entre 3 proteínas Rspo1/Wnt/β-Catenina (Chassot et al. 2011).

En mamíferos existen cuatro miembros de la familia Rspo (con un dominio de organización similar y regulando por la vía de señalización Wnt a través de un mecanismo común). Estos desempeñan un papel clave en la embriogénesis, el desarrollo y tumorigénesis (Zhou et al. 2012).

Rspo1 está implicado en una vía conservada que lleva a la foliculogénesis y desarrollo de las células germinales. Se sintetiza y se secreta en las células somáticas del ovario (Smith et al. 2009; Chassot et al. 2011).Por lo tanto, aunque estas proteínas han sido reportadas como moléculas secretadas que actúan sobre los receptores situados en las membranas de las células, también se pueden localizar en el núcleo (Kocer et al. 2008).

Rspo2 tiene un patrón de expresión sexo dimórfico específico en las hembras. El nivel de expresión de *rspo2* disminuye a los 36 dpc (días post coito) y sigue siendo baja en 40 y 50 dpc. (Kocer et al. 2008).

Datos recientes indican que Rspo1 estimula la vía de señalización de *β*-Catenina mediante la unión de Wnt4 (Smith et al. 2009). Es posible que las proteínas Rspo también puedan funcionar de forma independiente de la señalización de Wnt (Tomizuka et al. 2008). Sin embargo, dada la relación entre las proteínas de la RSPO y la vía Wnt (a través de Fst en los ovarios en desarrollo) y la importancia de Wnt4 para el desarrollo gonadal, estos dos factores pueden interactuar en el desarrollo del ovario (Smith et al. 2009; Tomizuka et al. 2008).

La eliminación de estos genes induce la diferenciación de los túbulos seminíferos en gónadas de hembras, lo que demuestra que están implicados en la supresión de la determinación

sexual masculina. La ausencia de *rspo1* en gónadas XX evita la sobre regulación de *wnt4* y da como resultado la presencia de las células esteroidogénicas y la formación de la cavidad celómica (Chassot et al. 2008; 2011).

1.6.3. yy1

Yin Yang 1 (*yy1*) es un factor de transcripción que contiene dominios en dedos de zinc y se ha visto que activa, reprime o inicia la transcripción de una gran lista de genes con diferentes funciones biológicas en vertebrados el desarrollo, carcinogénesis (ya que se cree que tiene una gran actividad de unión al ADN (Deng et al. 2010) y maduración de las células B, entre otros (Zhu et al. 2011; Liu et al. 2007; Deng et al. 2010; Lingenfelter et al. 2007; Golebiowski et al. 2012). En lo que refiere a peces aún no hay bibliografía publicada.

YY1 interacciona con muchos reguladores transcripcionales y se ha mostrado que actúa como activador o represor de diferentes *loci* mediante la unión al promotor y a elementos potenciadores (Griffith et al. 2011). Es conocido también como un factor de transcripción de expresión ubicua, demostrándose que regula la proliferación y diferenciación de la gónada y su deficiencia en ratas resulta en una letalidad durante el desarrollo embrionario (Deng et al. 2010; Stocco et al. 2007).

Participa en la transcripción de algunos productos génicos de virus, así como también está implicado en el desarrollo y en la reparación del ADN a través de la recombinación homóloga, y en el remodelado de la cromatina (Golebiowski et al. 2012). *YY1* se expresa en tejidos normales y es super-regulado por varios canceres incluyendo el cáncer de próstata, teniendo un efecto regulador positivo y negativo en la expresión de genes (Tang et al. 2012).

Este gen implicado en una compleja red de factores de transcripción en el ovocito, regulando la actividad transcripcional de muchos *loci* así como mediando las interacciones funcionales ADN-proteína. La función de *yy1* es críticamente requerida en el crecimiento del ovocito y la expansión de las células de la granulosa. Se expresa abundantemente en toda la ovogénesis. Normalmente, la expresión de *yy1* disminuye significativamente después de la maduración de los ovocitos. Está involucrado también en la foliculogénesis y en la función del

ovario en el ratón, indicando que es específicamente requerido en el ovocito en la comunicación de las células de la granulosa (Griffith et al 2011; Lingenfelter et al 2007).

2. Hipótesis de trabajo

La diferenciación sexual del esturión siberiano se encuentra controlada por mecanismos similares a los que regulan la diferenciación gonadal de teleósteos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Identificar genes potencialmente implicados en la diferenciación sexual de las gónadas femeninas del esturión siberiano, *A. baerii*.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fragmentos de *foxl2,* aromatasa gonadal *(cyp19a1a*), *wnt4*, *yy1* y *r-spondina* mediante PCR.

2. Estudiar la expresión mediante qPCR en gónadas en peri-diferenciación (animales de 16 y 18 meses de edad) y compararlas con ovarios maduros de 5 años para *foxl2*.

3. Caracterizar la expresión de *foxl2, cyp19a1, wnt4, yy1 y r-spondina* mediante qPCR en distintos tejidos (gónadas, branquias, hígado, cerebro y músculo) usando peces de 3 años de edad.

4. Estudiar el efecto *in vitro* de estrógenos y andrógenos sobre la expresión del *foxl2*.

5. Adaptar la técnica de hibridación *in situ* para estudiar la localización celular de *foxl2* en gónadas

4. Materiales y métodos

4.1. Animales experimentales y procedimientos de crianza

El trabajo experimental se ajustó a los principios de uso y cuidado de animales de laboratorio, de acuerdo a las normas uruguayas sobre el bienestar animal (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CHEA). Las muestras de animales de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) fueron colectadas en una cooperación con la granja piscícola Esturiones del Río Negro.

Los peces se transportaron en tanques de agua aireados de 1 m^3 y el tiempo de aclimatación dependió de la diferencia entre la temperatura del agua en el depósito y el agua en las instalaciones experimentales, considerando 1h para cada grado de diferencia. Los animales fueron mantenidos durante 2 meses en el Instituto de Investigaciones Pesqueras (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Oriental del Uruguay, a cargo del Dr. Daniel Carnevia) a temperatura ambiente antes del muestreo. Se les alimentó a voluntad con 38% de proteína, siguiendo la dieta desarrollada por la empresa Esturiones del Río Negro, con una alimentación correspondiente al 3% de su biomasa.

Para el análisis de la expresión génica en las gónadas se utilizaron diferentes lotes de peces. Un primer grupo de 16 meses de edad con un largo medio de 37 ± 5 cm y un peso medio de 110 ± 46 g; un segundo grupo, también de 16 meses de edad, presentó una longitud media de 70 ± 7 cm y un peso de 1,228 ± 165 g; un tercer grupo de especímenes de 18 meses de edad, midieron 40 ± 2 cm y pesaron 150 ± 37 g. Se utilizaron también gónadas femeninas de 3 años de edad (estas no mostraron macroscópicamente signos de haber iniciado la gametogénesis) y de 5 años de edad. Cada grupo de peces fue mantenido en un mismo tanque. Luego de la disección, una gónada fue fijada en solución de Bouin para su análisis histológico y su contralateral se conservó en N_2 líquido y posteriormente a -80ºC hasta la extracción del ARN. Para validar el patrón de expresión de los genes estudiados se analizaron diferentes tejidos y órganos, de machos y hembras con una edad de 3 años, para lo cual se colectaron: gónadas, cerebro, músculo, hígado, y branquias.

Para la realización de los ensayos de hibridación *in toto*, se analizaron gónadas de 18 meses de edad y se fijaron durante 3 horas a temperatura ambiente en 4% de

paraformaldehído en PBS, 0,01 M (4% PFA). Posteriormente se deshidrataron en 100% de metanol y se almacenaron a -20 ° C hasta su análisis.

4.2. Histología

Para los análisis histológicos de las gónadas, se fijaron durante 24 h en fijador de Bouin, y se almacenaron en 70% de etanol. Se deshidrataron, se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5-µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina Regaud, G naranja, y azul de anilina o hematoxilina de Mayer y eosina (Gabe 1968).

4.3. Extracción de ARN y Transcripción reversa

El ARN total se extrajo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, y la calidad y cantidad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1% y NanoDrop ND-1000 3.7 (Thermo Scientific). La síntesis de ADNc se efectuó utilizando 2 µg de ARN total. El ARN fue desnaturalizado en presencia de hexámeros aleatorios (random hexamers). La transcripción reversa (RT) se realizó a 37°C durante 1 h usando la enzima M-MLV transcriptasa inversa (Promega, Madison, WI) como describe el fabricante. El ADN copia fue controlado mediante una PCR de 25 ciclos con cebadores de β-actina.

4.4. Amplificación de genes por PCR en tiempo final

Cuando se inició esta tesis no había en las bases de datos públicas secuencias de esturión correspondiente a genes femeninos como *foxl2a*, *cyp19a1a* o aromatasa, *wnt4*, la *r-spondina1*, o *yy1*. De modo que se intentó amplificar estos genes a partir de cebadores heterólogos consenso diseñados en las regiones altamente conservadas de genes ortólogos de peces y tetrápodos en el caso del *foxl2a* y de la *cyp19a1a*. Para *wnt4, r-spondina1* y *yy1* se diseñaron cebadores heterólogos consenso a partir de secuencias de *Acipenser fulvescens* (esturión del lago) (Hale et al. 2010).

Los cebadores fueron diseñados manualmente, o utilizando el programa AmplifiX (Nicolas Jullien 2004-2006, versión 1.4.0). Se corroboró que los mismos no formaran horquillas, homo-

dímeros y hetero-dímeros mediante el programa en línea de la página web de IDT (Integrated DNA Technologies- http://www.idtdna.com/site).

En una primera instancia se buscaron los dos genes marcadores femeninos que surgían como más importantes de la lectura de los trabajos con peces teleósteos, ellos fueron *foxl2a* y *cyp19a1a*. Se diseñaron cebadores para *foxl2a* y *cyp19a1* en regiones altamente conservadas de genes ortólogos de peces teleósteos, condrictios y también de tetrápodos. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW, algoritmo de alineación múltiple de secuencias presentado a través del software BioEdit 349 (Hall 1999) y Multialin (Corpet 1988). Se logró amplificar *foxl2a,* pero no *cyp19a1a*. Para intentar amplificar *cyp19a1a,* se ensayaron múltiples juegos de cebadores diseñados a partir de bases de datos de peces teleósteos (incluyendo los teleósteos más antiguos como las anguila), condrictios, y tetrápodos. Por otro lado, se tuvo en cuenta el uso de material gonadal en distintos estadios ováricos, incluido un estadio en donde hay producción de estradiol y por ende supondría alta expresión de *cyp19a1*.

En una segunda instancia y con el fin de ampliar los genes posibles marcadores femeninos se realizó la búsqueda de otros genes reportados como involucrados en el desarrollo del ovario como lo son *wnt4*, *r-spondina1*, *yy1*, *sox3* y *cyp11a1a*. Los cebadores para amplificar estos genes fueron diseñados en base a las secuencias del esturión del lago (Hale et al. 2010). Se lograron amplificar y validar por secuenciación las secuencias parciales de *wnt4, r-spondina1, yy1* y el *sox3*. Los cebadores utilizados en la PCR en tiempo final se muestran en la Tabla 1.

La amplificación de los fragmentos de los genes mencionados se realizó mediante PCR en tiempo final. Para ello se utilizaron 0.8 µM de cada cebador, 0.65 unidades de Taq polimerasa ROCHE, 0.2 mM de dNTPS, tampón de PCR 1X ROCHE (10X buffer con 15 mM de Mg, pH8.3, 100mM Tris-HCl, 500mM KCl) y 1 µl de ADNc, para un volumen final de 25 µl.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Corbett Research modelo CG1-96 con una desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, seguida de 40 ciclos que consistían en una desnaturalización de 30s a 94ºC, hibridación de 30s a la temperatura de los cebadores y una enlongación a 72ºC por 1 minuto. La extensión final fue a 72ºC por 5-7 minutos.

Las electroforesis en agarosa 1% se realizaron en una cuba Hoefer "SUB 10 – MiniPlus submarine", a 100V y 200mA (fuente: General Electric-Elecroforesis PowerSupply EPS 301) por 35 min.

Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta, se recortaron las bandas esperadas, para ser purificadas mediante el Kit de purificación de bandas de gel General Electric (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit), para luego ser enviadas a secuenciar en del Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

Se digitalizaron las imágenes utilizando el equipo de digitalización "Transiluminador Marovue LKB Bro 2011, Gel logic 112" y software especializado "Software Carestream, Molecular Imaging Software, Estándar edition, v5.0.4.46, 1994-2009,". Se tomaron como controles de amplificación positivos para evaluar la calidad del ADN copia utilizando cebadores de β-actina.

Para una mayor sensibilidad y definición, en algunos casos se empleó electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en TBE. Se corrió el gel en una doble cubeta Hoefer "SE300 miniVE" a 90 volts y 100mA y se reveló con nitrato de plata. Se utilizó un marcador de peso molecular 1000 pb LowRange (Fermentas Internacional Inc., Canadá, Burlington Ontario (50-1500 pb) y Thermo Scientific (25-700pb).

4.5. PCR en tiempo real (qPCR)

Basándose en las secuencias obtenidas por PCR en tiempo final validadas como ortólogas de otros vertebrados se diseñaron los cebadores para qPCR (Tabla 2). Los fragmentos amplificados se validaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y por secuenciación. Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo en tres equipos; Applied Biosystems (ABI 7500, ABI 7500 Software Version 2.0.6), Corbett Research Rotor Gene 6000 (Rotor gene 600 series software Version 1.7) y Eco™ Real Time Illumina (REF101018, SNP1159; software ECO™ Real Time PCR System Versión 3.0.16.0 Illumina). Las reacciones se realizaron en 20 µl con 0,2 µM de cada cebador, Kapa Universal Sybr qPCR master mix y 2 µL de ADNc, excepto para el equipo Illumina en el que

se utilizó 12 µL de volumen final y 1 µL de ADNc. Los pasos utilizados para las distintas plataformas se detallan en la tabla 8, todos ellos fueron seguidos por 40 ciclos.

La validez de la qPCR se confirmó mediante el análisis de las curvas de fusión (curva de melt). Los fragmentos obtenidos amplificados se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1% y posterior secuenciación. Para la eficiencia de la reacción de PCR se analizaron por qPCR, ADNc de ovarios y testículos por duplicado utilizando siete diluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, se realizaron curvas para *foxl2a, wnt4, yy1* y *r-spondina1*).

Las gónadas utilizadas para *foxl2* y *r-spondina, wnt4, yy1* se encontraban en distintos estadios gonadales (Tabla 6 y 7 respectivamente).

Las eficiencias de las qPCR para cada gen se calcularon con la fórmula: (E) = [10 (1/pendiente)] $^{-1}$, se obtuvo un promedio de todos los genes analizados una eficiencia del 97 y 96% en la curva estándar para los ovarios y los testículos respectivamente. El cociente de sistematización (SQ) se calculó utilizando la fórmula: SQ = [10((Ct-intercepción)/pendiente)]-1 como se indica en Baron et al. (2005). Para la normalización de cada nivel de transcripto se dividió por los valores de expresión de β-actina.

4.6. Cultivo de tejidos

Se realizó una incubación de explantes de gónadas provenientes de animales en el período de peri-diferenciación. Para ello se realizaron muestreos de gónadas de los animales de 18 meses cuya caracterización morfológica se muestra en la Tabla 4. La mayor parte de la gónada se colocó en medio MCDB 105 estéril, pH 7,8 y osmolaridad (PO) de 310 mOsm kg^{-1}, mientras que un trozo de la misma fue fijada en Bouin para controlar su estadío. Las gónadas presentaron un aspecto filiforme y externamente era imposible reconocer *a priori* si ya estaban diferenciadas o no, y si correspondían a testículos u ovarios, de allí el control histológico posterior.

La incubación se realizó durante 24 horas, en una habitación estéril equipada con una cámara de flujo laminar, en placas de cultivo de 24 pozos. Se ensayó el efecto del estradiol-17β (E2) y de la 11β-hidroxiandrostenediona (11βOH) en tres concentraciones diferentes (8,5, 17 y 85 ng ml^{-1}).

Mediante el control histológico se verificó que los animales utilizados para evaluar el efecto del E2 fueron 4 hembras recién diferenciadas y un macho putativo, mientras que los animales utilizados para analizar el efecto de los andrógenos fueron 2 machos putativos, 2 hembras recién diferenciadas y un animal indiferenciado.

A las 24h de cultivo las muestras fueron homogenizadas en TRIzol y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. En estas muestras se estudió la expresión del *foxl2a*. Con el fin de validar si los tiempos y dosis usadas eran efectivos para afectar la expresión génica se estudió la expresión de genes que se habían estudiado previamente durante el desarrollo testicular (Berbejillo et al 2012, 2013). Los genes estudiados fueron *ar, dmrt1* y *cyp17a1*. Se controlaron los productos de qPCR para la β-actina y para los genes blancos, por electroforesis en gel de agarosa.

Para estos ensayos se realizó una puesta a punto para decidir el gen constitucional a utilizar (18S o β-actina), decidiéndose finalmente por *β-actina*, ya que ambos genes poseían similar estabilidad y este último fue utilizado para los anteriores ensayos. Se analizaron distintas diluciones y se hicieron análisis comparativos de las muestras. Así mismo se evaluó la utilización de dos aparatos diferentes en ABI7500 y el Rotor Gene, encontrando una mayor sensibilidad en los resultados en este último.

4.7. Hibridación in toto

Se realizó un ensayo de hibridación *in toto* con sonda para *foxl2a*. Para sintetizar la sonda específica de *foxl2a*, se obtuvo un DNA molde utilizando cebadores que incluían secuencias de promotor de ARN polimerasa. Los fragmentos de PCR sintetizados contenían ambos promotores de la ARN polimerasa (T7 y SP6) en sus dos extremos y las secuencia específica del *foxl2a* (según Ghafoory et al. (2012). Los cebadores diseñados se muestran en la Tabla 3.

Para sintetizar el ADN molde se utilizó un pre-ciclado de 5 ciclos que consistía en una desnaturalización de 30s a 94 º C, hibridación de 30s a la temperatura de hibridación de la parte específica de los cebadores y una enlongación a 72 º C por 2 minutos. Luego una nueva desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos que consistían en una

desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridación a 70°C por 30s y extensión de 72°C por 2 minutos. La extensión final fue a 72 º C por 7 minutos.

