



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**“MORFOGÉNESIS GONADAL Y EXPRESIÓN DE
GENES (Sox9, Foxl2 y Vasa) DURANTE LA
DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE *Chapalichthys
encaustus* (Teleostei: Goodeidae)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

SANDRA MILENA GUERRERO ESTÉVEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO
MENDOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GUERRERO ESTEVEZ SANDRA MILENA** con número de cuenta **501474029** con la tesis titulada "**MORFOGENESIS GONADAL Y EXPRESION DE GENES (Sox9, Foxl2 y Vasa) DURANTE LA DIFERENCIACION SEXUAL DE *Chapalichthys encaustus* (Teleostei: Goodeidae)**", realizada bajo la dirección de la **Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza**:

Presidente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Vocal: DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR
Secretario: DRA. MARICELA VILLAGRAN SANTA CRUZ
Suplente: DR. LUIS ZAMBRANO GONZALEZ
Suplente: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de Junio de 2012.

María del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT por la beca otorgada durante el periodo 2007-I a 2010-2.

Al CONACyT por el apoyo al proyecto SEP-CONACYT (Sol.81269)

A DGAPA- PAPIIT, UNAM, No. IN205011

A los miembros del Comité Tutor:

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Dr. Abraham Landa Piedra

AGRADECIMIENTOS

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza por la dirección, asesoría y sugerencias para poder llevar a cabo satisfactoriamente el presente trabajo de tesis.

M. en C. Esmeralda Lira Romero por su gran apoyo técnico durante la realización de este proyecto. Especialmente en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Dr. Omar Domínguez-Domínguez de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por su gran apoyo en la colecta e identificación de ejemplares de *Chapalichthys encaustus*.

M. en C. María Estela Pérez Cruz, directora del Acuario de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su apoyo con el mantenimiento y reproducción de los individuos de *C. encaustus* durante todo el tiempo de la realización del trabajo.

M. en C. Ignacio Morales Salina del Acuario de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su gran apoyo en el cuidado, alimentación y reproducción de individuos de *C. encaustus* durante el tiempo de realización del proyecto de tesis.

M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por su apoyo técnico en la microscopía electrónica.

Dra. Nivia Rocio Antonio Rubio por su asesoría en la realización de las técnicas de Biología molecular.

María Elena Vega Ramírez por su gran amistad y apoyo incondicional durante mis estudios de doctorado.

A mis compañeros de laboratorio Alma, Rocío, Esme, Lupita, Israel y Selene, por su apoyo, amistad y bellos momentos:

A Leonardo

Fuente de motivación permanente en mi vida.

A Erving J.

Compañero incondicional en mi camino

ÍNDICE

	Pág.
Lista de figuras y cuadros	I
Resumen	III
Abstract	IV
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
1. Diferenciación sexual en vertebrados	3
2. Diferenciación sexual en peces teleósteos	5
2.1 Células germinales primordiales	5
2.2 Patrones de diferenciación sexual	5
2.3 Diferenciación sexual gonadal	6
3. Genes relacionados con el desarrollo de la línea germinal	8
4. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en vertebrados	9
5. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en peces teleósteos	18
6. <i>Chapalichthys encaustus</i>	26
III. Justificación	27
IV. Hipótesis	28
V. Objetivos	28
VI. Metodología	29
1. Colecta y mantenimiento de individuos	29
2. Obtención de las muestras	29
3. Microscopía de campo claro y electrónica	31
4. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	31
5. Extracción de ARN total	34
6. Tratamiento del ARN total con DNasa I	35
7. Transcripción inversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	35
8. Electroforesis	37
9. Purificación y secuenciación	37
VII. Resultados	38
1. Morfogénesis gonadal y diferenciación sexual	38
1.1 Gónada indiferenciada	38

1.2	Gónada en diferenciación	41
1.3	Gónada diferenciada	44
2.	Detección de proteínas	47
2.1	Sox9	47
2.2	Foxl2	49
2.3	Vasa	50
3.	Determinación de transcritos	53
VIII.	Discusión	59
1.	Diferenciación sexual morfológica	59
2.	Expresión de genes	65
IX.	Conclusiones	72
X.	Bibliografía	73
XI.	Anexos	88
1.	Secuencias obtenidas para los genes <i>sox9</i> y <i>vasa</i>	88
2.	Artículo 1	
3.	Artículo 2	

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1.	Hembra gestante y embriones de <i>Chapalichthys encaustus</i>	30
Figura 2.	Primordio gonadal de <i>Chapalichthys encaustus</i> (E2)	39
Figura 3.	Establecimiento de la gónada indiferenciada en <i>Chapalichthys encaustus</i> (E3)	40
Figura 4.	Gónada en diferenciación de <i>Chapalichthys encaustus</i> (E4)	42
Figura 5.	Gónada en diferenciación de <i>Chapalichthys encaustus</i> (E5)	43
Figura 6.	Gónada diferenciada de <i>Chapalichthys encaustus</i> : ovario	45
Figura 7.	Gónada diferenciada de <i>Chapalichthys encaustus</i> : testículo	46
Figura 8.	Detección de la proteína Sox9 en la gónada indiferenciada y en diferenciación de <i>Chapalichthys encaustus</i>	47
Figura 9.	Detección de la proteína Sox9 en la gónada diferenciada de <i>Chapalichthys encaustus</i>	48
Figura 10.	Detección de la proteína Foxl2 en la gónada en diferenciación y diferenciada de <i>Chapalichthys encaustus</i>	49
Figura 11.	Detección de la proteína Vasa en la gónada indiferenciada y en diferenciación de <i>Chapalichthys encaustus</i>	51
Figura 12.	Detección de la proteína Vasa en la gónada diferenciada de <i>Chapalichthys encaustus</i>	52
Figura 13.	Prueba de integridad de ARN total	53
Figura 14.	Expresión del gen <i>sox9</i>	54
Figura 15.	Expresión del gen <i>foxl2</i>	55
Figura 16.	Expresión del gen <i>vasa</i>	56
Cuadro 1.	Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en vertebrados	17
Cuadro 2.	Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en peces teleósteos	25
Cuadro 3.	Características morfológicas de individuos en diferentes estadios de desarrollo	30

Cuadro 4. Anticuerpos primarios empleados para la localización de las proteínas Sox9, Foxl2 y Vasa por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	32
Cuadro 5. Anticuerpos secundarios empleados para la localización de las proteínas Sox9, Foxl2 y Vasa por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	33
Cuadro 6. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes <i>sox9</i> , <i>foxl2</i> , <i>vasa</i> y β - <i>actina</i> por RT-PCR	36
Cuadro 7. Porcentaje de similitud entre la secuencia de <i>foxl2</i> de <i>Chapalichthys encaustus</i> y de otros peces teleósteos	58

RESUMEN

Los peces teleósteos agrupan un gran número de especies que exhiben diversidad en los mecanismos de determinación del sexo y en los patrones de diferenciación sexual. Sin embargo, el estudio de estos procesos se ha enfocado en especies ovíparas, con escasos reportes en especies vivíparas. En este trabajo se describen las características estructurales y ultraestructurales del desarrollo gonadal temprano y la expresión de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* durante la diferenciación sexual del pez vivíparo *Chapalichthys encaustus*, perteneciente a la subfamilia Goodeinae la cual es endémica de México. Se anestesiaron y sacrificaron hembras y machos adultos. Se obtuvieron embriones que se clasificaron en seis estadios de desarrollo. Los tejidos se procesaron para microscopía de luz y electrónica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y RT-PCR. Durante el estadio 2 se forman los primordios gonadales que se localizan sobre el epitelio celómico y están conformados por células germinales y somáticas. Para el estadio 3, la gónada indiferenciada está suspendida del mesenterio de la vejiga natatoria y contiene un mayor número de células germinales y somáticas. En los estadios 4 y 5 la gónada está en proceso de diferenciación y contiene grupos de células germinales meióticas y no meióticas (indiferenciadas), ambos rodeados por células somáticas. En el estadio 6 y al momento del nacimiento, la gónada está morfológicamente diferenciada en un ovario o en un testículo. La diferenciación ovárica se determinó por la presencia de folículos con ovocitos meióticos y la diferenciación testicular por el desarrollo de los lóbulos testiculares. Las células germinales son de forma redondeada a ovalada y contienen “nuage”, un material electrodensito asociado con mitocondrias; su núcleo es grande y posee de uno a dos nucléolos. La proteína Vasa se localizó en las células germinales en todos los estadios de desarrollo embrionario. La proteína Sox9 se detectó en las células germinales y somáticas de la gónada indiferenciada y en diferenciación. En el ovario Sox9 se observó en los ovocitos en desarrollo, y en el testículo en las células somáticas que corresponden a células de Sertoli. La proteína Foxl2 no se detectó en la gónada indiferenciada, mientras que en la gónada en diferenciación se observó en las células germinales y en algunas células somáticas. En la gónada diferenciada, la proteína Foxl2 se detectó solamente en el ovario, específicamente en los ovocitos en desarrollo y en células somáticas que corresponden a células foliculares. Los transcritos de *sox9* y *vasa* se detectaron en el ovario y testículo adultos, mientras que los de *foxl2* exclusivamente en el ovario, presentando un patrón sexualmente dimórfico. La secuencia de *foxl2* de *C. encaustus* tiene un alto porcentaje de similitud con la de otras especies de teleósteos. *Chapalichthys encaustus* puede ser empleado como modelo para el estudio de la diferenciación sexual en peces vivíparos y en teleósteos en general.

ABSTRACT

Teleost fish consist of a large number of species which exhibit diversity in terms of mechanisms for sexual determination and patterns of sexual differentiation. However, most studies focusing on cellular and molecular aspects of sexual differentiation have been carried out on oviparous species, with few reports on viviparous species. The present study describes the structural and ultra-structural characteristics of early gonad development and expression of *vasa*, *sox9* and *foxl2* genes during sex differentiation of the viviparous fish *Chapalichthys encaustus*, belonging to the Goodeinae subfamily endemic to Mexico. Adult males and females were anesthetized and sacrificed by decapitation. Embryos were obtained from gestating females and classified into six stages of development. Tissues were processed using the techniques of light and electron microscopy, immunohistochemistry, immunofluorescence and RT-PCR. During stage 2, the gonad primordia are formed, are located on the coelomic epithelium and are composed by somatic and germ cells. By stage 3, the undifferentiated gonad emerges, suspended from the mesentery of the developing swim bladder, and contains a greater number of germ and somatic cells. During stages 4 and 5, the gonad is undergoing differentiation and both meiotic and undifferentiated germ cells clusters, surrounded by somatic cells can be observed. During stage 6 and at birth, the gonad is morphologically differentiated into an ovary or a testis. Ovarian differentiation was determined by the presence of follicles with meiotic oocytes and testicular differentiation because of the presence of developing testicular lobes. Germ cells are relatively large, roundish to oval shaped, containing nuage, an electron-dense material associated with mitochondria. The large nucleus contains one or two nucleoli. Vasa protein was localized in the germ cells at all stages of embryonic development. Sox9 protein was detected in germ and somatic cells of the undifferentiated gonad, as well as in the differentiating gonad. Sox9 protein was observed in developing oocytes in the ovary, and in the somatic cells corresponding to Sertoli cells in the testis. Foxl2 protein was not detected in the undifferentiated gonad, whereas in the differentiating gonad, it was observed in the germ cells and in some somatic cells. In the differentiated gonad, Foxl2 protein was detected only in the ovary, specifically in developing oocytes and in somatic cells corresponding to follicular cells. By means of RT-PCR, *sox9* and *vasa* genes were detected in adult ovaries and testicles, while the *foxl2* gene was detected only in ovaries, showing a dimorphic sex pattern. The sequence of *foxl2* of *C. encaustus* shows a high similarity with the sequence from several teleosts species. *Chapalichthys encaustus* may be used as a model to study the process of sex differentiation in viviparous teleosts fish and in teleosts as a whole.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de los procesos de determinación y diferenciación sexual constituye un aspecto esencial de la biología reproductora de los organismos. De acuerdo con Hayes (1998), la determinación sexual puede definirse como el proceso genético o ambiental que influye en la definición del sexo, es decir, al evento que compromete a una gónada bipotencial a diferenciarse como un ovario o como un testículo. Por su parte, la diferenciación sexual gonadal hace referencia al proceso de desarrollo gonadal una vez que el sexo se ha determinado, esto es, si la gónada indiferenciada bipotencial sigue el camino de diferenciación ovárica o testicular.

En los vertebrados, la determinación del sexo puede llevarse a cabo por un mecanismo genético o ambiental (Bull, 1980; Devlin y Nagahama, 2002). En general, la determinación genética del sexo está asociada a la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos, como es el caso de los sistemas XX/XY en mamíferos y ZZ/ZW en aves y algunos reptiles (Bull, 1985; Koopman, 2001; Smith y Sinclair, 2004). En la determinación del sexo por factores ambientales, uno de los principales factores involucrados es la temperatura, lo cual se ha reportado ampliamente en reptiles (Bull, 1985; Crews, 1996; Pieau *et al.*, 2001). Durante la diferenciación sexual gonadal de los vertebrados, entre los principales procesos celulares que ocurren se incluyen la diferenciación, migración, proliferación, comunicación y los eventos de señalización que los controlan (Koopman, 2001). En vertebrados, los mecanismos que conducen a la morfogénesis gonadal son procesos diversos y al parecer no están totalmente conservados evolutivamente; sin embargo, la estructura y función del ovario y del testículo adultos es similar en los diferentes grupos (De Falco y Capel, 2009).

El grupo de peces teleósteos está representado por cerca de 24,000 especies distribuidas en una gran variedad de hábitats alrededor del mundo (Nelson, 1994), y las cuales exhiben diversidad en los mecanismos de determinación y diferenciación sexual (Devlin y Nagahama, 2002; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010). En muchas especies la determinación del sexo ocurre por factores genéticos, mientras que en otras existe una fuerte influencia de factores ambientales como la temperatura, el pH y factores sociales (Baroiller *et al.*, 1999; Munday *et al.*, 2006; Godwin, 2009). Aunque en la mayoría de peces teleósteos no se han descrito cromosomas sexuales heteromórficos, las especies que los presentan exhiben los sistemas XX/XY, ZZ/ZW o variantes de estos (Yamamoto, 1969; Baroiller *et al.*, 1999; Volf y Scharlt, 2001; Scharlt, 2004). De igual forma, los patrones de diferenciación sexual gonadal en teleósteos son ampliamente diversos, incluyendo especies hermafroditas y gonocoristas. Las

especies hermafroditas pueden ser sincrónicas o secuenciales, dependiendo de sí los gametos masculinos y femeninos son liberados simultánea o periódicamente (Yamamoto, 1969; Shapiro, 1990). Por su parte, las especies gonocoristas pueden clasificarse en primarias o secundarias, tomando en cuenta sí la gónada indiferenciada se desarrolla directamente en una gónada femenina o masculina, o sí pasa por un estado hermafrodita inicial (Yamamoto, 1969; Devlin y Nagahama, 2002).

Los procesos de determinación y diferenciación sexual en los vertebrados están controlados por una compleja cascada de interacciones entre genes (Park y Jameson, 2005; Wilhelm *et al.*, 2007). La mayor parte de los eventos moleculares involucrados en estos procesos se han estudiado ampliamente en mamíferos. En los últimos años, muchos de los genes que participan en las vías de determinación y diferenciación sexual en mamíferos, se han caracterizado en otros vertebrados, incluyendo especies de teleósteos como el pez cebra y medaka (Johnston *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999a; Koopman, 2001; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010). En general, la estructura de la mayoría de estos genes está conservada y en cuanto a su función, se han propuesto tanto funciones conservadas como divergentes (Devlin y Nagahama, 2002; Von Hofsten y Olsson, 2005).

Chapalichthys encaustus, la especie de interés de este estudio, es un pez vivíparo perteneciente a la familia Goodeidae. Esta familia de peces dulceacuícolas está dividida en dos subfamilias: Empetrichthyinae, distribuida en el suroeste de Estados Unidos y de modo reproductor ovíparo, y Goodeinae compuesta por 40 especies vivíparas matrotónicas que se distribuyen a lo largo de la Mesa Central Mexicana (Álvarez del Villar, 1970; Webb *et al.*, 2004). La subfamilia Goodeinae presenta características reproductoras de gran interés como son: **1.** Dimorfismo sexual, evidenciado por la formación del andropodio que funciona en la transferencia del espermatozoides (Meyer y Lydeard, 1993), **2.** Fertilización intrafolicular, **3.** Gestación intraluminal; el desarrollo embrionario tiene lugar en el lumen ovárico (Wourms *et al.*, 1988), **4.** Patrón nutricional matrotónico, el embrión recibe nutrientes a través de la placenta trofoténica, conformada por la asociación de la trofotenia (estructuras derivadas del intestino posterior embrionario) con el epitelio ovárico luminal (Lombardi y Wourms, 1985; Schindler y Hamlett, 1993; Wourms, 2005), y **5.** Fusión de los primordios gonadales durante el desarrollo embrionario, lo cual forma una gónada impar, similar a lo reportado en otros teleósteos vivíparos y a diferencia de los teleósteos ovíparos y de los otros grupos de vertebrados (Wourms, 1981).

II. ANTECEDENTES

1. Diferenciación sexual en vertebrados

En todos los vertebrados, los testículos y los ovarios se desarrollan a partir de la gónada embrionaria, la cual se deriva del mesodermo intermedio e inicia su desarrollo como un engrosamiento del epitelio que reviste la cavidad celómica, justo debajo del mesonefros (Wilhelm *et al.*, 2007). Esta cresta gonadal es colonizada por las células germinales primordiales (CGPs), las cuales son de origen extragonadal y migran por diferentes vías para llegar a la gónada en desarrollo: por el mesenterio dorsal del intestino en mamíferos y a través del torrente sanguíneo en aves (Tsunekawa *et al.*, 2000; Molyneaux y Wylie, 2004). El primordio gonadal está conformado por las CGPs y células somáticas, es un órgano bipotencial, es morfológicamente similar en machos y hembras, y en algún momento durante su desarrollo se lleva a cabo una decisión para diferenciarse como un testículo o un ovario; este último evento es referido como determinación sexual primaria (Hayes, 1998; De Falco y Capel, 2009). Una vez ocurrida la determinación sexual primaria, la producción de hormonas por parte de las gónadas influencia la diferenciación de características sexuales secundarias como el desarrollo de los conductos sexuales internos, los genitales externos y otros rasgos sexualmente dimórficos como la pigmentación y la talla del cuerpo (Wilhelm *et al.*, 2007). En general, tanto la estructura como la función del ovario y del testículo adultos son similares en los diferentes grupos de vertebrados (Koopman, 2001; De Falco y Capel, 2009). El testículo está organizado en cordones testiculares en los cuales las células somáticas rodean grupos de células germinales que se diferencian para producir espermatozoides maduros; las células esteroideogénicas se localizan por fuera de los cordones testiculares y producen testosterona (Park y Jameson, 2005). En los ovarios, los ovocitos se desarrollan en la corteza y están rodeados por células de la granulosa y células esteroideogénicas de la teca (De Falco y Capel, 2009).

En mamíferos el modelo más estudiado ha sido el ratón (Wilhelm *et al.*, 2007). La diferenciación sexual inicia cuando el gen *Sry* se expresa en un grupo de células somáticas de las gónadas XY (Koopman *et al.*, 1990). Estas células se diferencian en células de Sertoli, un linaje que se asocia con la línea germinal a través de todo el desarrollo testicular y que actúa como organizador de otros linajes celulares como las células esteroideogénicas (Koopman, 2001; De Falco y Capel, 2009). Las células de Sertoli y las células germinales se asocian para formar cordones testiculares rodeados por una lámina basal, los cuales son los precursores de los

túbulos seminíferos y dentro de los cuales, las células germinales precursoras de las espermatogonias entran en arresto mitótico (Wilhelm *et al.*, 2007). Un grupo de células intersticiales inician su desarrollo como células de Leydig, las cuales secretan hormonas que virilizan a los embriones XY (De Falco y Capel, 2009). Durante la diferenciación ovárica, las células germinales de las gónadas XX inician la meiosis en etapas embrionarias y la foliculogénesis ocurre en las etapas perinatales; cada célula germinal está rodeada por una capa de células somáticas, formando los folículos primordiales (Wilhelm *et al.*, 2007; De Falco y Capel, 2009).

En aves el primordio gonadal está constituido por dos compartimentos básicos: la corteza, derivada de la proliferación del epitelio celómico, y la médula, formada por cordones sexuales entremezclados con células mesenquimáticas (Smith y Sinclair, 2004). Durante el desarrollo gonadal, en las gónadas ZZ, las CGPs se asocian con las células somáticas precursoras de Sertoli y forman los cordones medulares, los precursores de los cordones seminíferos; mientras que la región cortical entra en regresión. En los embriones ZW, las células germinales permanecen en la región cortical, donde inician la meiosis y posteriormente forman los folículos ováricos; la región medular forma el sistema lacunar. En las hembras ocurre un desarrollo asimétrico de los ovarios, el ovario izquierdo se constituye como la gónada funcional, mientras que el ovario derecho entra en regresión (Smith y Sinclair, 2004; De Falco y Capel, 2009).

En la gónada bipotencial de reptiles se forman los cordones sexuales primitivos en ambos sexos, los cuales son continuos con el epitelio celómico. Durante la diferenciación sexual de embriones incubados a temperatura feminizante (TF), las células germinales permanecen en la región cortical de la gónada; mientras que los cordones sexuales entran en regresión y forman lagunas en la región medular (De Falco y Capel, 2009). Por otra parte, a temperatura masculinizante (TM), los cordones sexuales medulares contienen células germinales y células de Sertoli y se desarrollan en cordones testiculares (Yao *et al.*, 2004). En la mayoría de anfibios el mecanismo de determinación sexual parece ser genético y en algunas especies se han descrito cromosomas sexuales, con los sistemas XX/XY y ZZ/ZW (Mikamo y Witschi, 1964). La gónada bipotencial está conformada por una región cortical y una región medular. En las hembras se desarrolla la región cortical y la región medular degenera formando una cavidad; mientras que en los machos la región medular se desarrolla y la región cortical entra en regresión (Hayes, 1998). La diferenciación sexual en este grupo de vertebrados puede ser alterada por el tratamiento con hormonas esteroideas exógenas (Hayes, 1998).

2. Diferenciación sexual en peces teleósteos

Los peces teleósteos son un grupo diverso en cuanto al proceso de diferenciación sexual. Las características histológicas y ultraestructurales del desarrollo gonadal temprano se han estudiado principalmente en especies ovíparas como medaka (*Oryzias latipes*, Hamaguchi, 1982; Shinomiya *et al.*, 2002), *Cichlasoma dimerus* (Meijide *et al.*, 2005), pez cebra (*Danio rerio*, Von Hofsten y Olsson, 2005) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, Vizziano *et al.*, 2007); mientras que en especies vivíparas son pocos los estudios reportados, principalmente en *Gambusia affinis* de la familia Poeciliidae (Koya *et al.*, 2003) y *Zoarcetes viviparus* de la familia Zoarcidae (Rasmussen *et al.*, 2006). La descripción histológica detallada del proceso de morfogénesis gonadal es de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos de diferenciación sexual en peces y en vertebrados en general.

2.1 Células Germinales Primordiales

En peces teleósteos, las células germinales primordiales (CGPs), al igual que en otros vertebrados, son de origen extraembrionario y migran para colonizar las crestas gonadales (Patiño y Takashima, 1995; Raz, 2004). Estas células dan origen a las espermatogonias y a las ovogonias. En el pez cebra, las CGPs se pueden observar por microscopía óptica entre el mesodermo lateral y el saco vitelino alrededor de los nueve días después de la fertilización. En esta especie, las CGPs migran a través de diferentes tejidos blanco intermedios en el embrión, entre los que se encuentran el mesenterio dorsal y después a lo largo de la pared del peritoneo, para finalmente posicionarse justo debajo de los conductos mesonéfricos en desarrollo (Braat *et al.*, 1999; Weidinger *et al.*, 1999; Molyneaux y Wylie, 2004).

Las CGPs de peces teleósteos tienen rasgos morfológicos similares a las de otros vertebrados como son: tamaño relativamente grande, forma ovalada a redondeada, núcleo grande con cromatina finamente granular y de uno a dos nucléolos prominentes, y citoplasma con escasos organelos y mitocondrias con crestas tubulares (Flores y Burns, 1993; Patiño y Takashima, 1995; Meijide *et al.*, 2005).

2.2 Patrones de diferenciación sexual

En peces teleósteos se ha descrito una gran variedad de patrones de diferenciación sexual gonadal que incluye desde especies gonocoristas hasta especies hermafroditas, pasando por

especies con características intermedias (Yamamoto, 1969; Ross, 1990; Shapiro, 1990). Las especies gonocoristas, dentro de las cuales se encuentran la mayor parte de las especies descritas, pueden ser primarias o secundarias. La mayoría de especies gonocoristas son primarias, denominadas también diferenciadas debido a que la gónada indiferenciada bipotencial se desarrolla directamente como un ovario o un testículo, y los individuos mantienen ese sexo durante toda su vida (Yamamoto, 1969; Devlin y Nagahama, 2002), como es el caso del pez ovíparo medaka y del pez vivíparo *Z. viviparus* (Hamaguchi, 1982; Rasmussen *et al.*, 2006).

En las especies gonocoristas secundarias o indiferenciadas, todos los individuos desarrollan inicialmente una gónada similar a un ovario y posteriormente cerca de la mitad de estas gónadas se diferencian como testículos. Este fenómeno se denomina hermafroditismo juvenil y se ha reportado en especies ovíparas como el pez cebra (Maack y Segner, 2003) y en especies vivíparas como *G. affinis* (Koya *et al.*, 2003).

Por otra parte, el hermafroditismo ocurre de manera natural en los peces teleósteos (Shapiro, 1990). Las especies hermafroditas pueden ser simultáneas o secuenciales. En las primeras, los individuos poseen tejido testicular y ovárico funcional de manera simultánea, por lo cual también se denominan sincrónicas como ocurre en *Serranus atricauda* (Ross, 1990; Devlin y Nagahama, 2002). En las segundas, algunas especies pueden madurar inicialmente como machos, denominadas protándricas como el pez payaso *Amphiprion ocellaris* (Devlin y Nagahama, 2002), o como hembras, referidas como especies protogínicas, como es el caso de *Thalassoma bifasciatum* (Munday *et al.*, 2006).

2.3 Diferenciación sexual gonadal

La diferenciación sexual gonadal involucra cambios en los diferentes tipos celulares que conforman la gónada en desarrollo. Así, se evidencian cambios en la línea germinal que incluyen la proliferación mediante mitosis, así como la meiosis. De igual forma, en el componente somático se observan cambios que involucran proliferación, diferenciación morfológica y su disposición dentro de la gónada (Rasmussen *et al.*, 2006). Las células germinales interactúan con las células somáticas durante el proceso de desarrollo gonadal, para llevar a cabo la formación de una gónada femenina o masculina (Nakamura *et al.*, 1998). Estudios realizados en medaka y el pez cebra han demostrado que las células germinales son

esenciales para el dimorfismo sexual de las gónadas (Shinomiya *et al.*, 2001; Kurokawa *et al.*, 2007; Siegfried y Nüsslein-Volhard, 2008).

Gónada indiferenciada

En general, las crestas gonadales de los peces teleósteos se forman en sus sitios presuntivos sólo después de la llegada de las CGPs, las cuales incrementan en número mediante mitosis (Nakamura *et al.*, 1998). Una vez establecida, la gónada indiferenciada bipotencial, compuesta por CGPs y células somáticas, va a iniciar el proceso de diferenciación hacia un ovario o un testículo (Devlin y Nagahama, 2002). Actualmente, se acepta que el componente somático de las crestas gonadales de los teleósteos es de origen unitario, a partir de la corteza o pared peritoneal, de manera que en la gónada temprana no hay un equivalente a una médula derivada del blastema interrenal o mesonéfrico, como en otros vertebrados (Hoar, 1969; Nakamura y Takahashi, 1973; Patiño y Takashima, 1995; Devlin y Nagahama, 2002).

Diferenciación ovárica

En la mayoría de peces teleósteos, la diferenciación ovárica se detecta por la proliferación de las células somáticas y de las ovogonias, la diferenciación de ovocitos tempranos y la formación de una cavidad ovárica (Nakamura *et al.*, 1998; Devlin y Nagahama, 2002). La presencia de algunas células germinales meióticas en los ovarios presuntivos es uno de los rasgos que marcan el inicio de la diferenciación ovárica (Patiño y Takashima, 1995). Se ha observado que la cantidad de células germinales es mayor en las gónadas destinadas a la vía ovárica que a la vía testicular, de manera que un incremento en el número de células germinales puede ser uno de los primeros signos de diferenciación ovárica, incluso previo al inicio de la meiosis (Nakamura *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008).

Durante la formación de una gónada femenina, las células somáticas y germinales empiezan a diferenciarse para formar los folículos, compuestos por ovocitos y una capa de células de la granulosa, rodeados por una capa externa de células de la teca (Grier, 2000). Estudios experimentales realizados en gónadas que carecen de células germinales, han demostrado que en las hembras la diferenciación de las células de la granulosa depende del ovocito en desarrollo (Shinomiya *et al.*, 2001).

Por otra parte, el ovario de los peces teleósteos es de tipo cistovárico, es decir, posee una cavidad interna, de manera que la formación de una cavidad también es un indicador de diferenciación hacia la vía femenina (Hoar, 1969; Nakamura *et al.*, 1998). En algunas especies

como la carpa *Carassius auratus* y la tilapia *Oreochromis mossambicus*, el inicio de la formación de la cavidad ovárica coincide con la aparición de células germinales meióticas; mientras que en otras como la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* ocurre antes del inicio de la meiosis (Nakamura y Nagahama, 1989; Nakamura *et al.*, 1998).

Diferenciación testicular

Los testículos permanecen histológicamente indiferenciados por más tiempo que los ovarios y la diferenciación del componente somático precede a la meiosis (Patiño y Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998). Las células germinales permanecen quiescentes por un período prolongado y en la mayoría de especies estudiadas, la espermatogénesis inicia mucho tiempo después de la eclosión (Nakamura y Nagahama, 1989; Matsuda, 2005). Entre los criterios que indican diferenciación testicular en teleósteos se encuentran la formación de los conductos eferentes, la presencia de vasos sanguíneos en la región estromática y la aparición de lóbulos testiculares en desarrollo (Nakamura *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 2006). En el pez medaka, se ha observado que las células de soporte (células de Sertoli) en el macho inician la diferenciación sexual independiente del sexo genético de la célula germinal (Shinomiya *et al.*, 2001).

3. Genes relacionados con el desarrollo de la línea germinal

Vasa

Vasa es un gen que codifica para una helicasa de ARN perteneciente a la familia de proteínas que comparten la caja DEAD (Liang *et al.*, 1994), el cual es importante en el desarrollo de la línea germinal y se expresa específicamente en las células germinales, por lo cual ha sido empleado como marcador de la línea germinal en invertebrados y vertebrados (Molyneaux y Wylie, 2004).

En diferentes especies de teleósteos se han aislado homólogos del gen *vasa* como en el pez cebra (Yoon *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 1997), la trucha arcoíris (Yoshizaki *et al.*, 2000), medaka (Shinomiya *et al.*, 2000) y la tilapia del Nilo (Kobayashi *et al.*, 2002). Empleando este gen como marcador, las CGPs se han detectado durante su formación, migración, colonización de la gónada, la diferenciación sexual gonadal, y en gónadas de peces teleósteos adultos (Shinomiya *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2008; Blázquez *et al.*, 2011). En embriones de

pez cebra, las CGPs marcadas con *vasa* se detectan en el área ventral, entre la tercera y quinta somita (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Von Hofsten y Olsson, 2005). En embriones de medaka, las CGPs positivas a *vasa* se han identificado durante la gastrulación (Shinomiya *et al.*, 2000); en esta especie se han descrito cambios en la localización espacial y temporal de la proteína Vasa durante la diferenciación sexual (Aoki *et al.*, 2008). Por otra parte, mediante el empleo de ejemplares transgénicos de trucha arcoíris y de medaka, se ha confirmado que en los teleósteos la expresión del gen *vasa* es específica de la línea germinal (Yoshizaki *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2001).