Las sondas (anti-sentido y sentido) de ARN fueron marcadas con digoxigenina por incorporación de DIG-UTP durante su síntesis utilizando el DIG RNA Labeling Kit (SP6, T7) de Roche como lo recomienda el fabricante.

La sonda de *foxl2a* sintetizada fue de 621 pb. Antes de su uso las sondas fueron purificadas mediante las columnas MicroSpin ™. G-50 columns Amersham Biosciences.

Una vez rehidratadas las muestras de tejido, se procedió a desarrollar la hibridación *in toto* según la técnica descrita por Vizziano et al (2011). Dicha técnica consiste en lavar el tejido en tampón fosfato salino a pH 7.4, tratarlas con proteinasa K para permeabilizar el tejido y permitir la entrada de la sonda, una pre-hibridación en tampón de hibridación de 1 h a 68ºC y la hibridación usando 3 ng ml^{-1} de la sonda durante una noche a 68ºC. La detención de la incubación y la eliminación de la unión no específica se realizaron con tampón de SCC (pH 7,4) con formamida en concentraciones decrecientes (50%, 25%, 0%) a 68ºC. Las gónadas se lavaron a continuación con tampón Tris (0,1 M, pH 7,5) y se saturaron con Tris (0,1 M, pH 7,5) con leche descremada al 2%. La digoxigenina se detectó usando anticuerpos anti-digoxigenina (dilución 1/4000) acoplado a una fosfatasa alcalina mediante incubación durante la noche a 4ºC con agitación. Las muestras se lavaron a continuación con tampón Tris y se incubaron con el tampón de revelado con NBT-BCIP. La reacción se detuvo con glicina 0.1 M, pH 2.4, PBS pH 5.5 con EDTA 1 mM, y 4% de PAF.

Después de esto, el tejido fue cortado con crióstato y montado con Vectashield. Todas las fotos macroscópicas fueron tomadas primero con Lupa Olympus SZ51 y luego con el microscopio Nikon Eclipse 80i, la cámara Nikon DS-5Mc-U2 Digital cooled Camara, El software utilizado fue Nikon Nis Elements 3.1 “Advanced Research Software”.

4.8. Análisis estadístico

Para comparar la expresión entre los sexos, se llevó a cabo el análisis comparativo de la expresión génica *foxl2a* para machos y hembras de 16, 18 meses y 5 años. Cuando hubo homogeneidad de varianzas (test de Levene), se procedió a la realización de test paramétricos. Se

aplicó el ANOVA cuando se compraron varias variables y el test de t-student cuando se compararon dos variables. Cuando no hubo homogeneidad de varianzas (mediante Levene) se procedió a analizar los datos mediante tests no paramétricos: Mann-Whitney para dos variables y Kruskal Wallis para más de dos variables.

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores consenso y homólogos usados para las PCR en tiempo final. La nomenclatura se realizó de acuerdo a la nomenclatura usada para los genes de zebrafish (http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa=ZDB_home.apg).

Gen	***Símbolo***	***Cebador/Número de acceso GenBank***	***Secuencia Forward***	***Secuencia Reverse***	***Tamaño (pb)***
forkhead box L2a	*foxl2a*	Cebador consenso	TACGAGAAGAACA AGAAAGGTTGGCA	GTGTTTGCTGTC GTGCTC CCA	680
forkhead box L2a	*foxl2a*	Cebador homólogo/ JN182652.1	AACAAGAAAGGTT GGCAAAACAGCAT	GCTCCCAGTATG AACAGTGCATC	621
yin yan transcription factor 1	*yy1*	Cebador consenso	TGAGGAGGAGTAT ATCGAGCAGACG	CGTGTGTCAAG ATGTGAGACTTC AG	738
wingless-type MMTV integration site family member 4a	*wnt4a1*	Cebador consenso	AAGGAGAAGTTTG ACGGGGCCAC	CCTGTCCACCAC CTCCACCTCCTC	273
r-spondin	*r-spo1*	Cebador consenso	GGCTTTTCCGCACG GTGCACG	GGTGGAGTGCA GCAGTGTTGTAC AA	194
18S ribosomal RNA gene	*18S*	AY904445.1	GAGGTGAAATTC TTGGACCGG	GGTGCCCTT CCGTCAATTCC	200
ß-actin	*ß-actin*	JX027376.1	TATCCTGACCCTGA AGTACCC	CTCATCGTACTC CTGCTTGCT	903

Tabla 2.-Secuencias nucleotídicas de cebadores usados para qPCR

Gen	***Símbolo/ Número de acceso al GenBank***	***Forward***	***Reverse***	***Tamaño (pb)***
yin yan factor 1	*yy1*	GTCCCCACAAAGG ATGCACAAAGA	CCCACATTCAGCA CAAACGTGAAC	101
foxl2 forkhead box L2	*foxl2/ JN182652.1*	GAGGCCTTTCAGACCC CCTCC	TGGGCTGACGTTGCC ACTT	190
R-spondin	*R-spo1*	ATTCCCTGGTCCTGTT CTGA	CAATGTGAACTTGG AGAGTGGG	97
wingless-type MMTV integration site family member 4a	*wnt4a/ JX421756.1 1*	TGCCCAAGAACTC GCAGTTCAA	GTCAATGGCCTTG GAGGTCTTGTT	146

Tabla 3.-Secuencia nucleotídica de los cebadores para hibridación *in toto*.

Gen	***Símbolo***	***T7 - Forward***	***SP6 - Reverse***	***Tamaño (pb)***
foxl2 forkhead box L2	*foxl2*	GTAATACGACTCACTATAGGG CGAAAAACAGCATCCGCCAC AACCT	GATTTAGGTGACACTATAGAATA CTGCTCCCAGTATGAACAGTGCA TC	647

Aclaración: Secuencia subrayada promotor T7 (cebador forward) o SP6 (cebador reverse), secuencia sin subrayar cebador de *foxl2* (forward o reverse).

Tabla 4. Características histológicas de las gónadas utilizadas en el cultivo de explantes

Ejemplar	***Sexo***	***Características morfológicas de las gónadas***
117	Macho putativo	Gónada con ausencia de grupos de células germinales y presencia de algunas espermatogónias
118	Hembra	Ovario compuesto por grupos o cistos de ovogonias, ovogonias en el epitelio germinativo entre las células somáticas
119	Hembra	Ovario compuesto por cistos de ovogonias, ovogonias en el epitelio germinativo entre las células somáticas
120	Hembra	Ovario caracterizado por grupos o cistos de células germinales, presencia de meiosis, epitelio cúbico con invaginaciones
121	Hembra	Ovario caracterizado por grupos de células germinales, ovocitos pre-vitelogénicos, con lamelas ovígeras ya formadas, y presencia de meiosis y ovocitos profásicos
122	Macho putativo	Gonias separadas
123	Indiferenciado	Gonias en el epitelio entre las células somáticas
124	Hembra	Ovario con grupos de células germinales
125	Macho	Gonias separadas, con el epitelio del ducto con presencia de cilios
126	Hembra	Ovarios con ovocitos profásicos, diploténicos con presencia de meiosis y lamelas ya formadas

Tabla 6. Características histológicas de las gónadas de 16 meses utilizadas en qPCR para el análisis de expresión de *foxl2*

Ejemplar	***Sexo***	***Características morfológicas de las gónadas***
1OV	Hembra	Presencia de ovocitos y lamelas
2OV	Hembra	Presencia de ovocitos y lamelas
3OV	Hembra	Presencia de ovocitos y lamelas
4OV	Hembra	Invaginación del tejido gonadal o primordio de la lamela, ovogonias organizadas en grupos celulares, ausencia de meiosis.
5OV	Hembra	Presencia de ovocitos en diploteno
6OV	Hembra	Presencia ovocitos y lamelas
7OV	Hembra	Presencia de meiosis, células germinativas distribuidas formando agrupamientos de células
8OV	Hembra	Presencia de ovocitos y lamelas
1T	Macho	Ausencia de meiosis, gonias dispersas por todo el tejido gonadal
2T	Macho	Ausencia de meiosis, gonias dispersas por todo el tejido gonadal
3T	Macho	Ausencia de meiosis, gonias dispersas por todo el tejido gonadal
4T	Macho	Ausencia de invaginación del tejido gonadal, ausencia de meiosis, gonias organizadas en cordones
5T	Macho	Disposición de gonias organizadas en cordones
6T	Macho	Presencia de ducto testicular y gonias en cordones distribuidas por todo el tejido gonadal
7T	Macho	Ausencia de invaginación del tejido gonadal, ausencia de meiosis, gonias organizadas en cordones

Tabla 7. Características histológicas de las gónadas de 16 meses utilizadas en qPCR para el análisis de expresión de *wnt4*, *yy1* y *r-spondina*

Ejemplar	***Sexo***	***Características morfológicas de las gónadas***
1OV	Hembra	Presencia de ovocitos y lamelas
2OV	Hembra	Presencia de ovocitos y lamelas
3OV	Hembra	Presencia de ovocitos en meiosis y células germinativas solamente en una región de la gónada
4OV	Hembra	Presencia de ovocitos en meiosis, disposición de las células germinativas distribuidas formando agrupamientos de células
1T	Testículo	Gonias localizadas por todo el tejido gonadal, ausencia de meiosis y tejido gonadal sin invaginación
2T	Testículo	Ausencia de invaginación del tejido gonadal, ausencia de meiosis
1I	Indiferenciado	Células germinativas primordiales, solamente junto al epitelio
2I	Indiferenciado	Presencia de células germinativas primordiales y células somáticas

Tabla 8. Ciclados de temperatura de las qPCR en las distintas plataformas utilizadas.

Plataforma	**Etapa de holding**	**Etapa de ciclado**	**Etapa de curva. de fusión**
ABI 7500	95°C- 10 min	95°C - 15 s, 60°C 1 min	95°C 15 seg, 60°C 1 min , 95°C 30 seg, 60°C, 15 seg
Rotor Gene 6000	95°C - 3 min	95°C durante 5 s, 60°C 45 seg	65 a 95°C (subiendo 1°C por cada paso), 90 seg pre-melt y 5 seg por cada paso.
Illumina	95°C por 3 min	95°C- 10 seg, 60°C- 45 seg	95°C- 15 seg, 60°C -1 min, 95°C- 15 seg

5. Resultados

5.0. Morfología gonadal

Se realizó un análisis detallado de la anatomía microscópica de las gónadas en desarrollo en el período de peri-diferenciación (16 y 18 meses de edad), es decir antes y después de la aparición de los primeros signos morfológicos que permitieron reconocer un patrón de desarrollo ovárico con respecto a un patrón de desarrollo testicular.

5.1. Caracterización microscópica de las gónadas durante el momento de peri-diferenciación

Las gónadas indiferenciadas de *A.baerii* se caracterizaron por presentar células germinales restringidas a la periferia gonadal localizadas entre las células epiteliales (Fig. 3 A-B, C, D-F). A medida que avanza la diferenciación, se distinguen dos patrones morfológicos distintos en la distribución de las células germinales primordiales, así como otros signos de diferenciación sexual gonadal que involucran al componente somático de la gónada.

5.1.1. Morfología de los ovarios en desarrollo

En las hembras presuntivas, las células epiteliales superficiales de la región caudal de la gónada se convierten en cúbicas y posteriormente columnares, originando el gonoducto que conecta las gónadas con las papilas urogenitales (Fig. 3C-E). En los ovarios presuntivos las ovogonias se encuentran en la región ventral de la gónada donde proliferan (Fig. 3A-C). La proliferación de las ovogonias da lugar a grupos o cistos de células germinales (Fig. 3A-B), que están rodeadas por las células somáticas. En la región dorsal de la gónada, no hay células germinales (Fig. 3A-B). Este patrón de distribución de las células germinales se mantiene a lo largo de la diferenciación gonadal femenino (Fig. 3 D).

A lo largo de la región ventral, el epitelio se invagina formando el primordio de las lamelas ovígeras (Fig. 3D-F). En este momento, también se forma la cavidad de ovario. A partir de uno de los lados de la región ventro-lateral de la gónada, una proliferación de células somáticas epiteliales forma un tejido laminar. Este tejido crece extendiéndose por debajo de las lamelas del ovario. El

tejido laminar se conecta con el lado opuesto de la gónada delimitando un espacio: la cavidad de ovario (Fig. 3D).

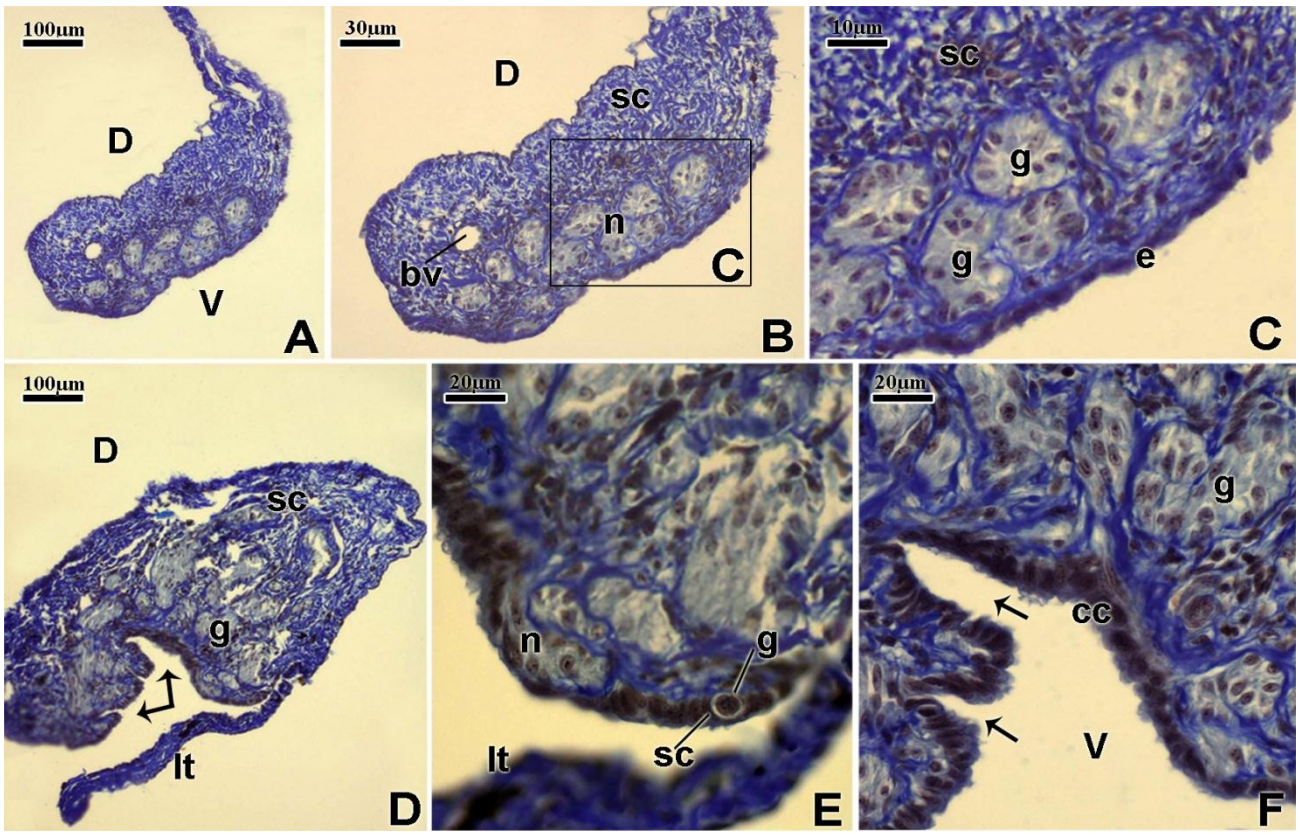

Figura 3. Imagen de un ovario presuntivo. Los primeros signos que sugieren la presencia de un ovario presuntivo son:

a -. la distribución de gonias a lo largo de la región ventral (A, B, D) organizadas en cistos rodeados de células somáticas (C, E, F).

b -. la invaginación de tejido gonadal en el lado ventral dando lugar a las lamelas (D, F).

Región dorsal (D); región ventral (V); células somáticas (sc); nidos de células (n); vasos sanguíneos (bv); gonia (g); primordio de lamelas ovígeras (flecha); tejido laminar (LT); epitelio (e); células columnares (cc).

Al mismo tiempo el espacio extravascular se está formando en la región dorsal de la gónada (Fig. 4A-C). El espacio extravascular es un tejido conectivo laxo, que contiene las células mesenquimales y dará lugar el estroma del ovario (Fig. 4C).Dentro de los cistos, se observan los ovocitos en profase I. Los cistos de ovocitos en profase I - leptoteno, cigoteno y paquiteno - se

puede distinguir por la organización de la cromatina, que es característica de las diferentes etapas de la profase meiótica. Al final del paquiteno, los ovocitos, dentro de los cistos, se individualizan al quedar rodeados por las células foliculares, formando así los folículos ováricos. En los folículos ováricos, inmersos en el tejido gonadal, los ovocitos que ahora están en diploteno de la primera profase meiótica entran en crecimiento primario (Fig. 4 F).