La especificación de las CGPs en peces teleósteos se lleva a cabo por componentes citoplasmáticos, los cuales son heredados maternamente y en su conjunto se denominan plasma germinal (Braat *et al.*, 1999; Knaut *et al.*, 2000; Herpin *et al.*, 2007). *Vasa* es uno de los componentes del plasma germinal y una función propuesta para este gen es la diferenciación de las CGPs (Knaut *et al.*, 2000; Shinomiya *et al.*, 2000). En medaka se ha demostrado que *vasa* se requiere para la adecuada migración de las CGPs, pero no para su proliferación, identidad y supervivencia (Li *et al.*, 2009).

Nanos

Nanos es un gen que codifica para una proteína de unión a al ARN, es esencial para la formación de la línea germinal en invertebrados y vertebrados y funciona impidiendo la mitosis y la transcripción durante el desarrollo de las células germinales (Draper *et al.*, 2007). En *Drosophila*, las células polares que carecen de *nanos* son incapaces de desarrollarse como células germinales funcionales (Kobayashi *et al.* 2005).

En peces teleósteos como el pez cebra y medaka, el gen *nanos* se detecta en la línea germinal desde etapas muy tempranas de su desarrollo, y al igual que el gen *vasa*, es un componente del plasma germinal (Kopranner *et al.*, 2001). En medaka se han reportado cambios en la localización de la proteína Nanos durante el desarrollo de la línea germinal (Aoki *et al.*, 2008).

4. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en vertebrados

Los procesos de determinación y diferenciación sexual en vertebrados están controlados por la interacción de genes localizados tanto en los cromosomas sexuales como autosómicos (Parker *et al.*, 1999). En mamíferos, el mecanismo de diferenciación de la gónada se ha

estudiado extensivamente en el ratón, en el cual se han identificado y caracterizado varios genes involucrados en la determinación sexual (*Sry*), en el establecimiento de la cresta genital (*Wt1* y *Sf-1*), y en la diferenciación testicular (*Sox9*, *Dmrt1* y *Mis*) y ovárica (*Foxl2*, *Dax1* y *Wnt4*) (Park y Jameson, 2005; Wilhelm *et al.*, 2007). Una gran parte de los genes que participan en la determinación y diferenciación sexual en mamíferos tienen ortólogos en otros vertebrados (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1999).

➤ Genes en la determinación sexual

El gen *Sry* (región determinante de sexo en el cromosoma Y) se localiza en el brazo corto del cromosoma Y de mamíferos (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990) y se caracteriza por tener un dominio de unión al ADN denominado HMG. Este gen codifica para un factor de transcripción, cuya función es desencadenar eventos celulares necesarios para la diferenciación testicular; *Sry* se expresa en la cresta urogenital de embriones XY, específicamente en las células somáticas de soporte (pre-Sertoli) (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990). En vertebrados no mamíferos, no se han detectado homólogos del gen *Sry* y la ocurrencia de un gen determinante del sexo sólo se ha descrito específicamente en el pez medaka, en el cual el gen *dmy*, un derivado del gen *dmrt1*, cumple esta función (Matsuda *et al.*, 2002). En aves se ha propuesto que el gen *Dmrt1* puede actuar como un determinante del sexo (Nanda *et al.*, 1999).

➤ Genes involucrados en la formación del primordio urogenital

Wt1

El gen *Wt1* (gen supresor del tumor de Wilms 1) codifica para un factor de transcripción con cuatro dominios de dedos de Zinc, el cual es crítico para el desarrollo del sistema urogenital en vertebrados (Larsson *et al.*, 1995). Su patrón de expresión y función en el desarrollo del sistema urogenital está conservado en los vertebrados (Kent *et al.*, 1995). En el ratón, *Wt1* se expresa en la cresta urogenital en ambos sexos y se mantiene en el testículo (Wilhelm y Englert, 2002). Los individuos mutantes para *Wt1* carecen de riñones y gónadas, debido que aunque se forma un primordio gonadal, este degenera por apoptosis (Wagner *et al.*, 2003).

A diferencia de lo reportado en mamíferos, en aves, el patrón de expresión de *Wt1* es similar en el ovario y en el testículo antes y después de la diferenciación sexual gonadal (Smith *et al.*,

1999a). En reptiles como la tortuga *Trachemys scripta* y en cocodrilos la expresión de *Wt1* es similar en el sistema urogenital de embriones incubados a TM y TF (Spotila *et al.*, 1998; Western *et al.*, 2000). En anfibios, en *Rana rugosa* *Wt1* no hay diferencias en los niveles de expresión en la gónada indiferenciada de ambos sexos (Yamamura *et al.*, 2009) y en *Xenopus laevis* se ha descrito su expresión en el testículo y en el pronefros, lo cual se relaciona con una función en el desarrollo del sistema urogenital (Semba *et al.*, 1996).

Sf-1

Sf-1 (gen que codifica para el factor esteroideogénico-1) es un factor de transcripción miembro de los receptores nucleares Ftz-f1 de la superfamilia de NRA51 (Parker *et al.*, 2002). *Sf-1* y genes homólogos a *Sf-1* se expresan en células esteroideogénicas y están ligados a la determinación sexual y al desarrollo de la gónada, así como al desarrollo de las glándulas adrenales en vertebrados. En mamíferos, *Sf-1* se expresa en ambos sexos durante los estadios tempranos del desarrollo gonadal y se relaciona con la formación del primordio gonadal (Luo *et al.*, 1994). Posteriormente, es regulado positivamente en el testículo (Ikeda *et al.*, 1994), donde junto con *Sox9*, *Wt1* y *Gata-4* regulan positivamente la transcripción de la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (Mis) y por lo tanto está involucrado en la vía de determinación sexual masculina (Giuli *et al.*, 1997).

En aves, el patrón de expresión de *Sf-1* es diferente al de mamíferos. Se expresa en las gónadas de ambos sexos antes de la diferenciación gonadal y después es regulado positivamente en las hembras, evento que se relaciona con una función en la actividad esteroideogénica, la cual es mayor en el ovario que en el testículo (Smith *et al.*, 1999a). En reptiles, el patrón de expresión de *Sf-1* difiere entre los distintos grupos. En la tortuga *T. scripta*, *Sf-1* se expresa en los dos sexos antes de la diferenciación sexual gonadal, es decir, en embriones incubados tanto a TM como TF, y posteriormente es regulado positivamente en machos, lo cual coincide con la diferenciación sexual morfológica (Fleming *et al.*, 1999). De manera que se ha propuesto a *Sf-1* como uno de los candidatos potenciales para la determinación sexual por temperatura (TSD) en tortugas (Valenzuela *et al.*, 2006). Por el contrario, en el cocodrilo *Alligator mississippiensis*, la expresión de este gen es mayor a TF (Western *et al.*, 2000); un patrón similar al descrito en aves por Smith y colaboradores (1999a) y que se relaciona con una función reguladora en la producción de estrógenos en el ovario (Western *et al.*, 2000). Estudios realizados en *R. rugosa* y en la rana toro *Rana catesbeiana* indican que *Sf-1* puede tener una función importante en el desarrollo gonadal de anfibios como ocurre en otros vertebrados (Kawano *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2002). En *R. catesbeiana*, la

expresión de la proteína Sf-1 es sexualmente dimórfica; aumenta en el ovario en diferenciación y disminuye en el testículo. Este patrón de expresión es similar al reportado en aves y *A. mississippiensis* y opuesto a lo observado en mamíferos y tortugas (Mayer *et al.*, 2002).

➤ Genes involucrados en la diferenciación testicular

Sox9

Sox9 (Gen 9 con región HMG relacionado con *Sry*) codifica para un factor de transcripción que contiene la caja HMG, motivo de unión a ADN (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993), y es uno de los principales genes autosómicos relacionados con la diferenciación sexual que se encuentra conservado entre vertebrados (Kent *et al.*, 1996). Se expresa en las células de Sertoli y ha sido empleado como marcador de diferenciación testicular en diferentes especies de vertebrados (Morais da Silva *et al.*, 1996; Cameron y Sinclair, 1997).

En mamíferos se ha demostrado que *Sox9* es un factor involucrado en la diferenciación testicular (Vidal *et al.*, 2001; Chaboissier *et al.*, 2004). Defectos en este gen en humanos conllevan al desarrollo de un síndrome denominado displasia campomélica, el cual se asocia con reversión sexual de macho a hembra (Wagner *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1994; Preiss *et al.*, 2001). En el ratón, los transcritos de *Sox9* se detectan en la cresta urogenital de ambos sexos y posteriormente es regulado negativamente en el ovario y se mantienen en el testículo hasta la vida adulta (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996). La proteína SOX9 se observa sólo en las crestas genitales masculinas después del inicio de la diferenciación sexual morfológica (Moreno-Mendoza *et al.*, 2003).

Sox9 actúa como un gen determinante del sexo masculino en mamíferos. Este gen, junto con *Sf-1* y *Gata-4*, activan la expresión de *Mis*, responsable de la regresión de los conductos de Müller en los machos (Morais da Silva *et al.*, 1996; De Santa Barbara *et al.*, 1998). Por otra parte, Vidal y colaboradores (2001) demostraron que la expresión ectópica de *Sox9* en gónadas XX de ratón, es suficiente para dirigir el desarrollo de la gónada hacia un testículo, lo que sugiere que este gen puede sustituir al gen *Sry* en el proceso de diferenciación testicular.

En aves, Morais da Silva y colaboradores (1996) detectaron el gen *Sox9* en ambos sexos durante las etapas tempranas del desarrollo y subsecuentemente solamente en machos (embriones ZZ), lo cual se relaciona con una función en la diferenciación testicular. Por el contrario, Kent y colaboradores (1996) no detectaron el gen *Sox9* en las hembras en ninguna etapa del desarrollo. A diferencia de los mamíferos, en el pollo la expresión de *Sox9* se activa

después del inicio de la diferenciación testicular, lo cual sugiere que este gen no tiene un papel en la determinación sexual testicular en todos los vertebrados (Koopman, 2001).

En reptiles, la expresión de *Sox9* se ha estudiado en diferentes especies. En las tortugas *T. scripta* y *Lepidochelys olivacea* se observan niveles similares de *Sox9* en embriones incubados a TM y TF durante el período de determinación sexual (período sensible a la temperatura) (Spotila *et al.*, 1998; Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Torres-Maldonado *et al.*, 2001). Posteriormente, se observa un patrón sexualmente dimórfico. En *T. scripta*, la expresión aumenta en los embriones destinados a la vía masculina, lo cual se relaciona con una función en la diferenciación testicular (Spotila *et al.*, 1998) y se expresa antes del inicio de la expresión específica de AMH en el testículo, lo que sugiere una función de este gen en la determinación del sexo por temperatura (Shoemaker *et al.*, 2007a). En *L. olivacea*, la regulación negativa de *Sox9* a TF se relaciona con el inicio de la diferenciación morfológica del ovario, lo cual sugiere un papel en la determinación sexual femenina (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Torres-Maldonado *et al.*, 2002). En *A. mississippiensis*, *Sox9* es regulado positivamente en las gónadas de embriones incubados a TM; sin embargo, probablemente este gen no es el factor desencadenante de la determinación masculina, debido a que su regulación positiva ocurre después del compromiso al desarrollo masculino (Western *et al.*, 1999).

En el anfibio *R. rugosa* se han aislado dos isoformas de *Sox9*: *Sox9 α* y *Sox9 β* ; las cuales se expresan tanto en gónadas femeninas como masculinas en desarrollo. Posteriormente, *Sox9* se detecta solamente en el testículo adulto. Se ha propuesto que *Sox9* participa en el desarrollo gonadal en ambos sexos (Takase *et al.*, 2000).

Dmrt1

El gen *Dmrt1* (gen 1 relacionado con los genes *Double sex* y *Mab-3*) codifica para un factor de transcripción que contiene el dominio DM, un dominio de unión al ADN (Raymond *et al.*, 1998). A pesar de la gran diversidad de mecanismos de determinación sexual que existe, *Dmrt1* es uno de los genes relacionados con la diferenciación sexual que está conservado en invertebrados y vertebrados (Raymond *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1999).

En mamíferos, el gen *Dmrt1* se expresa en las células de Sertoli y se ha demostrado que tiene una función en el desarrollo normal del testículo (Raymond *et al.*, 2000; Wilhelm *et al.*, 2007). En aves, *Dmrt1* se detecta en la cresta genital de ambos sexos antes y durante la diferenciación sexual, sin embargo, los niveles de expresión son mayores en machos que en hembras (Smith

et al., 1999b; Nanda *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que *Dmrt1* actúa en la diferenciación testicular, previo al inicio de la diferenciación morfológica (Smith *et al.*, 2003). *Dmrt1* se localiza en el cromosoma Z en el pollo y se ha propuesto como el posible gen determinante del sexo en aves (Nanda *et al.*, 1999).

En general, en reptiles el gen *Dmrt1* se expresa en niveles más altos en los complejos urogenitales de embriones incubados a TM que a TF, lo cual indica su posible función en la diferenciación testicular (Kettlewell *et al.*, 2000). En *T. scripta* y *A. mississippiensis* la expresión de *Dmrt1* precede a la de *Sox9*, lo cual sugiere que en la cascada génica actúa antes de la activación de *Sox9* (Shoemaker *et al.*, 2007b). En *L. olivacea* la regulación positiva de *Dmrt1* puede tener un papel importante en la determinación sexual masculina y posiblemente actúe manteniendo la expresión de *Sox9* en las gónadas masculinas (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). En anfibios, la expresión del gen *Dmrt1* es similar en los complejos gónada-mesonefros de *X. laevis* durante la etapa de gónada indiferenciada; mientras que en individuos juveniles la expresión es más alta en el testículo que en el ovario. Sin embargo, dado que la expresión de *Dmrt1* es posterior a la de *Sox9*, es probable que *Dmrt1* no esté involucrado en la determinación sexual, sino en la diferenciación gonadal en esta especie (Osawa *et al.*, 2005).

Mis

El gen *Mis* (sustancia inhibidora de los conductos de Müller), también conocido como *Amh* (hormona anti-mulleriana), codifica para una glucoproteína que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformantes β (Josso *et al.*, 1998). En mamíferos *Mis* se expresa en las células de Sertoli, su función principal es la regresión de los conductos mullerianos y se ha asociado con la diferenciación testicular (Vigier *et al.*, 1989). En este grupo de vertebrados, *Mis* es activado por *Sox9* y su regulación es compleja e involucra los factores *Sf-1*, *Gata-4*, *Sox9* y *Wt1* (Arango *et al.*, 1999; Rey *et al.*, 2003).

Por otra parte, el patrón de expresión de *Mis* en aves es diferente al descrito en mamíferos, debido a que se detecta antes del inicio de la expresión de *Sox9*. De manera que en este grupo de vertebrados, la regulación de la expresión de *Mis* no parece involucrar a *Sox9* (Oreal *et al.*, 1998). En el reptil *A. mississippiensis*, *Mis* presenta una alta expresión a TM y de forma similar a aves, precede a la expresión de *Sox9* (Western *et al.*, 1999).

➤ **Genes involucrados en la diferenciación ovárica**

Foxl2

El gen *Foxl2* (Factor de transcripción L2 con un dominio de unión a ADN denominado cabeza de horquilla) pertenece a una familia de factores de transcripción que comparten un dominio de unión al ADN de aproximadamente 110 aminoácidos, con una estructura de hélice-vuelta-hélice (Führer, 2002). La expresión de *Foxl2* es sexualmente dimórfica, se detecta en gónadas femeninas y no en gónadas masculinas; este patrón de expresión está conservado entre los diferentes grupos de vertebrados (Cocquet *et al.*, 2002). De igual forma, su función en la diferenciación ovárica se encuentra conservada, particularmente en la diferenciación de las células de la granulosa. Se ha propuesto que *Foxl2* puede actuar en la regulación del gen *Cyp19*, el cual codifica para la enzima aromatasa que cataliza la transformación de andrógenos a estrógenos durante la esteroidogénesis ovárica (Govoroun *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007).

En mamíferos, la expresión de *Foxl2* es específica de hembras y se detecta durante las fases tempranas del desarrollo gonadal (Cocquet *et al.*, 2002). Este gen se ha relacionado con el síndrome de blefarofimosis, ptosis y epicanto inverso (BPES), el cual se caracteriza por anomalías en los párpados y falla ovárica prematura, lo que sugiere que este factor es importante para el desarrollo de la gónada femenina (Crisponi *et al.*, 2001; Ottolenghi *et al.*, 2007). Los transcritos de *Foxl2* se localizan en las células mesenquimáticas del ovario y posteriormente en las células de la granulosa, aunque su expresión disminuye en la etapa postnatal (Loffler *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004). Las células de la granulosa en ovarios de ratones homocigotos nulos (*Foxl2*^{-/-}), no son capaces de completar la transición de células escamosas a cuboidales, lo que conduce a la ausencia de folículos secundarios y atresia folicular. Lo anterior indica que *Foxl2* es esencial en la diferenciación de las células de la granulosa (Schmidt *et al.*, 2004).

Por otra parte, aunque *Foxl2* tiene una función importante en el desarrollo ovárico en mamíferos, los ratones XX mutantes para *Foxl2* no presentan defectos durante el desarrollo temprano que puedan conducir a una reversión sexual; de igual forma, los casos de pacientes con el síndrome BPES no muestran reversión sexual de hembra a macho (Schmidt *et al.*, 2004; Uda *et al.*, 2004), de manera que el gen *Foxl2* se excluye como un factor determinante del ovario (Wilhelm *et al.*, 2007).

En aves, estudios en el pollo indican que el gen *Foxl2*, al igual que en mamíferos, se activa específicamente en las hembras. El inicio de la expresión de este gen ocurre justo antes del

inicio de la diferenciación sexual gonadal y se sugiere que actúa activando el gen de la aromatasa, la cual transforma andrógenos a estrógenos, un paso importante en el desarrollo hacia la vía de diferenciación ovárica (Govoroun *et al.*, 2004; Hudson *et al.*, 2005). En tortugas con TSD la expresión de *Foxl2* se restringe al ovario en desarrollo al final del período sensible a la temperatura, lo cual sugiere una función de este gen en el compromiso hacia la diferenciación ovárica (Loffler *et al.*, 2003; Shoemaker *et al.*, 2007a; Rhen *et al.*, 2007). En *A. mississippiensis* la expresión del ARNm de *Foxl2* es sexualmente dimórfica; con mayores niveles en los ovarios que en los testículos en todas las edades, y posiblemente actúe regulando la actividad del gen de la aromatasa (Moore *et al.*, 2010). En *R. rugosa* y *X. laevis* la expresión de *Foxl2* es sexualmente dimórfica durante el periodo de diferenciación sexual gonadal, y al igual que en otros vertebrados, posiblemente juega un papel importante en la diferenciación ovárica mediante la regulación del gen de la aromatasa (Oshima *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2009).

Wnt4

El gen *Wnt4* [Miembro 4 de la familia de genes con sitio de integración desalado de tipo MMTV (virus murino de tumor mamario)], codifica para una glucoproteína que actúa como molécula de señalización (Dale, 1998). En mamíferos este gen se expresa en la cresta genital y en el mesonefros de ambos sexos, y posteriormente es regulado negativamente en el testículo y su expresión permanece en el ovario (Vainio *et al.*, 1999). *Wnt4* participa en la formación de los conductos de Müller, la diferenciación de las células intersticiales y en el desarrollo de los ovocitos post-meióticos (Bernard y Harley, 2007). En el ratón se ha observado que la inactivación simultánea de *Wnt4* y *Foxl2* resulta en la formación de cordones testiculares y presencia de espermatogonias en gónadas XX, lo cual sugiere que estos genes tienen una función complementaria en la formación del ovario (Ottolenghi *et al.*, 2007). En mamíferos, *Wnt4* activa el gen β -catenina, el cual se requiere para una adecuada formación del ovario (Wodarz y Nusse, 1998).

En Aves, *Wnt4* es regulado positivamente en las gónadas femeninas, lo cual sugiere que está implicado en el desarrollo ovárico (Smith *et al.*, 2008; Chue y Smith, 2011). En reptiles, como la lagartija *Calotes versicolor*, *Wnt4* se expresa casi exclusivamente en las gónadas femeninas (Tripathi y Raman, 2010). En contraste a lo observado en otros vertebrados, en el anfibio *R. rugosa* *Wnt4* no tiene un patrón de expresión sexualmente dimórfico; su expresión es similar en las gónadas indiferenciadas y en diferenciación en ambos sexos (Oshima *et al.*, 2005). En el cuadro 1 se muestra un resumen de los genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en los diferentes grupos de vertebrados.

Cuadro 1. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en vertebrados.

Gen	Grupo	(Tejido / célula)	Etapas de desarrollo	Referencia
Sry	Mamíferos (ratón)	Testículo en desarrollo (células pre-Sertoli)	Embrionaria	Koopman <i>et al.</i> , 1990
Wt-1	Anfibios (<i>R. rugosa</i>)	Cresta urogenital	Embrionaria	Yamamura <i>et al.</i> , 2009
	Reptiles (<i>T. scripta</i>)	Sistema urogenital	Embrionaria	Spotila <i>et al.</i> , 1998
	Aves (pollo)	Sistema urogenital y gónadas femeninas y masculinas	Embrionaria	Smith <i>et al.</i> 1999a
	Mamíferos (ratón)	Cresta urogenital de ambos sexos; testículo	Embrionaria y adulta	Wilhelm y Englert, 2002
Sf-1	Anfibios (<i>R. catesbeiana</i>)	Ovario y testículo en desarrollo, con mayor expresión en el ovario.	Embrionaria	Mayer <i>et al.</i> , 2002
	Reptiles (<i>T. scripta</i>)	Gónada indiferenciada de ambos sexos y posteriormente en la gónada masculina	Embrionaria	Fleming <i>et al.</i> 1999
	Aves (pollo)	Gónada indiferenciada de ambos sexos; ovario	Embrionaria	Smith <i>et al.</i> , 1999a
	Mamíferos (ratón)	Gónada indiferenciada de ambos sexos; testículo	Embrionaria	Luo <i>et al.</i> , 1994
Sox9	Anfibios (<i>R. rugosa</i>)	Gónadas masculinas y femeninas	Embrionaria	Takase <i>et al.</i> , 2000
	Reptiles (<i>T. scripta</i>)	Gónada indiferenciada de ambos sexos y testículo en desarrollo	Embrionaria	Spotila <i>et al.</i> , 1998
	Aves (pollo)	Gónada indiferenciada de ambos sexos y testículo en desarrollo	Embrionaria	Morais da Silva <i>et al.</i> , 1996
	Mamíferos (ratón)	Cresta urogenital de ambos sexos y testículo en desarrollo (células de Sertoli)	Embrionaria y adulta	Kent <i>et al.</i> , 1996

Dmrt1	Anfibios (<i>R. rugosa</i>)	Complejo urogenital	Embrionaria	Osawa <i>et al.</i> , 2005
	Reptiles (<i>T. scripta</i>)	Complejos urogenitales de ambos sexos; mayor expresión en gónadas masculinas	Embrionaria	Shoemaker <i>et al.</i> 2007b
	Aves (pollo)	Complejos urogenitales de ambos sexos; mayor expresión en machos	Embrionaria	Smith <i>et al.</i> , 1999b
	Mamíferos (ratón)	Cresta urogenital de ambos sexos y testículo en desarrollo (células de Sertoli)	Embrionaria y adulta	Raymond <i>et al.</i> , 2000
Mis	Reptiles (<i>A. mississippiensis</i>)	gónadas masculinas	Embrionaria	Western <i>et al.</i> , 1999
	Aves (pollo)	Testículo en desarrollo	Embrionaria	Oreal <i>et al.</i> , 1998
	Mamíferos (ratón)	Testículo en desarrollo (células de Sertoli)	Embrionaria	Vigier <i>et al.</i> , 1998
Foxl2	Anfibios (<i>R. rugosa</i>)	Ovario	Embrionaria y adulta	Oshima <i>et al.</i> , 2008
	Reptiles (<i>T. scripta</i>)	Ovario	Embrionaria y adulta	Loffler <i>et al.</i> 2003
	Aves (pollo)	Ovario	Embrionaria y adulta	Govoroun <i>et al.</i> , 2004
	Mamíferos (ratón)	Ovario (células foliculares)	Embrionaria y adulta	Cocquet <i>et al.</i> , 2002
Wnt4	Anfibios (<i>R. rugosa</i>)	Ovario y testículo	Embrionaria y adulta	Oshima <i>et al.</i> , 2005
	Reptiles (<i>C. versicolor</i>)	Mayor expresión en gónadas femeninas	Embrionaria	Tripathi y Raman, 2010
	Aves (pollo)	Ovario	Embrionaria	Smith <i>et al.</i> , 2008
	Mamíferos (ratón)	Cresta urogenital y mesonefros de ambos sexos; posteriormente en el ovario	Embrionaria y adulta	Vainio <i>et al.</i> , 1999

5. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en peces teleósteos

Algunos de los genes involucrados en la diferenciación sexual en vertebrados se han descrito también en peces teleósteos. Respecto a su función, se han propuesto tanto funciones conservadas como divergentes entre mamíferos y teleósteos (Devlin y Nagahama, 2002; Von

Hofsten y Olsson, 2005). En peces teleósteos, el pez cebra y el pez medaka son organismos modelo en el estudio de los genes implicados en la determinación y la diferenciación sexual.

➤ Genes involucrados en la determinación sexual

Dmy/dmrt1bY

En medaka el sexo se determina genéticamente con el sistema XX/XY; las gónadas XX se diferencian directamente como ovarios y las gónadas XY como testículos (Matsuda, 2005). En esta especie se ha identificado un gen con dominio DM que corresponde a una copia funcional del gen *dmrt1* en el cromosoma Y, y se ha denominado *dmy* (Matsuda *et al.*, 2002) o *dmrt1bY* (Nanda *et al.*, 2002). Se propone que *dmy* surgió de un evento de duplicación del gen autosómico *dmrt1* (Kondo *et al.*, 2006). El gen *dmy* se detecta en las células somáticas que rodean a las células germinales del testículo en desarrollo (Matsuda *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la inserción de un fragmento que acarrea el gen *dmy* es suficiente para inducir la diferenciación testicular en individuos XX, los cuales se desarrollan como machos funcionales (Matsuda *et al.*, 2007). Por otra parte, mutaciones de pérdida de función de *dmy* causan desarrollo femenino en individuos XY (Matsuda, 2005). Estos resultados indican que *dmy* es el gen determinante del sexo en medaka.

Las observaciones anteriormente descritas permitieron proponer a *dmy* como el factor determinante del sexo en vertebrados no mamíferos (Matsuda *et al.*, 2003), con una función similar al gen *Sry* de mamíferos (Koopman *et al.*, 1990). Sin embargo, dado que sólo se ha reportado en medaka (*O. latipes*) y en su especie hermana *Oryzias curvinotus* (Matsuda *et al.*, 2003) y no se ha encontrado en otros miembros del género *Oryzias* ni en otros teleósteos (Kondo *et al.*, 2003; Veith *et al.*, 2003), *dmy* correspondería a un gen determinante testicular específicamente en estas especies de medaka y no en teleósteos en general.

➤ Genes involucrados en la formación del primordio gonadal

Wt1

En peces teleósteos se han identificado homólogos del gen *Wt1* de tetrápodos y se han relacionado con la formación del primordio urogenital (Perner *et al.*, 2007). En el pez cebra y en medaka se han descrito dos genes: *wt1a* y *wt1b*, los cuales son equivalentes al gen *Wt1* de tetrápodos (Bollig *et al.*, 2006; Klüver *et al.*, 2009). En ejemplares adultos del pez cebra, los dos

genes se expresan en gónadas y riñones (Bollig *et al.*, 2006). En medaka, *wt1a* se detecta en las células somáticas del primordio gonadal y se propone que participa en su formación y en el mantenimiento de las CGPs (Klüver *et al.*, 2009). Por otra parte, en la trucha arcoíris, *wt1* se expresa en el primordio gonadal de ambos sexos y posteriormente es regulado positivamente en el testículo (Baron *et al.*, 2005; Hale *et al.*, 2011).

Sf-1

En algunas especies de teleósteos como la trucha arcoíris (Ito *et al.*, 1998), medaka (Watanabe *et al.*, 1999), el salmón *Oncorhynchus keta* (Higa *et al.*, 2000), el pez cebra (Chai y Chan, 2000; Kuo *et al.*, 2005), la trucha del ártico *Salvelinus alpinus* (Von Hofsten *et al.*, 2002) y la carpa *Cyprinus carpio* (Tang *et al.*, 2010) se han identificado homólogos del gen *Sf-1* de mamíferos y se le relaciona con la diferenciación sexual en peces teleósteos.

En el pez cebra, *ff1b* y *ff1d* son homólogos funcionales del gen *Sf-1* de mamíferos y están relacionados con la biosíntesis de esteroides (Von Hofsten y Olsson, 2005). *ff1d* se ha detectado en las células interrenales, la hipófisis y en las gónadas femeninas y masculinas y presenta niveles de expresión más altos en los machos, detectándose su expresión en las células de Leydig y de Sertoli (Chai y Chan, 2000; Von Hofsten y Olsson, 2005). Se ha propuesto a *sf-1* como uno de los genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en el pez cebra, posiblemente involucrando al gen *mis*, de manera similar como ocurre en mamíferos (Von Hofsten y Olsson, 2005). En la trucha arcoíris, *sf-1* se expresa en los dos sexos y después aumenta durante la diferenciación testicular (Baron *et al.*, 2005). Tang y colaboradores (2010) sugieren que en la carpa *sf-1* tiene una función en el desarrollo testicular. En la tilapia del Nilo, *sf-1* se expresa en niveles similares en las gónadas indiferenciadas de individuos XX y XY, posteriormente aumenta en el ovario a los 25 días después de la eclosión (dde) y finalmente aumenta en los testículos a los 70 dde (Ijiri *et al.*, 2008).

➤ **Genes involucrados en la diferenciación testicular**

Sox9

El gen *sox9* se ha duplicado durante la evolución de algunos linajes de peces teleósteos y su expresión en la gónada parece estar diversificada (Yokoi *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003). El gen *sox9* se ha identificado y caracterizado en varias especies: trucha arcoíris (Takamatsu *et al.*, 1997), pez cebra (Chiang *et al.*, 2001), medaka (Yokoi *et al.*, 2002), la anguila *Monopterus albus*

(Zhou *et al.*, 2003), *P. reticulata* (Shen *et al.*, 2007), la carpa (Du *et al.*, 2007), la tilapia del Nilo (Ijiri *et al.*, 2008) y el pez gato *Clarias gariepinus* (Raghuvveer y Senthilkumaran, 2010).

De igual forma, se ha determinado su patrón de expresión, el cual en la mayoría de especies estudiadas es sexualmente dimórfico, con mayor expresión en los machos que en las hembras, lo que permite sugerir una función importante de este gen durante la diferenciación sexual.