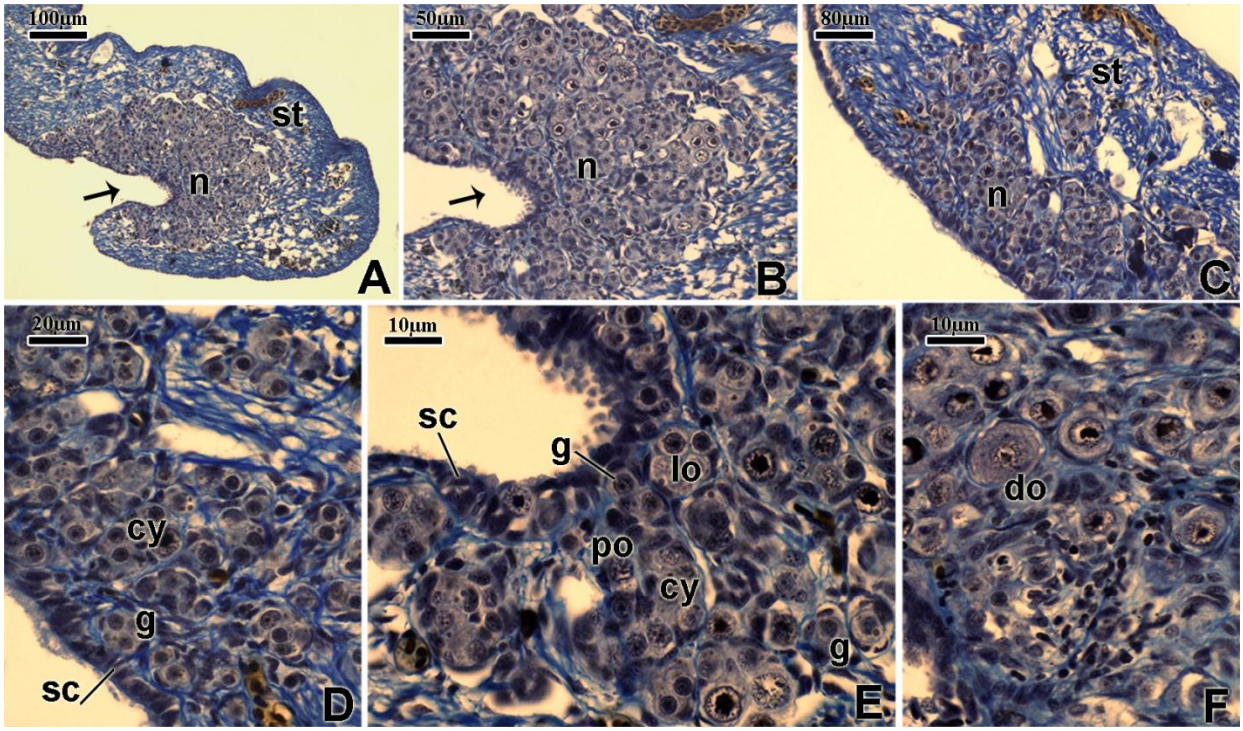

Figura 4. Esta etapa se caracteriza por la presencia de cistos que contienen los ovocitos en primera profase meiótica (D, E, F), y la formación de espacios extravasculares por las células mesenquimales del estroma originarias en la región dorsal (A, B, C). Células somáticas (sc); nidos de células (n); ovogonia (g); primordio de las lamelas ovígeras (flecha); estroma ovárico (st); cistos de células germinales (cy); ovocitos en leptoteno (lo); ovocitos en cigoteno (zo); ovocitos en paquiteno (po); ovocito en diploteno temprano (do).

El ovario desarrolla en su región ventral, las lamelas ovígeras que se vuelven más prominentes (Fig. 5A-G). La proliferación de las ovogonias y la entrada en la meiosis se intensifican, lo que resulta en un aumento de la cantidad de cistos de células germinales y el consiguiente aumento del espesor del tejido gonadal (Fig. 5C, D, E, F, G). Debido a la formación

continua de nuevos folículos ováricos y al progreso de los ovocitos en crecimiento primario las lamelas se hacen más grandes (Fig. 5 C). El límite de las lamelas ovígeras está establecido por el epitelio germinal que se activa proliferando. El epitelio germinal está formado por las células somáticas y las células germinales en proliferación (Fig. 5 D-G).

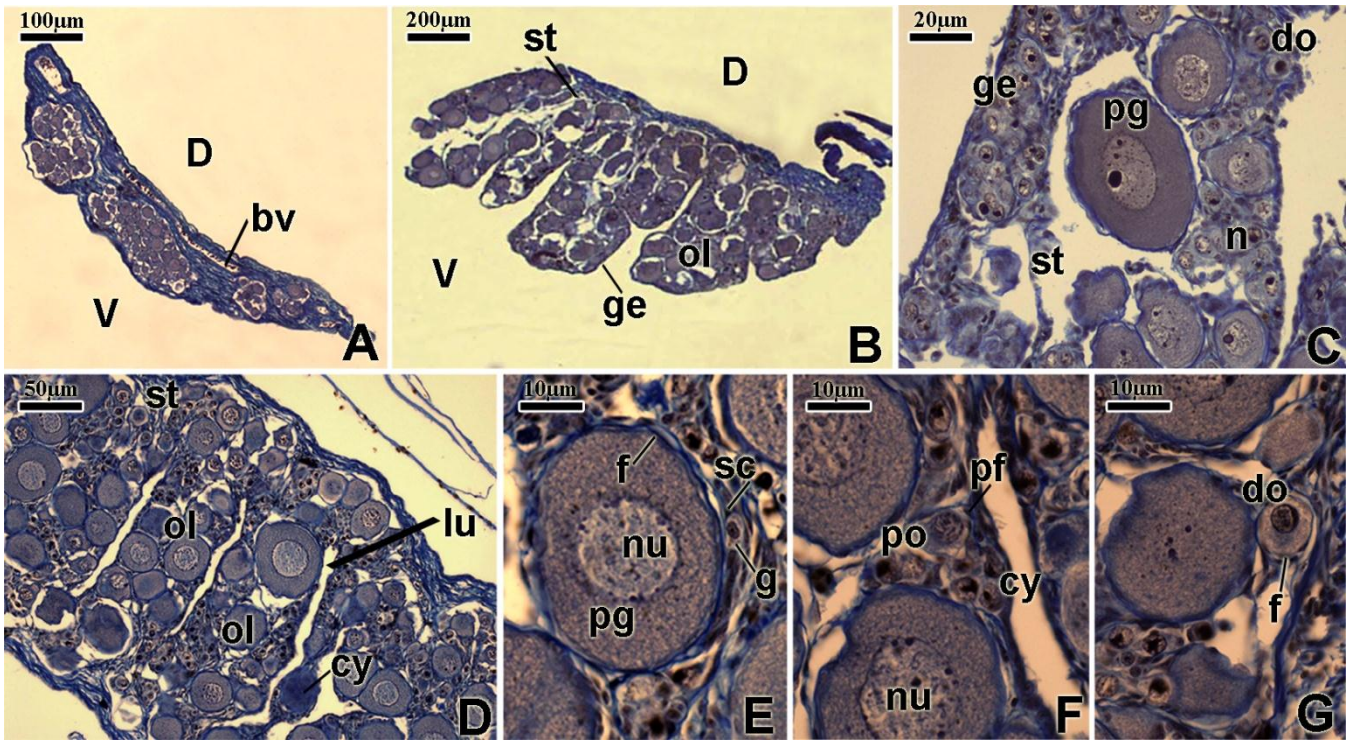

Figura 5. Esta etapa se caracteriza por la aparición de ovocitos en el crecimiento primario (C, D, E, F, G). Otra característica notable es el desarrollo de las lamelas (B, D). Los cistos de ovocitos en profase se restringieron al epitelio germinal (C, D, E, F, G). Región ventral (V), región dorsal (D); epitelio germinal (ge); ovocito en crecimiento primario (pg); lamelas ovígeras (ol); estroma ovárico (st); ovocito en diploteno temprano (do); nidos de ovocitos (n); vaso sanguíneo (bv), células del folículo (f), células pre-foliculares (pf), núcleo (nu); ovogonia (g); ovocitos en paquiteno (po).

5.2.1. Morfología de los testículos en desarrollo

En los machos presuntivos (Fig. 6A-I) las células germinales primordiales son pocas y están situadas en la región central del tejido gonadal (Fig. 6 B). La presencia de espermatogonias permite el diagnostico de los testículos. Las espermatogonias proliferan formando estructuras sinuosas y similares a un cordón que ocupa todo el tejido gonadal (Fig. 6A, B, C, D). Con la

proliferación de las células somáticas y de las espermatogonias, el tejido gonadal se vuelve más grueso (Fig. 6 B, C, D). En este momento, cada espermatogonia se individualiza y queda rodeada por las células somáticas que constituyen las células de pre-sertoli, formando cistos de células germinales (Fig. 6 F, I). Entre los cistos, el tejido intersticial (Fig. 6 I, F) está constituido por fibroblastos, vasos sanguíneos y las células mesenquimales amorfas. En la región dorsal de la gónada, se forma el conducto testicular (Fig. 6 G, E).

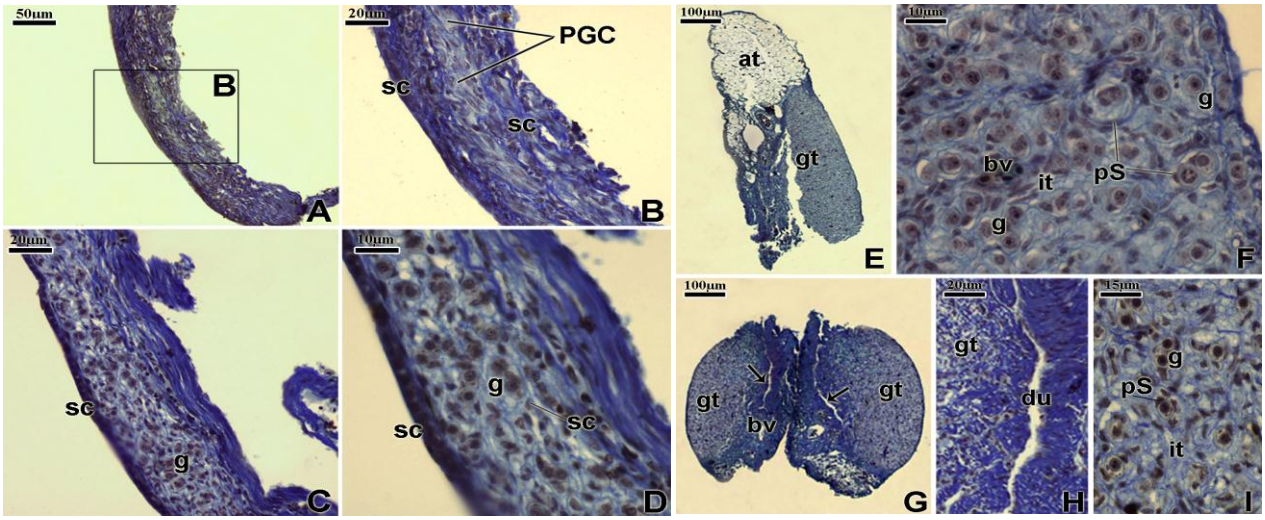

Figura 6. Las principales características que indican la presencia de un testículo temprano son:

a -. la distribución de espermatogonias que forman estructuras tipo cordón en el lado ventral y el dorsal (A, B, C, D).

b -. la formación de un conducto en la región dorsal (G, H).

c -. en esa etapa las células germinales no se encuentren en meiosis (I).

Células somáticas (sc); células germinales primordiales (PGC); espermatogonia (g); tejido adiposo (at); tejido gonadal (gt); vasos sanguíneos (bv); células pre-sertoli (pS); tejido intersticial (it); conducto testicular (flecha; du).

5.3. Caracterización del gen foxl2 y estudio de su expresión en las gónadas en desarrollo

5.3.1. Análisis filogenético de foxl2

El análisis filogenético realizado mostró la presencia de dos grupos distintos de genes *foxl2* en vertebrados.

El primer grupo incluye el *foxl2* de (Fig. 7): peces teleósteos (en azul oscuro) y al esturión siberiano (*A. baerii*) (sombreado en violeta) que tienen una raíz común con el celacanto (*Latimeria*

chalumnae, en rosado); peces cartilaginosos (en violeta); anfibios (en verde); aves y reptiles (en marrón-anaranjado) y por último mamíferos (en marrón oscuro). Este primer grupo fue denominado como *foxl2a* (Baron et al, 2004; Jiang et al. 2011).

El segundo grupo de genes *foxl2* se observa solamente en peces teleósteos (en celeste) (*Oncorhynchus mykiss, Salmo salar, Oryzias latipes, Oreochromis niloticus, Takifugu rubripes, Danio rerio*) y tiene al igual que el primer grupo de *foxl2* descripto una raíz común con un segundo gen ortólogo del celacanto (en rosado). Se trata de un grupo monofilético. Este segundo grupo de secuencias son muy divergentes en las porciones NH3 y COOH de la proteína por fuera del dominio forkhead cuando se las compara con las secuencias del *foxl2a*, que parecen menos evolucionadas, excepto por el largo brazo de los mamíferos terios (marsupiales y euterios). A este segundo grupo se le llamó *foxl2b* (Jiang et al. 2011).

Es interesante hacer notar que existe solamente una copia de *foxl2* encontrada en invertebrados como el *Saccoglossus kowalevskii* (gusano hemicordado) (en negro).

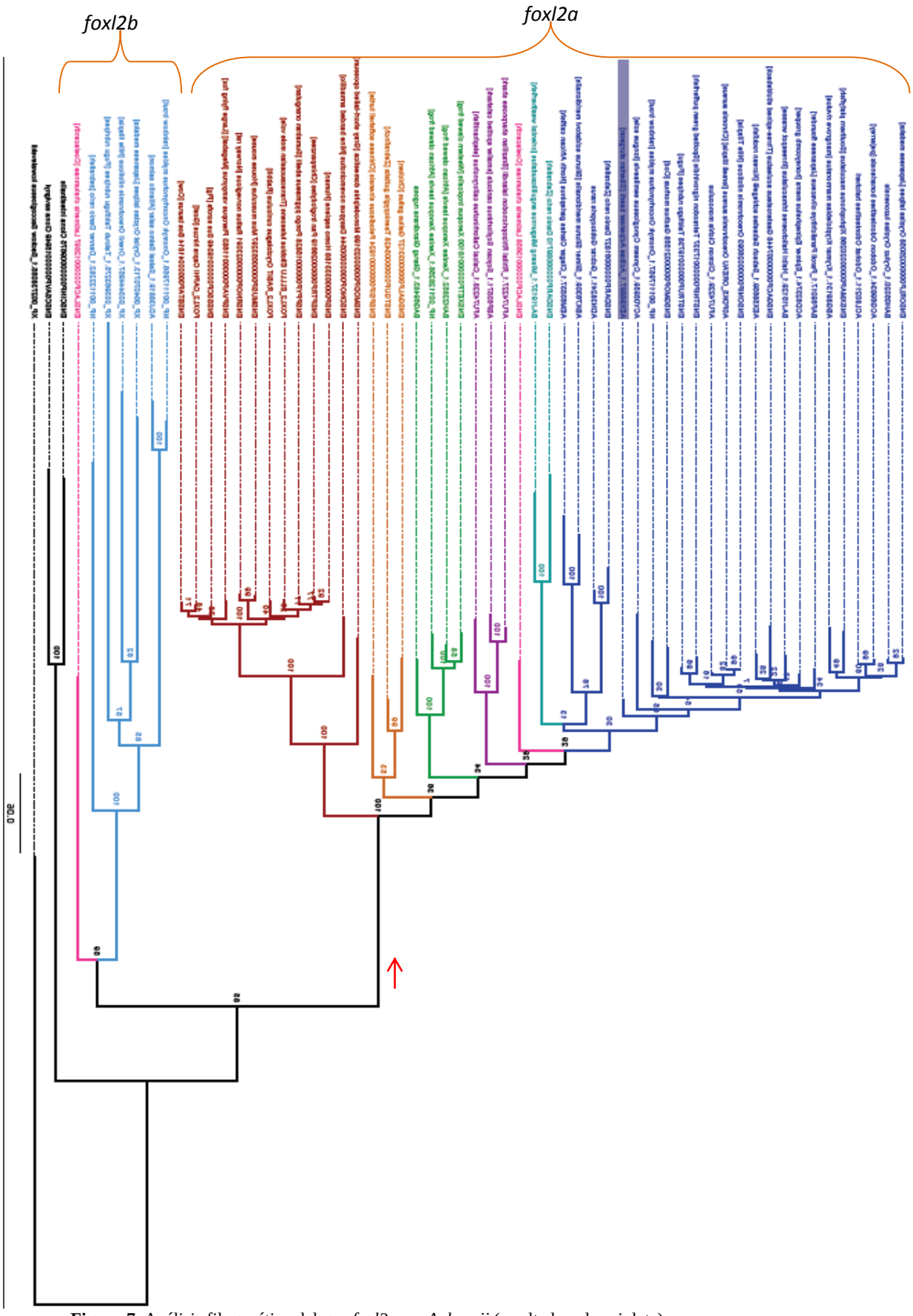

Figura 7. Análisis filogenético del gen *foxl2* para *A. baerii* (resaltado color violeta)

5.3.2. Caracterización tisular de foxl2

Se estudió la expresión del gen *foxl2* en distintas muestras de tejido de 3 años (i.e. gónada, músculo, hígado, branquias y cerebro), detectándose expresión del gen en algunos tejidos y órganos de ambos sexos.

En hembras, la expresión de *foxl2* fue en general muy baja y pudo ser detectada en ovario, músculo y branquias. En los machos la expresión fue baja salvo en el testículo y en el músculo. Estos resultados mostraron que contrariamente a lo esperado la expresión de *foxl2* fue mayor en los testículos con respecto a los ovarios en individuos ya diferenciados de 3 años de edad con gónadas inmaduras (Fig. 8).

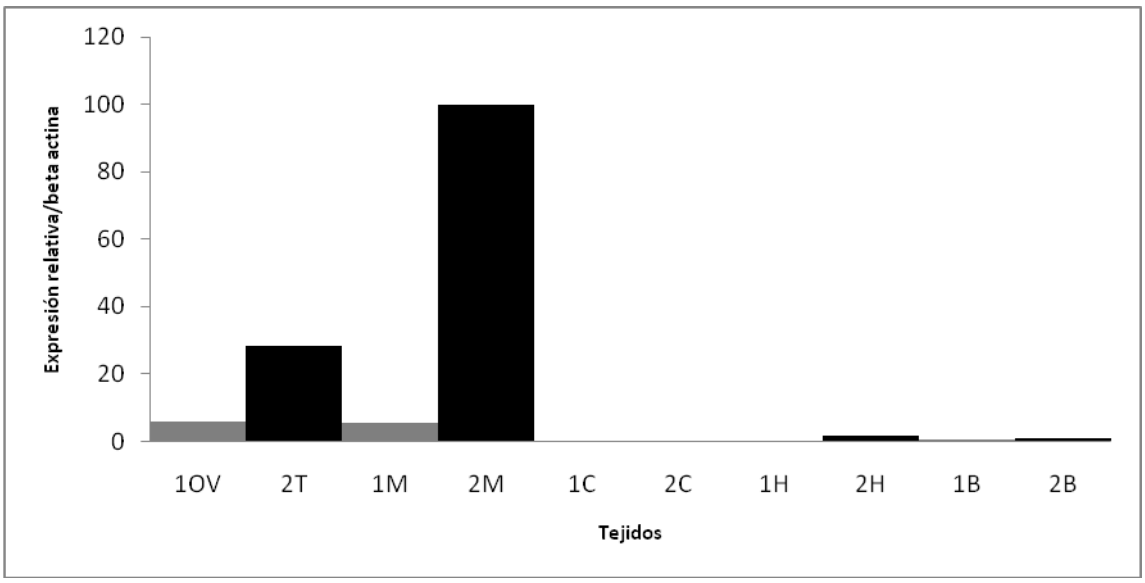

Figura 8. Expresión relativa de *foxl2* con respecto a beta actina en distintos tejidos de machos y hembras de *A. baerii* de 3 años (inmaduros). 1-Ovario (gris), 2-Testiculo (negro), M-Musculo, C-Cerebro, H-Hígado, B-Branquias.

5.3.3. Análisis de expresión de foxl2 durante el desarrollo gonadal

Se estudió la expresión del *foxl2* en las gónadas en peri-diferenciación de animales de 16 (Tabla 6 para ver el estadio de las gónadas) y 18 (Tabla 5 para ver el estadio de las gónadas) meses de edad, incluyendo ovarios recientemente diferenciados, testículos presuntivos y en un caso una gónada indiferenciada. Las gónadas a los 16 meses se encontraban en distintos estadios de desarrollo gonadal (Tabla 6), realizándose dos duplicados técnicos por cada muestra.

Contrariamente a lo esperado, la expresión de *foxl2* no exhibió ninguna diferencia cuantitativa entre los sexos, en ninguna de las dos edades estudiadas (Fig.9 y 10).Tanto en las gónadas femeninas como en las masculinas se observó una gran variabilidad en los niveles de expresión de este gen (Fig. 9 y 10). Es interesante notar que en el único individuo indiferenciado la expresión de *foxl2* fue muy baja.

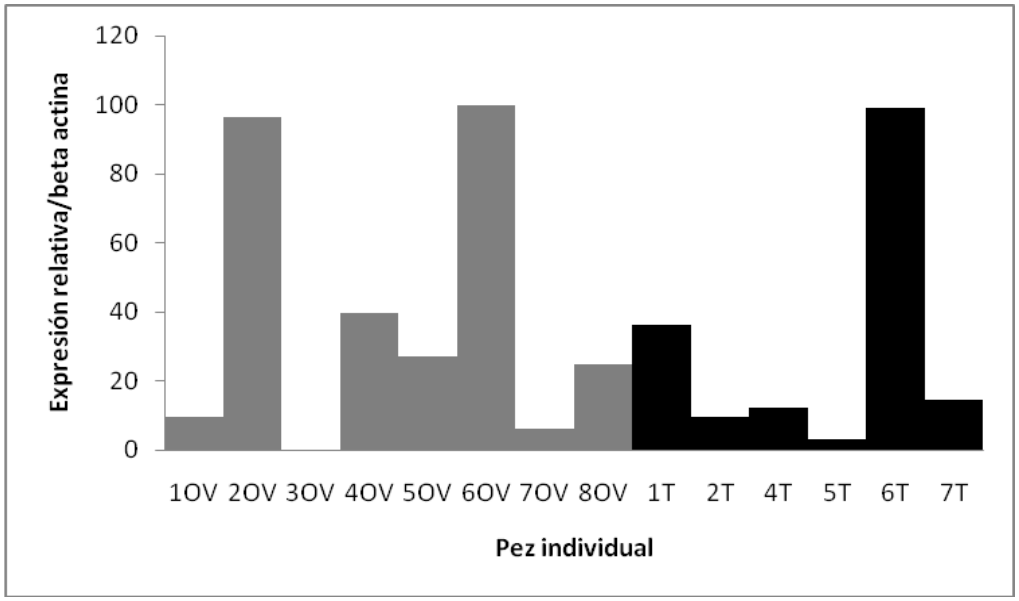

Figura 9. Estudio de la expresión de *foxl2* en gónadas de 16 meses de *A. baerii*. Se muestra la expresión individual en 8 hembras señaladas con OV (ovarios) y 7 machos señalados como T (testículos).

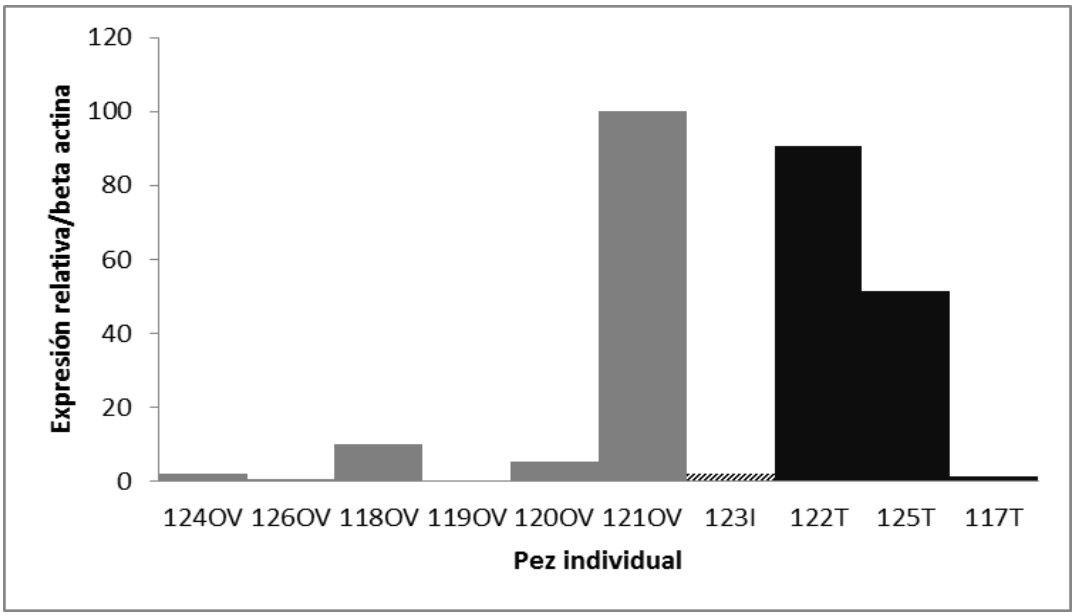

Figura 10. Estudio de la expresión de *foxl2* en gónadas de 18 meses de *A. baerii*. Se muestra la expresión individual en 6 hembras señaladas con OV (ovarios), 3 machos señalados como T (testículos) y 1 gónada indeterminada señalada con I (indeterminado).

Cuando se estudian los niveles de expresión de *foxl2* durante el desarrollo gonadal y se comparan las gónadas recién diferenciadas (16 meses) con gónadas en vitelogénesis (ovocitos gris-negro, hembras de 5 años) se observa un aumento claro y significativo ($p<0,000089$) en la expresión de este gen (Fig. 11).

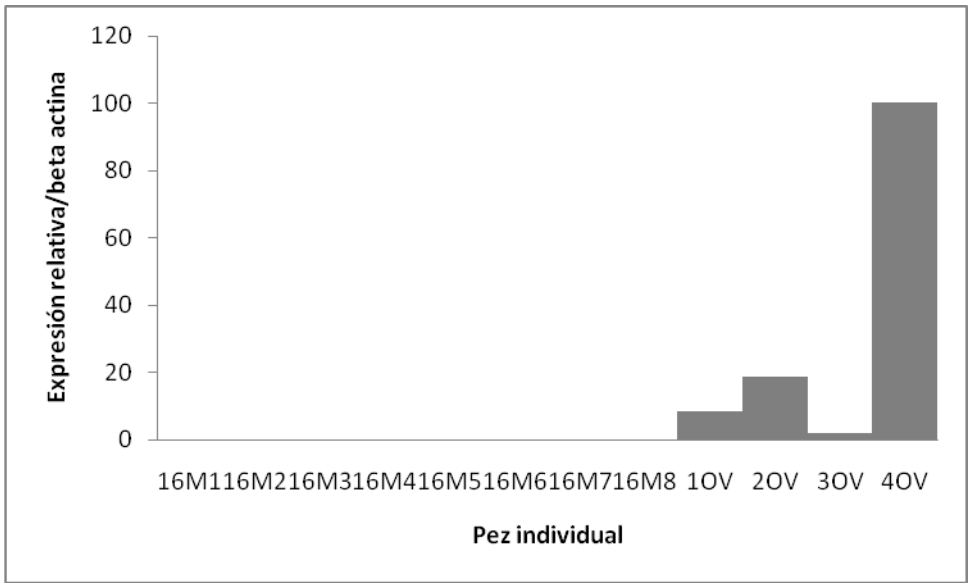

Figura 11. Comparación de la expresión de *foxl2* entre ovarios de 16 meses (16M) con ovarios de 5 años (1-4OV) (relación significativa p<0,000089).

5.3.4.1. Efecto in vitro de los estrógenos sobre la expresión gonadal de foxl2

La expresión de *foxl2* fue detectada en las gónadas de los 5 animales ensayados luego de ser incubados con medio de cultivo sin tratamiento (pozos control). Cuando se agregó el tratamiento con concentraciones crecientes de E2 los niveles de *foxl2* aumentaron de un modo general con respecto al control, pero solamente en un caso (hembra recién diferenciada (hembra 121 - p<0,0125, Fig. 12) la diferencia fue significativa. Sin embargo, este aumento no fue dependiente de la dosis. La variabilidad en la expresión de las réplicas fue alta lo cual posiblemente enmascaró un efecto estimulador del E2.

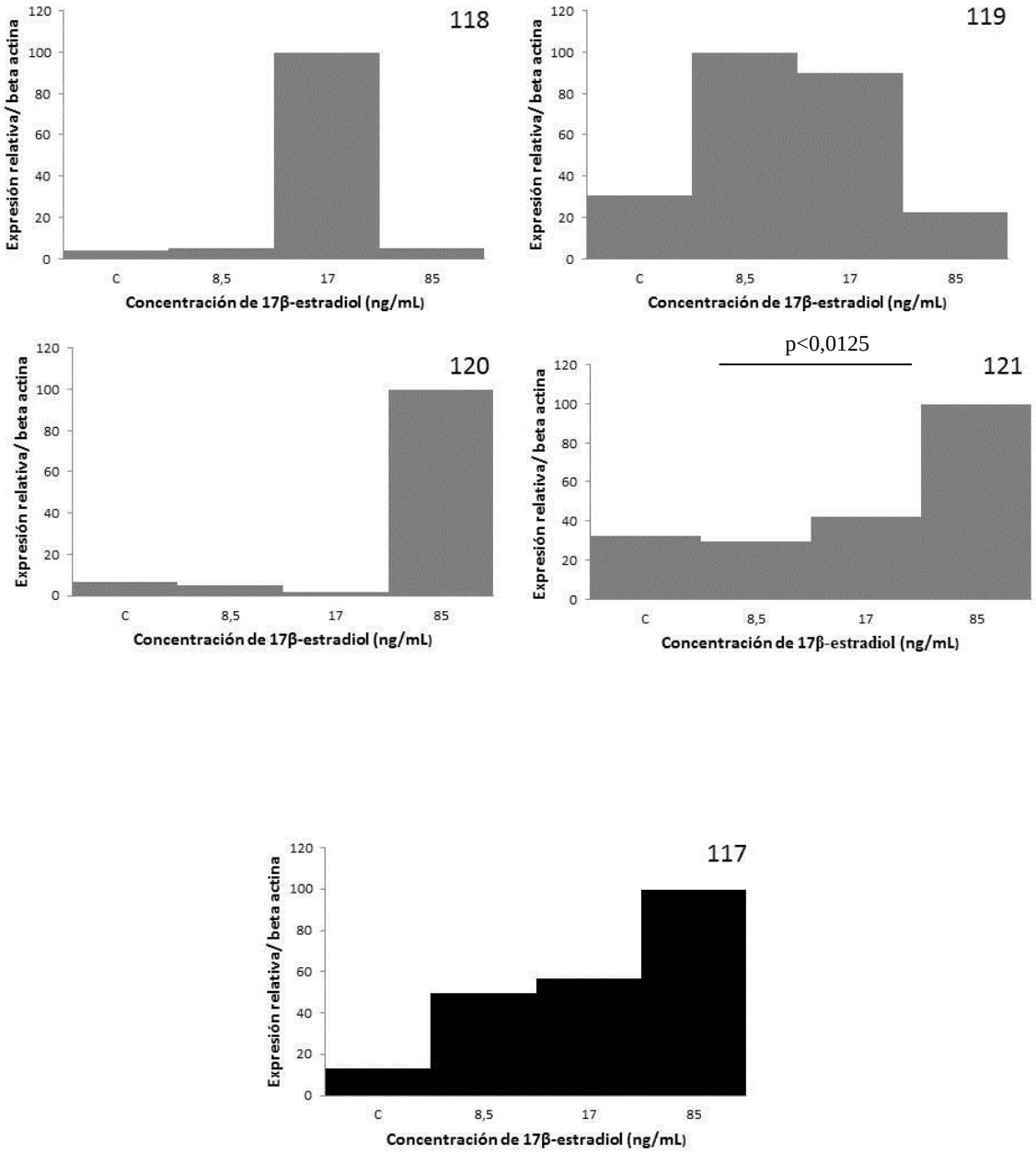

Figura 12. Efectos de concentraciones crecientes de 17β-estradiol sobre la expresión de *foxl2* en gónadas femeninas (gris) y masculinas (negro) de animales recién diferenciados de 18 meses de edad.

5.3.4.2. Efecto in vitro de la 11β-hidroxiandrostenediona sobre la expresión gonadal de foxl2

Una vez más se detectó expresión de *foxl2* en las gónadas control (sin tratamiento) de los 5 peces ensayados de 18 meses de edad. Contrariamente a lo esperado, hubo una tendencia a un

aumento de expresión de *foxl2* luego del tratamiento con la A11β-OH (Fig. 13). No se observó una dependencia en la expresión con respecto a la dosis utilizada.

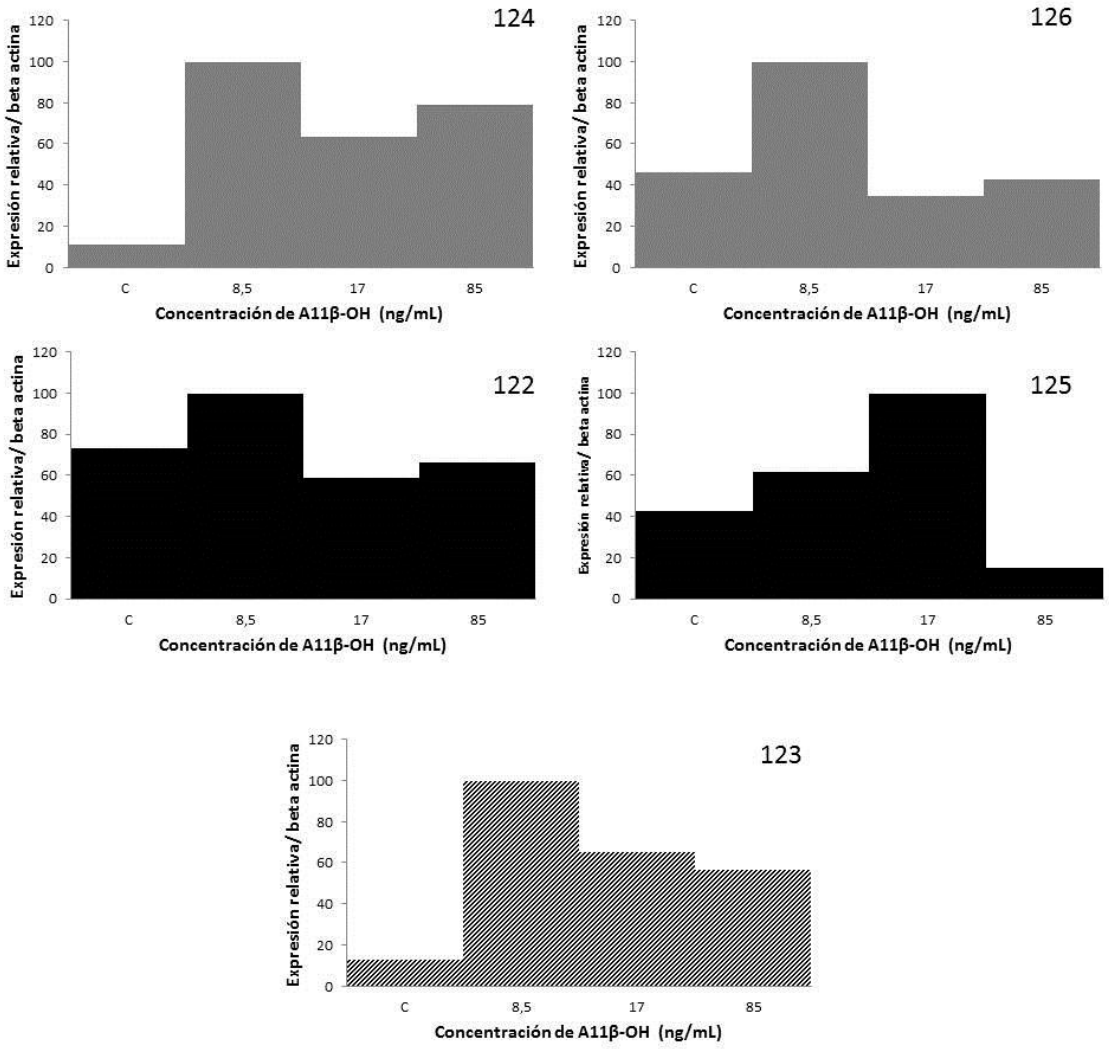

Figura 13.Efecto de la A11β-OH sobre la expresión de *foxl2* en gónadas femeninas (gris), indiferencfiadas (gris rayado) y masculinas (negro) de *A. baerii* de 18 meses de edad.

5.3.5. Hibridación in toto de foxl2 en gónadas de A. baerii

Una vez realizada la hibridación *in toto* (Fig. 14), se procedió a realizar cortes de material incluido en parafina pero lamentablemente le tejido no se conservó bien y no se pudo concluir nada. En un segundo intento, luego de la hibridación *in toto*, se realizaron cortes por congelación y se obtuvieron las imágenes de la Figura 15 y 16. En ellas se puede observar que hay coloración

positiva en las láminas con sense y una ausencia de coloración con la sonda antisense al revés de lo que se espera normalmente.