En el pez cebra, se han caracterizado dos genes *sox9*: *sox9a* y *sox9b*, los cuales se consideran homólogos del gen *Sox9* de tetrápodos. *sox9a* se detecta en el testículo, cerebro, riñón y músculo, mientras que *sox9b* se encuentra solamente en el ovario (Chiang *et al.*, 2001). Durante la diferenciación sexual, *sox9a* presenta un patrón sexualmente dimórfico, con expresión exclusivamente en los testículos en desarrollo (Jørgensen *et al.*, 2008). Los embriones de pez cebra homocigotos para la mutación *jef* (mutación en *sox9a*) exhiben malformaciones craneofaciales y carecen de cartílago, similar al síndrome de displasia campomélica en humanos (Yan *et al.*, 2002). Sin embargo, los individuos tienen la capacidad de reproducirse, lo que indica que *sox9a* no dirige la determinación y diferenciación sexual en esta especie (Von Hofsten y Olsson, 2005).

Nakamoto y colaboradores (2005) encontraron que en medaka el gen *sox9a2* se expresa en los dos sexos durante la diferenciación gonadal temprana, posteriormente es regulado positivamente en machos y el mantenimiento de su expresión en la gónada masculina corresponde a la etapa de formación de los lóbulos testiculares. De manera que aunque *sox9a2* no está involucrado en la determinación sexual temprana, tiene una función importante en el diferenciación sexual del fenotipo masculino en esta especie (Nakamoto *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008).

De igual forma, en la trucha arcoíris se han identificado dos genes *sox9*, denominados *sox9a1* y *sox9a2* (Baron *et al.*, 2005). Tanto en la trucha arcoíris como en la tilapia del Nilo, la expresión de *sox9* es similar en gónadas XX y XY durante la etapa de gónada indiferenciada y posteriormente es regulado positivamente en las gónadas masculinas (Vizziano *et al.*, 2007; Ijiri *et al.*, 2008; Hale *et al.*, 2011).

Dmrt1

Homólogos del gen *Dmrt1* se han relacionado con la determinación sexual y el desarrollo gonadal en varias especies de teleósteos. En el pez cebra, la expresión de *dmrt1* se detecta en

las células germinales del testículo y el ovario (Guo *et al.*, 2005). En medaka, *dmrt1* es autosómico y está involucrado en la diferenciación testicular (Kobayashi *et al.*, 2004; Matsuda, 2005).

Un patrón de expresión sexualmente dimórfico de *dmrt1* se ha reportado en la trucha arcoíris (Baron *et al.*, 2005), la tilapia del Nilo (Ijiri *et al.*, 2008), el bacalao del Atlántico *Gadus morhua* (Johnsen *et al.*, 2010), el pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Fernandino *et al.*, 2008a) y el pez gato (Raghuvver *et al.*, 2011). En la trucha arcoíris, *dmrt1* se expresa específicamente en la gónada masculina, previo a la diferenciación sexual morfológica y después de la expresión de *sox9*; de manera que se sugiere que participa en la diferenciación testicular en esta especie (Marchand *et al.*, 2000; Baron *et al.*, 2005; Vizziano *et al.*, 2007). Asimismo, en la tilapia del Nilo, *dmrt1* se expresa específicamente en las gónadas de individuos XY y cuando se administran estrógenos se observa una reversión sexual de macho a hembra y bajos niveles de *dmrt1*, lo cual sugiere una función importante de este gen en la diferenciación testicular (Guan *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2003). Estudios recientes en esta especie, sugieren que *dmrt1* actúa suprimiendo la vía de diferenciación femenina mediante la inhibición del gen de la aromataza y por ende la producción de estrógenos (Wang *et al.*, 2010).

Mis

En varias especies de teleósteos se han caracterizado y clonado homólogos de *Mis* (Miura *et al.*, 2002; Rodríguez-Mari *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010). Sin embargo, la función de *mis* en la diferenciación sexual de teleósteos, los cuales carecen de conductos de Müller no es muy clara (Von Hofsten y Olsson, 2005).

En el pez cebra, el patrón de expresión de *mis* es sexualmente dimórfico, con mayores niveles en las gónadas masculinas y se detecta en las células de Sertoli, expresándose junto con *sox9* y *ff1d (sf-1)*; sin embargo, también se detecta en las células foliculares en el ovario (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2007). En esta especie, el promotor del gen *mis* contiene sitios de unión putativos para los mismos factores de transcripción que regulan *Mis* en mamíferos, lo que indicaría un mecanismo de regulación conservado en vertebrados (Rey *et al.*, 2003; Von Hofsten y Olsson, 2005). En medaka, el sistema de señalización de *mis* y su receptor *amh RII* tiene funciones reguladoras en el desarrollo gonadal, incluyendo la regulación del desarrollo folicular y de la proliferación de las células germinales en una manera sexo-dependiente. Se considera que desde el punto de vista evolutivo, estas funciones preceden a la función de *Mis* en la regresión de los conductos de Müller (Morinaga *et al.*, 2007).

En la anguila se ha identificado una sustancia similar a *Mis*, denominada eSrs21, en las células de Sertoli de testículos inmaduros (Miura *et al.*, 2002). Este hallazgo indica que los genes relacionados con *Mis* pueden tener funciones importantes en la determinación y diferenciación sexual en teleósteos. Se ha propuesto que la regulación de la proliferación y diferenciación de las espermatogonias puede ser una de las funciones comunes de *Mis* entre vertebrados (Yoshinaga *et al.*, 2004; Von Hofsten y Olsson, 2005).

En el pejerrey, una especie con TSD, *mis* presenta niveles de expresión mayores en gónadas incubadas a TM y la administración de estradiol se relaciona una regulación negativa de este gen en gónadas masculinas; de manera que *mis* juega un papel importante en la diferenciación sexual de esta especie, posiblemente regulada por la acción de los estrógenos (Fernandino *et al.*, 2008b).

➤ **Genes involucrados en la diferenciación ovárica**

Foxl2

El patrón de expresión del gen *foxl2* en la mayoría de teleósteos estudiados es sexualmente dimórfico, con mayores niveles de expresión en el ovario. Lo anterior sustenta la hipótesis que al igual que otros vertebrados, *foxl2* juega un papel importante en la diferenciación ovárica en teleósteos (Liu *et al.*, 2007; Hale *et al.*, 2011; Raghuvver *et al.*, 2011). Por el contrario, en el pez hermafrodita protogínico *Halichoeres trimaculatus*, los niveles de expresión de *foxl2* son similares en testículos y ovarios (Kobayashi *et al.*, 2010).

En la tilapia del Nilo y en medaka, la expresión de *foxl2* se detecta inicialmente en las células somáticas que rodean las células germinales en gónadas que han iniciado la diferenciación hacia la vía ovárica. Posteriormente, su expresión se mantiene en las células de la granulosa durante todo el desarrollo ovárico, principalmente en folículos previtelogénicos y vitelogénicos (Wang *et al.*, 2004; Nakamoto *et al.*, 2006).

En la trucha arcoíris se han clonado dos genes *foxl2*: *foxl2a*, considerado un ortólogo de *foxl2* de mamíferos, y *foxl2b*. En esta especie, *foxl2a* junto con folistatina y *Cyp19a1* (aromatasa) se han postulado como genes importantes en la diferenciación y mantenimiento de las células de la granulosa y la producción de estrógenos (Baron *et al.*, 2004; Vizziano *et al.*, 2007). De forma similar, en la tilapia del Nilo (Wang *et al.*, 2007), *Silurus meridionalis* (Liu *et al.*, 2007) y *Paralichthys olivaceus* (Yamaguchi *et al.*, 2007), se ha propuesto que *foxl2* actúa regulando la

enzima aromatasa durante la diferenciación sexual, ya sea por medio de su unión al promotor del gen *cyp19a1*, o a través de la interacción con *sf-1* para incrementar la transcripción y por ende la producción de estrógenos en la gónada femenina.

Cyp19a1

En muchas especies de peces teleósteos, la proporción entre estrógenos y andrógenos es un factor esencial que influye en la diferenciación sexual, el cual está limitado por la disponibilidad de la enzima aromatasa (P450arom). Esta enzima es codificada por el gen *cyp19a1* y funciona en la regulación de la cantidad de estrógenos, principalmente 17 β estradiol, y por lo tanto en la diferenciación ovárica (Trant *et al.*, 2001; Fenske y Segner, 2004).

En peces teleósteos, dos genes codifican para enzimas aromatasas: *cyp19a1* y *cyp19a2* (Kwon *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007). La expresión de *cyp19a1* se restringe a las gónadas y su función se relaciona con la diferenciación sexual gonadal (Chang *et al.*, 2005; Sawyer *et al.*, 2006). El gen *cyp19a1* funciona en el desarrollo ovárico de varias especies de peces teleósteos (Chang *et al.*, 1997; Guiguen *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2007). En la trucha arcoíris, la expresión de P450arom es mayor en gónadas XX que en XY antes de la diferenciación sexual y posteriormente se detecta solamente en el ovario (Guiguen *et al.*, 1999; Vizziano *et al.*, 2007). De forma similar, en la tilapia del Nilo, la expresión de P450arom es específica de hembras desde antes de la diferenciación sexual morfológica (Wang *et al.*, 2007). Von Hofsten y Olsson (2005) proponen un modelo para explicar la determinación y diferenciación sexual en el pez cebra, en el cual la enzima P450arom tiene una función importante en la diferenciación ovárica. La expresión *Cyp19a1* está regulada por otros factores como *sf-1*, *foxl2* y *mis* (Wang *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007).

Wnt4

El gen *wnt4* se ha caracterizado en varias especies de peces teleósteos. En el pez hermafrodita protándrico *Acanthopagrus schlegeli* la expresión de *wnt4* se relaciona con el desarrollo ovárico y la proliferación de las ovogonias (Wu y Chang, 2009; Wu *et al.*, 2010). En la trucha arcoíris, *wnt4* se detecta en las células somáticas que rodean a las células germinales en las gónadas de ambos sexos, y no se observa un patrón de expresión predominante en el ovario durante la diferenciación sexual temprana (Nicol *et al.*, 2012).

En el cuadro 2 se muestra un resumen de los genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en algunas especies de peces teleósteos.

Cuadro 2. Genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual en peces teleósteos.

Gen	Grupo	Tejido/Célula	Etapas de desarrollo	Referencia
dmy	Medaka	Testículo (células de Sertoli)	Embrionaria y adulta	Matsuda <i>et al.</i> 2002
wt1	Medaka	Primordio gonadal	Embrionaria	Klüver <i>et al.</i> , 2009
	Pez cebra	Primordio gonadal	Embrionaria	Bolling <i>et al.</i> , 2006
	Trucha arcoíris	Primordio gonadal	Embrionaria	Hale <i>et al.</i> , 2011
sf1	Pez cebra	Ovario y testículo; mayor expresión en el testículo (células de Sertoli y de Leydig)	Embrionaria	Chai y Chan, 2000
	Trucha arcoíris	Gónadas femeninas y masculinas; mayor expresión en el testículo	Embrionaria	Baron <i>et al.</i> , 2005
	Tilapia	Gónadas indiferenciadas de ambos sexos	Embrionaria	Ijiri <i>et al.</i> , 2008
sox9	Medaka	Gónada indiferenciada de ambos sexos; regulación positiva en machos	Embrionaria y adulta	Nakamoto <i>et al.</i> , 2005
	Pez cebra	Testículo y ovario	Embrionaria y adulta	Chiang <i>et al.</i> , 2001
	Trucha arcoíris	Gónada indiferenciada de ambos sexos; regulación positiva en machos	Embrionaria y adulta	Baron <i>et al.</i> , 2005
	Tilapia	Gónada indiferenciada de ambos sexos; regulación positiva en machos	Embrionaria y adulta	Ijiri <i>et al.</i> , 2008
dmrt1	Medaka	Testículo	Embrionaria y adulta	Kobayashi <i>et al.</i> , 2004
	Pez cebra	Células germinales de testículo y ovario	Embrionaria y adulta	Guo <i>et al.</i> , 2005
	Trucha arcoíris	Testículo	Embrionaria y adulta	Marchand <i>et al.</i> , 2000
	Tilapia	Testículo	Embrionaria y adulta	Guan <i>et al.</i> , 2000
mis	Medaka	Ovario y testículo	Embrionaria y adulta	Morinaga <i>et al.</i> 2007
	Pez cebra	células foliculares y células de Sertoli	Embrionaria y adulta	Rodríguez-Marí <i>et al.</i> , 2005
	Anguila	células de Sertoli	Embrionaria	Miura <i>et al.</i> , 2002

foxl2	Medaka	Células foliculares	Embrionaria y adulta	Nakamoto <i>et al.</i> , 2006
	Trucha arcoíris	Células foliculares	Embrionaria y adulta	Vizziano <i>et al.</i> , 2007
	Tilapia	Células foliculares	Embrionaria y adulta	Wang <i>et al.</i> , 2004
cyp19a1	Pez cebra	Ovario en desarrollo	Embrionaria y adulta	Von Hofsten y Olsson, 2005
	Trucha arcoíris	Ovario	Embrionaria y adulta	Vizziano <i>et al.</i> , 2007
	Tilapia	Ovario	Embrionaria	Wang <i>et al.</i> , 2007
wnt4	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Ovario	Embrionaria	Wu <i>et al.</i> , 2010
	Trucha arcoíris	Gónadas femeninas y masculinas	Embrionaria	Nicol <i>et al.</i> , 2012

6. *Chapalichthys encaustus*

Chapalichthys encaustus (Jordan y Snyder 1899), conocido comúnmente como “pintilla”, es un goodeido vivíparo endémico de México, el cual se distribuye en el delta del río Lerma, en el lago de Chapala en Jalisco y Michoacán, y en el lago de Orandino y el Manantial La Luz en Michoacán, los cuales son tributarios del río Lerma (Wischnath, 1993; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2005).

El tamaño promedio del adulto es 63 mm de longitud total (LT) en el macho y 61 mm LT en la hembra (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2005). Su cuerpo es delgado, con cabeza pequeña y puntiaguda. La parte superior del cuerpo es olivo-grisáceo o plateado y a menudo hay una banda negra irregular de puntos y manchas que se extienden a lo largo de la línea lateral. La coloración del macho generalmente es más intensa que la de la hembra (Wischnath, 1993). Su dieta es amplia e incluye materia vegetal; requiere agua ligeramente alcalina, con un intervalo de temperatura de 20 a 28°C (Dawes, 1995).

Respecto a los aspectos reproductores de esta especie se ha documentado el ovario adulto es un órgano impar con una cavidad interna (Hubbs y Turner, 1939; Guerrero, 2005), la fertilización es interna, la gestación ocurre en el lumen ovárico y dura de seis a ocho semanas, periodo después del cual nacen en promedio 15 crías (Wischnath, 1993).

III. JUSTIFICACIÓN

Los peces teleósteos proveen un sistema biológico particularmente interesante para el estudio de la determinación y diferenciación sexual debido a la variedad de mecanismos que exhiben. Sin embargo, las descripciones histológicas detalladas y la ultraestructura del desarrollo gonadal temprano y del periodo de diferenciación sexual se han realizado principalmente en especies ovíparas; mientras que en especies vivíparas son pocos los estudios sobre estos procesos, particularmente en las familias Poeciliidae y Zoarcidae.

Los teleósteos vivíparos poseen características reproductoras únicas entre vertebrados, como es la fusión de los dos primordios gonadales durante la diferenciación sexual gonadal para formar una gónada impar; lo cual plantea diferencias en este proceso respecto a las especies ovíparas. De manera que el estudio de los mecanismos morfogenéticos y moleculares de la diferenciación gonadal en especies vivíparas puede contribuir a un mayor entendimiento de la diferenciación sexual en teleósteos.

Por otra parte, en los últimos años se ha identificado un gran número de genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en vertebrados y se han propuesto tanto funciones conservadas como divergentes en peces teleósteos. Específicamente, el gen *Sox9* está involucrado en el desarrollo testicular y el gen *Foxl2* está implicado en la diferenciación ovárica en varias especies de vertebrados. Los aspectos moleculares de la diferenciación sexual gonadal en peces teleósteos se han descrito principalmente en especies ovíparas.

La subfamilia de peces vivíparos Goodeinae es un grupo endémico que contribuye a la diversidad de la fauna mexicana. *C. encaustus*, la especie objeto del presente estudio, es un miembro de esta subfamilia y posee algunas ventajas como son su fácil colecta en campo, fácil reproducción y mantenimiento en acuario, y no presenta ningún estatus de conservación.

Para especies vivíparas, incluyendo la subfamilia Goodeinae, no se han reportado estudios que relacionen las características ultraestructurales de la gónada durante la diferenciación sexual con la expresión de genes involucrados en este proceso. Particularmente, los aspectos morfológicos y celulares del desarrollo gonadal temprano y la expresión de genes que pudieran estar implicados en este proceso no se han descrito en *C. encaustus*, por lo cual se pretende contribuir al desarrollo de este campo de investigación tomando como modelo un pez vivíparo endémico de México.

IV. HIPÓTESIS

Los genes *Sox9*, *Foxl2* y *Vasa* que se expresan durante el desarrollo gonadal temprano de varias especies de vertebrados, incluyendo especies de teleósteos, se expresan durante la diferenciación sexual de *Chapalichthys encaustus*.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Describir la morfogénesis gonadal y el patrón de expresión de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* durante la diferenciación sexual de *Chapalichthys encaustus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la etapa de gónada indiferenciada.
- Establecer el inicio de la diferenciación morfológica de la gónada en machos y hembras.
- Describir la diferenciación de las células germinales y de Sertoli.
- Determinar el patrón de expresión de la proteína de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa*.
- Determinar el patrón de expresión de los transcritos de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* en gónadas de adultos.
- Determinar si hay expresión dimórfica de estos genes durante la diferenciación sexual.

VI. METODOLOGÍA

1. Colecta y mantenimiento de individuos

Ejemplares adultos machos y hembras de *C. encaustus* se colectaron con redes en el manantial La Luz, municipio de Jacona, Michoacán, México (101°, 17' Oeste y 27° 55' Norte), ubicado en la región del eje neovolcánico a una altitud de 1633 m.s.n.m. (Vera-Martínez y CRM, 1995). La obtención de los ejemplares en campo se realizó en colaboración con personal de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Los individuos colectados se trasladaron al acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde se mantuvieron en acuarios de 100L y se reprodujeron bajo condiciones estándar de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) y fotoperiodo (12h luz: 12h oscuridad) y se alimentaron con larvas de *Artemia sp.* y alimento comercial en hojuelas (Wardley).

2. Obtención de las muestras

Machos y hembras adultos de *C. encaustus* se anestesiaron con una solución de NaHCO_3 al 2% y posteriormente se sacrificaron por decapitación para obtener las gónadas. El ovario de hembras gestantes se disectó y se obtuvieron los embriones, los cuales se clasificaron en diferentes estadios de desarrollo (E1- E6) de acuerdo con la tabla de desarrollo descrita para el goodeido *Girardinichthys viviparus* (Díaz-Pardo y Ortiz-Jiménez, 1986). En la figura 1 se muestran los embriones obtenidos y clasificados en diferentes estadios de desarrollo.

Embriones en diferentes estadios de desarrollo así como crías de 1 día pos parto (dpp) se sacrificaron rápidamente por decapitación. Se obtuvieron las regiones caudales de embriones en estadios 2 al 6 (E2-E6) y mediante microdissección se aisló la gónada de embriones en estadios 4 al 6 (E4-E6) y de crías de 1dpp. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía de Uso de Animales del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. En el cuadro 3 se presentan las características morfológicas de los individuos en diferentes estadios de desarrollo.

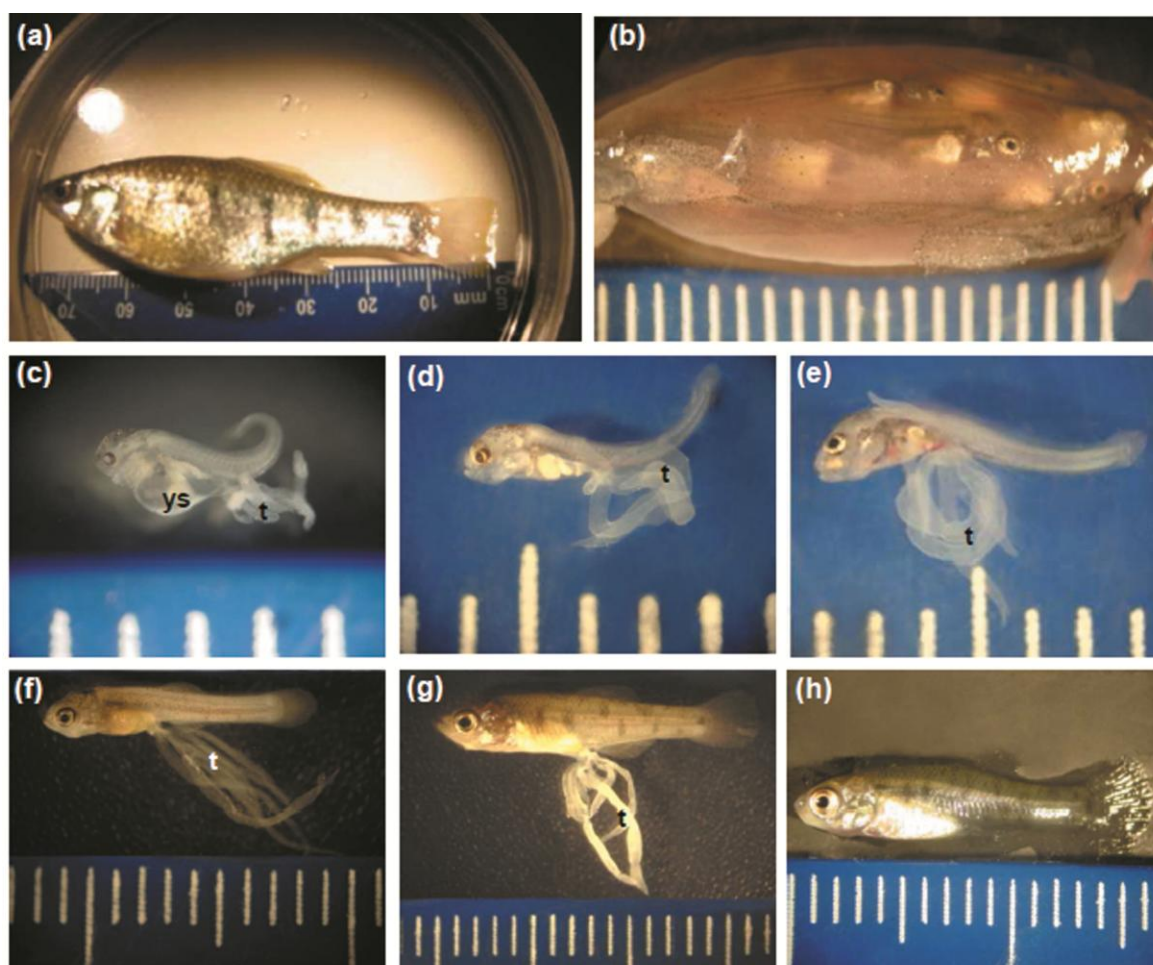


Figura 1. Hembra gestante y embriones de *Chapalichthys encaustus*. a. Hembra gestante. b. Ovario que contiene los embriones en su interior. c-g. Embriones de *C. encaustus* en estadios de desarrollo del 2 al 6. Se observa la trofotenia (t), una estructura que funciona en la toma de nutrientes. h. Cría de 1dpp en la cual se ha desprendido la trofotenia.

Cuadro 3. Características morfológicas de individuos en diferentes estadios de desarrollo. dpp, días pos parto.

Estadio	Longitud total (mm)	Características morfológicas	Número de individuos
2	3	Saco vitelino; trofotenia	5
3	5	Saco vitelino disminuido; trofotenia	5
4	7	Sin saco vitelino; trofotenia; desarrollo de los primordios de las aletas	5
5	10	Sin saco vitelino; trofotenia; aletas dorsal y ventral en continuidad con la aleta caudal	7
6	15	Sin saco vitelino; con trofotenia; aletas dorsal, ventral y caudal bien definidas	10
1dpp	16	Sin trofotenia	10

3. Microscopía de campo claro y electrónica

Con el fin de realizar el análisis morfológico y ultraestructural del desarrollo gonadal de *C. encaustus* se empleó la técnica convencional de microscopía de luz de alta resolución y electrónica de transmisión (TEM). Las regiones caudales de embriones en E2-E6, así como las gónadas aisladas de embriones en E4-E6 y de crías de 1dpp se fijaron en solución de Karnovsky (Paraformaldehído 1%-Glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4) (Karnovsky, 1965) durante 12 h a 4°C; se lavaron con amortiguador de cacodilatos (pH 7.3) y se posfijaron con tetróxido de Osmio (OsO₄) al 1% en amortiguador de Zetterqvist por 1 h. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en serie de alcoholes graduales (70-100%). Las muestras se pusieron en acetonitrilo por 40 min, en una mezcla de acetonitrilo-epón 812 (1:1) por 1 h, en acetonitrilo-epón (1:2) por 1 h, y finalmente se dejaron en epón puro durante toda la noche. Los tejidos se incluyeron en la resina Epón 812 y se polimerizaron a 60°C durante toda la noche. Se obtuvieron cortes semifinos y finos en un ultramicrotomo (Leica). Los cortes semifinos (1- 2 µm) se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes finos (600-900 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación al microscopio electrónico de transmisión JEOL.

4. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Inmunohistoquímica

Para la detección de la proteína Vasa en embriones en E2 y de las proteínas Sox9 y Foxl2 en regiones caudales de embriones en E2-E4, se empleó la técnica de inmunohistoquímica sobre secciones transversales. Las muestras se fijaron en una solución de Paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma, USA) en amortiguador salino de fosfatos (PBS, Phosphate-buffered saline, pH 7.1, Gibco) al 1% por 20 min, se lavaron con PBS y se dejaron toda la noche en una solución de Sacarosa (Sigma-Aldrich, USA) al 30% en PBS. Los tejidos se embebieron en medio OCT (Tissue-Tek 4583, Sakura Finetek, USA) y se congelaron en hexano (J. T. Baker) sobre hielo seco. Se obtuvieron cortes transversales seriados por congelación de 20 µm de grosor en un criostato (Leica).

Las secciones colocadas en cámara húmeda se trataron con PBS por 5 min y se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena (Blocking Reagent, Biocare Medical PX968MM). Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS (3 lavados de 5 min), se trataron con una

solución de Tritón (Sigma) 1X en PBS y se bloquearon con una solución de albúmina bovina (BSA, Albumin Bovine, Sigma-Aldrich) al 1% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Las secciones se incubaron por separado con los anticuerpos primarios específicos diluidos en BSA a 4°C durante toda la noche (cuadro 4). Subsecuentemente, después de tres lavados de 5 min con PBS, las secciones se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-conejo o anti-cabra acoplado a la peroxidasa de rábano (cuadro 5). Después de tres lavados de 5 min con PBS, las muestras se revelaron con diaminobenzidina (DAB Chromogen K3466, Dako), se montaron con una solución acuosa (Medio de montaje fluorescente; Dako Cytomation, USA), para su posterior observación con el microscopio óptico.

Cuadro 4. Anticuerpos primarios empleados para la localización de las proteínas Sox9, Foxl2 y Vasa por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Anticuerpo Primario	Origen	Marca y N° de catálogo	Dilución
Anti- Sox9	Policlonal generado en conejo	Anaspec 28139	1: 100
Anti- Foxl2	Policlonal generado en cabra	Abcam 5096	1: 200
Anti- Vasa	Policlonal generado en conejo	Abcam 13840	1: 250

Inmunofluorescencia sobre secciones

Con el fin de detectar la proteína Vasa en regiones caudales de embriones en estadios del 3 al 6 se realizó la técnica de inmunofluorescencia sobre secciones. La fijación de los tejidos y su procesamiento hasta la obtención de los cortes se realizó de forma similar a la descrita para la técnica de inmunohistoquímica. Una vez obtenidas las secciones, se colocaron en una cámara húmeda y se trataron con PBS durante 10 min, con Tritón 1X en PBS durante 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 2 h a TA. Las secciones se incubaron con el anticuerpo contra la proteína Vasa (cuadro 4) durante toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados de 5 min con PBS, las muestras se bloquearon con BSA durante 15 min, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo rodaminado (cuadro 5) por 1 h a TA, se lavaron nuevamente con PBS (4 lavados de 5 min) y se montaron con solución acuosa Dako.

Cuadro 5. Anticuerpos secundarios empleados para la localización de las proteínas Sox9, Foxl2 y Vasa por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Anticuerpo Secundario	Origen	Marca y N° de catálogo	Dilución
Anti- conejo acoplado a la peroxidasa endógena de rábano (HRP)	Generado en cabra	Invitrogen G 21234	1: 1000
Anti- cabra acoplado a la peroxidasa endógena de rábano (HRP)	Generado en conejo	Invitrogen G 11620	1: 500
Anti- conejo IgG Rodamina conjugado	Generado en cabra	Calbiochem 401321	1: 100
Anti-cabra IgG Rodamina conjugado	Generado en Conejo	Zymed 811614	1:100

Inmunofluorescencia en gónadas completas

Con el objetivo de detectar las proteínas Sox9, Foxl2 y Vasa en gónadas aisladas de embriones en E5 y E6 y de crías de 1dpp se empleó la técnica de inmunofluorescencia sobre gónadas completas. En general, el protocolo empleado fue similar al descrito previamente para inmunofluorescencia sobre secciones, con algunas modificaciones. Brevemente, las gónadas aisladas se fijaron en PFA 4% por 15 min, se lavaron con PBS y se incubaron en sacarosa al 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se lavaron con PBS, se trataron con Tritón 1X (en BSA al 0.1% en PBS) por 3 h y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios contra las proteínas Sox9, Foxl2 y Vasa (cuadro 4) diluidos en BSA durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS de 30 min, las gónadas se bloquearon con BSA al 1% durante 15 min y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo o anti-cabra rodaminado (cuadro 5), durante toda la noche a 4°C. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS de 1 h y las gónadas completas se montaron con solución acuosa Dako.

Se incluyeron controles negativos para los experimentos realizados tanto para la técnica de inmunohistoquímica como para la de inmunofluorescencia. Las muestras control se trataron con el mismo protocolo empleado para las muestras experimentales, incubadas sin el anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario correspondiente.

Las secciones de las regiones caudales y las gónadas completas procesadas mediante la técnica de inmunofluorescencia se observaron al microscopio confocal (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss) equipado con laser de Argón-Kriptón y Helio-Neón. Las imágenes se obtuvieron en un formato de archivo LSM.

5. Extracción de ARN total

Se obtuvieron los ovarios y testículos de ejemplares adultos de 9 y 12 meses pos parto (mpp) de *C. encaustus*, los cuales se congelaron inmediatamente en hielo seco con 100 µl de Trizol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA) y se almacenaron en un ultracongelador a -70°C. De igual forma, se obtuvieron y congelaron gónadas de ejemplares adultos de pez cebra, las cuales se emplearon como controles. Para la extracción del ARN total (ARNt) se empleó el método de Trizol/Cloroformo (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA).

La extracción consistió en cinco fases. **1. Homogeneización:** el tejido se homogeneizó en Trizol en un volumen de 500 µl de Trizol y se incubó por 15 min a 10°C. **2. Separación:** Se adicionaron 100 µl de Cloroformo (J. T. Baker), se incubó por 15 min a 10°C y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 30 min. **3. Precipitación:** la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf lavado con agua tratada con Di-Etil-Pirocarbonato (DEPC, Sigma) y se precipitó con 100 µl de Isopropanol (J. T. Baker) durante toda la noche a -20°C. **4. Lavado de ARNt:** para obtener el botón de ARNt y remover el sobrenadante, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min a 4°C. Posteriormente el botón (ARNt) se lavó con 200 µl de alcohol etílico al 80 % (J. T. Baker) en agua libre de RNAsas y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa se decantó y el botón de ARNt se dejó secar por 5 min. **5. Resuspensión del ARNt:** el botón que contiene el ARNt se disolvió en 20 a 30 µl de agua libre de RNAsas de acuerdo con el tamaño del botón.

La concentración de ARNt obtenido por muestra se cuantificó con un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf), usando una dilución de 1:100 (1 µl de la muestra en 100 µl de agua libre de RNAsas). Se realizaron lecturas de la absorbancia a 260 y 280 nanómetros (nm) para obtener la concentración y pureza. Para determinar la calidad del ARNt extraído se realizó una prueba de integridad, para lo cual se corrió 1 µg de ARNt en un gel de Agarosa (Gibco) al 1.5 %.

6. Tratamiento del ARN total con DNasa I

Las muestras de ARNt se trataron con la enzima DNasa I (Deoxyribonucleasa I, Invitrogen) con el fin de evitar la amplificación de ADN genómico. Se empleó 1 µg de ARN total, 1 µl de amortiguador de reacción (10X), 1U de la enzima DNasa I (1U/ µl) y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua libre de RNAsas. Las muestras se incubaron por 15 min a TA, posteriormente se adicionó 1 µl de EDTA (25 mM, pH 8.0, Sigma) y se incubaron a 65°C durante 10 min para inactivar la acción de la DNasa I.

7. Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Con el objeto de estudiar la expresión de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* se realizó la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa de un solo paso. Debido a que las secuencias de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* para *C. encaustus* no se encuentran disponibles en la base de datos del Gen Bank, no fue posible diseñar oligonucleótidos para esta especie. De manera que se realizaron ensayos para probar oligonucleótidos que amplifican estos genes en otras especies de peces teleósteos como el pez cebra, medaka y *Poecilia reticulata*. Se seleccionaron los oligonucleótidos reportados para el gen *sox9a* de pez cebra (Chiang *et al.*, 2001) y *foxl2* (Nakamoto *et al.*, 2006), *vasa* (Shinomiya *et al.*, 2000) y β -*actina* (Brunner *et al.*, 2001) de medaka. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados, la temperatura media (Tm) y el tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb) se presentan en el cuadro 6.

Se emplearon 500 ng de ARNt previamente tratado con DNasa I para la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes de interés, utilizando el kit Superscript One-Step (Invitrogen). Como control interno de expresión se realizó la amplificación de un fragmento del gen de β -*actina*. La RT-PCR se llevó a cabo empleando un volumen final de 20 µl de reacción: 10µl del amortiguador de reacción (2X Reaction Mix); 1.5 µl de oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido) a 10µM; 0.5 µl de la enzima RT/ Platinum Taq Mix; 500 ng de ARN total tratado con DNasa I; y el volumen restante se completó con agua libre de RNAsas. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf. Para establecer el programa de amplificación para cada uno de los genes de interés, se tomaron como base las condiciones de reacción reportadas para estos genes en el pez cebra o en medaka y se realizaron algunas modificaciones en la Tm y en el número de ciclos.

Para la amplificación del gen *sox9* se establecieron las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de 30 min a 50°C; 1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 40 seg, 58°C por 50 seg y 72°C por 70 seg, y finalmente 1 ciclo de 5 min a 72°C.

Para el gen *foxl2* las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 30 min a 50°C; 1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 40 seg, 55°C por 50 seg y 72°C por 70 seg, y por último 1 ciclo de 5 min a 72°C.

Para la amplificación del gen *vasa* se establecieron las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de 30 min a 50°C; 1 ciclo de 5 min a 94°C; 40 ciclos de 94°C por 40 seg, 60°C por 50 seg y 72°C por 70 seg, y por último 1 ciclo de 5 min a 72°C.

Para el gen de *β-actina* las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 30 min a 50°C; 1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 40 seg, 58°C por 50 seg y 72°C por 70 seg, y finalmente 1 ciclo de 5 min a 72°C. Como controles negativos se emplearon muestras con la mezcla de reacción sin ARNt. Se realizaron tres experimentos para cada gen empleando diferentes muestras.

Cuadro 6. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes *sox9*, *foxl2*, *vasa* y *β-actina* por RT-PCR. pb, pares de bases; Tm, temperatura media

Gen	Oligonucleótidos	pb	Tm	Referencia
<i>sox9a</i>	1: CGGTGAAGAACGGCCAGAGC 2: CTGTAGAGTCAGCAATGGGT	758	58°C	Chiang <i>et al.</i> , 2001
<i>foxl2</i>	1: GCGATGATGGCCACTTACAAAGTA 2: AATATCAATCCTCGTGTGCAAAGC	921	55°C	Nakamoto <i>et al.</i> , 2006
<i>vasa</i>	1: CGCATGTTGGACATGGCGTTC 2: GTTCTCCCGATGCGGTGGAC	545	60°C	Shinomiya <i>et al.</i> , 2000
<i>β-actina</i>	1: GGGTCAGAAGGATTCCTATG 2: GGTCTCAAACATGATCTGGG	349	58°C	Brunner <i>et al.</i> , 2001

8. Electroforesis

Los productos de las reacciones de RT-PCR se analizaron por electroforesis en un gel de Agarosa al 1% en TAE 1X (48.4 g de Tris base, 11.5 ml de Ácido Acético, 20 ml de EDTA 0.5 M, pH 8 y agua desionizada), con Bromuro de Etidio (0.25 mg/ml, Bio-Rad) que se corrió a 100 Volts. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid (Polaroid, Waltham, MA) y una película Fuji FP asa 100B.

9. Purificación y secuenciación

Los fragmentos de ADNc de *sox9*, *foxl2* y *vasa* amplificados por RT-PCR se purificaron empleando el kit QI Quick Gel Extraction (QIAGEN). La purificación del ADNc de *sox9* y *vasa* se llevó a cabo a partir de las bandas obtenidas de un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X. Por otra parte, la purificación del ADNc de *foxl2* se realizó directamente a partir del producto de la reacción de RT-PCR.

Con el fin de corroborar la presencia del producto, se corrieron 4 µl de ADNc purificado en un gel de agarosa al 2%. La secuencia de oligonucleótidos de ADNc purificado para cada gen se obtuvo utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE, Applied Biosystems) en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se empleó 1 µg del producto purificado, 1 µmol del oligonucleótido sentido y del oligonucleótido antisentido. Las secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en el Gen Bank utilizando el programa BlastN 2.2.17 (Zhang *et al.*, 2007) disponible en la página electrónica <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

VII. RESULTADOS

1. Morfogénesis gonadal y diferenciación sexual

El proceso de diferenciación sexual morfológica de la gónada en *C. encaustus* se dividió en tres etapas: **gónada indiferenciada**, la cual incluye a embriones en estadios de desarrollo 2 (E2) y 3 (E3); **gónada en diferenciación**, que ocurre durante los estadios 4 (E4) y 5 (E5); y **gónada diferenciada**, etapa en la cual se puede distinguir un ovario o un testículo y se observa en el estadio 6 (E6) y al momento del nacimiento (1dpp).

1.1 Gónada indiferenciada

En cortes transversales de la región caudal de embriones en E2 (Fig. 2a), las gónadas aparecen como estructuras pareadas ubicadas sobre el epitelio celómico, entre los riñones en desarrollo y el intestino (Fig. 2b). Este estadio corresponde a una etapa temprana de desarrollo gonadal, específicamente a la formación del primordio gonadal, el cual está conformado por células germinales de gran tamaño y de forma redondeada a ovalada y algunas células somáticas (Fig. 2c). En cortes finos del primordio gonadal en sección transversal, se observa generalmente una célula germinal rodeada por varias células somáticas (Fig. 2d). El citoplasma de las células germinales contiene abundantes mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplasmático escaso y un material electrodensito conocido como nuage, el cual generalmente está asociado a mitocondrias; el núcleo contiene cromatina granular fina y generalmente un nucléolo (Fig. 2e). Las células somáticas que rodean a las células germinales son de forma irregular y tienen extensiones citoplasmáticas; su núcleo contiene heterocromatina y de uno a dos nucléolos (Fig. 2f, g).

En secciones transversales de embriones en E3, la gónada se observa en la región media, en cercanía al intestino (Fig. 3a); y se ubica sobre la vejiga natatoria en desarrollo (Fig. 3b, c). Esta etapa corresponde al establecimiento de la gónada indiferenciada bipotencial, la cual está constituida por células germinales y células somáticas (Fig. 3c). Las células germinales han aumentado en número respecto al estadio anterior y ultraestructuralmente presentan características de células germinales indiferenciadas, con núcleo grande y redondo, cromatina finamente granular (Fig. 3d-f) y generalmente un nucléolo (Fig. 3e). Las células somáticas son de forma irregular y de acuerdo a su posición en la gónada se clasificaron en periféricas e internas (Fig. 3d). Las células somáticas periféricas se observan en relación con la cavidad celómica (Fig. 3d) y las células somáticas internas se encuentran en cercanía a las células germinales (Fig. 3d, f).

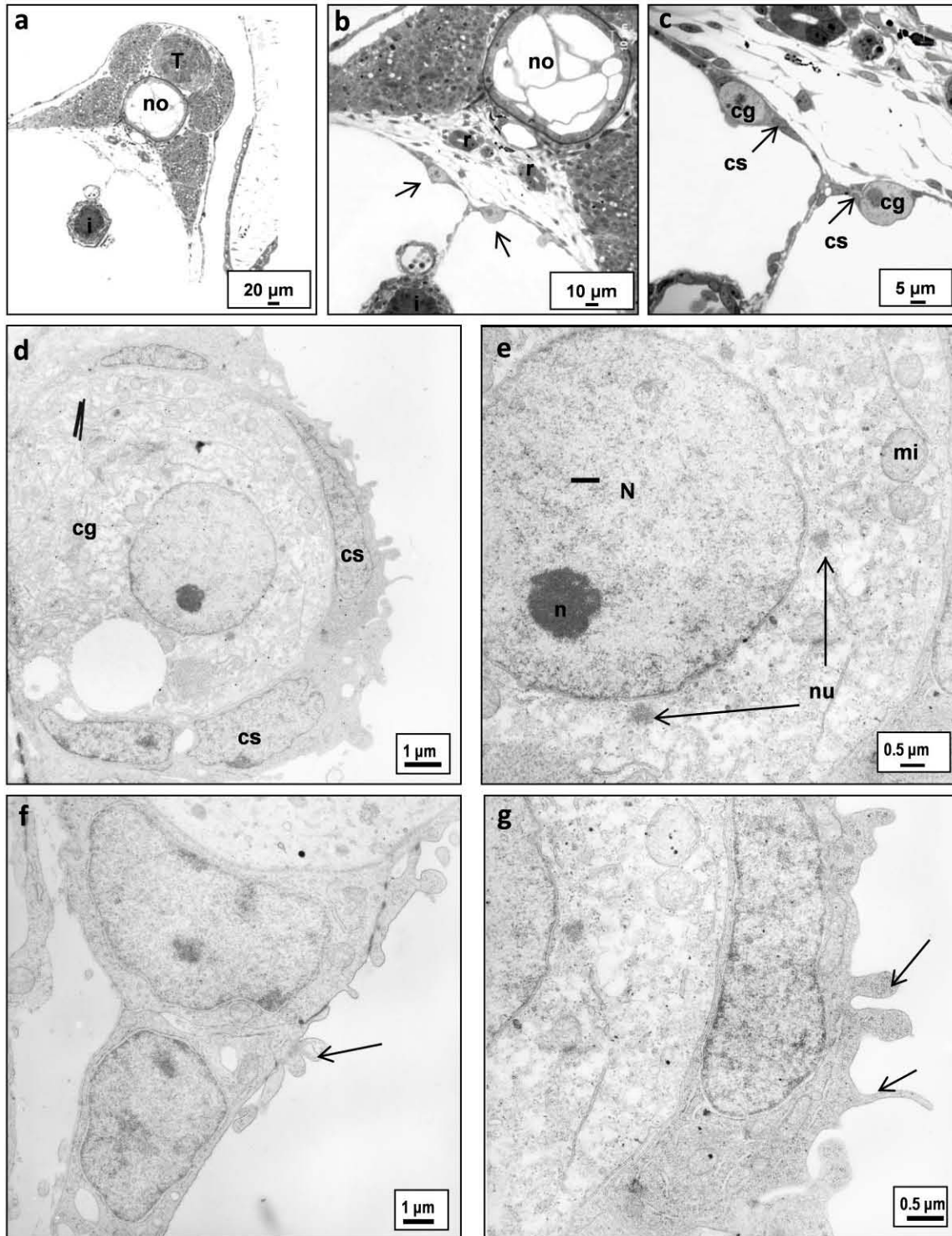


Figura 2. Primordio gonadal de *Chapalichthys encaustus* (E2). a. Corte transversal de un embrión en E2 en el que se observan diferentes estructuras embrionarias en desarrollo. b. Los primordios gonadales se ubican sobre el epitelio celómico (flechas). c. Detalle del primordio gonadal en el que se observan las células germinales (CG) y somáticas. d. Micrografía electrónica del primordio gonadal con una CG primordial rodeada por varias células somáticas. e. Detalle ultraestructural de una CG. f, g. Células somáticas con prolongaciones citoplasmáticas (flechas) y núcleo irregular que contiene heterocromatina. **cg**, célula germinal; **cs**, célula somática; **i**, intestino; **mi**, mitocondria; **N**, núcleo; **n**, nucléolo; **no**, notocorda; **nu**, nuage; **r**, riñón en desarrollo; **T**, tubo neural.

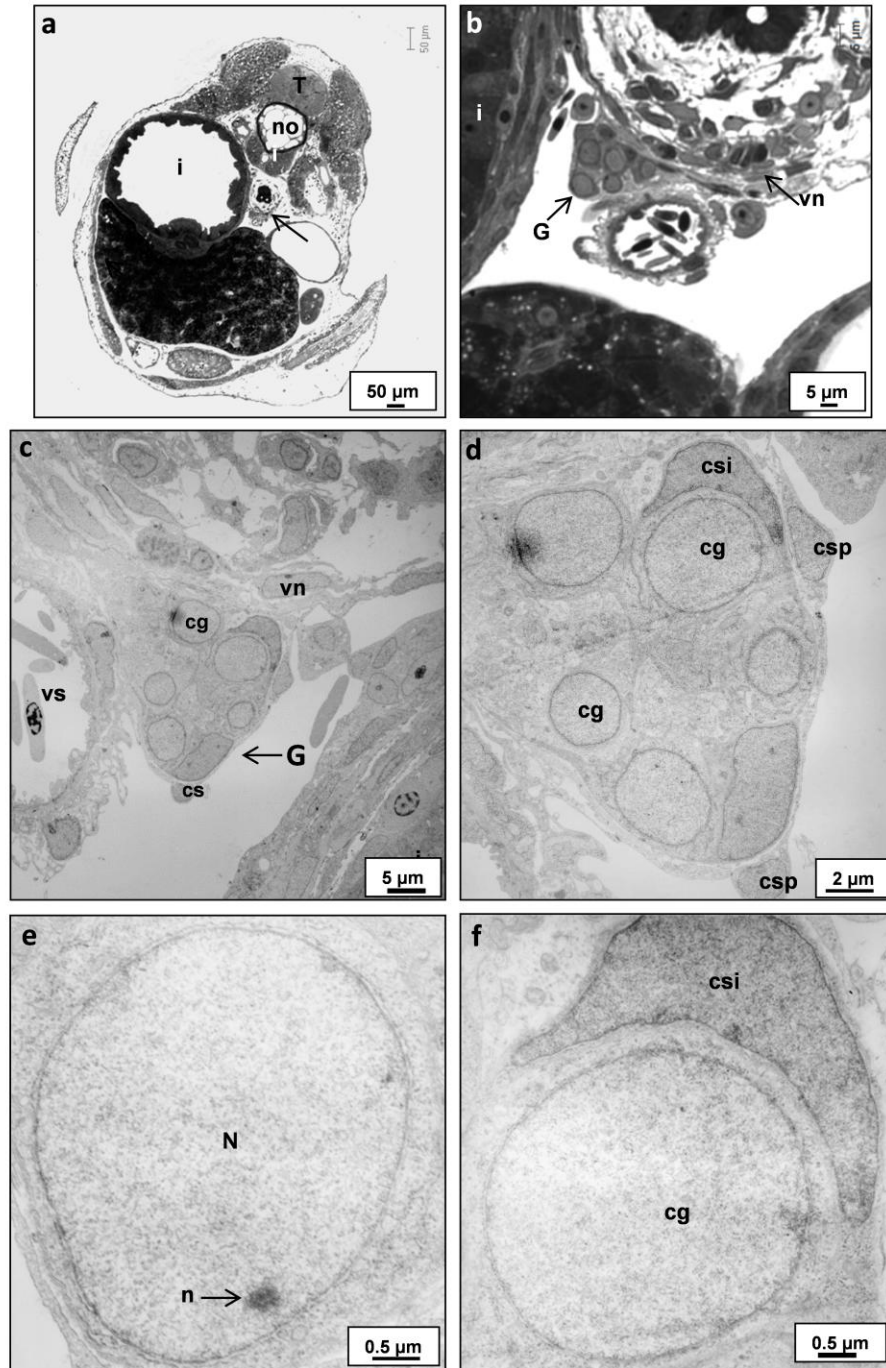


Figura 3. Establecimiento de la gónada indiferenciada en *Chapalichthys encaustus* (E3). a. Corte transversal de un embrión en E3 donde se observan diferentes órganos en desarrollo, incluyendo la vejiga natatoria (flecha). b. Detalle de "a" en el que se observa la gónada indiferenciada ubicada sobre la vejiga natatoria en desarrollo y en cercanía al intestino. c. Micrografía electrónica de la gónada conformada por varias CG y somáticas. d. Detalle de la gónada en el que se observan las CG y los dos tipos de células somáticas: periféricas (csp) e internas (csi). e. Detalle ultraestructural de una CG con características de células indiferenciadas. f. Célula somática interna en proximidad a una CG. **cg**, célula germinal; **cs**, célula somática; **csi**, célula somática interna; **csp**, célula somática periférica; **G**, gónada; **i**, intestino; **N**, núcleo; **n**, nucléolo; **no**, notocorda; **T**, tubo neural; **vn**, vejiga natatoria; **vs**, vaso sanguíneo.

1.2 Gónada en diferenciación

Durante los estadios 4 y 5 la gónada está en transición hacia la diferenciación. En secciones transversales de gónadas aisladas de embriones en E4 (Fig. 4a) se observan algunas células germinales indiferenciadas y abundantes células somáticas (Fig. 4b), similar a lo observado en el estadio 3. Sin embargo, algunas gónadas aisladas mediante microdissección y analizadas en secciones longitudinales (Fig. 4c, d), contienen abundantes células germinales en división (Fig. 4e), algunas de las cuales se observan en grupos rodeados por células somáticas (Fig. 4f). Las células germinales que no están en división (indiferenciadas) tienen rasgos ultraestructurales similares a los de células germinales de estadios más tempranos (E2 y E3), es decir, un núcleo con cromatina fina distribuida homogéneamente y uno a dos nucléolos prominentes. De igual forma, se observan mitocondrias y nuage en el citoplasma (Fig. 4g). Las células somáticas en cercanía a las células germinales indiferenciadas tienen núcleos de forma irregular con heterocromatina (Fig. 4g). Las células germinales en división tienen una distribución heterogénea de la cromatina (Fig. 4h).

En secciones transversales de la región caudal de embriones en E5 se observa la gónada ubicada entre el intestino y la vejiga natatoria, suspendida a esta última por un mesenterio (Fig. 5a). En secciones longitudinales de gónadas aisladas (Fig. 5b, c) se observan células germinales en división y células germinales que no están en división (indiferenciadas) (Fig. 5d). Tanto las células germinales en división como las células germinales indiferenciadas forman grupos rodeados por células somáticas (Fig. 5e, f). Durante este estadio de desarrollo se observa más claramente una compartimentalización de la gónada de acuerdo con las características de las células germinales, es decir, grupos de células germinales meióticas (Fig. 5e) y grupos de células germinales indiferenciadas (Fig. 5f). Ultraestructuralmente, la meiosis se evidenció por la presencia de complejos sinaptonémicos (Fig. 5g). Por otra parte, las células germinales indiferenciadas tienen rasgos similares a las células germinales de gónadas indiferenciadas (E2 y E3), es decir, mitocondrias y nuage en el citoplasma y un núcleo con una distribución homogénea de la cromatina (Fig. 5h) que contiene uno o dos nucléolos.

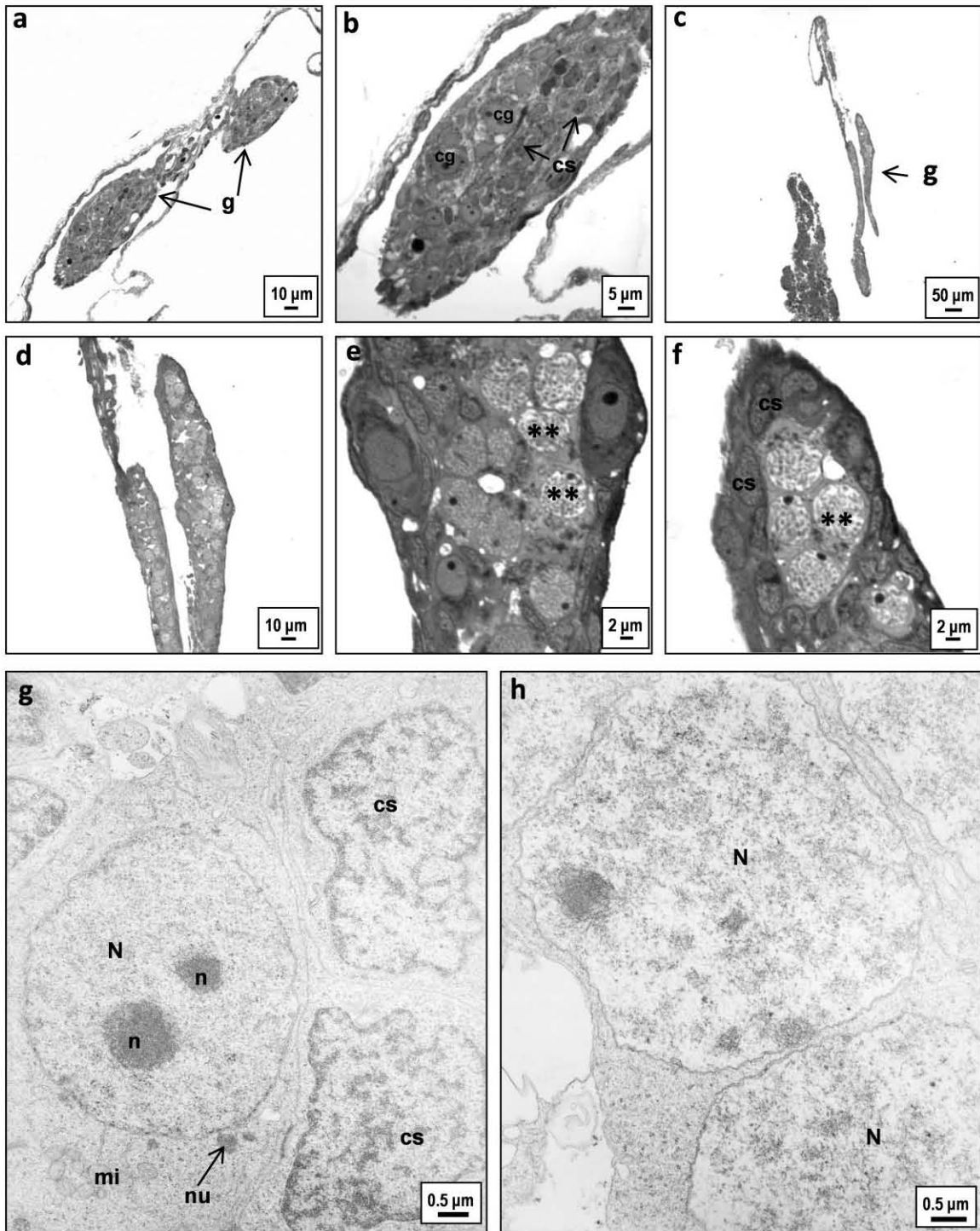


Figura 4. Gónada en diferenciación de *Chapalichthys encaustus* (E4). a. Gónada aislada en sección transversal. b. Detalle de “a” que muestra la gónada con algunas CG y abundantes células somáticas. c. Corte longitudinal de una gónada aislada mediante microdissección. d. Detalle de “c” en la que se observan los dos lóbulos de la gónada. e. CG en división (**). f. Grupo de CG en división (**) rodeado por células somáticas. g. Ultraestructura de una CG indiferenciada en cercanía a dos células somáticas. h. Ultraestructura de una CG en división, se observa una distribución heterogénea de la cromatina. **cg**, célula germinal; **cs**, célula somática; **g**, gónada; **mi**, mitocondria; **N**, núcleo; **n**, nucléolo; **nu**, nuage.

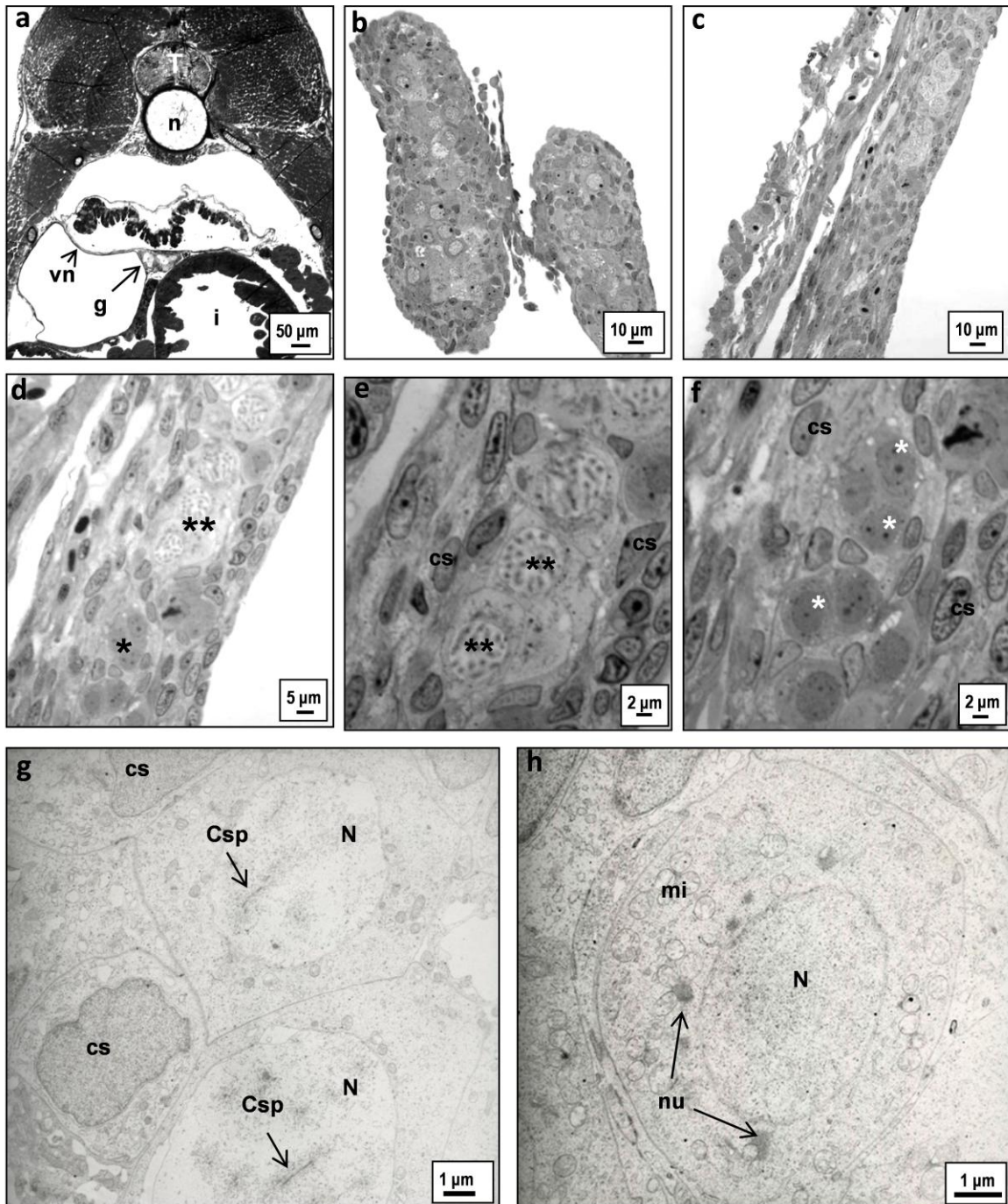


Figura 5. Gónada en diferenciación de *Chapalichthys encaustus* (E5). a. Sección transversal de una región caudal embrionaria en la que se observa la gónada suspendida del mesenterio de la vejiga natatoria b, c. Gónadas aisladas en sección longitudinal; los dos lóbulos que conforman la gónada se observan claramente en b. d. Detalle de "c" en el cual se observan grupos de CG en división (**), y grupos de CG indiferenciadas (que no están en división) (*). e. Grupo de CG en división (**) rodeado por células somáticas. f. Grupo de CG indiferenciadas (*) rodeados por células somáticas. g. Ultraestructura de una CG en división; se observan los complejos sinaptonémicos en el núcleo indicadores de meiosis. h. Ultraestructura de una CG indiferenciada con nuage asociado a mitocondrias. cg, célula germinal; cs, célula somática; csp, complejos sinaptonémicos; g, gónada; i, intestino; mi, mitocondria; N, núcleo; no, notocorda; nu, nuage; T, tubo neural; vn, vejiga natatoria.

1.3 Gónada diferenciada

Las gónadas de embriones clasificados en E6, es decir embriones a término, se encuentran ya diferenciadas, es decir es posible distinguir morfológicamente un ovario (Fig. 6) de un testículo (Fig. 7).

Diferenciación ovárica

En los ovarios en desarrollo de embriones en E6 (Fig. 6a) y de crías de 1dpp (Fig. 6b) las células germinales se localizan a lo largo de la gónada, la cual es una estructura compacta que aún no presenta una cavidad o lumen. Las células germinales corresponden principalmente a ovocitos en etapa de previtelogénesis, específicamente en los estadios de cromatina-nucléolo y perinucléolos (Fig. 6c, d, e), los cuales están rodeados por una capa de células foliculares planas, constituyendo los folículos ováricos (Fig. 6d). Ultraestructuralmente, el citoplasma de los ovocitos en desarrollo contiene nuage en cercanía con la membrana nuclear (Fig. 6g). De igual forma, se observaron grupos de ovocitos en meiosis, la cual se evidenció por la presencia de los complejos sinaptonémicos (Fig. 6f, h).

Diferenciación testicular

En los testículos en desarrollo de embriones en E6 (Fig. 7a) y de crías de 1dpp (Fig. 7b) se observa un arreglo morfológico lobular, característico de la diferenciación testicular (Fig. 7c); sin embargo, aún no se ha formado el conducto eferente. En su interior, los lóbulos testiculares están conformados por células germinales (espermatogonias) y células somáticas (Sertoli), y se encuentran rodeados por células somáticas con núcleos alargados que corresponden a células peritubulares (Fig. 7d). A nivel ultraestructural se observan las espermatogonias en proximidad a células somáticas de Sertoli (Fig. 7e, 7f). Las espermatogonias contienen un núcleo grande y redondo, generalmente con un nucléolo; en el citoplasma se observan abundantes mitocondrias y nuage. Las células de Sertoli en diferenciación tienen un núcleo de forma irregular (Fig. 7e). Rodeando las estructuras lobulares se observan células peritubulares y en el estroma se encuentran fibroblastos (Fig. 7e).