Se realizó un nuevo ensayo, esta vez realizando una hibridación *in situ*, es decir sobre cortes, pero las concentraciones de proteinasa K fueron muy elevadas y esto digirió el tejido impidiendo obtener un resultado válido.

Si bien la técnica quedó validada, hay que seguir mejorando algunos aspectos de la misma para poder llegar a concluir sobre la localización celular de *foxl2* en la gónada del esturión siberiano.

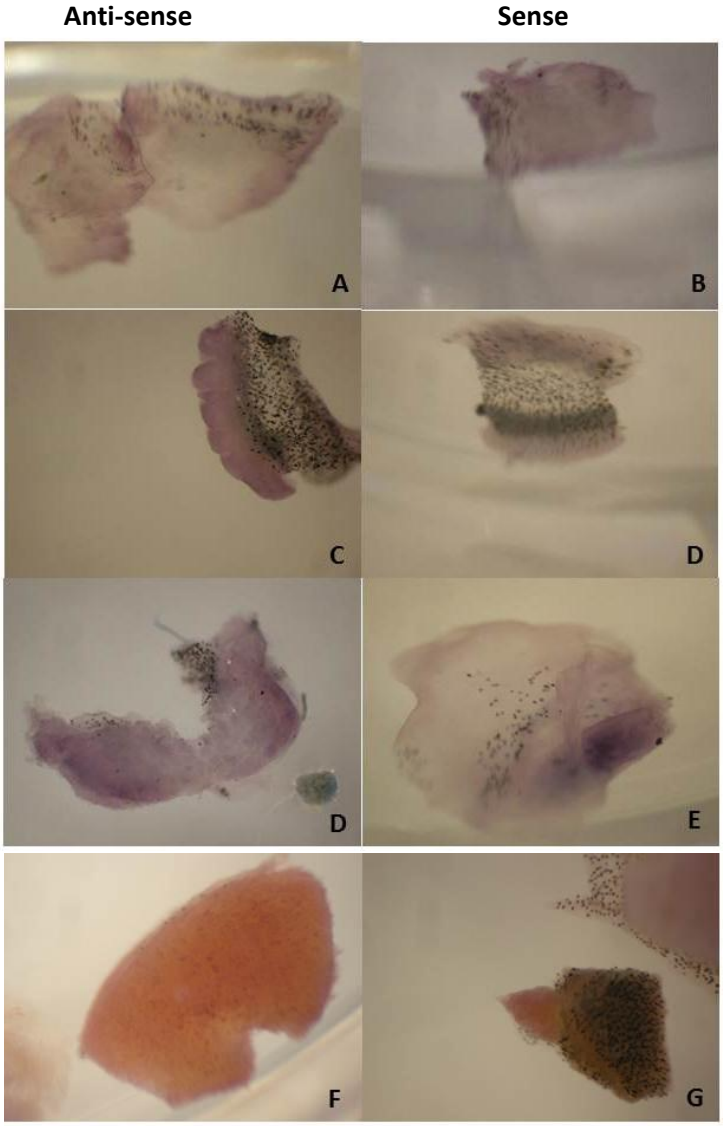

Figura 14. Gónadas de *A. baerii* de 18 meses observadas con lupa. A-B espécimen hembra, C-D espécimen macho, D-E espécimen hembra, F-G espécimen macho de 16 meses.

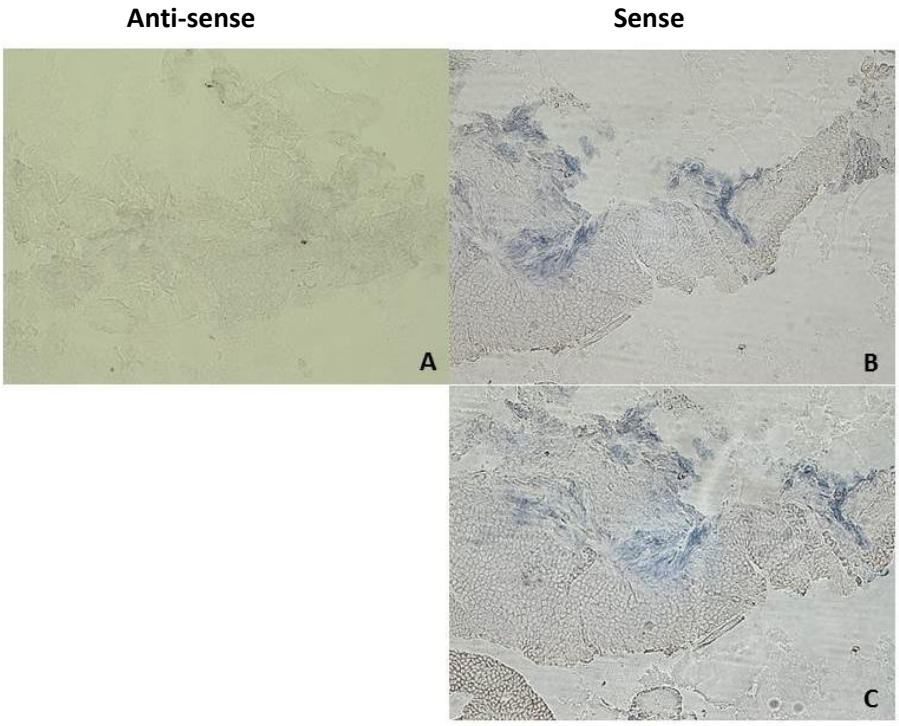

Figura 15. Fotos de gónadas femeninas de 18 meses correspondientes a D-E de la figura 14

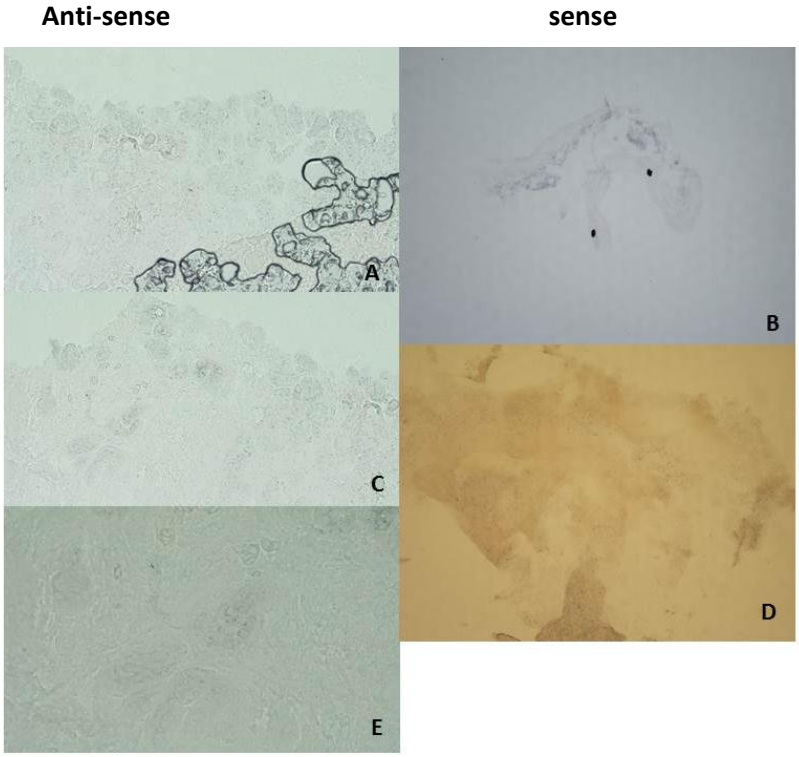

Figura 16. Fotos de gónadas masculinas de 16 meses correspondientes a F-G de la figura 14

5.4. Ensayos de amplificación de otros genes potencialmente involucrados en el desarrollo ovárico.

5.4.1. Caracterización del gen femenino de la esteroidogenésis (cyp19a1)

En las bases de datos públicas noexistían datos sobre la secuencia de *cyp19a1*o aromatasa para *Acipenseridae*, ni *Acipenseriformes*. Es por ello que se realizaron estudios bioinformáticos diversos para poder diseñar cebadores adecuados que permitieran amplificar la *aromatasa*. Se diseñaron más de 7 juegos de cebadores a partir de la información obtenida en distintas bases de datos de tetrápodos y peces de posición basal como es el caso del esturión.

Por otro lado se realizaron análisis de exones e intrones de 11 especies (entre tetrápodos y peces), para tratar de verificar si los cebadores ya diseñados anteriormente caían en exones y podían ser utilizados en muestras de ADN genómico, tanto en *A. baerii* (ovocitos de 5 años) como en *A. gueldenstaedtii* (ovocitos en estadio 3). Los ovarios de de *A. gueldenstaedtii* provenían de animales con altas concentraciones de E2 indicativo de alta expresión y activación de la aromatasa (Vizziano, datos no publicados). Se realizaron PCR finales, obteniéndose bandas que potencialmente podían corresponder a la aromatasa. Sin embargo, la secuenciación de 30 fragmentos obtenidos no confirmó la presencia de aromatasa. Por lo tanto el resultado es que no se logró amplificar este gen.

Más adelante, se analizó el transcriptoma de la gónada del esturión del lago, *A. fulvescens*, no se encontró ninguna secuencia que correspondiera a la aromatasa.

5.4.2. Caracterización de yy1

Se amplificó una secuencia de *yy1* usando cebadores diseñados en base a la secuencia de *yy1* del esturión del lago, *A. fulvescens*. La primera amplificación fue realizada con PCR en tiempo final y se observó una expresión clara solamente en los ovarios, no detectándose con esta técnica fragmentos de 738pb amplificados en los testículos (Fig. 17).

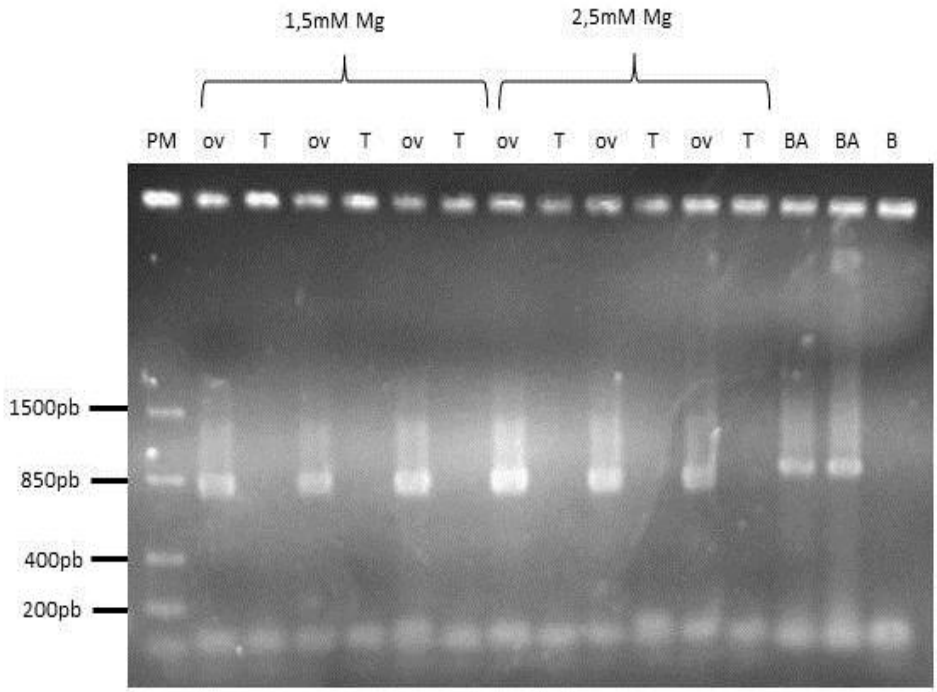

Figura 17. Gel de agarosa 1% de productos PCR de ovarios de 5 años (OV) y testículos (T) de 16 meses con el gen *yy1* (738 pb). Para una concentración de 1,5 y 2,5mM de Mg se utilizaron 3 temperaturas diferentes. Se utilizó como control positivo utilizando β-actina (BA) y como control negativo o blanco realizado con agua ultra purificada (B).

Luego se procedió a caracterizar la expresión del *yy1* en distintos tejidos de ejemplares de 3 años de edad usando la técnica de qPCR (Fig. 18). Con esta técnica se observó que el *yy1* estaba presente tanto en testículos como en ovarios, y que hubo una expresión claramente mayor en músculo, cerebro y riñón de los machos con respecto a las hembras.

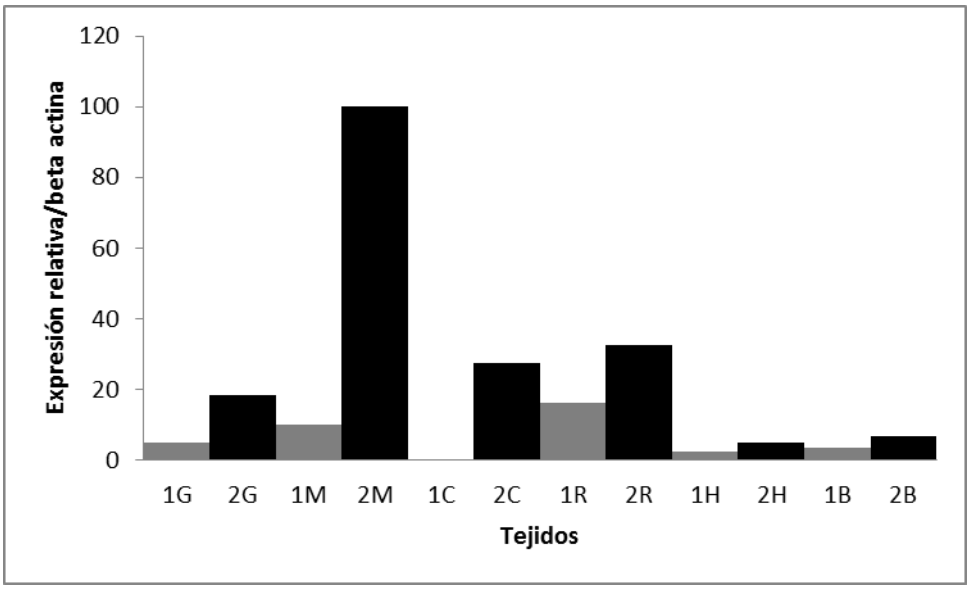

Figura 18. Expresión relativa con respecto a beta actina en distintos tejidos de 3 años para el gen *yy1*. 1G- Gónada femenina (gris), 2G- Gónada masculina (negro), M-Musculo, C-Cerebro, R, riñón, H-Hígado, B-Branquias

5.4.2.1. Ensayos de expresión de yy1 durante la peri-diferenciación

El estudio de la expresión de *yy1* en las gónadas de individuos de 16 meses en la etapa de peri-diferenciación muestra una expresión muy baja en los ovarios recién diferenciados y en algunos testículos y gónadas indiferenciadas. Se desataca que un testículo y una gónada indiferenciada mostraron una expresión más elevada. (Fig. 19). Se precisan más datos para concluir sobre la expresión de *yy1* durante el desarrollo gonadal.

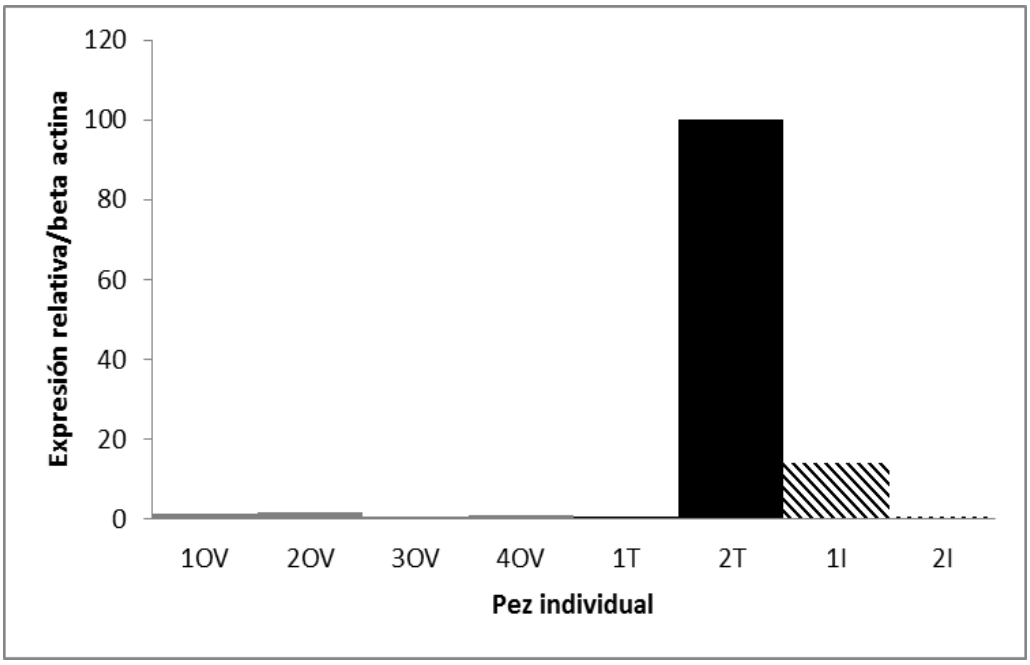

Figura 19. Estudio de la expresión de *yy1* en ovarios, testículos y gónadas indiferenciadas de 16 meses.

El estudio de individuos en peri-diferenciación de 18 meses (en la tabla 4 se detallan los estadios gonadales), muestra que no hay diferencia en la expresión de *yy1* entre ovarios y testículos recién diferenciados y gónadas indiferenciadas (Fig. 20).