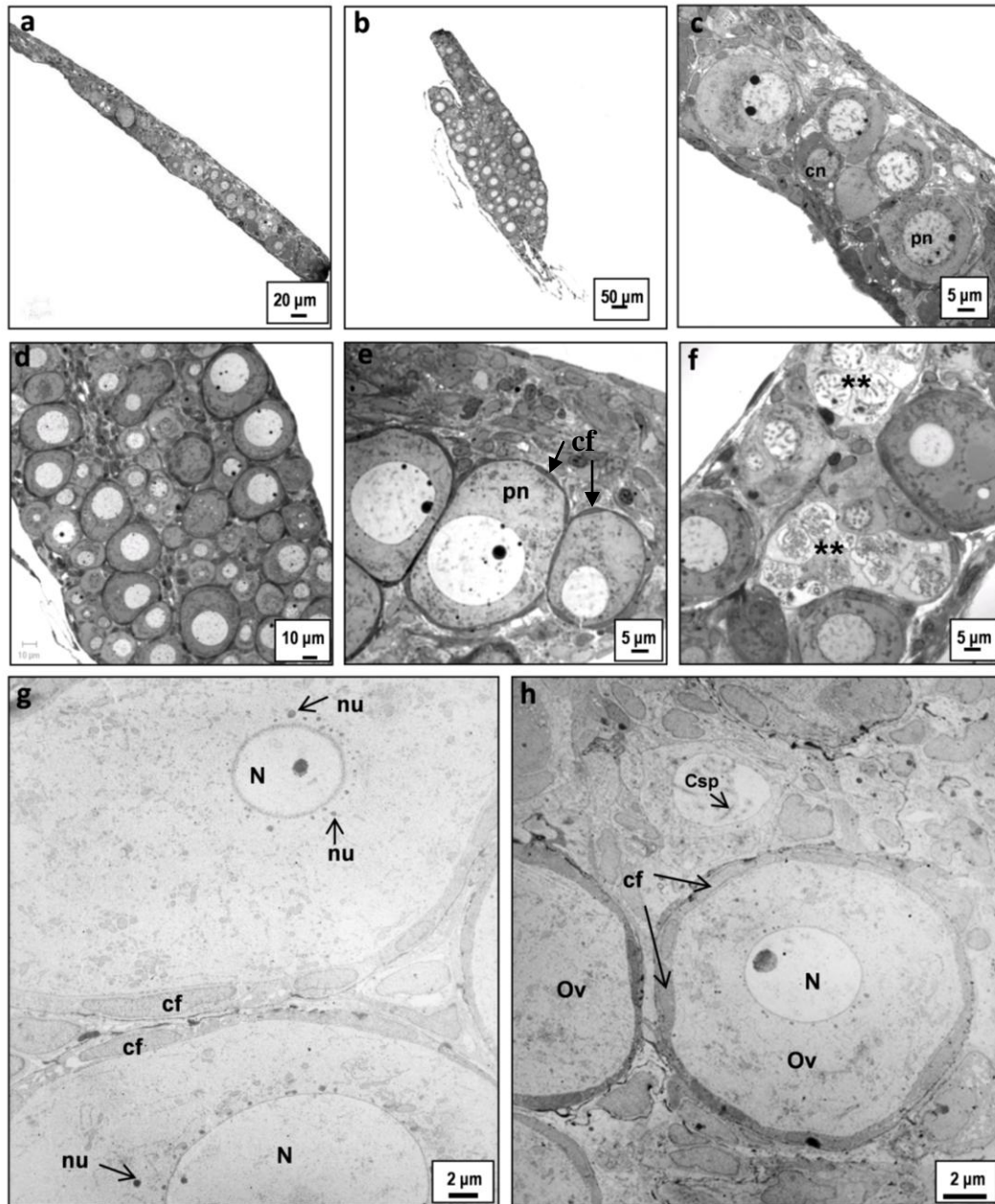


Figura 6. Gónada diferenciada de *Chapalichthys encaustus*: ovario. **a.** Sección longitudinal de un ovario aislado de un embrión en E6. **b.** Sección longitudinal de un ovario aislado de una cría de 1dpp. **c-d.** Detalle de “a” y “b” respectivamente en el que se observan ovocitos en etapas de cromatina-nucléolo y perinucléolos. **e.** Ovocitos rodeados por células foliculares planas conformando los folículos ováricos. **f.** Grupos de ovocitos en meiosis (**). **g.** Sección fina de dos ovocitos rodeados por células foliculares. **h.** Sección fina de un ovario en desarrollo en el que se observan los folículos ováricos, un ovocito en meiosis, y abundantes células en el estroma cuyos núcleos son de forma irregular. **cf**, células foliculares; **cn**, ovocito en etapa de cromatina-nucléolo; **csp**, complejos sinaptonémicos; **N**, núcleo; **nu**, nuage; **pn**, ovocito en etapa de perinucléolos.

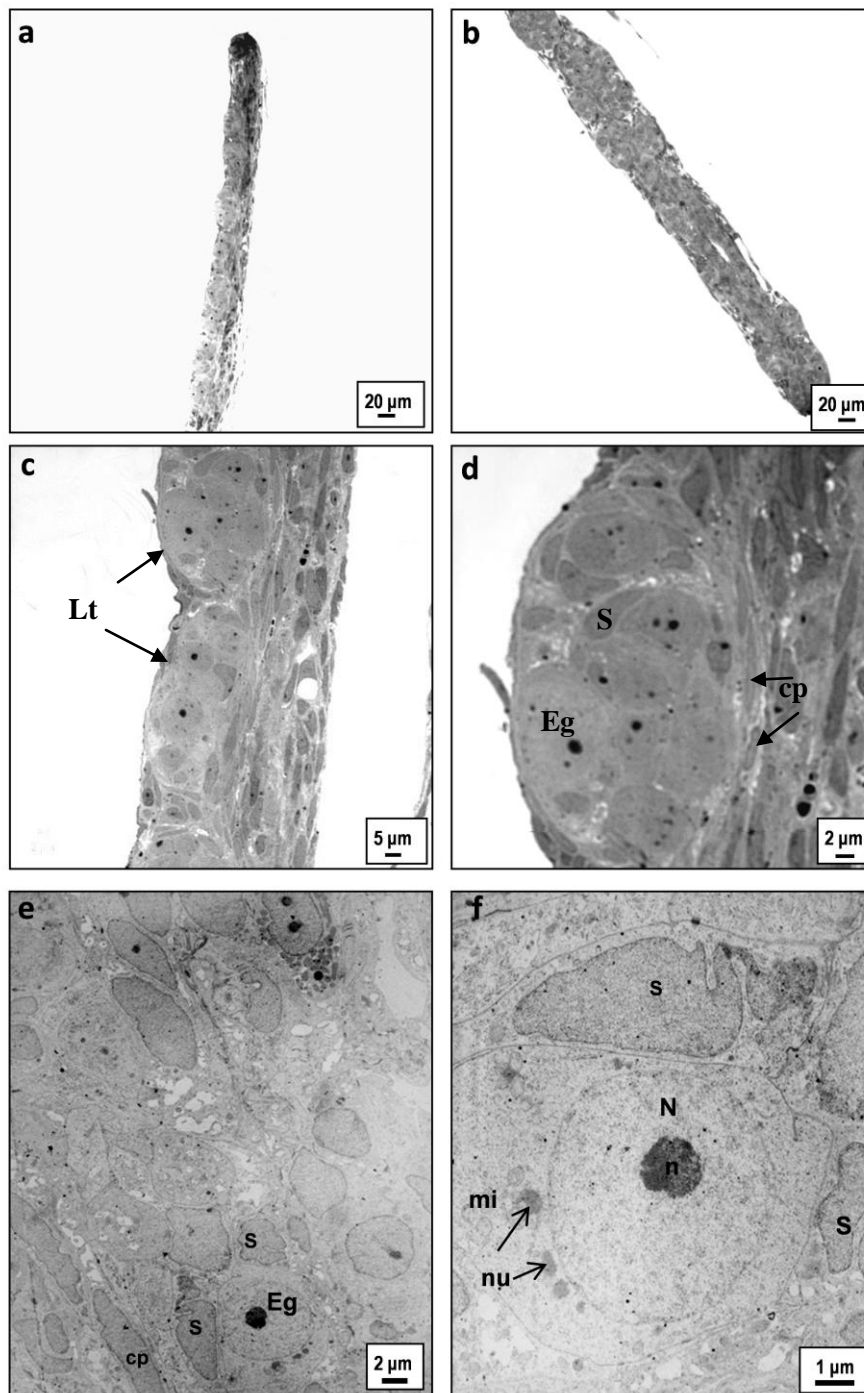


Figura 7. Gónada diferenciada de *Chapalichthys encaustus*: testículo. **a.** Sección longitudinal de un testículo aislado de un embrión en E6. **b.** Sección longitudinal de un testículo aislado de una cría de 1 dpp. **c.** Lóbulos testiculares en desarrollo. **d.** Detalle de un lóbulo testicular en un embrión en E6 compuesto por espermatogonias y células somáticas (Sertoli), rodeados por células peritubulares. **e.** Sección fina en la que se observan espermatogonias, células de Sertoli y algunas células peritubulares. **f.** Sección fina de una espermatogonia en proximidad a dos células de Sertoli. **cp**, células peritubulares; **Eg**, espermatogonia; **Lt**, lóbulos testiculares; **N**, núcleo; **n**, nucléolo; **nu**, nuage; **mi**, mitocondrias; **S**, células de Sertoli.

2. Detección de proteínas

2.1 Sox9

La proteína Sox9 se detectó en la gónada de embriones en los diferentes estadios de desarrollo estudiados. En el primordio gonadal (E2), Sox9 se detectó en las células germinales (Fig. 8a). En la gónada indiferenciada de embriones en E3, Sox9 se detectó en las células germinales así como en algunas células somáticas (Fig. 8b). En cortes transversales de embriones en E4, Sox9 se detectó en células somáticas y germinales de la gónada en diferenciación (Fig. 8c). En gónadas en diferenciación aisladas de embriones en E5 y analizadas por inmunofluorescencia (Fig. 8d), Sox9 se localizó las células germinales (Fig. 8e, f), así como en algunas células somáticas (Fig. 8f).

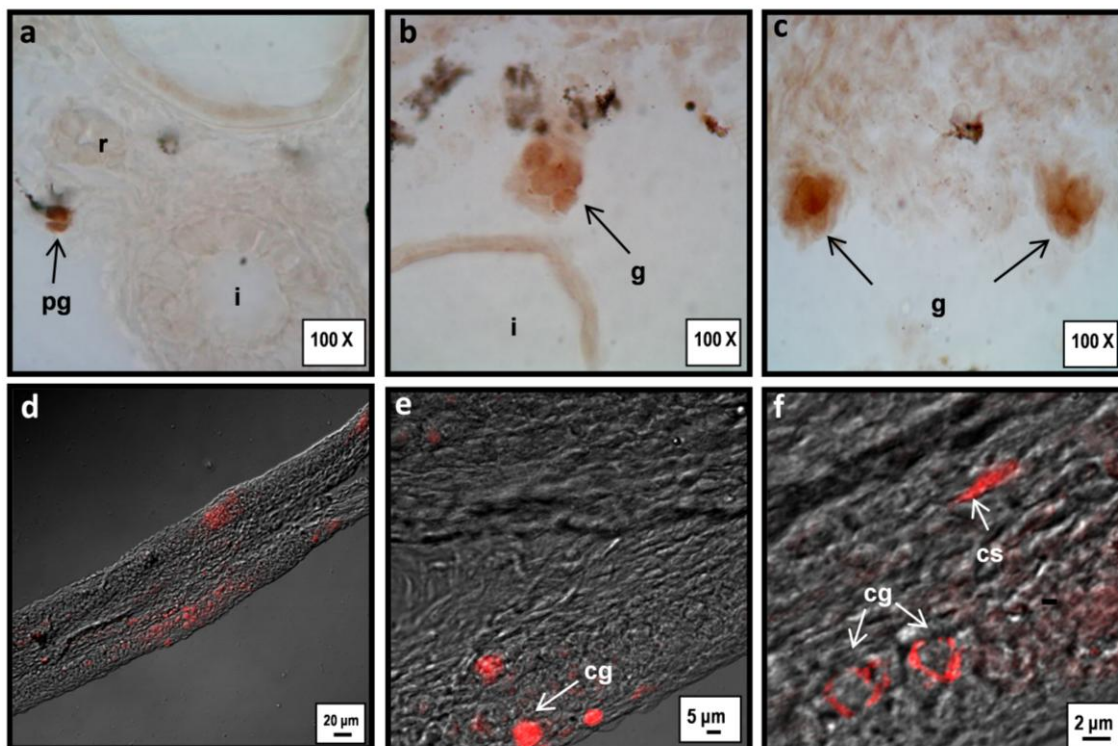


Figura 8. Detección de la proteína Sox9 en la gónada indiferenciada y en diferenciación de *Chapalichthys encaustus*. **a.** Detección por inmunohistoquímica de Sox9 en el primordio gonadal de un embrión en E2. **b.** Detección de Sox9 en la gónada indiferenciada de un embrión en E3 mediante inmunohistoquímica. **c.** Detección de Sox9 en cortes transversales de la gónada en diferenciación de un embrión en E4. **d-f.** Inmunofluorescencia sobre gónadas en diferenciación aisladas de embriones en E5. Sox9 se observa en las células germinales (e, f) y en algunas células somáticas (f). **cg**, células germinales; **cs**, células somáticas; **g**, gónada; **pg**, primordio gonadal; **i**, intestino; **r**, riñón en desarrollo.

En la gónada diferenciada (E6) Sox9 se detectó tanto en el testículo (Fig. 9a-c) como en el ovario (Fig. 9d-f). En el testículo se detectó en las células somáticas en los lóbulos testiculares, las cuales pueden corresponder a células de Sertoli (Fig. 9c). En el ovario, la expresión se observó en los ovocitos en desarrollo, los cuales corresponden a ovocitos previtelogénicos (Fig. 9e, f).

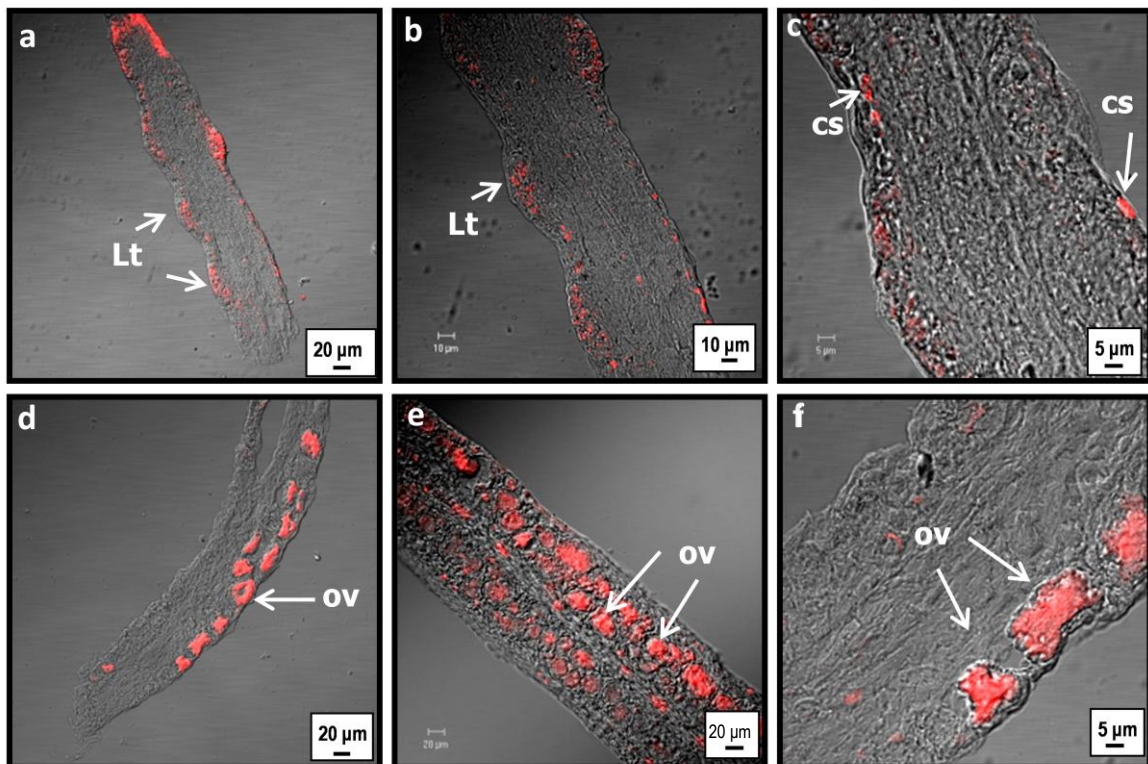


Figura 9. Detección de la proteína Sox9 en la gónada diferenciada de *Chapalichthys encaustus*. a-c. Detección por inmunofluorescencia de Sox9 en un testículo en desarrollo aislado de un embrión en E6. Se observan los lóbulos testiculares (a, b), en los cuales se detecta la marca de Sox9 en las células somáticas (c). d-f. Inmunofluorescencia en un ovario en desarrollo aislado de un embrión en E6. Se observan los ovocitos previtelogénicos localizados a lo largo del ovario positivos a Sox9 (d, e); la proteína se localizó en el citoplasma de los ovocitos (f). cs, células somáticas; Lt, lóbulos testiculares; ov, ovocitos.

2.2 Foxl2

La expresión de la proteína Foxl2, un marcador ovárico, se analizó en las diferentes etapas de desarrollo gonadal. Mediante inmunohistoquímica, en cortes transversales de la región caudal embrionaria no se detectó Foxl2 durante la etapa de gónada indiferenciada (E2 y E3), ni en la gónada en diferenciación de embriones en E4. Sin embargo, mediante inmunofluorescencia sobre gónadas completas en diferenciación aisladas de embriones en E5, la proteína Foxl2 se detectó en el citoplasma de las células germinales (Fig. 10a, b) y en algunas células somáticas (Fig. 10b). En la gónada diferenciada, se detectó solamente en el ovario (Fig. 10c), específicamente en el citoplasma de los ovocitos previtelogénicos y en algunas células somáticas que pueden corresponder a células foliculares (Fig. 10d, e). En el testículo en desarrollo no se observó expresión (Fig. 10f).

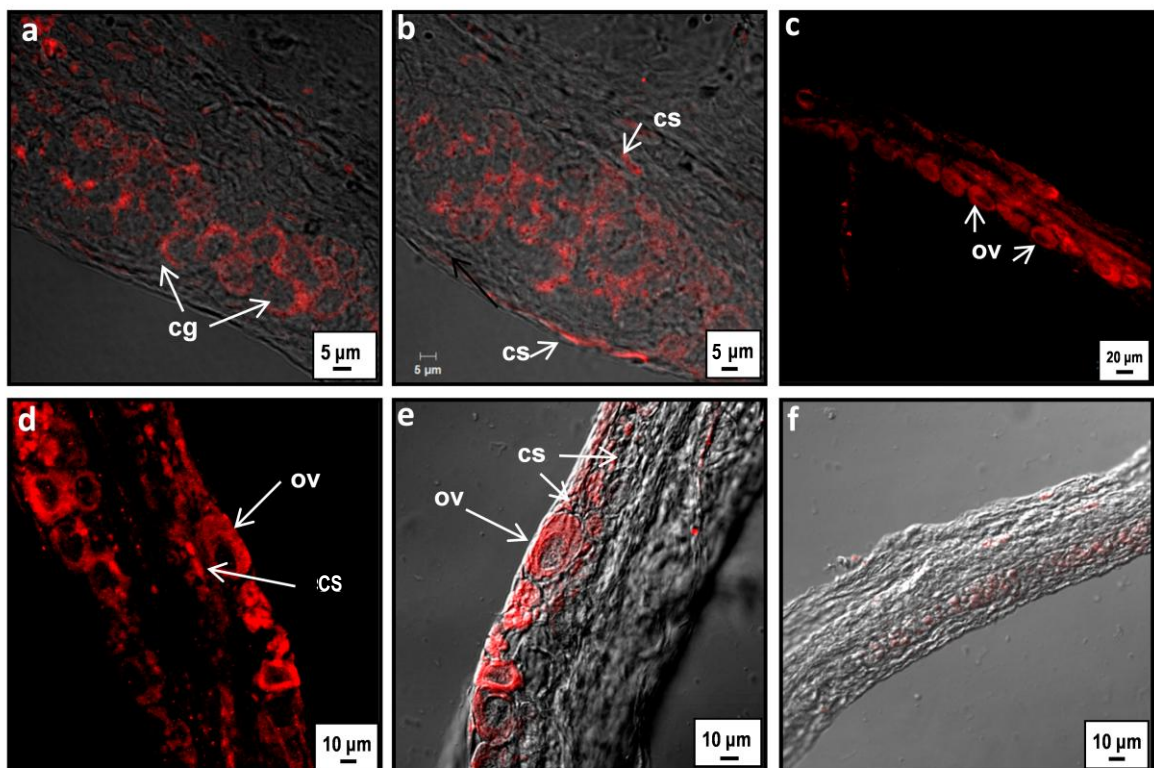


Figura 10. Detección de la proteína Foxl2 en la gónada en diferenciación y diferenciada de *Chapalichthys encaustus*. a-b. Detección por inmunofluorescencia de Foxl2 en una gónada aislada de un embrión en E5. Foxl2 se localizó en el citoplasma de las células germinales (a, b) y en el núcleo de algunas las células somáticas (b). c-e. Inmunofluorescencia para Foxl2 en un ovario aislado de un embrión en E6. La proteína se localizó en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos y en algunas células somáticas (d, e). f. Testículo aislado de un embrión en E6 en el cual no se detectó Foxl2. **cg**, células germinales; **cs**, células somáticas; **ov**, ovocitos.

2.3 Vasa

La proteína Vasa, un marcador de la línea germinal, se detectó en las gónadas de embriones en todos los estadios de desarrollo analizados en este estudio (E2-E6 y 1dpp), así como en las distintas etapas de desarrollo gonadal (Fig. 11 y 12). La expresión de Vasa se evidenció en las células germinales del primordio gonadal de embriones en E2 (Fig. 11a, b) y de la gónada indiferenciada ubicada sobre la vejiga natatoria en embriones en E3 (Fig. 11c, d). De igual forma, Vasa se observó en la gónada en diferenciación (E4 y E5) (Fig. 11 e-i), adyacente a la vejiga natatoria (Fig. 11e, g), particularmente en las células germinales (Fig. 11f). En gónadas en diferenciación aisladas de embriones en E5 (Fig. 11h), se observó la localización de Vasa específicamente en el citoplasma de las células germinales (Fig. 11i).

En la gónada diferenciada, Vasa se encontró tanto en ovarios (Fig. 12 a-c) como en testículos (Fig. 12 d-f). En los ovarios de embriones en E6 (Fig. 12a) y crías de 1dpp (Fig. 12b), Vasa se detectó en los ovocitos en desarrollo (previtelogénicos), específicamente en el citoplasma de estos ovocitos (Fig. 12c). En testículos de embriones en E6 (Fig. 12 d, e) y de crías de 1dpp (Fig.12f), Vasa se observó en las espermatogonias, las cuales forman un arreglo lobular característico.

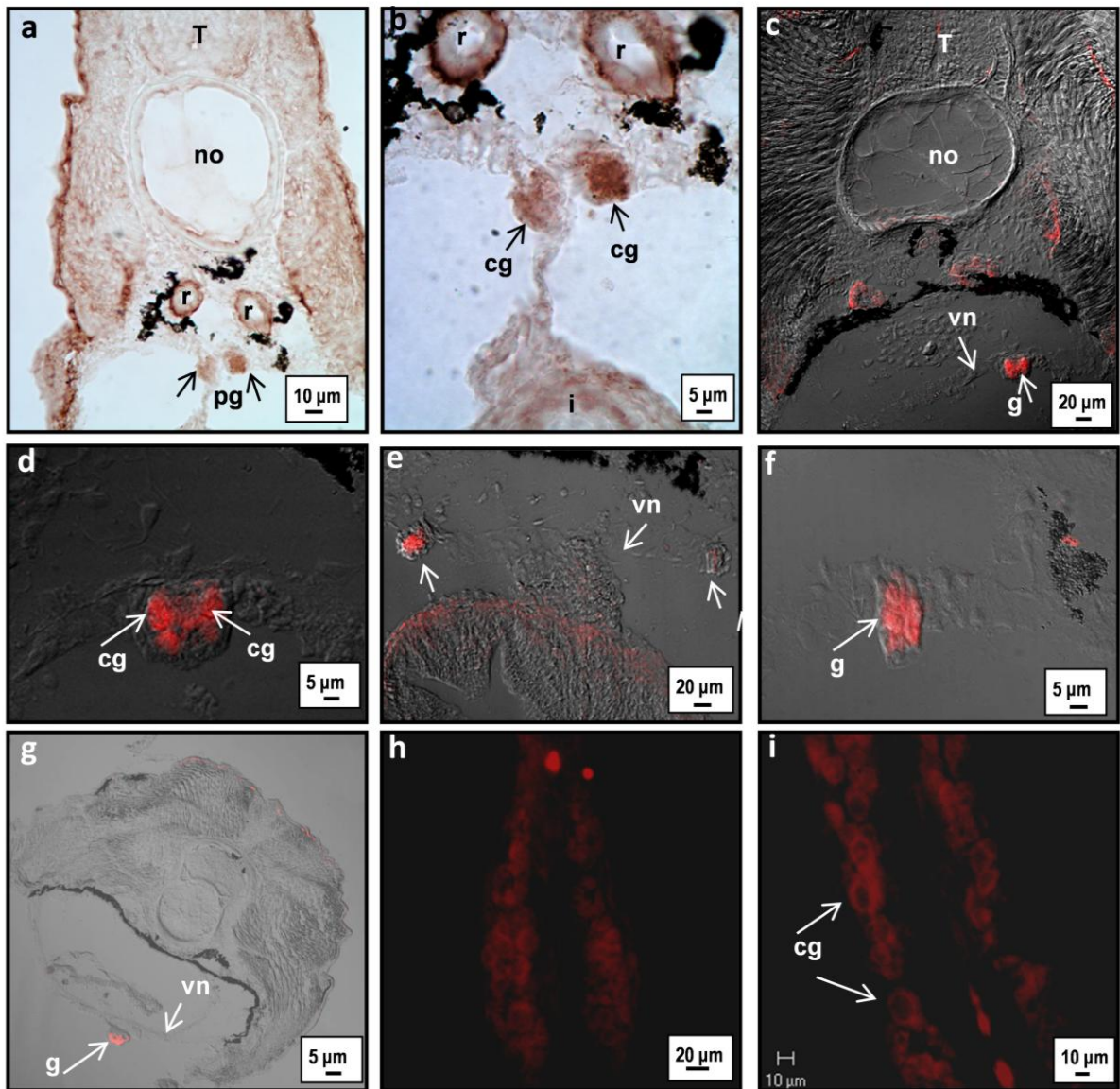


Figura 11. Detección de la proteína Vasa en la gónada indiferenciada y en diferenciación de *Chapalichthys encaustus*. a-d. Detección de Vasa en la gónada indiferenciada (E2 y E3). a, b. Inmunohistoquímica en secciones transversales de un embrión en E2. Vasa se detectó en el primordio gonadal (a), específicamente en las células germinales (b). c, d. Inmunofluorescencia en secciones transversales de un embrión en E3. Vasa se detectó en la gónada (c), específicamente en las células germinales (d). e-i. Inmunofluorescencia en gónadas en diferenciación (E4 y E5). Vasa se detectó en la gónada en cortes transversales de embriones en E4 (e) y E5 (g) y es específica de las células germinales (f). En gónadas aisladas de embriones en E5, la proteína se localizó en las células germinales (h), específicamente en el citoplasma (i). **cg**, células germinales; **g**, gónada; **i**, intestino; **pg**, primordio gonadal; **no**, notocorda; **r**, riñón; **T**, tubo neural; **vn**, vejiga natatoria.

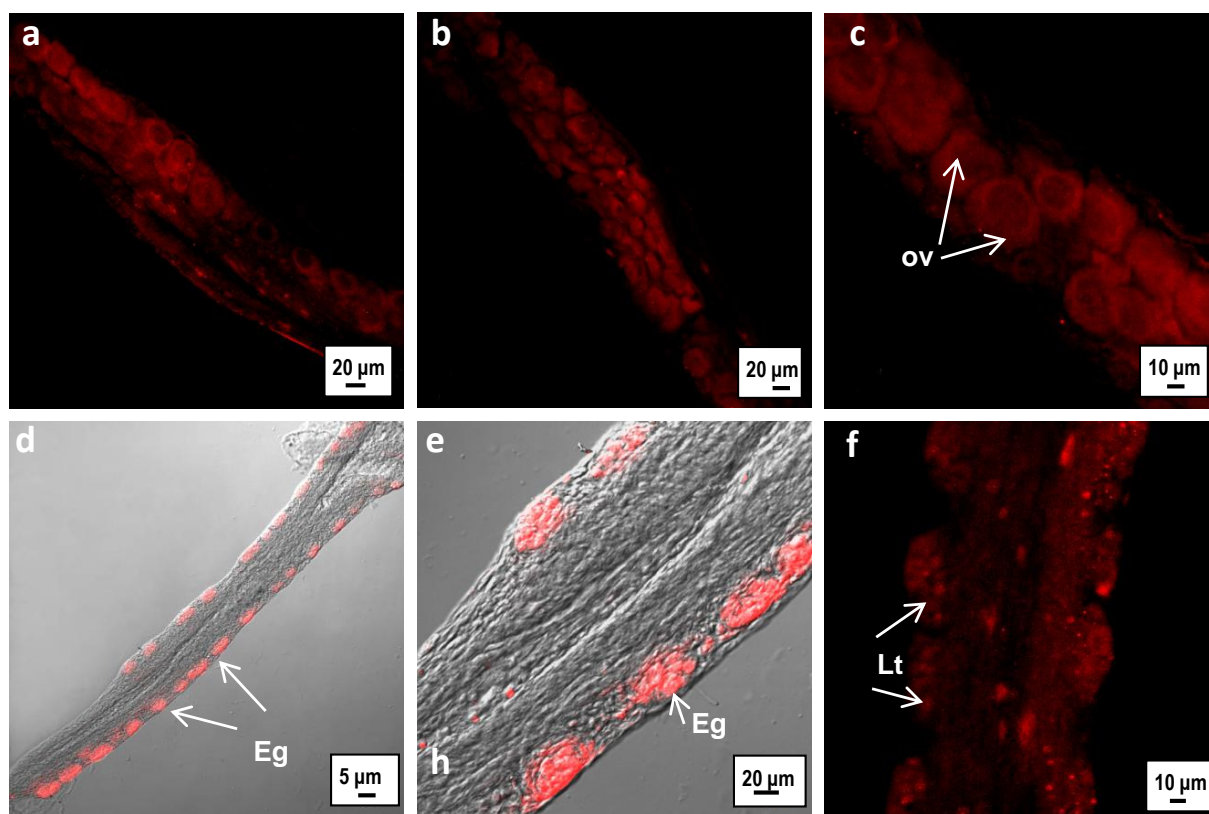


Figura 12. Detección de la proteína Vasa en la gónada diferenciada de *Chapalichthys encaustus*. **a-c.** Inmunofluorescencia para Vasa en ovarios aislados en E6 (a) y de 1dpp (b). Vasa se localizó en el citoplasma de los ovocitos. **d-f.** Inmunofluorescencia en testículos aislados en E6 (d, e) y de 1dpp (f). Vasa se detectó en las espermatogonias (d, e) localizadas al interior de los lóbulos testiculares en desarrollo (e, f). **Eg**, espermatogonia; **ov**, ovocitos; **Lt**, lóbulos testiculares.

3. Determinación de transcritos

➤ Prueba de integridad de ARNt

Previamente a la realización de la amplificación de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* mediante la técnica de RT-PCR, el ARNt obtenido de ovarios y testículos de ejemplares adultos de 12 meses pos parto (mpp) de *C. encaustus* (Fig. 13a), así como de adultos de *D. rerio* (pez cebra) (Fig. 13b) se visualizó en un gel de agarosa.

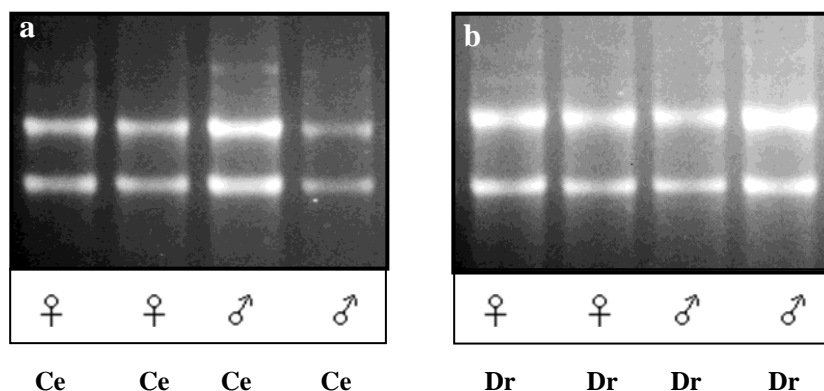


Figura 13. Prueba de integridad de ARN total. **a.** Bandas de ARN obtenido de gónadas de hembras y machos adultos de 12mpp de *Chapalichthys encaustus* (Ce). **b.** Bandas de ARN obtenido de gónadas de hembras y machos adultos de *Danio rerio* (Dr). Se observan las bandas características correspondientes a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal.

➤ RT-PCR

sox9

La expresión del gen *sox9*, un factor de transcripción relacionado con la diferenciación sexual, se estudió en gónadas de adultos de 12 mpp, empleando los oligonucleótidos para el gen *sox9a* reportados por Chiang y colaboradores (2001) para el pez cebra (cuadro 6). En el pez cebra se detectó una banda de cerca de 800 pares de bases (pb) en el testículo, la cual corresponde a la reportada por estos autores de 758 pb; mientras que en el ovario no se detectó esta banda. En *C. encaustus* se observó una banda de menor tamaño, de cerca de 600

pb en testículo y ovario (Fig. 14a). Tanto en gónadas de *C. encaustus* como en gónadas de pez cebra se observó una banda adicional de cerca de 200 pb. La expresión del gen de β -actina, el cual se empleó como control interno de ARNt, se detectó en todas las muestras analizadas (Fig. 14b).

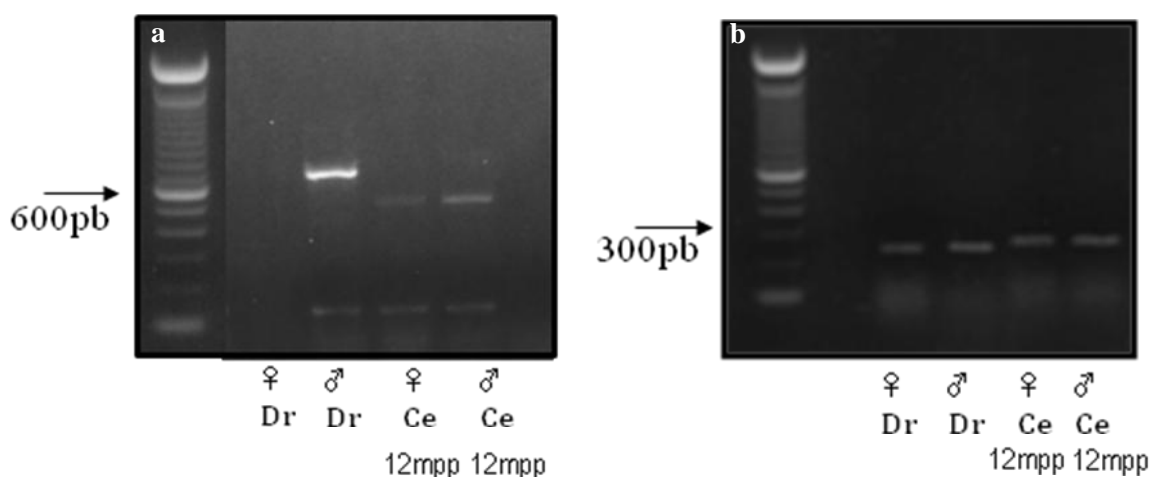


Figura 14. Expresión del gen *sox9*. a. Gel representativo que muestra la expresión de *sox9* en gónadas de *Chapalichthys encaustus* (Ce) y del pez cebra *Danio rerio* (Dr) empleado como control positivo. Se observa una banda de cerca de 800 pb en testículo de pez cebra y de aproximadamente 600 pb en ovario y testículo de *C. encaustus*. b. Expresión del gen de β -actina empleado como control interno de ARNt, el cual se detectó en todas las muestras analizadas.

foxl2

Para la expresión del gen *foxl2* en gónadas de adultos (9 y 12 mpp) de *C. encaustus*, se emplearon oligonucleótidos reportados para el pez medaka (Nakamoto *et al.*, 2006) (cuadro 6). En *C. encaustus* se detectó una banda de cerca de 900 pb sólo en ovarios; mientras que en el testículo no se detectó su expresión (Fig. 15a), lo cual concuerda con lo descrito por Nakamoto y colaboradores (2006), quienes detectaron una banda de 921 pb sólo en gónadas femeninas de medaka. De manera que en *C. encaustus*, *foxl2* es un gen con un patrón de expresión sexualmente dimórfico. La expresión del gen de β -actina, el cual se empleó como control interno de ARNt, se detectó en todas las muestras analizadas (Fig. 15b).

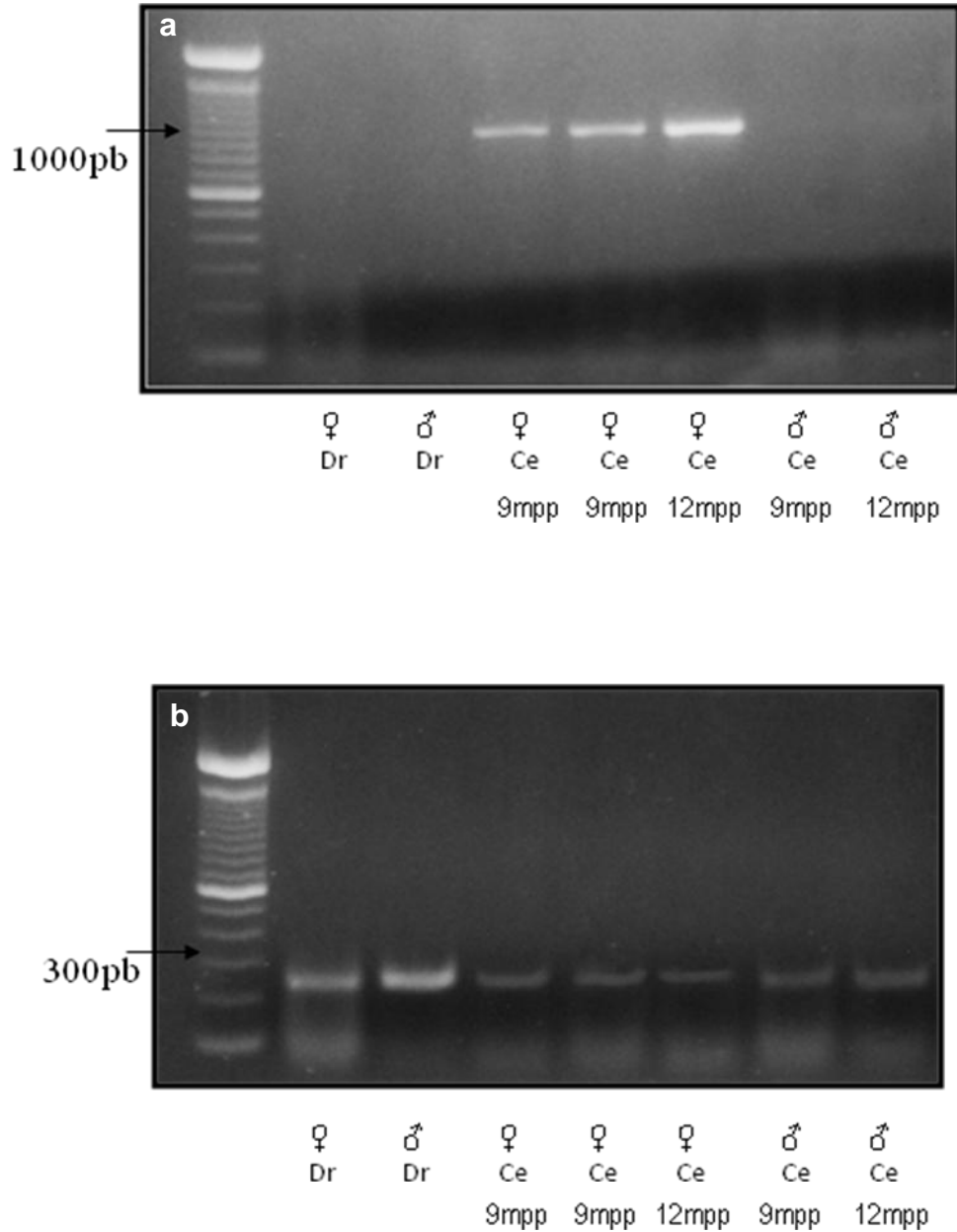


Figura 15. Expresión del gen *foxl2*. **a.** Gel representativo que muestra la expresión de *foxl2* exclusivamente en ovarios de *Chapalichthys encaustus* (Ce). Se observa una banda de cerca de 900 pb. No se detectó expresión de *foxl2* en el testículo de *C. encaustus* ni en gónadas del pez cebra *Danio rerio* (Dr). **b.** Expresión del gen de β -actina empleado como control interno de ARNt. Se observa la expresión en todas las muestras analizadas.

vasa

La expresión del gen *vasa* se estudió en gónadas de adultos (12mpp), empleando oligonucleótidos reportados para el pez medaka (cuadro 6), los cuales amplifican un fragmento de 545 pb (Shinomiya *et al.*, 2000). En ovarios y testículos de adultos de *C. encaustus* se detectó una banda de cerca de 400 pb; mientras que en el ovario de pez cebra, empleado como control, se detectó una banda de aproximadamente 600 pb (Fig. 16a). La expresión del gen de β -actina, el cual se empleó como control interno de ARNt, se detectó en todas las muestras analizadas (Fig. 16b).

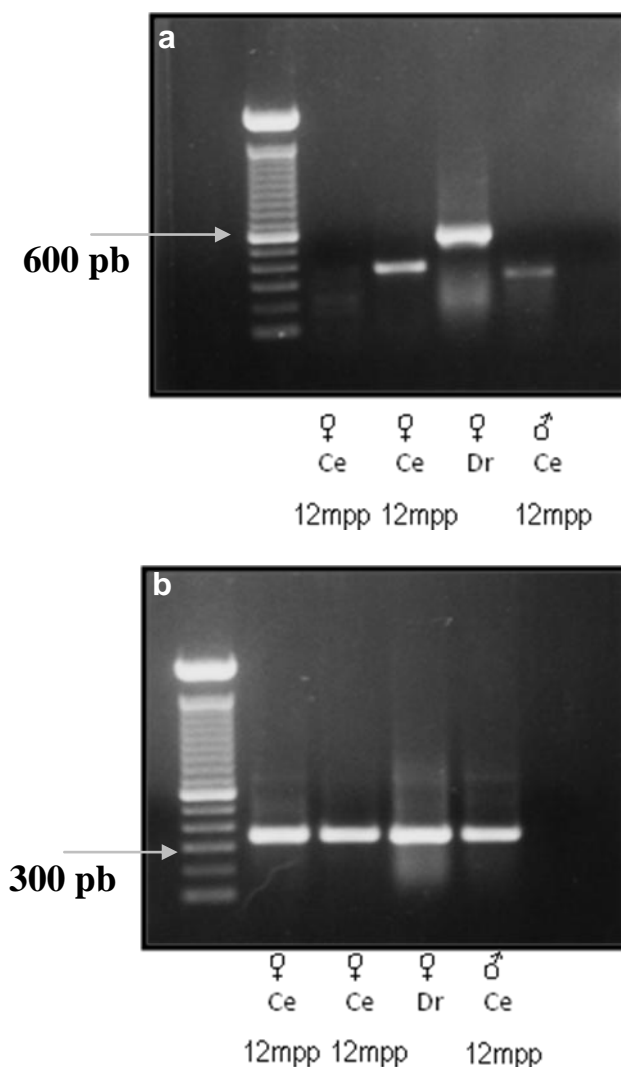


Figura 16. Expresión del gen *vasa*. a. Gel representativo que muestra la expresión de *vasa* gónadas de 12mpp de *Chapalichthys encaustus* (Ce) y del pez cebra *Danio rerio* (Dr). Se observa una banda de cerca de 400 pb en ovarios y testículos de *C. encaustus* y una banda de aproximadamente 600pb en el ovario de pez cebra. b. Expresión del gen de β -actina empleado como control interno de ARNt.

➤ Secuenciación

Los productos de los genes *sox9*, *foxl2* y *vasa* obtenidos en *C. encaustus* se purificaron para su secuenciación. Sin embargo, solamente para *foxl2* se obtuvo una secuencia similar a la reportada para otros peces teleósteos. De manera que en esta sección se presentan los resultados obtenidos para este gen. En el anexo 1 se presentan las secuencias obtenidas para los genes *sox9* y *vasa*. La secuencia obtenida del fragmento purificado para *foxl2* de *C. encaustus* se muestra a continuación.

Muestra FoxL2+foxl2 1

```
GTCGGAGAGACTGGCCTTTGTGATCCATGACACCTACACGACCGATGAGGAGGACGGCCCGGTG
GGAGCCGGACCAGGATGAGTGGAAAGAGAAGCCGGATCCGTCCCAGAAACCACCGTACTCCTACGTC
GCTCTCATTGCCATGGCCATCCGGGAGAGCGCAGAGAAGCGCCTCACTCTGTCCGGTATATACCAGT
ACATTATCAGCAAGTTCCCCTTCTATGAGAAGAACAAGAAAGGCTGGCAGAACAGCATCAGGCACAA
CTTGAGTCTCAATGAATGCTTCATCAAGGTTCCGCGGGAGGGAGGCGGCGAGAGGAAGGGGAACTA
CTGGACCCTGGACCCAGCCTGTGAGGACATGTTGAGAAGGGGAACTACAGGAGACGGCGCAGGAT
GAAGCGGCCTTTCAGACCCCGCCAGCGCACTTCCAGCCTGGAAAGGCCTTGTTCCGGAGGGGACGG
CTACGGCTACCTGACCCACCCAAGTACCTGCAGTCTAGCTTCATGAACAACCTCTGGTTCGCTAGGC
CAGCCGCCACCCCGATGTCCTACACGTCTGTGAGATGGCCGGCGGCAACGTGAGTCCGGTGAAC
GTGAAGGGACTGACGGCCCGTCATCCTACAACCCCTACTCAGGGTGCAGAGCATGACGCTGCCCA
GCATGGTAAACTCTTACAACGGGCATGAGCCACCACACCTCCGTCCGAGAGACTGGCCTTTGTGA
TCCATGACACCTACACGACCGATGAGGAGGACGGCCCGGTGGGAGCCGGACCAGGATGAGTGGAA
GAGAAGCCGGATCCGTCCCAGAAACCACCGTACTCCTACGTCGCTCTCATTGCCATGGCCATCCGGG
AGAGCGCAGAGAAGCGCCTCACTCTGTCCGGTATATACCAGTACATTATCAGCAAGTTCCCCTTCTAT
GAGAAGAACAAGAAAGGCTGGCAGAACAGCATCAGGCACAACCTTGAGTCTCAATGAATGCTTCATCA
AGGTTCCGCGGGAGGGAGGCGGCGAGAGGAAGGGGAACTACTGGACCCTGGACCCAGCCTGTGAG
GACATGTTGAGAAGGGGAACTACAGGAGACGGCGCAGGATGAAGCGGCCTTTCAGACCCCGCCA
GCGCACTTCCAGCCTGGAAAGGCCTTGTTCCGGAGGGGACGGCTACGGCTACCTGACCCACCCAAG
TACCTGCAGTCTAGCTTCATGAACAACCTCTGGTTCGCTAGGCCAGCCGCCACCCCGATGTCCTACA
CGTCCTGTCAGATGGCCGGCGGCAACGTGAGTCCGGTGAACGTGAAGGGACTGACGGCCCGTCAT
CCTACAACCCCTACTCAGGGTGCAGAGCATGACGCTGCCAGCATGGTAAACTCTTACAACGGGCAT
GAGCCACCACACCTCC
```

El tamaño del fragmento secuenciado fue de 705 pb y al realizar el análisis mediante el programa Blast (NCBI) se observó que tiene una alta similitud con la secuencia de *foxl2* reportada para otras especies de peces teleósteos (cuadro 7). Particularmente, la secuencia obtenida para *foxl2* de *C. encaustus* tiene un porcentaje de similitud del 87% con la del pez medaka, especie de la cual se emplearon los oligonucleótidos. Mediante este análisis se comprobó la identidad del fragmento obtenido como parte del gen *foxl2*.

Cuadro 7. Porcentaje de similitud entre la secuencia de *foxl2* de *Chapalichthys encaustus* y de otros peces teleósteos.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max ident
FJ548572.1	Odontesthes hatcheri forkhead box L2 mRNA, complete cds	89%
EU555180.1	Epinephelus merra forkhead transcription factor L2 (Foxl2) mRNA, c	88%
EU864151.1	Odontesthes bonariensis forkhead box L2 (Fox12) mRNA, complete	88%
DQ683738.1	Kryptolebias marmoratus foxl2 mRNA, partial cds	88%
AB303854.1	Paralichthys olivaceus foxl2 mRNA for forkhead transcription factor	88%
AM232737.1	Oreochromis niloticus Foxl2 gene for forkhead transcription factor L	88%
AM232738.1	Oreochromis aureus Foxl2 gene for forkhead transcription factor L2	88%
AY554172.1	Oreochromis niloticus forkhead transcription factor L2 mRNA, compl	88%
AB428665.1	Oryzias luzonensis Foxl2 mRNA for forkhead box L2, complete cds	87%
NM_001104888.1	Oryzias latipes forkhead box L2 (foxl2), mRNA >dbj AB252055.1 C	87%
AB547448.1	Halichoeres trimaculatus Foxl2 mRNA for forkhead transcriptional fa	87%
EU496493.1	Acanthopagrus schlegelii forkhead box L2 (fox12) mRNA, partial cd:	89%
NM_001124485.1	Oncorhynchus mykiss Foxl2 ortholog (LOC100136214), mRNA >qb	84%
XM_002187418.1	PREDICTED: Taeniopygia guttata forkhead box L2 (LOC100222465)	82%
EZ814626.1	TSA: Oncorhynchus nerka 51292.Onmycontiq mRNA sequence	86%
XM_001605374.1	PREDICTED: Nasonia vitripennis similar to FD-4 protein (LOC10012:	89%

VIII. DISCUSIÓN

1. Diferenciación sexual morfológica

➤ Gónada indiferenciada

En *C. encaustus* el primordio gonadal se forma durante el estadio de desarrollo 2 y en el estadio 3 se establece la gónada indiferenciada, la cual contiene un mayor número de células germinales. Las gónadas de los embriones en estos dos estadios se clasificaron como indiferenciadas morfológicamente y contienen células germinales primordiales y células somáticas. Por su morfología se podría considerar que las células germinales primordiales en estos estadios son similares y bipotenciales en los dos sexos (Devlin y Nagahama, 2002; Rasmussen *et al.*, 2006).

La cresta genital en teleósteos se forma por un engrosamiento del mesodermo que se proyecta a la cavidad celómica, justo debajo de los riñones en desarrollo (Devlin y Nagahama, 2002). Las células germinales primordiales en teleósteos, al igual que en otros vertebrados, se originan en sitios extragonadales y migran para colonizar las crestas genitales (Braat *et al.*, 1999). Los primordios gonadales de *C. encaustus* se observan como dos estructuras ubicadas sobre el epitelio celómico. Esta ubicación se ha reportado en otros teleósteos y vertebrados (Hoar, 1969; Devlin y Nagahama, 2002). El origen del primordio gonadal en peces teleósteos se ha discutido ampliamente y en general se acepta que es de origen unitario, es decir, a partir del epitelio celómico o pared peritoneal; a diferencia del origen de la gónada de otros vertebrados, en donde hay contribución del blastema mesonéfrico (Hoar, 1969; Nakamura *et al.*, 1998).

El primordio gonadal de *C. encaustus* al igual que en otros teleósteos, está compuesto por escasas células germinales rodeadas por células somáticas que forman una estructura de asociación celular, en la cual no se reconocen signos histológicos de diferenciación sexual en las células germinales o somáticas. Las células germinales en teleósteos, como en otros vertebrados, interactúan con las células somáticas a medida que ocurre el proceso de diferenciación sexual gonadal (Patiño y Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998).

En secciones transversales del primordio gonadal de *C. encaustus* se observa generalmente una célula germinal rodeada por algunas células somáticas y para el estadio 3, este primordio ha aumentado de tamaño posiblemente debido a proliferación mitótica de las células germinales y somáticas, así como por la llegada de más células germinales (Patiño y Takashima, 1995; Grandi y Colombo, 1997). En algunas especies como medaka ocurre una actividad mitótica intensa de las células germinales cuando estas arriban a la cresta genital (Hamaguchi, 1982). Mientras que en otras especies como *Cichlasoma dimerus*, la proliferación de las células germinales en la gónada está precedida por un período de quiescencia (Meijide *et al.*, 1995). Las células germinales indiferenciadas de *C. encaustus* tienen las características típicas de células germinales en teleósteos y vertebrados en general: forma redondeada a oval, tamaño relativamente grande, núcleo prominente con uno a dos nucléolos evidentes, cromatina finamente granular, citoplasma con escasos organelos, mitocondrias de crestas tubulares y nuage (Flores y Burns, 1993; Patiño y Takashima, 1995; Meijide *et al.*, 2005).

En el citoplasma de las células germinales de *C. encaustus*, se observó un material electrodenso generalmente asociado a mitocondrias en todos los estadios de desarrollo estudiados, el cual se describió como “nuage” y es específico de la línea germinal en varios organismos (Eddy, 1975). Los gránulos de nuage en asociación con mitocondrias se han descrito en células germinales indiferenciadas, espermatogonias, ovogonias y ovocitos de varias especies de peces teleósteos (Eddy, 1975; Hamaguchi, 1982; Wallace y Selman, 1990; Flores y Burns, 1993; Grandi y Colombo, 1997; Meijide *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006). Estos gránulos son parte de material nuclear y están compuestos por ribonucleoproteínas que migran a través de los poros nucleares y se ensamblan en el citoplasma (Azevedo, 1984; Flores y Burns, 1993). De manera que en *C. encaustus*, la presencia de estos gránulos evidencia las células germinales a nivel ultraestructural.

La gónada indiferenciada bipotencial de los vertebrados posee una plasticidad remarcable (De Falco y Capel, 2009). Las células germinales primordiales permanecen indiferenciadas hasta que son expuestas a un ambiente hormonal determinado, o la acción de genes expresados en la misma gónada que influyen en su diferenciación morfológica en espermatogonias u ovogonias (Devlin y Nagahama, 2002).

➤ **Gónada en diferenciación**

Durante los estadios de desarrollo 4 y 5 la gónada está en proceso de diferenciación. La mayoría de las gónadas analizadas poseen tanto grupos de células germinales en división como grupos de células germinales indiferenciadas, las primeras han iniciado la meiosis evidenciada por la presencia de complejos sinaptonémicos a nivel ultraestructural. De acuerdo con estos rasgos morfológicos, la gónada en diferenciación posee características de una gónada ambisexual. La presencia de gónadas ambisexuales, es decir con características femeninas y masculinas, a partir de la cual se desarrolla un ovario o un testículo se ha descrito en *Anguilla anguilla*, una especie gonocorista indiferenciada (Grandi y Colombo, 1997). Sin embargo, a diferencia de lo observado en *C. encaustus*, en *A. anguilla* se observan folículos ováricos y espermatogonias en la misma gónada.

El pez cebra es una especie gonocorista indiferenciada en la cual todas las gónadas inicialmente desarrollan ovocitos. Este fenómeno se denomina hermafroditismo juvenil (Takahashi, 1977; Maack y Segner, 2003) y ha sido descrito también en *Barbus tetrazona*, *Oncorhynchus masou* (Nakamura *et al.*, 1998) y en el pez vivíparo *G. affinis* (Koya *et al.*, 2003). En el pez cebra, aproximadamente la mitad de las gónadas sufren un proceso de degeneración de los ovocitos y estas gónadas se desarrollarán como testículos; en las gónadas restantes se mantiene el desarrollo de los ovocitos y se diferencian como ovarios (Maack y Segner, 2003). Se ha propuesto que la apoptosis es el mecanismo por el cual se lleva a cabo la pérdida de ovocitos (Uchida *et al.*, 2002). De manera que en los testículos en desarrollo se pueden observar tanto cistos de espermatocitos como ovocitos en fase de degeneración. Las gónadas clasificadas como testículos presuntivos contienen pocos ovocitos perinucleolares y poseen numerosas células germinales indiferenciadas (De Falco y Capel, 2009).

De acuerdo con la clasificación propuesta por Yamamoto (1969), la cual se sigue empleando en la actualidad, *C. encaustus* es una especie gonocorista debido a que los individuos adultos tienen sexos separados y mantienen ese sexo durante la vida adulta del animal. Por otra parte, las características de las gónadas en E5 (grupos de células germinales meióticas e indiferenciadas) podrían sugerir un patrón de diferenciación sexual gonocorista indiferenciado como en el pez cebra. Es decir que todas las gónadas inicien la diferenciación ovárica y a partir de esta se diferencie un testículo o un ovario. Sin embargo, en los testículos en desarrollo en *C. encaustus*, los cuales se observan a partir de E6, no se observaron simultáneamente cistos de

espermatogonias y ovocitos en degeneración que pudieran indicar un fenómeno de hermafroditismo juvenil como en el pez cebra.

➤ **Gónada diferenciada**

En *C. encaustus* a partir del estadio de desarrollo 6 la gónada puede clasificarse morfológicamente como un ovario o un testículo. La dirección de la diferenciación sexual gonadal puede ser mediada a través de la acción del componente somático sobre el componente germinal (Nakamura *et al.*, 1998).

Diferenciación Ovárica

El inicio de la diferenciación de la línea germinal se observa durante los estadios 4 y 5 y se evidencia por la presencia de los complejos sinaptonémicos a nivel ultraestructural, los cuales indican la entrada a meiosis. Los complejos sinaptonémicos se han empleado como marcadores de meiosis en teleósteos y en vertebrados y se observan durante las etapas de paquiteno y cigoteno de la primera división meiótica (Devlin y Nagahama, 2002).

Una de las principales características que marcan el inicio de la diferenciación sexual gonadal en teleósteos es la aparición de figuras meióticas en una pequeña fracción de las células germinales de los ovarios presuntivos (Patiño y Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998). Otros rasgos de diferenciación ovárica en teleósteos son una proliferación intensa de células germinales y arreglos de las células somáticas que eventualmente conducen a la formación de una cavidad ovárica (Kanamori *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1998). Tomando en cuenta lo anterior, la presencia de células germinales en meiosis puede ser un indicador de diferenciación ovárica en *C. encaustus*. Esto se ha observado también en *C. dimerus* (Meijide *et al.*, 2005). Sin embargo, en algunas especies previo a la entrada a meiosis hay un aumento en la proliferación de las células germinales en los ovarios presuntivos, de manera que la diferencia en el número de células germinales entre sexos también podría considerarse como primer indicador de diferenciación sexual (Patiño y Takashima, 1995). De manera que existiría un mayor número de células germinales primordiales en la gónada femenina como es el caso de medaka (Satoh y Egami, 1972; Hamaguchi, 1982), trucha arcoíris (Lebrun *et al.*, 1982) y *O. bonariensis* (Strussmann *et al.*, 1996).

En medaka se han descrito dos patrones de proliferación de las células germinales primordiales. En el primero (tipo I), las CGPs proliferan independientemente de manera lineal. En el segundo (tipo II), las células se dividen sincrónicamente para incrementar su número exponencialmente (Saito *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008). Las células resultantes de la división tipo I se encuentran aisladas en la gónada y rodeadas por células somáticas; mientras que las resultantes de la división tipo II forman grupos de células que forman cistos de células germinales, formadas vía citocinesis. En las gónadas tempranas XY sólo se observan CGP tipo I, mientras que en las XX se encuentran ambos tipos. En las gónadas de *C. encaustus* en los estadios 4 y 5 se observan grupos de células germinales que podrían corresponder a las células resultantes de la división tipo II reportada en medaka. De igual forma, se observan algunas células germinales aisladas rodeadas por células somáticas, que corresponderían a las resultantes de la división tipo I.

En *C. encaustus* la diferenciación de la línea germinal en el ovario precede a la diferenciación del componente somático. Esto concuerda con lo que se ha descrito en la mayoría de especies de teleósteos y a diferencia de lo que ocurre en el pez vivíparo *Zoarces viviparus* donde el primer signo de diferenciación ovárica es el desarrollo de la cavidad ovárica, seguido de la presencia de algunos ovocitos meióticos tempranos (Rasmussen *et al.*, 2006). En especies de tilapia, la organización del componente somático para formar una cavidad ovárica puede empezar antes de la meiosis como en *Oreochromis mossambicus*; mientras que en *O. niloticus* y *O. aureus* estos eventos ocurren simultáneamente (Patiño y Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998). En *C. encaustus* no se observó la formación de una cavidad ovárica durante el desarrollo embrionario, de manera que este evento ocurre en etapas posnatales.

El proceso de crecimiento primario del ovocito en *C. encaustus*, es decir la previtelogénesis, es similar al descrito en general para otros teleósteos (Selman y Wallace, 1989; Patiño y Takashima, 1995; Devlin y Nagahama, 2002). En ovarios de embriones a término y al momento del nacimiento, se observan ovocitos previtelogénicos en fase de cromatina-nucléolo y de perinucléolos, en los cuales ha ocurrido la foliculogénesis. La fase de cromatina-nucléolo comprende varios estadios cromosómicos desde el leptoteno al inicio del paquiteno durante la profase I de la meiosis; el apareamiento de los cromosomas homólogos ocurre durante el cigoteno y es posible observar los complejos sinaptonémicos (Patiño y Takashima, 1995). El inicio de la fase perinucleolar está marcado por la aparición y migración de múltiples nucléolos en la periferia del nucleoplasma que indican una intensa transcripción de ARN ribosómico; en este momento inicia la fase de diploteno (Selman y Wallace, 1989; Patiño y Takashima, 1995).