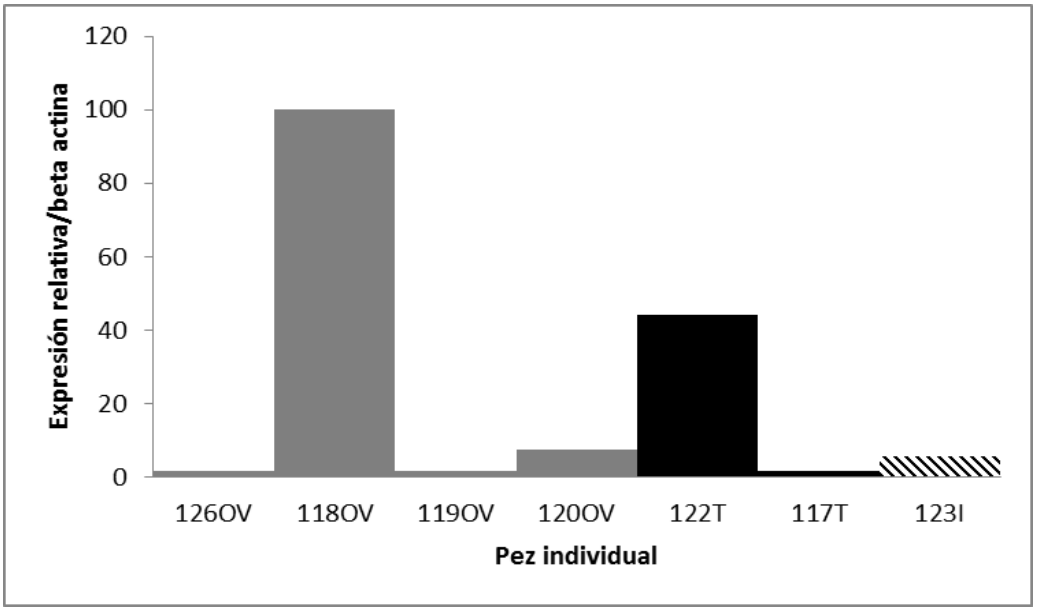

Figura 20. Estudio de la expresión de *yy1* en ovarios, testículos y gónadas indiferenciadas de 18 meses.

Cuando se compara la expresión de *yy1* durante el desarrollo del ovario (16 meses, 18 meses y 5 años) se observa un aumento significativo (p<0,0427) de la expresión en los ovarios más desarrollados con un máximo en ovarios en vitelogénesis (Fig21).

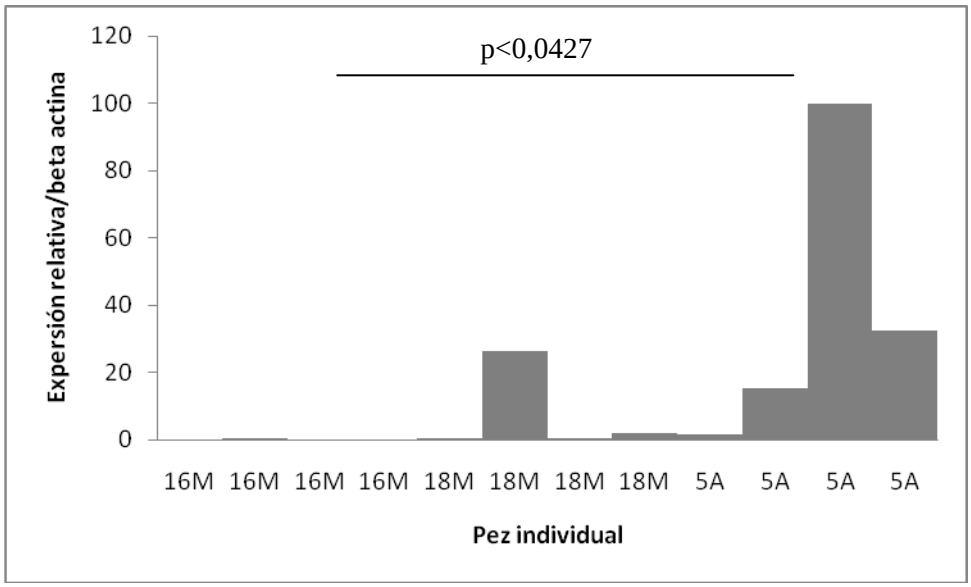

Figura 21. Estudio de la expresión de *yy1* en ovarios en distintas etapas del desarrollo. 16M: 16 meses, 18M: 18 meses y 5A: 5 años (expresión significativa p<0,0427).

5.4.3. Caracterización de wnt4

Se amplificó una secuencia de *wnt4* usando cebadores diseñados en base a la secuencia de *wnt4* delesturión del lago, *A. fulvescens,* obteniéndose un fragmento de 273pb.

Posteriormente, se realizó el análisis de la expresión de *wnt4* en los tejidos de individuos de 3 años usando qPCR. De un modo general se obtuvo una expresión alta en los tejidos masculinos con respecto a los femeninos (Fig. 22). En esta etapa del desarrollo el testículo presentó mayor expresión de *wnt4* que el ovario.

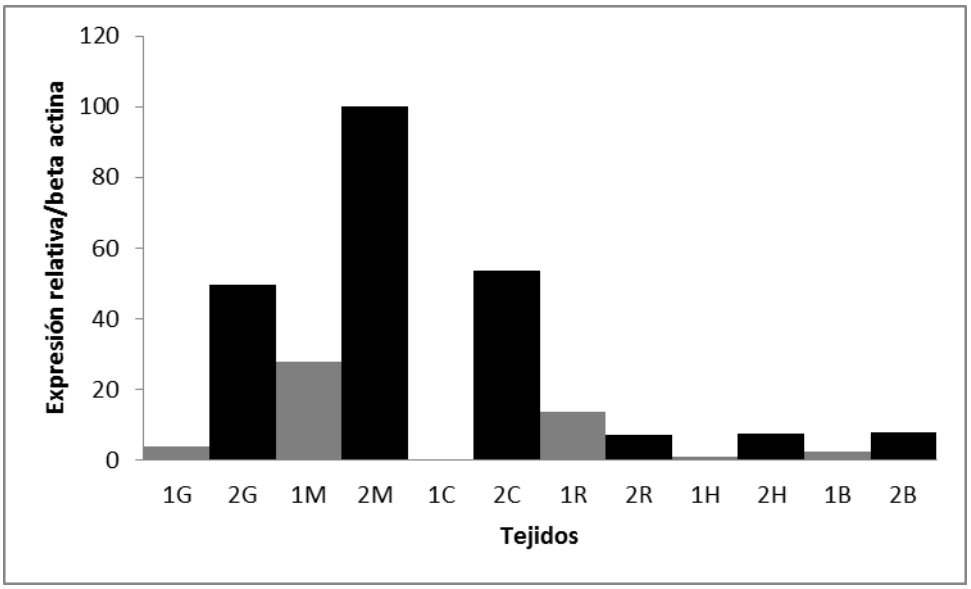

Figura 22. Expresión relativa con respecto a beta actina en distintos tejidos de 3 años para el gen *wnt4*. 1G-Gonada femenina (gris), 2G- Gónada masculina (negro), M-Musculo, C-Cerebro, R, riñón, H-Hígado, B-Branquias

5.4.3.1. Ensayos de expresión de wnt4 durante la peri-diferenciación

Al igual que en el caso de *yy1*, no se observan diferencias en la expresión del gen entre las gónadas recién diferenciadas hacia testículo u ovario, ni en las indiferenciadas con respecto a los niveles de expresión de *wnt4*. (Fig. 23 y 24).

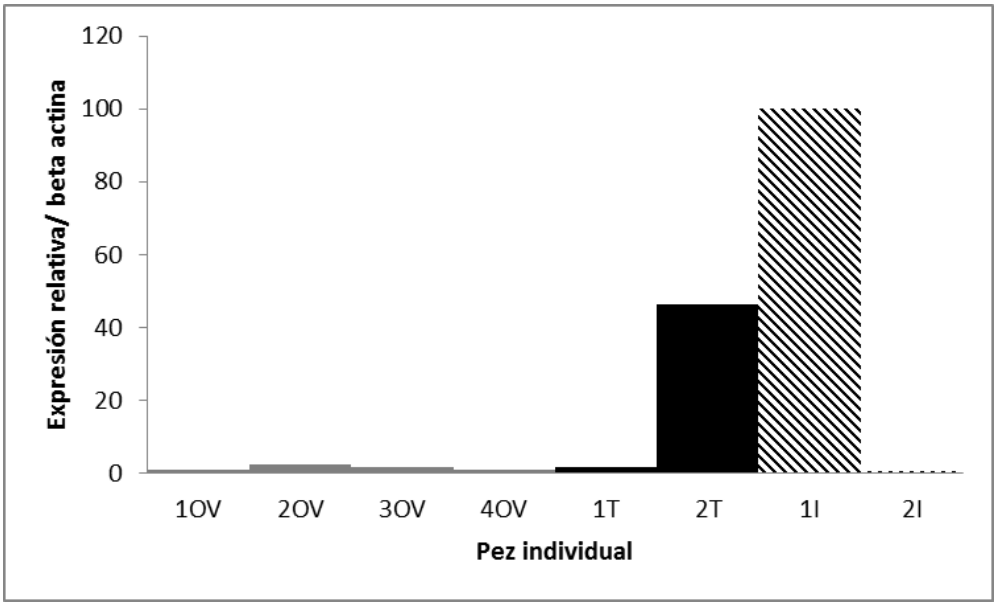

Figura 23. Estudio de la expresión de *wnt4* en ovarios, testículos y gónadas indiferenciadas de 16 meses.

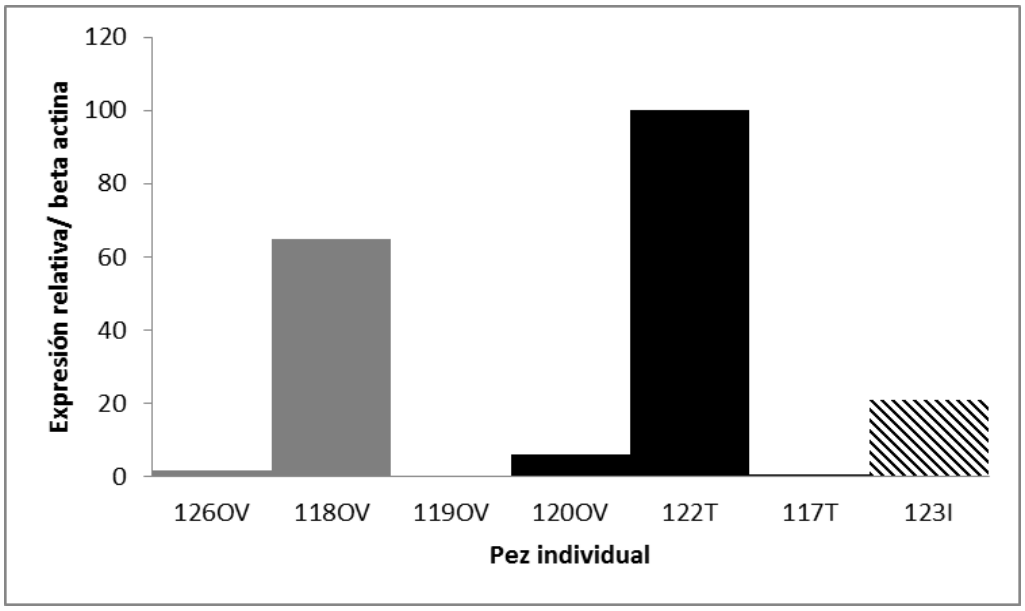

Figura 24. Estudio de la expresión de *wnt4* en ovarios, testículos y gónadas indiferenciadas de 18 meses.

Cuando se compara la expresión de *wnt4* durante el desarrollo del ovario (16 meses, 18 meses y 5 años) no se observan cambios significativos durante la peri-diferenciación en individuos de 18 meses (Fig. 25).

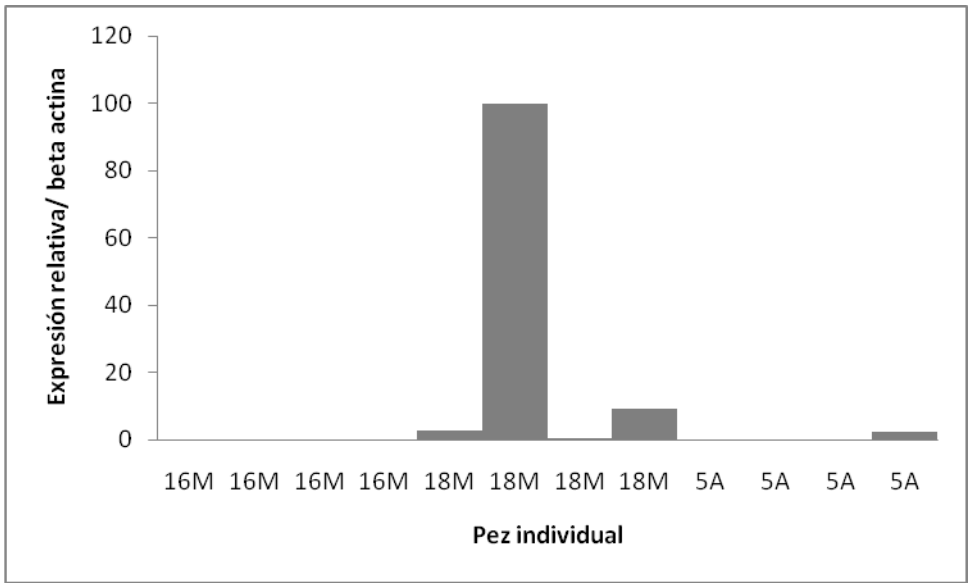

Figura 25. Estudio de la expresión de *wnt4*en ovarios en distintas etapas del desarrollo. 16M: 16 meses, 18M: 18 meses y 5A: 5 años (expresión no significativa).

5.4.4. Caracterización de r-spondina1

Se amplificó la secuencia de *r-sondina1* usando cebadores diseñados en base a la secuencia del esturión del lago, *A. fulvescens*.

En el estudio de análisis de la expresión de *r-spondina1* en los tejidos de individuos de 3 años usando qPCR, mostró una expresión en gónadas tanto en hembras como en machos. Hubo una expresión más elevada en las gónadas, músculo y cerebro de los machos con respecto a las hembras. (Fig. 26).

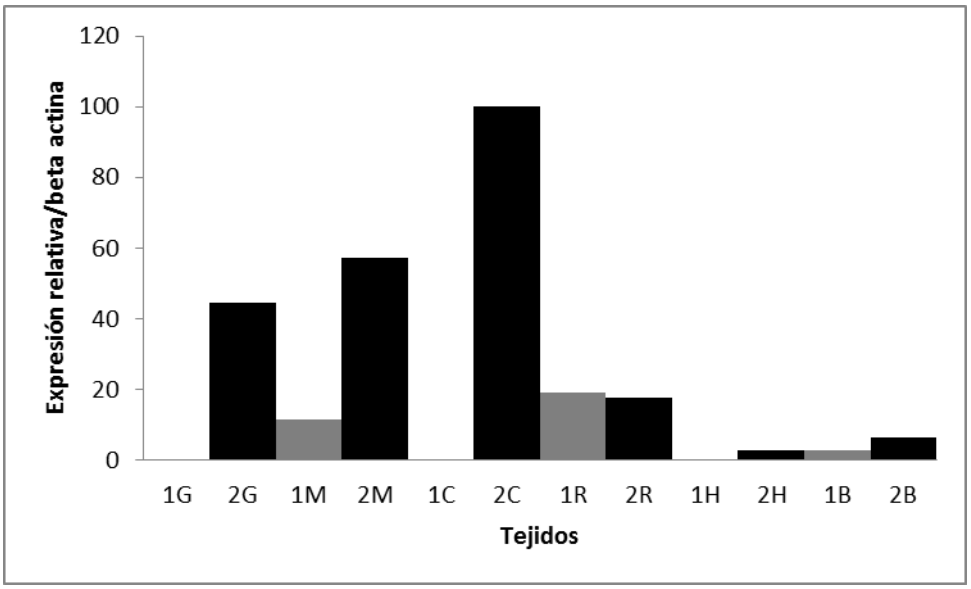

Figura 26. Expresión relativa con respecto a beta actina en distintos tejidos de 3 años para el gen *r-spondina*. 1G-Gónada femenina (gris), 2G-Gonada masculina (negro), M-Músculo, C-Cerebro, R, riñón, H-Hígado, B- Branquias.

5.4.4.1. Ensayos de expresión de r-spondina1 durante la peri-diferenciación

Como en los casos anteriores y al igual que *yy1* y *wnt4*, no se observan diferencias en la expresión entre las gónadas femeninas y masculinas recién diferenciadas (Fig 27 y 28).

En las gónadas de individuos de 16 meses en la etapa de peri-diferenciación (ver tabla 5) se observa una expresión muy baja en los ovarios recién diferenciados, mientras que en algunos testículos y gónadas indiferenciadas la expresión aumenta. Un testículo y una gónada

indiferenciada mostraron una expresión más elevada (al igual que *yy1*) tanto para gónadas de 16 meses y 18 meses (ver tabla 4). (Fig. 27 y 28).

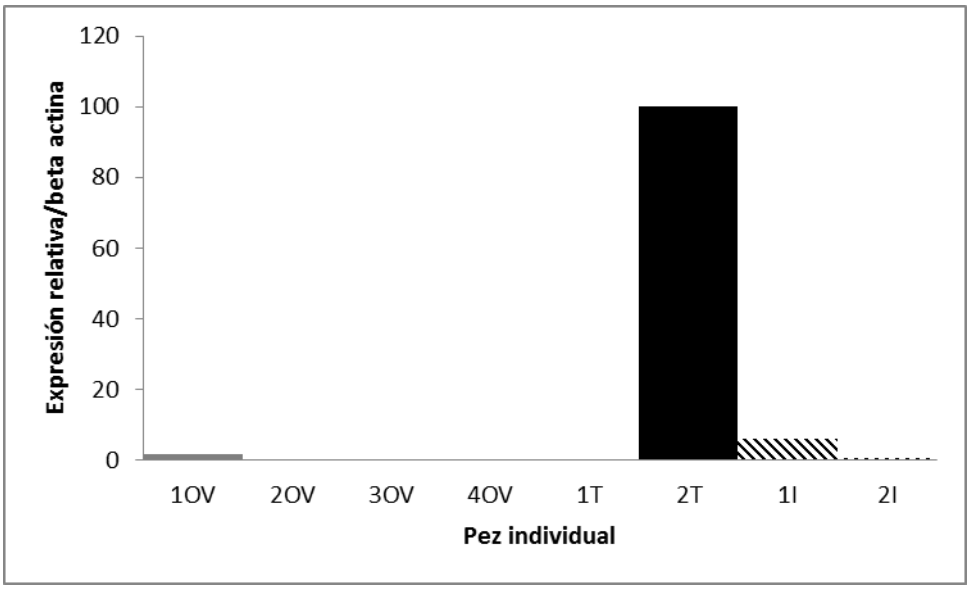

Figura 27. Estudio de la expresión de *r-spondina* en ovarios, testículos y gónadas indiferenciadas de 16 meses.