Las células foliculares de *C. encaustus* probablemente se originen de células epiteliales que a su vez se derivan del epitelio celómico, como se ha propuesto para otras especies de teleósteos (Grier, 2000; Grier y Parenti, 2004; Meijide *et al.*, 2005), mientras que las células de la teca se derivan del tejido conectivo que da origen al estroma. De acuerdo con Grier (2000), el folículo ovárico se define por su origen a partir del epitelio germinal y consta del ovocito y las células foliculares circundantes. El termino complejo folicular propuesto por Grier y Lo Nostro (2000) incluye al folículo, la membrana basal, y la teca y sus vasos sanguíneos.

Diferenciación testicular

En *C. encaustus*, el inicio de la diferenciación testicular ocurre durante el estadio desarrollo 6, es decir posterior al inicio de la diferenciación ovárica que se hace evidente a partir del estadio 5. Este hecho concuerda con lo descrito en general para teleósteos en donde los testículos permanecen histológicamente indiferenciados por más tiempo que los ovarios (Patiño y Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado que en algunas especies de tilapia la diferenciación ovárica y testicular puede iniciarse de manera sincrónica (Nakamura y Nagahama, 1989; Patiño y Takashima, 1995).

En teleósteos uno de los primeros signos de diferenciación testicular es la formación temprana de los conductos eferentes en el estroma; otros signos son la aparición de vasos sanguíneos cerca de los conductos eferentes y la formación de estructuras lobulares testiculares, precursoras de los lóbulos testiculares (Patiño y Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998). La diferenciación testicular en *C. encaustus* se observó inicialmente en el componente somático, por la formación de estructuras lobulares que corresponden a los precursores de los lóbulos testiculares. La aparición de estas estructuras parece ser el signo más importante de diferenciación testicular en *C. encaustus*, más temprano que la formación de los conductos eferentes. De igual forma, en medaka, la formación inicial de estructuras lobulares a los 10 días pos eclosión es un indicador de diferenciación testicular (Kanamori *et al.*, 1985; Hamaguchi, 1982). En *Z. viviparus* y en *Pimephales promelas* la formación de conductos espermáticos, de vasos sanguíneos y de estructuras lobulares son indicadores de diferenciación testicular (Van Aerle *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2006). Por el contrario, en los peces vivíparos de la familia Poeciliidae, la agregación de células estromáticas en la región hiliar señala el inicio de la diferenciación testicular (Takahashi, 1974; Nakamura *et al.*, 1998).

Por otra parte, la línea germinal del testículo en *C. encaustus* permanece indiferenciada durante el desarrollo embrionario, a diferencia de la línea germinal en las hembras que se desarrolla más tempranamente. Al momento del nacimiento los testículos de *C. encaustus* sólo contienen espermatogonias rodeadas por células de Sertoli y células del estroma, de manera que la espermatogénesis ocurre en etapas posnatales. En teleósteos, las células germinales en las gónadas destinadas a la diferenciación testicular usualmente permanecen quiescentes por un tiempo largo (Nakamura *et al.*, 1998). El inicio de la espermatogénesis posterior a la ovogénesis se ha reportado ampliamente en especies de teleósteos: especies de tilapia (Nakamura *et al.*, 1998) *G. affinis* (Koya *et al.*, 2003) y *Z. viviparus* (Rasmussen *et al.*, 2006). Sin embargo, en *C. dimerus*, la diferenciación del componente somático ocurre concomitante con el inicio de la meiosis en los machos (Meijide *et al.*, 2005).

Las células de Sertoli en *C. encaustus* probablemente se deriven de células epiteliales, como se ha descrito para otras especies de teleósteos (Grier, 1993; Grier y Parenti, 2004). Las células de Sertoli establecen contactos mediante desmosomas y uniones estrechas, lo cual resulta en la formación de una barrera de células de Sertoli (Grier, 1993; Grier y Parenti, 2004; Meijide *et al.*, 2005). Como en la mayoría de teleósteos, en *C. encaustus* existe un arreglo epiteliode de células de Sertoli y células germinales en lugar de un epitelio germinal, es decir, las células germinales y de Sertoli dentro de los lóbulos testiculares no bordean directamente a un lumen (Grier, 2000; Grier y Parenti, 2004).

2. Expresión de genes

➤ **sox9 / Sox9**

En *C. encaustus* se detectó la proteína Sox9 en las distintas etapas de desarrollo gonadal: gónada indiferenciada, gónada en diferenciación y en ovario y testículo. En la trucha arcoíris (Baron *et al.*, 2005; Vizziano *et al.*, 2007; Hale *et al.*, 2011), en la tilapia del Nilo (Ijiri *et al.*, 2008) y en medaka (Nakamoto *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008) se ha reportado la expresión del gen *sox9* (transcritos de *sox9*) desde la etapa de gónada indiferenciada. En estas especies, la expresión es similar en gónadas masculinas y femeninas (XX y XY). En el pez cebra, los transcritos de *sox9a* (el tipo testicular) se expresa en la gónada indiferenciada a los 17 días pos fertilización (dpf). En la gónada diferenciada de juveniles de 31dpf, los testículos continúan

expresando *sox9a*, mientras que los ovarios expresan *sox9b* y algunos genes característicos de diferenciación ovárica como *Cyp19a1* (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005).

En *C. encaustus*, la expresión de Sox9 se detecta en células germinales y somáticas de la gónada indiferenciada y en diferenciación. Posteriormente, su patrón se hace dimórfico; manteniéndose en las células somáticas en el caso del testículo y en las células germinales (ovocitos) en el caso del ovario. En el pez gato *Clarias gariepinus*, mediante inmunohistoquímica, la proteína Sox9 es detectada en las células somáticas y germinales de la gónada indiferenciada (Raghuveer y Senthilkumaran, 2010). En el testículo la proteína Sox9a se detecta en las células de Sertoli, espermatogonias y espermatocitos y retiene su función en el desarrollo testicular como en otros vertebrados, mientras que Sox9b se expresa en el citoplasma de las ovogonias, los ovocitos primarios (perinucleolares) y previtelogénicos (Raghuveer y Senthilkumaran, 2010). En *Bufo marinus*, mediante hibridación *in situ*, se detectó el ARNm de *sox9* en las células de Sertoli del testículo en desarrollo y en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos en el ovario en desarrollo (Abramyan *et al.*, 2009).

De forma similar a lo encontrado con el patrón de expresión y localización de la proteína de Sox9 en el ovario de *C. encaustus*, en otros peces teleósteos como medaka, el ARNm de *sox9a1* es detectado en el citoplasma de los ovocitos del ovario en desarrollo de individuos de dos semanas posfertilización, así como en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos en el ovario adulto (Yokoi *et al.*, 2002). En el pez cebra, *sox9b* se detecta en el citoplasma de los ovocitos (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005).

En *C. encaustus*, la proteína Sox9 se expresa tanto en el ovario como en el testículo en desarrollo, con un patrón sexualmente dimórfico en cuanto a la localización subcelular de la proteína. En medaka, aunque la expresión del mensajero de *sox9a2* no difiere entre machos y hembras durante la diferenciación sexual temprana, se ha sugerido que posiblemente la localización subcelular de la proteína pueda diferir entre sexos durante la diferenciación sexual temprana (Nakamoto *et al.*, 2005).

En *Xenopus tropicalis*, el ARNm y la proteína Sox9 se detectaron cuando la gónada ya está diferenciada en un ovario o un testículo y esta expresión continúa en la etapa adulta. En el testículo la expresión de Sox9 se detecta en el núcleo de las células de Sertoli, similar a lo descrito para otros vertebrados, sugiriendo una función conservada en la diferenciación testicular. En el ovario, la proteína Sox9 se localizó en el citoplasma de los ovocitos

previtelogénicos (crecimiento primario), antes de ser trasladada al núcleo de ovocitos vitelogénicos, sugiriendo una función diferente durante la ovogénesis. En esta especie, *Sox9* al parecer no es un gen determinante del sexo y puede tener diferentes funciones en el desarrollo ovárico y testicular (El Jamil *et al.*, 2008). Por otra parte, en el pez gato *C. gaeripinus*, la proteína *Sox9* se detecta en ovocitos previtelogénicos, pero no en ovocitos vitelogénicos (Raghuveer y Senthilkumaran, 2010).

El patrón de expresión de la proteína *Sox9* en *C. encaustus* es diferente al reportado en vertebrados amniotas, donde la expresión de *Sox9* está restringida a las células somáticas de soporte y no se detecta en las células germinales. El patrón de localización de la proteína *Sox9* en ovocitos encontrado en *C. encaustus* tiene características similares al reportado en otras especies de teleósteos y en *X. tropicalis*. En teleósteos se han reportado dos genes *sox9*, uno específico de ovario y otro específico de testículo. La existencia de dos genes *sox9* en peces teleósteos con diferentes funciones se ha correlacionado con la duplicación del genoma, un evento que ocurrió antes de la divergencia de los teleósteos y la cual puede haber conducido a una subfuncionalización específica de linaje (Klüver *et al.*, 2005). De acuerdo con El Jamil y colaboradores (2008), el patrón de expresión de *Sox9* en teleósteos y en *Xenopus* puede reflejar una función diversificada de un gen *Sox9* ancestral, cuya función en la gónada femenina se ha perdido durante la evolución de los tetrápodos. De igual forma, estos autores sugieren que el importe nuclear de la proteína *Sox9* hacia el núcleo de los ovocitos vitelogénicos sustenta un papel biológico diferente de esta proteína durante las fases tardías de la ovogénesis (El Jamil *et al.*, 2008).

En mamíferos, se ha reportado que la proteína *Sox9* se localiza en el citoplasma de células somáticas de soporte en gónadas XX y XY a bajos niveles previo a la expresión de *Sry*. Posteriormente *Sox9* sufre un cambio en la localización subcelular, es decir, es trasladada al núcleo de las células de Sertoli en la gónada XY, donde es detectada hasta en la etapa adulta (Morais da Silva *et al.*, 1996; De Santa Barbara *et al.*, 2000). La proteína *Sox9* permanece citoplasmática en las células somáticas de la gónada femenina y su expresión es regulada negativamente durante la diferenciación ovárica. La translocación al núcleo de la proteína *Sox9* es un evento clave en el inicio del proceso de diferenciación de las células de Sertoli y de los cordones testiculares (Gasca *et al.*, 2002; Malki *et al.*, 2005).

En el testículo de *C. encaustus*, la proteína *Sox9* se detecta en las células somáticas que corresponden a células de Sertoli y coincide con la formación de los lóbulos testiculares, primer

signo de diferenciación testicular en *C. encaustus*. De forma similar a lo reportado en otros peces teleósteos y vertebrados en general, el gen *sox9* en *C. encaustus* puede tener una función en el desarrollo de estructuras testiculares y por lo tanto en la diferenciación testicular. La importancia funcional de *Sox9* en la diferenciación del fenotipo masculino se ha reportado ampliamente en vertebrados (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996; Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Spotila *et al.*, 1998).

En *C. encaustus*, mediante RT-PCR, empleando oligonucleótidos para el gen *sox9* del pez cebra, se detectó una banda de cerca de 600 pb en las muestras de ovarios y testículos, la cual podría corresponder al gen *sox9*. La presencia de los transcritos de *sox9* en ovario y testículo adultos se ha reportado en varias especies de teleósteos ovíparas y vivíparas. En *P. reticulata*, el ARNm de *sox9* (*sox9b*) se detecta tanto en el ovario como en el testículo adulto, con niveles de expresión similares y se sugiere que este gen puede estar involucrado en el desarrollo gonadal de esta especie (Shen *et al.*, 2007). En medaka, *sox9* se ha detectado tanto en el ovario como en el testículo. En esta especie se han descrito dos genes *sox9*. *sox9a1* se encuentra preferencialmente en el ovario y *sox9a2* en el testículo (Klüver *et al.*, 2005; Nakamoto *et al.*, 2005). De igual forma, en el pez cebra se han reportado dos genes *sox9*, *sox9a* que se expresa en el testículo y *sox9b* expresado exclusivamente en el ovario (Chiang *et al.*, 2001). En la trucha arcoíris el ARNm de *sox9* se detectó en testículo y ovario adultos, con una expresión prominente en el testículo (Takamatsu *et al.*, 1997).

La secuencia del gen *sox9* en las especies anteriormente descritas tiene un porcentaje de similitud significativo con la secuencia de *Sox9* de otros vertebrados. Por el contrario, en *C. encaustus* al realizar la secuenciación del ADNc obtenido para el gen *sox9*, no se obtuvo similitud con las secuencias reportadas para este gen en otras especies de vertebrados. Lo anterior pudo deberse a que la banda obtenida no corresponde al gen *sox9* y se amplificó un gen diferente de manera inespecífica.

➤ ***foxl2* / *Foxl2***

Foxl2 es un gen conservado en vertebrados conocido por ser específico de la diferenciación ovárica (Baron *et al.*, 2005). En *C. encaustus* no se observó la proteína *Foxl2* en la etapa de gónada indiferenciada. Sin embargo, su expresión fue evidente durante la etapa de gónada en diferenciación (E5) y en la gónada diferenciada exclusivamente en el ovario. En algunas especies de teleósteos como la trucha arcoíris, *Foxl2* se expresa en la gónada indiferenciada de

ambos sexos a niveles similares y posteriormente es sobre-expresado en las gónadas femeninas en desarrollo (Baron *et al.*, 2005; Vizziano *et al.*, 2007).

Específicamente, la proteína Foxl2 se detectó en las células germinales y en algunas células somáticas en la gónada en diferenciación y en el ovario embrionario de *C. encaustus*. Las células somáticas en el ovario positivas a Foxl2 pueden corresponder a células foliculares. En vertebrados el gen *Foxl2* participa en la diferenciación de las células foliculares y por lo tanto en la diferenciación del ovario (Cocquet *et al.*, 2002).

El patrón de expresión de la proteína y del transcrito de *foxl2* en *C. encaustus* es sexualmente dimórfico. Teniendo en cuenta lo anterior, el gen *foxl2* puede tener una función en la diferenciación ovárica en *C. encaustus*. A diferencia de lo encontrado en *C. encaustus*, en la trucha arcoíris se ha reportado una expresión basal del mensajero de *foxl2* en gónadas masculinas (Vizziano *et al.*, 2007). En peces teleósteos se ha postulado una relación entre *foxl2* y los estrógenos, basado en la coexpresión temporal de *foxl2* y *cyp19a1* (aromatasa) (Baron *et al.*, 2005). En tilapia, Wang y colaboradores (2007) sugieren que Foxl2 puede ser un activador transcripcional directo del gen *cyp19a1*. De manera que la interacción de estos genes funcionaría en el mantenimiento de la diferenciación de las células de la granulosa y en la producción de estrógenos (Vizziano *et al.*, 2007).

En gónadas de adultos de *C. encaustus* empleando oligonucleótidos reportados para el pez medaka, se obtuvo una banda de cerca de 900 pb exclusivamente en ovarios, lo cual concuerda con lo descrito por Nakamoto y colaboradores (2006), quienes detectan una banda de 921pb sólo en gónadas femeninas de medaka. La secuencia obtenida para *foxl2* de *C. encaustus* tiene un alto porcentaje de similitud con el gen *foxl2* de otras especies de teleósteos, incluyendo el pez medaka, lo cual permite concluir que efectivamente la secuencia obtenida corresponde al gen *foxl2*.

➤ ***vasa / Vasa***

El gen *Vasa* codifica para una helicasa de ARN de la familia de proteínas de caja DEAD específico de la línea germinal, el cual está conservado filogenéticamente en secuencia proteica y localización intracelular (Lasko y Ashburne, 1988). *Vasa* ha sido empleado como un marcador

de la línea germinal en especies de vertebrados e invertebrados (Liang *et al.*, 1994; Molyneaux y Wylie, 2004). En este estudio se detectó la expresión de la proteína Vasa en las células germinales de la gónada de *C. encaustus* en las diferentes etapas de desarrollo gonadal: primordio gonadal, gónada indiferenciada, en proceso de diferenciación, y en ovarios y testículos diferenciados. De manera que Vasa puede ser empleado como marcador de la línea germinal en esta especie y probablemente en otras especies de peces goodeidos. La identificación de las células germinales es importante en estudios de especificación, migración y función de la línea germinal.

La expresión específica de Vasa en las células germinales durante la diferenciación sexual y en gónadas de adultos se ha documentado en varias especies de teleósteos: el pez cebra (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997), medaka (Shinomiya *et al.*, 2000), la trucha arcoíris (Yoshizaki *et al.*, 2000) y *Dicentrarchus labrax* (Blázquez *et al.*, 2010). En individuos adultos de medaka, la expresión de Vasa se restringe a las espermatogonias y a los espermatoцитos tempranos en el testículo, y a los ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos en el ovario (Shinomiya *et al.*, 2000).

En *C. encaustus* Vasa se localizó específicamente en el citoplasma de las células germinales. Un patrón similar de localización de la proteína se ha documentado en mamíferos (Castrillon *et al.*, 2000; Toyooka *et al.*, 2000), aves (Tsunekawa *et al.*, 2000) y anfibios (Saotome *et al.*, 2010). De igual forma, durante la diferenciación sexual en medaka la proteína se localiza en el citoplasma, con cambios en su localización temporal (Aoki *et al.*, 2008) y los transcritos de *vasa* se detectan específicamente en el citoplasma de las células germinales (Shinomiya *et al.*, 2000)

La función de Vasa se ha discutido ampliamente y en muchos organismos aún no se entiende completamente. En *Drosophila melanogaster*, se ha demostrado que la proteína Vasa es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de las células polares, las futuras células germinales (Lasko y Ashburne, 1988) y actúa como regulador traduccional del gen *Oskar*, el cual dirige el ensamblaje del plasma germinal (Jhostone y Lasko, 2004). Debido a su secuencia de caja DEAD, se sugiere que su función en la determinación de las células germinales está relacionada con la habilidad para unir y desenrollar el ARN (Liang *et al.*, 1994; Yoon *et al.*, 1997). En vertebrados, una posible función de la proteína Vasa puede ser su unión a ARNs requeridos para la determinación de las células germinales así como el control de su traducción (Yoon *et al.*, 1997).

En el pez cebra las CGP son especificadas por componentes citoplasmáticos (plasma germinal), entre los que se incluye el gen *vasa*, los cuales se segregan en 4 grupos dentro del embrión en segmentación (Yoon *et al.*, 1997; Raz, 2003). Se ha propuesto que *vasa* puede tener una función en la especificación y el desarrollo de la línea germinal en esta especie (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha observado que el uso de oligonucleótidos morfolinós que inhiben la traducción de *vasa* no afecta el establecimiento de la línea germinal en esta especie (Braat *et al.*, 2001).

En medaka, Li y colaboradores (2009) demostraron que *vasa* se requiere para la migración de las células germinales primordiales, pero no para su proliferación, identidad y supervivencia. Como en otros vertebrados, en *C. encaustus*, *vasa* probablemente juega un papel importante en el desarrollo de la línea germinal.

En *X. laevis*, Bilinski y colaboradores (2004) demostraron la presencia de *Vasa* en los gránulos de nuage en las células germinales y proponen una función de estos gránulos en las vías de microARNs y ARN de interferencia (ARNi) similar a la función de nuage en *D. melanogaster* (Findley *et al.*, 2003).

En *C. encaustus*, empleando oligonucleótidos para *vasa* de medaka, se detectó una banda de cerca de 400pb en las muestras de ovarios y testículos, la cual puede corresponder al gen *vasa*. La presencia de los transcritos de *vasa* en ovario y testículo adultos se ha reportado en varias especies de teleósteos como medaka (Shinomiya *et al.*, 2000) y pez cebra (Chiang *et al.*, 2001). Sin embargo, al realizar la secuenciación del ADNc obtenido para *vasa* de *C. encaustus*, no se obtuvo similitud con secuencias reportadas en otras especies de vertebrados, de forma similar a la situación encontrada para *sox9*. Al respecto, una posibilidad es que la banda obtenida no corresponda al gen *vasa* y se haya amplificado un gen diferente de manera inespecífica.

IX. CONCLUSIONES

- La diferenciación sexual gonadal en *Chapalichthys encaustus* ocurre durante el desarrollo embrionario, de manera que en los embriones a término, la gónada está diferenciada morfológicamente en un ovario o en un testículo.
- Durante el estadio de desarrollo 2 se forma el primordio gonadal; en el estadio 3 ocurre el establecimiento de la gónada indiferenciada bipotencial; en los estadios 4 y 5 la gónada está en transición hacia la diferenciación; y en el estadio 6 se observa la diferenciación sexual morfológica de la gónada.
- La diferenciación ovárica se inicia en la línea germinal evidenciada por la entrada a meiosis de las células germinales; mientras que la diferenciación testicular se observa primero en el componente celular somático, con la formación de los lóbulos testiculares.
- La proteína Vasa se detectó en las células germinales en los diferentes estadios de desarrollo y puede ser empleada como un marcador de la línea germinal en esta especie.
- La proteína Sox9 se detectó en las células germinales y somáticas de la gónada indiferenciada y en diferenciación. En los testículos se observó en las células somáticas correspondientes a células de Sertoli, mientras que en los ovarios se localizó en el citoplasma de los ovocitos.
- Tanto los transcritos como la proteína del gen *foxl2* se detectaron solamente en ovarios, específicamente la proteína se localizó en los ovocitos y las células foliculares.
- La proteína del gen Sox9 presenta un patrón de localización dimórfico; mientras que la expresión de Foxl2 se restringe al ovario. De tal manera que estos genes podrían tener un papel esencial en la diferenciación testicular y ovárica respectivamente en *Chapalichthys encaustus*.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abramyan J, Feng CW y P Koopman (2009). Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Dev Dyn* 238(9):2430-2441.

Álvarez del Villar J (1970). Peces mexicanos (claves). Edit. Comisión Nacional Consultiva de Pesca:100-114. México D.F.

Aoki Y, Nagao I, Saito D, Ebe Y, Kinjo M y M Tanaka (2008). Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. *Dev Dyn* 237:800-807.

Arango NA, Lovell-Badge R y RR Behringer (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* Gene Promoter: In Vivo Definition of Genetic Pathways of Vertebrate Sexual Development. *Cell* 99:409-419.

Azevedo C (1984). Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuages) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *Cell Tissue Res* 238:121-128.

Baroiller JF, Guiguen Y y A Fostier (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol Life Sci* 55:910-931.

Baron D, Houlgatte R, Fostier A y Y Guiguen (2005). Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 73:959-966.

Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y y RA Veitia (2004). An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *J Mol Endocrinol* 33(3):705-715.

Bernard P y VR Harley (2007). Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):31-43.

Bilinski SM, Jaglarz MK, Szymanska B, Etkin LD y M Kloc (2004). Sm proteins, the constituents of the spliceosome, are components of nuage and mitochondrial cement in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* 299:171-178.

Blázquez M, González A, Mylonas CC y F Piferrer (2011). Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 170:322-333.

Bollig F, Mehringer R, Perner B, Hartung C, Schäfer M, Scharl M, Volff JN, Winkler C y C Englert (2006). Identification and comparative expression analysis of a second wt1 gene in zebrafish. *Dev Dyn* 235(2):554-561.

Braat AK, van de Water S, Korving J y D Zivkovic (2001). A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline. *Genesis* 30(3):183-185.

Braat AK, Speksnijder JE y D Zivkovic (1999). Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol* 43:745-760.

Brunner B, Hornung U, Shan Z, Nanda I, Kondo M, Zend-Ajus E, Haaf T, Ropers HH, Shima A, Schmid M, Kalscheuer VM y M Scharl (2001). Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*. *Genomics* 77(1-2):8-17.

Bull JJ (1985). Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia* 41:1285-1296.

Bull JJ (1980). Sex determination in reptiles. *Quart Rev Biol* 55:3-21.

- Cameron** FJ y AH Sinclair (1997). Mutations in Sry and Sox9: Testis-Determining Genes. *Human Mutation* 9:388-395.
- Castrillon** DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C y CP Crum (2000). The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9585-9590.
- Chaboissier** MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR y A Schedl (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891-1901.
- Chai** C y WK Chan (2000). Developmental expression of a novel Ftz-F1 homologue, ff1b (NR5A4), in the zebrafish *Danio rerio*. *Mech Dev* 91:421-426.
- Chang** CF, Lin BY, Lau EL, Lee MF, Yueh WS, Lee YH, Chang CN, Huang JD, Tacon P, Lee FY, Du JL y LT Sun (1997). The endocrine mechanism of sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: a review. *Chin J Physiol* 40(4):197-205.
- Chang** X, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Kobayashi-Kajura H, Sudhakumari CC y Y Nagahama (2005). Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 141(2):101-115.
- Chiang** EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J y B Chung (2001). Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* 231:149-163.
- Chue** J y CA Smith (2011). Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS J* 278(7):1027-1034.
- Cocquet** J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M, De Baere E, Messiaen L, Cotinot C, Fellous M y RA Veitia (2002). Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* 39(12):916-921.
- Crews** D (1996). Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zool Sci* 3(1):1-13.
- Crisponi** L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A y G Pilia (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27(2):159-166.
- Dale** TC (1998). Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329:209-222.
- Dawes** JA (1995). Livebearing fishes, a guide to their aquarium care, biology and classification. Blandford Publications, United Kingdom, 240pp.
- De Falco** T y B Capel (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:457-482.
- De Santa Barbara** P, Moniot B, Poulat F y P Berta (2000). Expression and subcellular localization of SF1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn* 217:293-298.
- De Santa Barbara** P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F y P Berta (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18:6653-6665.
- Draper** BW, McCallum CM y CB Moens (2007). *nanos1* is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. *Dev Biol* 305:589-598.

- Devlin** RH y Y Nagahama (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- Díaz-Pardo** E y D Ortiz-Jiménez (1986). Reproducción y ontogenia de *Girardinichthys viviparus* (Pisces: Goodeidae). *Ann Esc Nal Cien Biol Mex* 30:45-66.
- Domínguez-Domínguez** O, Mercado-Silva N, Lyons J y H Grier (2005). The viviparous Goodeid fishes. En: *Viviparous Fishes* (Uribe MC y HJ Grier, eds), pp. 525-569. Homestead, FL: New Life Publications.
- Du** QY, Wang FY, Hua HY y ZJ Chang (2007). Cloning and study of adult-tissue-specific expression of Sox9 in *Cyprinus carpio*. *J Genet* 86(2):85-91.
- Eddy** EM (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 43:229-280.
- El Jamil** A, Kanhoush R, Magre S, Boizet-Bonhoure B y M Penrad-Mobayed (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn* 237(10):2996-3005.
- Fenske** M y H Segner (2004) Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 67:105-126.
- Fernandino** JI, Hattori RS, Shinoda T, Kimura H, Strobl-Mazzulla PH, Strüssmann CA y GM Somoza (2008a). Dimorphic expression of dmrt1 and cyp19a1 (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 2(6):316-324.
- Fernandino** JI, Hattori RS, Kimura H, Strüssmann CA y GM Somoza (2008b). Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 237(11):3192-3199.
- Fhürer** D (2002). Lessons from studies of complex genetic disorders: identification of FOXL2-a novel transcription factor on the wing to fertility. *Eur J Endocrinol* 146(1):15-18.
- Findley** SD, Tamanaha M, Clegg NJ y H Ruohola-Baker (2003). Maelstrom a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development* 130:859-871.
- Fleming** A, Wibbels T, Skipper JK y D Crews (1999). Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 116(3):336-346.
- Flores** JA y JR Burns (1993). Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Cell Tissue Res* 271:263-270.
- Foster** JW, Domínguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Wellwe PA, Stevanovich M, Weissenbach J, Manssur S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD y AJ Schafer (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutation in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530.
- Gasca** S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P y B Boizet-Bonhoure (2002). A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17):11199-11204.
- Giuli** G, Shen WH y HA Ingraham (1997). The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development* 124:1799-1807.
- Godwin** J (2009). Social determination of sex in reef fishes. *Semin Cell Dev Biol* 20(3):264-270.

- Goodfellow** PN y R Lovell-Badge (1993). SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27:71-92.
- Govoroun** MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F y Cotinot C (2004). Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn* 231:859-870.
- Grandi** G y G Colombo (1997). Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla Anguilla* [L.], Anguilliformes, Teleostei): a cytological and ultrastructural study. *J Morphol* 231:195-216.
- Grier** H (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: centropomidae). *J Morphol* 243(3):265-281.
- Grier** HJ (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. En: *The Sertoli cell* (Russell LD y MD Griswol, eds), pp. 704-739. Clearwater, FL: Cache River Press.
- Grier** HJ y LR Parenti (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Int Comp Biol* 44(5):333-348.
- Grier** HJ y F Lo Nostro (2000). The germinal epithelium in the fish Gonads: the unifying concept. En: *Proceeding of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Anderson F y SO Stefansson, eds), pp. 233-236. The University of Bergen, Norway.
- Guan** G, Kobayashi T y Y Nagahama (2000). Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Biophys Res Commun* 272:662-666.
- Guerrero** SM (2005). Estructura microscópica del ovario y la ovogénesis de dos especies de peces vivíparos: *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae) y *Chapalichthys encaustus* (Goodeidae). Tesis de Maestría (Biología Experimental), Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F. 104pp.
- Guerrero-Estévez** S y N Moreno-Mendoza (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 20:101-121.
- Guiguen** Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, Mcmeel OM, Martin SA y A Fostier (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reprod Dev* 54(2):154-162.
- Guo** Y, Cheng H, Huang X, Gao S, Yu H y R Zhou (2005). Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochem Biophys Res Commun* 330(3):950-957.
- Hale** MC, Xu P, Scardina J, Wheeler PA, Thorgaard GH y KM Nichols (2011). Differential gene expression in male and female rainbow trout embryos prior to the onset of gross morphological differentiation of the gonads. *BMC Genomics* 12:404.
- Hamaguchi** S (1982). A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res* 227:139-151.
- Hayes** TB (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibian: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281:373-399.
- Herpin** A, Rohr S, Riedel D, Kluever N, Raz E y M Schartl (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev Biol* 7:3.

- Higa M**, Kanda H, Kitahashi T, Ito M, Shiba T y H Ando (2000). Quantitative analysis of fushi tarazu factor 1 homolog messenger ribonucleic acids in the pituitary of salmon at different prespawning stages. *Biol Reprod* 63:1756-1763.
- Hoar WS** (1969). Reproduction. En: *Fish Physiology* (Hoar WS y DJ Randall, eds), pp 1-72. New York, NY: Academic Press.
- Hubbs CL**, Turner CL (1939). Studies of the fishes of the order cyprinodonts. XVI. A revision of the Goodeidae. *Misc Publ Mus Zool Univ Mich* 42:1-80.
- Hudson QJ**, Smith CA y AH Sinclair (2005). Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Dev Dyn* 233:1052-1055.
- Ijiri S**, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M y Y Nagahama (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 78(2):333-341.
- Ikeda Y**, Shen WH, Ingraham HA y KL Parker (1994). Development expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 94:654-662.
- Ito M**, Masuda A, Yumoto K, Otomo A, Takahashi Y, Takamatsu N, Kanda H, Yamashita S y T Shiba (1998). cDNA cloning of a new member of the FTZ-F1 subfamily from a rainbow trout. *Biochem Biophys Acta* 1395(3):271-274.
- Jhostone O** y P Lasko (2004). Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development* 131(17):4167-4178.
- Johnsen H**, Seppola M, Torgersen JS, Delghandi M y Ø Andersen (2010). Sexually dimorphic expression of dmrt1 in immature and mature Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biology* 156(3):197-205.
- Johnston CM**, Barnett M y PT Sharpe (1995). The molecular biology of temperature-dependent sex determination. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 350(1333):297-303.
- Jørgensen A**, Morthorst JE, Andersen O, Rasmussen LJ y P Bjerregaard (2008). Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. *Reprod Biol Endocrinol* 30:6:25.
- Josso N**, Racine C, di Clemente N, Rey R y F Xavier (1998). The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Moll Cell Endocrinol* 145:3-7.
- Kanamori A**, Nagahama Y y N Egami (1985). Development of the tissue architecture in the gonads of the medaka *Oryzias latipes*. *Zool Sci* 2:695-706.
- Karnovsky MJ** (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. *J Cell Biol* 27:137A.
- Kawano K**, Furusawa S, Matsuda H, Takase M y M Nakamura (2001). Expression of steroidogenic factor-1 in frog embryo and developing gonad. *Gen Comp Endocrinol* 123(1):13-22.
- Kent J**, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH y P Koopman (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813-2822.
- Kent J**, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND y V van Heyningen (1995). The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* 11(9):1781-1792.