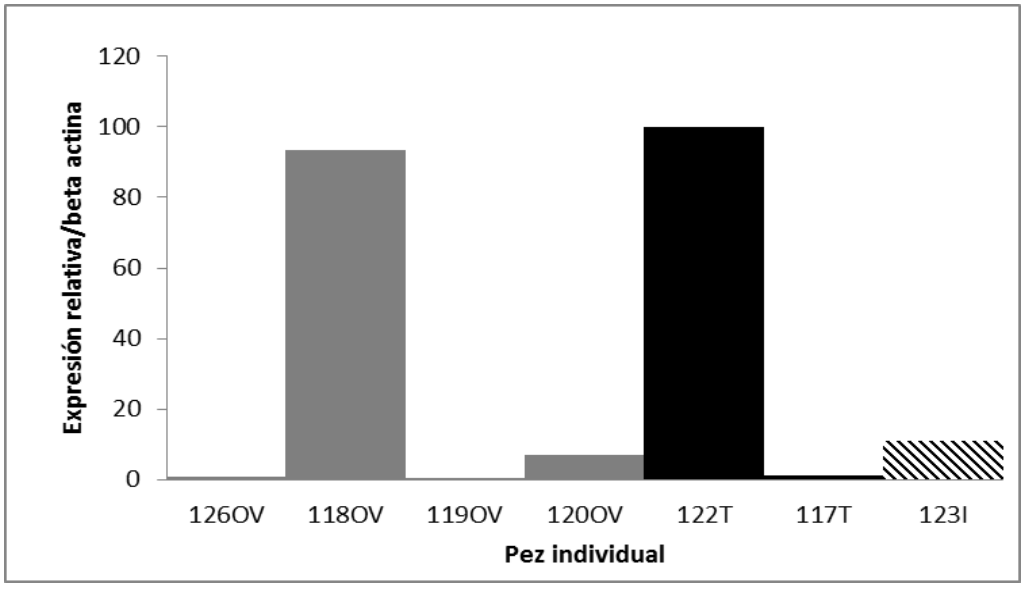

Figura 28. Estudio de la expresión de *r-spondina* en ovarios, testículos y gónadas indiferenciadas de 18 meses.

Cuando se compara la expresión de *r-spondina1* durante el desarrollo ovárico (16 meses, 18 meses y 5 años) se observa un aumento de la expresión en los ovarios más desarrollados (18 meses y 5 años) (Fig.29). Estos resultados fueron muy similares al patrón encontrado para *wnt4* (Fig. 25).

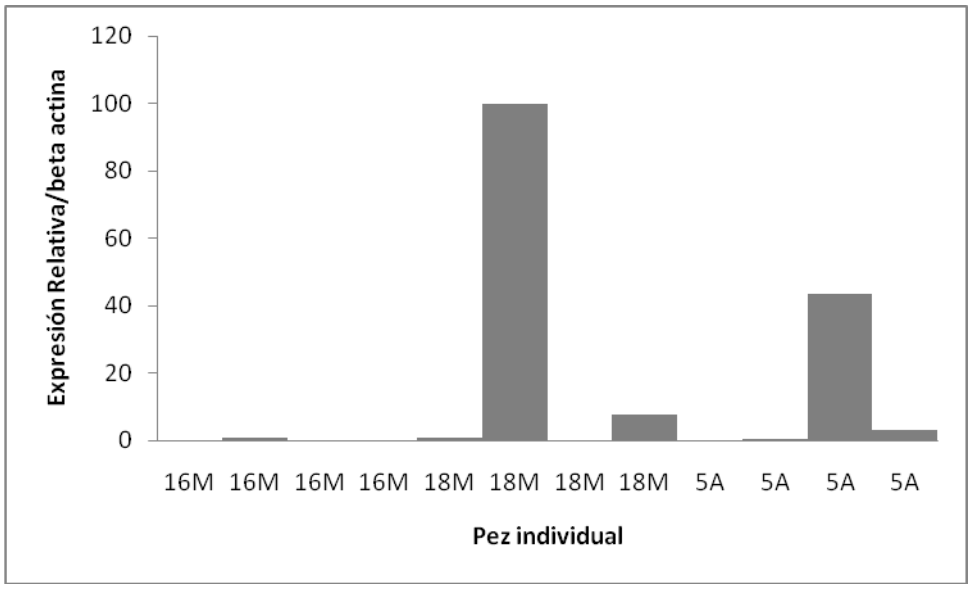

Figura 29. Estudio de la expresión de *r-spondina* en ovarios en distintas etapas del desarrollo. 16M: 16 meses, 18M: 18 meses y 5A: 5 años (expresión no significativa).

6. Discusión

Esta tesis constituye el primer esfuerzo de identificación de genes que están involucrados en las vías de diferenciación ovárica en el esturión siberiano durante el período de peri-diferenciación.

6.1. Diferenciación morfológica y cinética de diferenciación

La cinética de diferenciación ha sido estudiada en pocas especies de esturiones. Para el esturión chino (*Acipenser sinensis*) se detectaron los primeros signos de diferenciación morfológica a los 9 meses de vida (Chen et al. 2006), mientras que en el esturión del Adriático (*Acipenser naccarii*) se reportan los primeros signos de diferenciación a los 6 meses de edad (Grandi et al. 2007; Grandi & Chicca 2008). Los esturiones cultivados en Polonia mostraron signos claros de diferenciación gonadal a los 9 meses, siendo identificados ovarios y testículos presuntivos a los 4 meses de edad (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013). Los animales de 16 y 18 meses de esturión siberiano utilizados en esta tesis mostraron un grupo de gónadas consideradas como ovarios presuntivos, otras se identificaron como ovarios recientemente diferenciados similares a los descriptos a los 9 meses por Rzepkowska & Ostaszewska (2013), otros fueron ovarios ya estructurados constituidos por lamelas ovígeras conteniendo mayoritariamente ovocitos primarios pero también ovogonias en el epitelio germinal, y testículos presuntivos. Solamente dos individuos estaban indiferenciados morfológicamente. Esto indica que a los 16 y 18 meses los animales utilizados en este trabajo se encontraban en la peri-diferenciación, es decir en el momento que una gónada comienza a ser reconocida como ovario o como testículo. Es de destacar que los animales experimentales de 16 y 18 meses brindados por la piscicultura Esturiones del Rio Negro tuvieron un retraso en el crecimiento como lo atestiguan sus largos y pesos medios (37 cm y 110 g para 16 meses, y 40 cm y 150 g para 18 meses). Cuando se compara estos animales con unos de crecimiento normal muestreados recientemente en otra empresa uruguaya, se observa que a los 9 meses los animales presentaron una talla media de 43 cm y un peso de 250 g (DiLandro &

Vizziano, datos no publicados). Es decir que los animales utilizados de 16 y 18 meses tuvieron un largo y un peso menor con respecto a animales de 9 meses cultivados en otra empresa. Esto explicaría la presencia de individuos recién diferenciados a los 16 meses, que en definitiva equivaldrían en nivel de crecimiento normal a individuos de 8 a 9 meses. Lo importante es tener en cuenta que trabajamos con gónadas que presuntivamente serán ovarios, otras eran testículos presuntivos y otras ya estaban claramente diferenciadas. En este momento se están siguiendo diversas cohortes para poder establecer el período de diferenciación en las condiciones de cultivo de Uruguay.

Si se considera la cinética de diferenciación sexual a nivel morfológico se pueden establecer según las especies diferentes momentos en los cuales ocurre la diferenciación sexual: antes de la eclosión, luego de la eclosión y durante la etapa larvaria, en la etapa juvenil. Así en el guppy (*Poecilia reticulata)* machos y hembras se diferencian 8 y 12 días antes de la eclosión, en Austrolebias ocurre antes de la eclosión, y en el medaka (*Oryzias latipes)* ocurre dos días después de la eclosión (Brusle & Brusle 1983; Arezzo et al. 2007). En otras especies la diferenciación sexual ocurre en el período de larva o post larva como es el caso de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y de la tilapia (*Tilapia zilli)* (Bruslé & Bruslé 1983; Devlin & Nagahama, 2002). Finalmente, hay un grupo de especies con diferenciación tardía como el *Dicentrarchus labrax* (1 o 2 años), *Anguilla anguilla* entre 1 y 6 años, y los esturiones en el primer año de vida. El esturión siberiano en las condiciones experimentales de este trabajo se diferenció hacia los 16 – 18 meses de edad.

Los criterios utilizados para identificar a nivel morfólogico los primeros signos de diferenciación sexual son variados. Así en trucha el primer criterio claro aparece en el futuro ovario, con una organización especial del tejido conjuntivo en forma de invaginaciones que indican la formación de las futuras lamelas ovígeras (Vizziano et al. 2007), mientras que en el macho las gonias se mantienen distribuidas en forma homogénea como lo constatamos en el esturión. En las tilapias y los pejerreyes uno de los primeros signos de diferenciación es la aparición en el futuro ovario de crestas que luego al proseguir su desarrollo formarán una cavidad ovárica (Strüssmann & Nakamura 2002; Ijiri et al. 2008). En el medaka el primer signo de diferenciación ovárica es el

aumento claro en el número de gonias, ya que la multiplicación gonial es mayor en los ovarios (Kobayashi et al. 2004). En nuestro trabajo observamos dos criterios para distinguir un ovario presuntivo: a) la presencia de invaginaciones del epitelio germinativo, b) la localización de células germinales formando clusters en la zona ventral de la gónada. Una publicación de este año plantea que se pueden reconocer ovarios de testículos presuntivos del esturión siberiano a los 4 meses (animales cultivados en Polonia) y se considera como criterio de distinción la presencia de invaginaciones en el epitelio germinal que rodea al ovario (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013). De modo que uno de los criterios que se establecieron en este trabajo coincide con el recientemente publicado por las colegas de Polonia. Cuando esta tesis comenzó había una ausencia notable de estudios detallados de la morfología de la diferenciación gonadal del esturión siberiano. Solo habían antecedentes fraccionados de estudios en otras especies, que no completaban toda la cinética de diferenciación gonadal en esturiones (Grandi & Chicca 2008; Amberg et al. 2010; Vidotto et al. 2013; Yue et al. 2013). El trabajo que desarrollamos en morfología en este trabajo está acorde a lo publicado recientemente en el esturión siberiano y aporta algún criterio más de distinción del desarrollo ovárico con respecto a ese trabajo (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013).

Existen diferentes tipos de diferenciación gonadal en peces. Algunas especies presentan gonocorismo primario y otras presentan lo que se puede llamar hermafroditismo juvenil. En las especies gonocóricas primarias la gónada indiferenciada se desarrolla directamente hacia ovario o hacia testículo, mientras que en el hermafroditismo juvenil aparece un estadio transitorio en donde se observan ovocitos y luego de ello esas gónadas ‘femeninas’ se diferencian hacia ovarios o hacia testículos (Devlin & Nagahama 2002). El análisis de las gónadas de este trabajo sumado a lo descripto por Rzepkowska & Ostaszewska (2013), sugieren que el esturión posee un tipo de desarrollo gonocórico.

6.2. Diferenciación molecular

La diferenciación del ovario en peces teleósteos está antecedida por una serie de cambios moleculares que implican la expresión de factores de trasncripción, factores de crecimiento,

proteínas y enzimas de la esteroidogénesis. En estas etapas tempranas las células germinales en proliferación entran en meiosis y comienzan a expresarse genes que codifican factores de transcripción como *sf1, sox, foxl2* y *figα,* los cuales activarán a la *cyp19a1a* induciendo la producción de estrógenos (Piferrer & Guiguen 2008). El *foxl2* juega un papel importante en la diferenciación gonadal temprana de la gónada femenina mucho antes de la diferenciación morfológica sobre-expresándose junto al gen de la aromatasa (Vizziano et al 2007; Ijiri et al 2008). Estudios en trucha han sugerido que podría haber una retro-regulación positiva entre *foxl2* y *cyp19a1* (Baron et al 2004; Vizziano et al. 2007), siendo *foxl2* capaz de estimular la expresión de *cyp19a1* en mamíferos y peces (Pannetier et al. 2005; Wang et al. 2007). A su vez los estrógenos estimulan *foxl2* en peces (Baron et al. 2004; Wang et al. 2007; Vizziano-Cantonnet et al. 2008) y los tratamientos masculinizantes suprimen al expresión de *foxl2a* (Vizziano et al. 2008) indicando que este gen juega un papel importante en los procesos de feminización y masculinización.

Dado que nuestra hipótesis de trabajo consideraba que los mecanismos moleculares de diferenciación gonadal eran compartidos entre peces basales como los esturiones y peces divergentes como los teleósteos, la primera intención fue centrarnos en la amplificación y estudio de la expresión de *foxl2* y de la aromatasa gonadal (*cyp19a1a*). En este trabajo se logró amplificar y caracterizar el *foxl2.*

Los estudios de filogenia del gen *foxl2* permitieron distinguir la presencia de dos grupos de *foxl2* en peces: *foxl2a* y *foxl2b* que son coincidentes con lo reportado previamente (Baron et al 2004; Jiang et al 2011; Geraldo et al 2013). Este análisis confirmó que la secuencia de *foxl2* con la cual trabajamos en el esturión siberiano corresponde a *foxl2a*. Los estudios realizados por Baron et al (2004) y por Jiang et al (2011) sostenían que las copias duplicadas de *foxl2* se habían generado exclusivamente en la tercera duplicación completa del genoma que precedió a los teleósteos. Sin embargo, un estudio reciente descartó claramente este hecho y sugiere que el evento de duplicación habría ocurrido en un ancestro de los gnatostomados para la copia de *foxl2b* para aparecer en condrictios, teleósteos, celacantos y tetrápodos (Geraldo et al 2013). El *foxl2b* se habría perdido en los tetrápodos ya que estudios exhaustivos realizados en los genomas disponibles no han permitido identificar al *foxl2b* (Geraldo et al 2013).

En los mamíferos el *foxl2* se expresa en las células foliculares fetales y adultas del ratón (Loffler 2003), es responsable de la manutención y desarrollo de la granulosa (Yao 2005) y ha sido asociada recientemente con el desarrollo de tumores celulares de la granulosa (Caburet et al. 2012). Las mutaciones de *foxl2* en las células somáticas de soporte resultaron en la reversión parcial de ratones XX (Ottolenghi et al. 2005) confirmando la participación de este gen en la diferenciación ovárica del ratón. Sin embargo, la ausencia de reversión sexual en los casos de BPES en humanos y las mutaciones nulas de *Foxl2* en ratones no afectaron la formación inicial del ovario, indicando que foxl2 no funciona como gen determinante del sexo en humanos y ratones (Yao, 2005). La ausencia de análisis funcionales en otros vertebrados previene cualquier conclusión sobre su posible implicancia en la determinación sexual del ovario. Dado que el sistema de determinación genético del esturión siberiano es del tipo ZZ/ZW una de las alternativas es que el *foxl2* actuase como gen ligado al sexo asociado al cromosoma W como descripto en anfibios para el *dm-W* (Kobayashi et al. 2008). Los resultados de expresión muestran que este gen es expresado tanto en las gónadas femeninas como masculinas, lo cual sugiere que *foxl2a* no cumple el papel de determinante sexual femenino para este pez.

Con respecto a la participación de *foxl2* en la vía de diferenciación femenina, los patrones de expresión de *foxl2a* en el esturión siberiano, contrariamente a lo observado en teleósteos, muestran que el *foxl2a* no resultó dimórfico ni en las gónadas en peri-diferenciación (16 y 18 meses) ni en las gónadas de individuos inmaduros (3 años de edad). Esto sugiere que por lo menos en esta etapa tardía de la diferenciación el *foxl2a* no se encuentra mayormente expresado en las futuras gónadas femeninas a diferencia de lo que se constata en peces teleósteos durante la diferenciación sexual reciente (Vizziano et al. 2007; Ijirii et al. 2008). Sin embargo, no puede descartarse que haya un pico de expresión más temprano en las primeras etapas del desarrollo gonadal del esturión siberiano. Los resultados actuales no permiten apoyar la idea de que el *foxl2a* tenga un papel central en el control de la diferenciación hacia ovario para esta especie basal. A esto se suma que los estudios *in silico* sobre la base de datos del transcriptoma de la gónada recién diferenciada de dos esturiones (esturión del lago o *Acipenser fulvescens*, Hale et al. 2010) y esturión del adriático o *Acipenser naccarii*, Vidotto et al. 2013) y en ninguno de los dos casos *foxl2*

se expresó en gónadas tempranas con los primeros signos de diferenciación. Esto último refuerza la idea de que *foxl2a* no es un regulador temprano de la diferenciación ovárica en esturiones.

En mamíferos se ha descripto que el *foxl2* parece ser crítico es crítico para la diferenciación correcta de las células de la granulosa durante la foliculogénesis (Yao 2005). El aumento claro en la expresión de *foxl2a* entre los ovarios de 16 y 18 meses (recién diferenciados) y los de 5 años (en post-vitelogénesis) sugiere que este gen podría estar involucrado en el desarrollo del folículo, al igual que ocurre en mamíferos. Con el fin de corroborar si *foxl2a* se expresaba en las células foliculares en ovarios en distintas etapas del desarrollo se realizaron los primeros ensayos de hibridación *in situ*. Si bien pudimos validar la metodología, no logramos distinguir los tipos celulares en los cuales se expresó este gen en los ovarios recién diferenciados. Se precisan estudios de localización de la expresión en distintos estadios de desarrollo ovárico asociados a estudios funcionales para poder confirmar si *foxl2a* cumple un papel regulador de la conformación del folículo en esturiones.

En peces teleósteos se propone que el mecanismo de diferenciación del sexo está controlado por los esteroides sexuales gonadales, especialmente en los ovarios. Los estrógenos aparecen como factores claves en la diferenciación ovárica de peces según la idea desarrollada por Yamamoto (1969) y trabajos posteriores (Baroiller et al. 1999, Piferrer & Guiguen 2008, Guiguen et al. 2010). Según la bibliografía, los estrógenos desencadenan la expresión de los principales genes relacionados con la diferenciación morfológica del ovario (*foxl2a, fst*), e inhiben algunos genes relacionados con la diferenciación testicular (Baron et al. 2004; Vizziano et al. 2008; Guiguen et al. 2010). A su vez los andrógenos inhiben el *foxl2* (Vizziano et al 2008). Por otro lado, los andrógenos e inhibidores de aromatasa en gónadas femeninas, estarían inhibiendo los genes femeninos, y aumentarían la expresión de los genes masculinos (Baron et al. 2004; Vizziano et al. 2007). Tratamientos con andrógenos (2-metil-testosterona) en la especie *G. rarus*, reprimió la expresión de *foxl2*, provocando una completa reversión del sexo (Jiang et al. 2011). Estos resultados fueron similares a estudios previos en otros animales, tales como la trucha arco iris (Baron et al. 2004, Vizziano et al 2008) y bagre (Liu et al. 2007).

En este trabajo se realizaron los primeros ensayos de regulación *in vitro* por estrógenos y andrógenos esperando que los estrógenos estimularan la expresión de *foxl2a* y los andrógenos la inhibieran. Sin embargo, en las condiciones experimentales ensayadas no se observaron cambios en la expresión de *foxl2* luego del tratamiento con esteroides.

Los resultados obtenidos sugieren que el esturión siberiano (que tiene una posición filogenética basal) no presenta los mismos genes reguladores de la diferenciación ovárica que los teleósteos (más divergentes). En este contexto, y dado que *foxl2,* no parecía ser un buen canditato implicado en la regulación de la gónada femenina se decidió amplificar otros genes propuestos como implicados en la diferenciación ovárica de mamíferos (*wnt4, r-spondina1).* A su vez se eligió el *yy1,* luego del análisis *in silico* de la base de datos del transcriptoma gonadal del esturión del lago (Hale et al 2010). Nuestros resultados son muy preliminares como para discutirlos, sin embargo pudimos amplificar y confirmar la identidad de todos estos genes así como iniciar los estudios de caracterización de los mismos.

7. Conclusiones

1.- Si bien la hipótesis general planteada aún no puede ser descartada, de esta tesis se desprende que el *foxl2a* no parece jugar un papel fundamental en la diferenciación sexual del ovario como está propuesto en peces teleósteos y en otros vertebrados.

2.- Los esturiones de 16 y 18 meses con los cuales se trabajó presentaron un nivel de crecimiento equivalente a animales de crecimiento normal de entre 8 y 9 meses. Queda claro que los animales usados tuvieron un retardo en el crecimiento.

3.- En estas condiciones los animales experimentales se encontraban recién diferenciados con imágenes histológicas similares a las descriptas para esturiones siberianos de 9 meses (Rzepkowska & Ostaszewska, 2013) .El retardo en el crecimiento fue probablemente la causa del retraso en la cinética de diferenciación sexual.

4.- El fragmento de gen que amplificamos Genbank (JN182652) corresponde a *foxl2a* según los estudios de filogenia.

5.- Los esteroides ensayados *in vitro* no afectaron la expresión de *foxl2a* en nuestras condiciones de estudio.

6.-No se pudo amplificar la *cyp19a1a* como se había propuesto.

7.- Se amplificaron otros genes potencialmente femeninos *yy1, wnt4* y *r-spondina1*

8. Bibliografía

Amberg JJ., Goforth R., Stefanavage T., Sepu´lveda MS. 2010. Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*).Fish Physiol Biochem 36:923–932.

Arezo MJ., D'Alessandro S., Papa N., de Sá R., Berois N. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish Austrolebias charrua (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Tissue and Cell 39: 89–98

Auguste A, Chassot AA, Grégoire EP, Renault L, Pannetier M, Treier M, Pailhoux E, Chaboissier MC. 2011. Loss of *R-spondin1* and *Foxl2* amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. Sex Dev. 5(6):304-17.

Biason-Lauber A. 2012. wnt4, rspo1, and foxl2 in Sex Development. Semin Reprod Med 30(05): 387-395.

Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish.Cellular and molecular life sciences 55 910–931.

Baroiller JF,D'Cotta H, Bezault E, Wessels S, Hoerstgen-Schwark G. 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 153:30–38

Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y, Veitia RA. 2004. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation. J. Mol Endocrinol 33:705–715

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.

Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y. 2008. Expression profiling of candidate genes during ovary-to-testis trans-differentiation in rainbow trout masculinized by androgens. Gen Comp Endocrinol 156:369–378.

Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW: 1971. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes.ProcNatlAcad Sci. 68:240-243.

Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedo G, Brunet F, Volff JN, 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.

Barske L & Capel C. 2010. An avian sexual revolution. Nature;Vol 464:171-172.

Bruslé J & Bruslé S. 1983. La gonadogenèse des poisons. Reprod. Nutr.Dévelop. 23:453-491.

Bidwel lCh A & Carlson D M. 1995. Characterization of Vitellogenin from White Sturgeon, *Acipenser transmontanus*. J. Mol. Evol. 41:104-112

Billard R & Lecointre G. 2001.Biology and conservation of sturgeon and paddle fish.Rev Fish Biol Fish 10:355–392.

Brennan J. & Capel B. 2004. One tissue, two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat. Rev. Genet. 5:509–521.

Caburet S, Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, Benayoun BA, Veitia RA. 2012. The transcription factor FOXL2: At the crossroads of ovarian physiology and pathology. Molecular and Cellular Endocrinology 356:55–64.

Carmona R, Domezain A, García-Gallego M, Fernando JAH, Ruiz-Rejón M. 2009. Biology, conservation and sustainable development of sturgeons. Fish &Fisheriees Series 29, Chapter 1. Ed. Springer.

Capel B. & Tanaka M. 2013.Forward to the special issue on sex determination.Developmental Dynamics. Volume 242, Issue 4: 303–399.

Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, et al. 2008. Activation of beta-catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. Hum Mol Genet 17: 1264–1277

Chassot AA., Gregoire EP., Lavery R., Taketo MM., de Rooij DG., Adams I., ChaboissierMCh. 2011. RSPO1/b-Catenin Signaling Pathway Regulates Oogonia Differentiation and Entry into Meiosis in the Mouse Fetal Ovary. PLoS ONE 6(10): e25641.

Chen X., Wei Q., Yang D and 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 H., Zhang Y., Wei W., Liu G., Li X., and Qiu S. 2011. Observations on gonadal development of 7–11 year old Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* cultured in freshwater. J. Appl. Ichthyol. 27:648–650.

Chung Wu G. & Chang Ch. 2009.*wnt4* Is Associated with the Development of Ovarian Tissue in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrusschlegeli*. Biology of reproduction 81: 1073–1082.

Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M, De Baere E, Messiaen I, Cotinot C, Fellous M, Veitia R. 2002. Evolution and expression of *foxl2*.J Med Genet. 39: 916–922.

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

Deng Z, Cao P, Wan M. and Sui G. 2010. Yin Yang 1 A multifaceted protein beyond a transcription factor. Transcription 1:2, 81-84.

Devlin RH. &Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208:191–364.

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.

FAO web site: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Acipenser_baerii/en

Gabe, M. 1968. Techniques Histologiques.Ed.Masson and Cie. Paris.

Geraldo MT., Valente GT., Braz AS., and Martins C. 2013. The discovery of *Foxl2* paralogs in chondrichthyan, coelacanth and tetrapod genomes reveals an ancient duplication in vertebrates. Heredity (Edinb). 111(1):57-65.

Ghafoory S,Breitkopf-Heinlein K, Li Q, Dzieran J, Scholl C, Dooley S &Wölfl S. 2012. A fast and efficient polymerase chain reaction-based method for the preparation of in situ hybridization probes. Histopathology.DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04237.x.

Golebiowski FM, Górecki A, Bonarek P, Kozik MP, Kozik A, and Dziedzicka-Wasylewska. 2012. An investigation of the affinities, specificity and kinetics involved in the interaction between the Yin Yang 1 transcription factor and DNA M. FEBS J.279(17):3147-58.

Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F, Cotinot C. 2004. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. DevDyn 231:859–870.

Grandi G, Giovannini S, and Chicca M. 2007. Gonadogenesis in early developmental stages of *Acipenser naccarii* and influence of estrogen immersion on feminization. J. Appl. Ichthyol. 23: 3–8.

Grandi G. & Chicca M. 2008.Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipensernaccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei).J Morphol.269(10):1238-62.

Grier HJ. & Lo Nostro F. 1999. The teleost germinal epithelium: a unifying concept. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of fish, 233-236.

Griffith GJ, Trask MC, Hiller J, Walentuk M, Pawlak JB, Tremblay KD, and Mager J. 2011. Yin-Yang1 Is Required in the Mammalian Oocyte for Follicle Expansion. Biology of Reproduction 84, 654–663.

Hale M, Jackson J, and JA DeWoody. 2010. Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenserfulvescens*). Genetica 138:745–756

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl.Acids.Symp. Ser. 41:95-98.

Hattori R, Muraia Y, Ouraa M, Masudaa S, Majhia SK, Sakamotoa T, Fernandino J, Somoza GM, Yokotaa M, and Strüssmanna CA. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. PNAS Vol:109, N°8, 2955-2959.

Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y, 2008.Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia,*Oreochromis niloticus*.Biol. Reprod. 78, 333–341.

Jiang W, Yang Y, Zhao D, Liu X, Duan J, Xie S, Zhao H. 2011. Effects of sexual steroids on the expression of *foxl2* in *Gobiocypris rarus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 160 ;187–193.

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 gurubripes* (Fugu). PLoS Genet 8(7): e1002798. doi:10.1371/journal.pgen.1002798.

Keyvanshokooh S. & Gharaei A. 2010.A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. Aquaculture Research, 41, e1-e7.

Koopman P. 1999.Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. Cellular and molecular life sciences 55(6-7): 839-856.

Kobayashi Y, Nagahama Y and Nakamura M. 2013. Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. Sexual Develpment Vol. 7, No. 1-3. DOI:10.1159/00034200.

Kobayashi Y, Horiguchi R, Nozu R, Nakamura M. 2010. Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (*Foxl2*) in the gonads of *protogynous wrasse*, Halichoerestrimaculatus. Biology of Sex Differences 1:3.

Kobayashi T., Matsuda M., Kajiura-Kobayashi H., Suzuki A., Saito N., Nakamoto M. Shibata N & Nagahama Y. 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.*, 231: 518-526.

Kocer A, Pinheiro I, Pannetier M, Renault L, Parma P, Radi O, Kim KA, Camerino G, and Pailhoux E. 2008. R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. BMC Developmental Biology 8:36.

Kunz Y, Luer C, Kapoor BG. 2009. Development of Non-Teleost Fishes. Science Publishers

Kuo FT, Fan K, Bentsi-Barnes I, Barlow GM, Pisarska MD. 2012. Mouse forkhead L2 maintains repression of FSH-dependent genes in the granulosa cell. Reproduction 144(4):485-94.

Lau W, Snel B. and CleversH. 2012. The R-spondin protein family. Genome Biology 2012, 13:242.

Le Menn F, Davail B, Pelissero C, NDiaye P, Bon E, Perazzolo L, Nuñez Rodríguez J, 1999. New aproach to fish oocyte vitellogenesis. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway. International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 6: pp. 27-34.

Lingenfelter B, Dailey R, Inskeep K, Vernon M, Poole D, Rhinehart J, and Yao J. 2007. Changes of Maternal Transcripts in Oocytes From Persistent Follicles in Cattle. Molecular Reproduction and Development 74:265–272.

Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y, Gunnarsson D, Selstam G, Boman K & Liu K. 2007. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. Development 134 199–209.

Loffler KA. **& Koopman P**. 2002. Charting the course of ovarian development in vertebrates. Int J Dev Biol46:503-510.

Lubzens E, YoungG,Bobe J &Cerdà J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. Gen Comp Endocrinol. 165(3):367-89.

Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. and Hou J. 2009. A "FOXO" in sight: targeting Foxo proteins from conception to cancer. Medicinal Research Reviews 29:395–418.

Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, 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, MatsudaM, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Hamaguchi S, and Sakaizumi M. 2012.Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias luzonensis*. Genetics, Vol. 191, 163–170.

Nagahama Y. 2005. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish.Fish PhysiolBiochem 31:105–109.

Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y, Shibata N. 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryziaslatipes*.BiochemBiophys Res Commun 344:353-361.

Nakamoto M, Muramatsu S, Yoshida S, Matsuda M, Nagahama Y. and Shibata N. 2009. Gonadal Sex Differentiation and Expression of *Sox9a2, Dmrt1, and Foxl2* in *Oryzias luzonensis*. Genesis 47:289–299.

Nakamura M., Kobayashi T., Chang T & Nagahama Y. 1998. Gondal Sex Differentiation in Teleost Fish. J. Exp. Zool., 362-372.

Nanda I, Kondo M, Homung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, ShanZ,Haaf T, Shimizu N, ShimaA,Schmid M, andSchartl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11778-11783.

Nelson JS. 2006. Fishes of the world. 4th Edition. John Wiley and Sons, New York.

Nicol B, Guerin A, Fostier A, and Guiguen Y. 2012. Ovary-Predominant wnt4 Expression During Gonadal Differentiation is not Conserved in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Reproduction & Development 79:51–63.

Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G and Schlessinger D. 2005. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. Human Molecular Genetics 14 2053–2062.

Pailhoux E, Vigier B, Schibler L, Cribiue P, Cotinot C, Vaiman D. 2005. Positional cloning of the PIS mutation in goats and its impact on understanding mammalian sex-differentiation.Genet. Sel. Evol. 37 (Suppl. 1) S55–S64.

Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R. and Pailhoux E. 2006. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. Journal of Molecular Endocrinology 36, 399–413

Penman D. & Piferrer F. 2008. Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination. Reviews in Fisheries Science, 16(S1):16–34.

Piferrer F. & Guiguen Y. 2008. Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. Rev. Fish Sci. 16 (S1), 35–55.

Pisarska MD, Barlow G, and Kuo FT. 2011.Minireview: Roles of the Forkhead Transcription Factor FOXL2 in Granulosa Cell Biology and Pathology. Endocrinology 152: 1199–1208.

Rzepkowska 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.

Smith CA, Shoemaker ChM, Roeszler K, Queen J, Crews D, and Sinclair AH. 2009. Cloning and expression of *R-Spondin1* in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. BMC Developmental Biology 8:72**.**

Stocco C, Kwintkiewicz J, and Cai Z. 2007. Identification of regulatory elements in the *Cyp19* proximal promoter in rat luteal cells. Journal of Molecular Endocrinology 39, 211–221

Strüssmann, C. A. & M. Nakamura. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 13-29.

Tang S, Mishra M, Frazier DP, Moore ML, Inoue K, et al. 2012. Positive and Negative Regulation of Prostate Stem Cell Antigen Expression by Yin Yang 1 in Prostate Epithelial Cell Lines.PLoS ONE 7(4): e35570.

Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, InoueA, Oshima T, and Kakitani M. 2008. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating *Wnt-4* signaling. Human Molecular Genetics, Vol. 17, No. 9 1278–1291.

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG. 1998. Multistep signalingrequirements for pituitary organogenesis in vivo, Genes Dev. 12: 1691–1704.

Uhlenhaut NH. & Treier M. 2006. *Foxl2* function in ovarian development. Molecular Genetics and Metabolism 88 225–234. .

Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI et al. 2009. Somatic sex re-programming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. Cell 139:1130–1142.

Vidotto M, Grapputo A, Boscari E, Barbisan F, Coppe A, Grandi G, Kumar A, Congiu L.2013. Transcriptome sequencing and de novo annotation of the critically endangered Adriatic sturgeon.BMC Genomics.;18;14:407. doi: 10.1186/1471-2164-14-407.

Vizziano D,Randuineau G, Baron D, CautyCh, Guiguen Y. 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. DevDyn 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.

Vizziano-Cantonnet D,Anglade I, Pellegrini E, Gueguen M-M, Fostier A, Guiguen Y, Kah O. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the

central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. General and Comparative Endocrinology 170: 346–355

Volff JN., Kondo M., Schartl M. 2003. MedakadmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. Trends in genetics 19(4): 196-199.

Volff J.N. 2005.Genome evolution and biodiversity in teleost fish. Heredity 94 (3): 280-294

Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Nagahama Y. 2004.Molecular cloning and gene expression of *foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.Biochem Biophys Res Commun 320:83–89.

Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K.I, Nagahama Y. 2007. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. Mol. Endocrinol. 21, 712–725.

Wang H, Wu T, Qin F, Wang LH, Wang ZZ. 2012. Molecular cloning of Foxl2 gene and the effects of endocrine-disrupting chemicals on its mRNA level in rare minnow, *Gobiocyprisrarus*. Fish PhysiolBiochem 38:653–664.

Williot P & Brun R. 1998. Aquat. Living Resour 11:111-118

Williot P, Rochard E, Desse-Berset N, Kirschbaum F, Gessner J. 2011. Biology and Conservation of the European Sturgeon*Acipensersturio*. Editorial – Springer Chapter 26: 369-382.

Wrobel KH. 2003. The genus *Acipenser* as a model for vertebrate urogenital development: the müllerian duct. Anat Embryol (Berl). Mar;206(4):255-71.

Yamamoto T. 1969. Sex differentiation. En: Hoar, W., Randall, D. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, pp. 117–175.

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

Yao HHC. 2005. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. Mo lCel Endocrinol 230:87-93.

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopuslaevis*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 105(7): 2469-2474.

Yue H, Ye H, Chen X, Cao H and Li C.2013. Molecular cloning of cDNA of gonadotropin-releasing hormones in the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and the effect of 17β-estradiol on gene expression. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2013 166(4):529-537.

Zhang J. 2004. Evolution of DMY, a newly emergent male sex-determination gene of medaka fish. Genetics 166(4): 1887-1895.

Zhou L, Charkraborty T, Yu X, Wu L, Liu G, Mohapatra S, Wang D and Nagahama Y. 2012. *R-spondins* are involved in the ovarian differentiation in a teleost, medaka (*Oryziaslatipes*) BMC Developmental Biology 12:36

Zhu W, Olson S, and Garbán HJ. 2011.Transcription Regulator *Yin-Yang 1*: From Silence to Cancer. Critical Review in Oncogenesis, 16(3-4), 227–238.