- Kettlewell** JR, Raymond CS y D Zarkower (2000). Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* 26(3):174-178.
- Klüver** N, Herpin A, Braasch I, Driessle J y M Schartl (2009). Regulatory back-up circuit of medaka *Wt1* co-orthologs ensures PGC maintenance. *Dev Biol* 325(1):179-88.
- Klüver** N, Kondo M, Herpin A, Mitani H y M Schartl (2005). Divergent expression patterns of *Sox9* duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Dev Genes Evol* 215(6):297-305.
- Knaut** H, Pelegri F, Bohmann K, Schwarz H y C Nusslein-Volhard (2000). Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J Cell Biol* 149:875-888.
- Kobayashi** S, Sato K y Y Hayashi (2005). The role of mitochondrial rRNAs and Nanos protein in germline formation in *Drosophila* embryos. *Zool Sci* 22:943-954.
- Kobayashi** T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H, Suzuki A, Saito N, Nakamoto M, Shibata N y Y Nagahama (2004). Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* 231:518-526.
- Kobayashi** T, Kajiura-Kobayashi H y Y Nagahama (2003). Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenet Genome Res* 101:289-294.
- Kobayashi** T, Kajiura-Kobayashi H y Y Nagahama (2002). Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech Dev* 111:167-171.
- Kobayashi** Y, Horiguchi R, Nozu R y M Nakamura (2010). Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (*Foxl2*) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Biol Sex Differ* 1(1):3.
- Kondo** M, Hornung U, Nanda I, Imai S, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Hori H, Schmid M, Shimizu N y M Schartl (2006). Genomic organization of the sex-determining and adjacent regions of the sex chromosomes of medaka. *Genome Res* 16(7):815-826.
- Kondo** M, Nanda I, Hornung U, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Schmid M, Shima A y M Schartl (2003). Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. *Curr Biol* 13:416-420.
- Koopman** P (2001). The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell* 105:843-847.
- Koopman** P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N y R Lovell-Badge (1990). Expression of a candidate sex determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- Koprunner** M, Thisse C, Thisse B y E Raz (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev* 15:2877-2885.
- Koya** Y, Fujita A, Niki F y E Ishihara (2003). Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zool Sci* 20:1231-1242.
- Kuo** MW, Postlethwait J, Lee WC, Lou SW, Chans WK y BC Chung (2005). Gene duplication, gene loss and evolution of expression domains in the vertebrate nuclear receptor NR5A (*Ftz-F1*) family. *Biochem J* 389:19-26.
- Kurokawa** H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, Morohashi KI y M Tanaka (2007). Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *PNAS* 104(43):16958-16953.

- Kwon** JY, McAndrew, BJ Y DJ Penman (2001). Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59(4):359-370.
- Larsson** SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V y ND Hastie (1995). Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81:391-401.
- Lasko** PF y M Ashburne (1988). The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335:611-617.
- Lebrun** C, Billard R, Jalabert B (1982). Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. *Reprod Nutr Dev* 22 (2):405-412.
- Lewis** ZR, McClellan MC, Postlethwait JH, Cresko WA y RH Kaplan (2008). Female-specific increase in primordial germ cells marks sex differentiation in threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J Morphol* 269(8):909-921.
- Li** JZ, Zhou YP, Zhen Y, Xu Y, Cheng P, X Wang HN y FJ Deng (2009). Cloning and characterization of the SSB-1 and SSB-4 genes expressed in zebrafish gonads. *Biochem Genet* 47:179-190.
- Liang** L, Diehl-Jones W y P Lasko (1994). Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120:1201-1211.
- Liu** Z, Wu F, Jiao B, Zhang X, Hu C, Huang B, Zhou L, Huang X, Wang Z, Zhang Y, Nagahama Y, Cheng CH y D Wang (2007). Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J Endocrinol* 194(1):223-241.
- Loffler** KA, Zarkower D y P Koopman (2003). Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome, FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 144:3237-3243.
- Lombardi** J y JP Wourms (1985). The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish. I. Ultrastructure of the internal ovarian epithelium, the maternal component. *J Morphol* 84:277-292.
- Luo** X, Ikeda Y y KL Parker (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- Maack** G y H Segner (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *J Fish Physiol* 62:895-906.
- Malki** S, Berta P, Poulat F y B Boizet-Bonhoure (2005). Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res* 309(2):468-475.
- Marchand** O, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel O, Lareyre J, Bernot A, Laudet V y Y Guiguen (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem Biophys Acta* 1493:180-187.
- Matsuda** M (2005). Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Annu Rev Genet* 39:293-307.
- Matsuda** M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M y Y Nagahama (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(10):3865-3870.

- Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, Nagahama Y, Hamaguchi S y M Sakaizumi (2003).** *Oryzias curvinotus* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zool Sci* 20:159-161.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S y M Sakaizumi (2002).** DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559-563.
- Mayer LP, Overstreet SL, Dyer CA y CR Propper (2002).** Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol* 127(1):40-47.
- Meijide F J, Lo Nostro FL y GA Guerrero (2005).** Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): a light and electron-microscopy study. *J Morphol* 264:191-210.
- Meyer A y C Lydeard (1993).** The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placentas and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes), as inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene *X-src*. *Proc R Soc B* 254:153-162.
- Mikamo, K y E Witschi (1964).** Masculinization and breeding of the W W *Xenopus*. *Experientia* 20:622-623.
- Miura T, Miura C, Konda Y y K Yamauchi (2002).** Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129:2689-2697.
- Molyneaux K y C Wylie (2004).** Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* 48:537-544.
- Moore BC, Hamlin HJ, Botteri NL y LJ Jr Guillette (2010).** Gonadal mRNA expression levels of TGFbeta superfamily signaling factors correspond with post-hatching morphological development in American alligators. *Sex Dev* 4(1-2):62-72.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A y R Lovell-badge (1996).** Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the genes in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14:62-68.
- Moreno-Mendoza N, Harley V y LH Merchant (2003).** Cell aggregation precedes the onset of Sox9 expressing preSertoli cells in the genital ridge of mouse. *Cytogenet Genome Res* 101:219-223.
- Moreno-Mendoza N, Harley VR y H Merchant-Larios (1999).** Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male-or female-promoting temperatures. *J Exp Zool* 284(6):705-710.
- Morinaga C, Saito D, Nakamura S, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M y H Kondoh (2007).** The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(23):9691-9696.
- Munday PL, White JW y RR Warner (2006).** A social basis for the development of primary males in a sex changing fish. *Proc R Soc B* 273:2845-2851.
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y y N Shibata (2006).** Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 344(1):353-361.
- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y y N Shibata (2005).** Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 333(3):729-736.

- Nakamura**, M, Kobayashi T, Chang XT y Y Nagahama (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J Exp Biol* 281:362-372.
- Nakamura** M y Y Nagahama (1989). Differentiation and development of Leydig cells, and change of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 7:211-219.
- Nakamura** M y H Takahashi (1973). Gonadal sex differentiation in tilapia, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 24:1-13.
- Nakamura** S, Aoki Y, Saito D, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K y M Tanaka (2008). Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Mol Reprod Dev* 75(3):472-476.
- Nanda** I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M y M Scharl (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.
- Nanda** I, Zend-Ajusck E, Shan Z, Grützner F, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwin G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T y M Schmid (2000). Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet* 89(1-2):67-78.
- Nanda** I, Shan Z, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Nothwang H, Grützner F, Paton IR, Windsor D, Dunn I, Engel W, Staeheli P, Mizuno S, Haaf T y M Schmid (1999). 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet* 21(3):258-259.
- Nelson** JS (1994). *Fishes of the World*. 3^a ed. J Wiley and Sons, Inc, New York, 600pp.
- Nicol** B, Guerin A, Fostier A y Y Guiguen (2012). Ovary-predominant *wnt4* expression during gonadal differentiation is not conserved in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev* 79(1):51-63.
- Okada** E, Yoshimoto S, Ikeda N, Kanda H, Tamura K, Shiba T, Takamatsu N y M Ito (2009). *Xenopus* W-linked *DM-W* induces *Foxl2* and *Cyp19* expression during ovary formation. *Sex Dev* 3(1):38-42.
- Olsen** LC, Aasland R y A Fjose (1997). A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech Dev* 66:95-105.
- Oreal** E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D y S Magre (1998). Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular *SOX9* expression. *Dev Dyn* 212:522-532.
- Osawa** N, Oshima Y y M Nakamura (2005). Molecular cloning of *Dmrt1* and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zool Sci* 22(6):681-687.
- Oshima** Y, Uno Y, Matsuda Y, Kobayashi T y M Nakamura (2008). Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol* 159(2-3):170-177.
- Oshima** Y, Hayashi T, Tokunaga S y M Nakamura (2005). *Wnt4* expression in the differentiating gonad of the frog *Rana rugosa*. *Zool Sci* 22(6):689-693.
- Ottolenghi** C, M Uda, L Crisponi, S Omari, A Cao, A Forabosco y D Schlessinger (2007). Determination and stability of sex. *Bioessays* 29:15-25.
- Park** SY y L Jameson (2005). Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146(3):1035-1042.

- Parker** KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley NA, Stallings N y BP Schimmer (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 57:19-36.
- Parker** KL, Schimmer BP y A Scedl (1999). Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Lif Sci* 55:831-838.
- Patiño** R y F Takashima (1995). Gonads. En: *An atlas of fish histology, normal and pathological features* (Takashima F y T Hibiya , eds), pp. 128-153. Tokyo/Stuttgart/New York: Kodanska/Gustav Fisher.
- Perner** B, Englert C y F Bollig (2007). The Wilms tumor genes wt1a and wt1b control different steps during formation of the zebrafish pronephros. *Dev Biol* 309(1):87-96.
- Pieau** C, Dorizzi M y M Richard-Mercier (2001). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *EXN* 91:117-141.
- Preiss** S, Argentaro A, Clayton A, John A, Jans DA, Ogata T, Nagai T, Barroso I, Schafer AJ y VR Harley (2001). Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 276(30):27864-27872.
- Raghuveer** K, Senthilkumaran B, Sudhakumari CC, Sridevi P, Rajakumar A, Singh R, Muruganankumar R y KC Majumdar (2011). Dimorphic expression of various transcription factor and steroidogenic enzyme genes during gonadal ontogeny in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Sex Dev* 5(4):213-223.
- Raghuveer** K y B Senthilkumaran (2010). Isolation of sox9 duplicates in catfish: localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of sox9 in testicular slices. *Reproduction* 140(3):477-487.
- Rasmussen** TH, Jespersen A y B Korsgaard (2006). Gonadal morphogenesis and sex differentiation intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarces viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): a histological and ultrastructural study. *J Morphol* 267:1032-1047.
- Raymond** CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ y D Zarkower (2000). Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14(20):2587-2595.
- Raymond** CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ y D Zarkower (1999). Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215(2):208-220.
- Raymond** CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J y D Zarkower (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391(6668):691-695.
- Raz** E (2004). Guidance of primordial germ cell migration. *Curr Op Cell Biol* 16:169-173.
- Raz** E (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat Rev Genet* 4:690-700.
- Rey** R, Lukas-Croisier C, Lasala C y P Bedecarras (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 211:21-31.
- Rhen** T, Metzger K, Schroeder A y R Wood-ward (2007). Expression of putative sex-determining genes during the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Sex Dev* 1:255-270.

- Rodríguez-Marí A**, Yan YL, Bremiller RA, Wilson C, Canestro C y JH Postlethwait (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Mullerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expr Patterns* 5:655-667.
- Ross RM** (1990). The evolution of sex-change mechanisms in fishes. *Environ Biol Fishes* 29:81-93.
- Saito D**, Morinaga C, Aoki Y, Nakamura S, Mitani H, Furutani-Seiki M, Kondoh H y M Tanaka (2007). Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Dev Biol* 310:280-290.
- Saotome K**, Hayashi K, Adachi N, Nakamura Y y M Nakamura (2010). Isolation and characterization of Vasa in the frog *Rana rugosa*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313:452-459.
- Satoh N** y N Egami (1972). Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *J Embryol Exp Morphol* 28:385-395.
- Sawyer SJ**, Gerstner KA y GV Callard (2006). Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen Comp Endocrinol* 147(2):108-117.
- Schartl M** (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 14:634-641.
- Schindler JF** y WC Hamlett (1993). Maternal-embryonic relations in viviparous teleosts. *J Exp Zool* 266:378-393.
- Schmidt D**, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC y M Treier (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131(4):933-942.
- Schulz RW**, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC y CR Tyler (2007). Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol* 41(17):6305-6310.
- Selman K** y EA Wallace (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool Sci* 6:211-231.
- Semba K**, Saito-Ueno R, Takayama G y M Kondo (1996). cDNA cloning and its pronephros-specific expression of the Wilms' tumour suppressor gene, WT1, from *Xenopus laevis*. *Gene* 175:167-172.
- Shapiro DY** (1990). Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. *J Exp Zool Suppl* 4:132-136.
- Shen XY**, Cui JZ, Gong QL y Y Nagahama (2007). Cloning of the full-length coding sequence and expression analysis of Sox9b in guppy (*Poecilia reticulata*). *Fish Physiol Biochem* 33(3):195-202.
- Shinomiya A**, Shibata N, Sakaizumi M y S Hamaguchi (2002). Sex reversal of genetic females (XX) induced by the transplantation of XY somatic cells in the medaka, *Oryzias latipes*. *Int J Dev Biol* 46:711-717.
- Shinomiya A**, Hamaguchi S y N Shibata (2001). Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *J Exp Zool* 290:402-410.
- Shinomiya A**, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y y S Hamaguchi (2000). The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ* 42:317-326.

- Shoemaker C**, Queen J y D Crews (2007a). Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol Endocrinol* 21:2750-2763.
- Shoemaker C**, Ramsey M, Queen J y D Crews (2007b). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 236(4):1055-1063.
- Siegfried KR** y C Nüsslein-Volhard (2008). Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Dev Biol* 324:277-287.
- Sinclair AH**, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge, R. y PN Goodfellow (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Smith CA**, Shoemaker CM, Roeszler KN, Queen J, Crews D y AH Sinclair (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev Biol* 8:72.
- Smith CA** y AH Sinclair (2004). Sex determination: insights from the chicken. *Bio Essays* 26:120-132.
- Smith CA**, Katz M y AH Sinclair (2003). DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod* 68(2):560-570.
- Smith CA**, Smith MJ y AH Sinclair (1999a). Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234(2):395-402.
- Smith CA**, McClive PJ, Western PS, Reed KJ y AH Sinclair (1999b). Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402(9):601-602.
- Spotila LD**, Spotila JR y SE Hall (1998). Sequence and expression analysis of Wt1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J Exp Zool.* 281(5):417-427.
- Strussmann CA**, Moriyama S, Hanke EF, Calsina Cota JC y F Takashima (1996). Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *J Fish Biol* 48:643-651.
- Takahashi H** (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 28:57-65.
- Takahashi H** (1974). Modification of the development of female reproductive organs in the guppy, *Poecilia reticulata*, following androgen treatment in their juvenile period. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 25:174-199.
- Takamatsu N**, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S y T Shiba (1997). Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene* 202:167-170.
- Takase M**, Noguchi S y M Nakamura (2000). Two Sox9 messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*. *FEBS Letters* 466:249-254.
- Tanaka M**, Saito D, Morinaga C y H Kurokawa (2008). Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ* 50:273-278.
- Tanaka M**, Kinoshita M, Kobayashi D y Y Nagahama (2001). Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2544-2549.

- Tang B**, Hu W, Hao J y Z Zhu (2010). Developmental expression of steroidogenic factor-1, cyp19a1a and cyp19a1b from common carp (*Cyprinus carpio*). *Gen Comp Endocrinol* 167(3):408-416.
- Torres-Maldonado LC**, Landa-Piedra A, Moreno-Mendoza N, Marmolejo-Valencia A, Meza-Martínez A y H Merchant-Larios (2002). Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Comp Endocrinol* 129(1):20-26.
- Torres-Maldonado LC**, Moreno-Mendoza N, Landa A y H Merchant-Larios (2001). Timing of SOX9 downregulation and female sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J Exp Zool* 290(5):498-503.
- Toyooka Y**, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M y T Noce (2000). Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* 93:139-149.
- Trant JM**, Gavasso S, Ackers J, Chung BC y AR Place (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool* 290(5):475-483.
- Tripathi V** y R Raman (2010). Identification of Wnt4 as the ovary pathway gene and temporal disparity of its expression vis-a-vis testis genes in the garden lizard, *Calotes versicolor*. *Gene* 449(1-2):77-84.
- Tsunekawa N**, Naito M, Sakai Y, Nishida T y T Noce (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127:2741-2750.
- Uchida D**, Yamashita M, Kitano T y T Iguchi (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* 205:711-718.
- Uda M**, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D y G Pilia (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13(11):1171-81.
- Vainio S**, M Heikkila, A Kispert, N Chin, y AP McMahon (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405-409.
- Valenzuela N**, LeClere A y T Shikano (2006). Comparative gene expression of steroidogenic factor 1 in *Chrysemys picta* and *Apalone mutica* turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination. *Evol Dev* 8(5):424-432.
- Van Aerle R**, Runnals TJ y CR Tyler (2004). Ontogeny of gonadal sex development relative to growth in fathead minnow. *J Fish Biol* 64:355-369.
- Veith AM**, Froschauer A, Korting C, Nanda I, Hanel R, Schmid M, Scharlt M y JN Volf (2003). Cloning dmrt1 gen of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene* 317:59-66.
- Vera-Martínez A** y CRM (Consejo de Recursos Minerales) (1995). Monografía geológico-minera del estado de Michoacán. México: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Coordinación General de Minería.
- Vidal VP**, Chaboissier MC, de Rooij DGH y A Schedk (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28(3):216-217.
- Vigier B**, Forest MG, Eychenne B, Bézard J, Garrigou O, Robel P y N Josso (1989). Anti-Mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Nat Acad Sci USA* 86:3684-3688.
- Vizziano D**, Randuineau GI, Baron D, Cauty C y Y Guiguen (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dynamics* 236:2198-2206.

- Volff** JN y M Scharl (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111(1-3):101-110.
- Von Hofsten** J y PE Olsson (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod Biol Endocrinol* 3:63.
- Von Hofsten** J, Karlsson J, Jones I y PE Olsson (2002). Expression and regulation of fushi tarazu factor-1 and steroidogenic genes during reproduction in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Biol Reprod* 67:1297-1304.
- Wagner** KD, N Wagner y A Schedl (2003). The complex life of WT1. *J Cell Sci* 116:1653-1658.
- Wagner** T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W y G Scherer (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120.
- Wallace** RA y K Selman (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Microscop Tech* 16:175-201.
- Wang** DS, Zhou LY, Kobayashi T, Matsuda M, Shibata Y, Sakai F y Y Nagahama (2010). Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinol* 151(3):1331-1340.
- Wang** DS, Kobayashi T, Zhou LY, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K y Y Nagahama (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(3):712-725.
- Wang** D, Kobayashi T, Zhou L y Y Nagahama (2004). Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 320(1):83-89.
- Watanabe** M, Tanaka M, Kobayashi D, Yoshiura Y, Oba Y y Y Nagahama (1999). Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization. *Mol Cell Endocrinol* 149:221-228.
- Webb** SA, Graves JA, Macías-García C, Magurran AE, Foighil DÖ y MJ Ritchie. (2004). Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Mol Phylogenetics Evol* 30:527-544.
- Weidinger** G, Wolke U, Köpruner M, Klinger M y E Raz (1999). Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cell. *Development* 126(23):5295-5307.
- Western** PS, Harry JL, Marshall Graves JA y AH Sinclair (2000). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241(2):223-232.
- Western** PS, Harry JL, Graves JA y AH Sinclair (1999). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn* 216(4-5):411-419.
- Wilhelm** D, Palmer S y P Koopman (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87:1-28.
- Wilhelm** D y C Englert (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev* 16:1839-1851.
- Wischnath** L (1993). Atlas of livebearers of the world. T.F.H. Publications Inc, USA, 336 pp.

- Wodarz A y R Nusse** (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88.
- Wourms JP** (1981). Viviparity: The maternal-fetal relationships in fishes. *Am Zool* 21:473-515.
- Wourms JP** (2005). Functional morphology, development and evolution of Trophotaeniae. En: *Viviparous fishes* (Uribe MC y HJ Grier, eds), pp. 219-244. Homestead, FL: New Life Publications.
- Wourms JP, Grove BD y J Lombardi** (1988). The maternal-embryonic relationships in viviparous fishes. En: *Fish Physiology*, Vol. XI (Hoar WS y DJ Randall, eds), pp. 1-134. New York, NY: Academic Press.
- Wu GC y CF Chang** (2009). wnt4 is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biol Reprod* 81(6):1073-82.
- Wu GC, Chiu PC, Lyu YS y CF Chang** (2010). The expression of amh and amhr2 is associated with the development of gonadal tissue and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biol Reprod* 83(3):443-453.
- Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T y T Kitano** (2007). Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Commun* 359(4):935-940.
- Yamamoto T** (1969). Sex differentiation. En: *Fish Physiology*, Vol. III (Hoar WS y DJ Randall, eds), pp. 117-175. London: Academic Press.
- Yamamura Y, Aoyama S, Oshima Y, Kato T, Osawa N y M Nakamura** (2009). Molecular cloning and expression in gonad of *Rana rugosa* WT1 and Fgf9. *Zool Sci* 22(9):1045-1050.
- Yan YL, Miller CT, Nissen RM, Singer A, Liu D, Kirn A, Draper B, Willoughby J, Morcos PA, Amsterdam A, Chung BC, Westerfield M, Haffter P, Hopkins N, Kimmel C, Postlethwait JH y R Nissen** (2002). A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis. *Development* 129:5065-5079.
- Yao HH, DiNapoli L y B Capel** (2004). Cellular mechanisms of sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Mech Dev* 121:1393-401.
- Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, Araki K, Morohashi KI y K Ozato** (2002). Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol Reprod Dev* 63:5-16.
- Yoon C, Kawakami K y N Hopkins** (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124:3157-3166.
- Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, Iguchi T, Abe SI y T Kitano** (2004). Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Commun* 322:508-513.
- Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S y T Takeuchi** (2000). Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *Int J Dev Biol* 44:323-326.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L y W Miller** (2007). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comp Biol* 7 (1-2):203-214.
- Zhou RJ, Liu L, Guo LQ, Yu HS, Cheng H, Huang X, Tiersch TR y P Berta** (2003). Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol Reprod Dev* 66:211-217.

XI. Anexos**1. Secuencias obtenidas para los genes *sox9* y *vasa******sox9***

>Muestra Sox9+Sox9 1

**CACTGATCTGTGTCCGACGAGGACTCGCAGCAGGGTGAGGCGCGGGTCCCTCTGA
GATTGGCTTATCTTCACTGATTCTATTCTGTGCATGTCCGGACTGCACCGGGCCTTC
TGCCCACCCGCCACTACCGACGCCTCACCCATTGCTGACTCTACAGACGTTCTTCA
CAGA**

vasa

>Muestra Vasa+vasa 1

**CATGCGGCTGCCGCCTCCCGTCCCTTGTGGGTGGATAGACTGCCCTCTGGGTTTCGT
CTCAGAGGTGGGGTTCCTCTCCTTGAGCCCTGCCGCCCGGGTGAGGTTTCATCGCC
ACGCTGGATATCCTCCGCCTGACGGATATGCCTACCCATCCCTCAGTCTTGGTCT
TCTTCCCATCTCCGAGATCATCCTGGCCAACCTTTGCCCTATTCCGGTTCTGGTC
CACTCCACCGGACCTGGAGAACATGGGAGTCCCGGCCATCATCTGGATTATAGGG
AGGTGCGAGGATGTCCCA**



Journal of Fish Biology (2012) **80**, 572–594

doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x, available online at wileyonlinelibrary.com

Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae)

S. GUERRERO-ESTÉVEZ AND N. MORENO-MENDOZA*

*Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomedicas,
Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Apartado Postal 70228, Mexico D.F. 04510,
Mexico*

(Received 27 May 2011, Accepted 23 November 2011)

This study describes the structural and ultrastructural characteristics of gonadal sex differentiation and expression of *Vasa*, a germline marker, in different developmental stages of embryos and newborn fry of the barred splitfin *Chapalichthys encaustus*, a viviparous freshwater teleost endemic to Mexico. In stage 2 embryos, the gonadal crest was established; gonadal primordia were located on the coelomic epithelium, formed by scarce germ and somatic cells. At stage 3, the undifferentiated gonad appeared suspended from the mesentery of the developing swimbladder and contained a larger number of germ and somatic cells. At stages 4 and 5, the gonads had groups of meiotic and non-meiotic germ cells surrounded by somatic cells; meiosis was evident from the presence of synaptonemal complexes. These stages constituted a transition towards differentiation. At stage 6 and at birth, the gonad was morphologically differentiated into an ovary or a testis. Ovarian differentiation was revealed by the presence of follicles containing meiotic oocytes, and testicular differentiation by the development of testicular lobules containing spermatogonia in mitotic arrest, surrounded by Sertoli cells. Nuage, electron-dense material associated with mitochondria, was observed in germ cells at all gonadal stages. The *Vasa* protein was detected in all of the previously described stages within the germ-cell cytoplasm. This is the first report on morphological characteristics and expression of the *Vasa* gene during sexual differentiation in viviparous species of the Goodeidae family. *Chapalichthys encaustus* may serve as a model to study processes of sexual differentiation in viviparous fishes and teleosts.

© 2012 The Authors

Journal of Fish Biology © 2012 The Fisheries Society of the British Isles

Key words: germ cells; gonadal development; immunofluorescence; nuage; ultrastructure; *Vasa* protein.

INTRODUCTION

In teleosts, mechanisms of sexual determination are controlled by genetic, environmental and social factors. Various patterns of gonadal development have been described, including gonochoristic and hermaphroditic species (Yamamoto, 1969; Nakamura *et al.*, 1998; Devlin & Nagahama, 2002; Guerrero-Estévez & Moreno-Mendoza, 2010).

*Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: +52 55 56223866; email: angelica@biomedicas.unam.mx

Gonochoristic species may be either differentiated, in which the immature gonad differentiates directly into an ovary or a testis, or undifferentiated, in which all individuals develop an initial ovarian-like gonad. The latter subsequently differentiates into a testis or into an ovary proper (Maack & Segner, 2003).

Detailed histological descriptions as well as the ultrastructure of early gonadal development and of sexual differentiation have been described in oviparous species, such as the medaka *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel 1846) (Hamaguchi, 1982; Shinomiya *et al.*, 2002), *Cichlasoma dimerus* (Heckel 1840) (Meijide *et al.*, 2005), the zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) (Maack & Segner, 2003), the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) (Vizziano *et al.*, 2007) and the fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque 1820 (Van Aerle *et al.*, 2004). Most of these species are used as laboratory models. By contrast, for viviparous teleosts information on gonadal differentiation is limited to some species of Poeciliidae and Zoarcidae (Koya *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2006). Meticulous histological observation of the process of gonad morphogenesis is of primary importance to understand the mechanism of sexual differentiation (Nakamura *et al.*, 1998).

Approximately 500 species of teleosts have been classified as viviparous (Wourms, 1981) and they exhibit unique reproductive characteristics and strategies among vertebrates, such as intraovarian gestation, formation of placental analogues and fusion of gonadal primordia during embryonic development (Wourms, 1981; Wourms *et al.*, 1988). Thus, the study of viviparous teleosts can contribute to a greater understanding of patterns of sexual differentiation in teleosts in general.

Teleost gonads have many features in common with those of other vertebrates (Hoar, 1969; Patiño & Takashima, 1995). In teleosts, however, the gonads originate from only one primordium, the cortex or the peritoneal wall, so that unlike other vertebrates, the early gonad does not have an equivalent of the medulla that is derived from the interrenal or mesonephric blastema (Hoar, 1969; Patiño & Takashima, 1995; Devlin & Nagahama, 2002). Gonads usually develop bilaterally but, later, they can fuse and this is the case for viviparous species (Wourms, 1981). In teleosts, as in other vertebrates, primordial germ cells (PGC) are of extra-embryonic origin and migrate to reach the genital crests (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Molyneaux & Wylie, 2004).

With regard to genetics, *Vasa* is a specific gene of the vertebrate and invertebrate germ line, which codes for an RNA helicase belonging to a family of proteins that share the DEAD box (Liang *et al.*, 1994; Molyneaux & Wylie, 2004). By investigating *Vasa*, fish PGCs have been detected during early development, migration, sexual differentiation and in adult gonads (Kobayashi *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2008; Blázquez *et al.*, 2011). In *D. rerio*, *Vasa* has been detected in the ventral area between the third and the fifth somite (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Von Hofsten & Olsson, 2005), while in *O. latipes* it has been reported during gastrulation (Shinomiya *et al.*, 2000). Aoki *et al.* (2008) state that during sexual differentiation in *O. latipes*, changes in the spatial and temporal localization of the *Vasa* protein occur. In the testicle, expression is restricted to spermatogonia and early spermatocytes; in the ovary it may be detected in previtellogenic and early vitellogenic oocytes (Shinomiya *et al.*, 2000). In most teleosts, gonadal crests are formed at the presumptive sites only after the arrival of PGCs, which in turn increase in number by mitotic proliferation (Nakamura *et al.*, 1998).

Teleost gonadal differentiation involves alterations in both germ and somatic cells. In germ cells, the alterations are revealed by mitotic and meiotic divisions of oogonia and spermatogonia. In somatic cells, alterations involve the formation of a cavity in the ovary and of efferent ducts, spermatic ducts and the appearance of testicular lobules in the testicle (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 2006). The histological appearance of meiotic figures in germ cells of the prospective ovaries marks the onset of gonad differentiation in teleosts, while the testicles remain histologically undifferentiated longer than the ovaries. In testicles, somatic differentiation precedes germ-cell meiosis (Nakamura *et al.*, 1998).

With regard to the species selected for this study, the Goodeidae family comprises freshwater fishes; the egg-laying Empetrichthynae subfamily is distributed in the U.S.A., and the viviparous Goodeinae subfamily is found along the central Mexican plateau (Álvarez del Villar, 1970; Webb *et al.*, 2004). Recently, interest in the Goodeinae subfamily has grown because they are an endemic group which contributes to the diversity of the Mexican fauna and their environment has been contaminated with pollutants that may affect their reproductive physiology (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2005a). Thus, studies have been performed on their reproductive characteristics (Grier *et al.*, 2005; Uribe *et al.*, 2005), ecology (De la Vega & Macías-García, 2005), conservation (Contreras-Balderas, 2005; Medina-Nava *et al.*, 2005) and evolution and biogeography (Doadrio & Domínguez, 2004; Webb *et al.*, 2004).

The reproductive characteristics of the Goodeinae subfamily include sexual dimorphism consisting of the modification of the male's anal fin into an andropodium, a key organ for sperm transfer (Meyer & Lydeard, 1993). Fertilization occurs inside the follicle and embryonic development takes place in the ovarian lumen (intraluminal gestation) (Wourms *et al.*, 1988). The nutritional pattern is matrotrophic and embryonic nutrition is by means of trophotaeniae, structures derived from the intestine which project from the embryonic perianal region to the exterior (Wourms, 2005). These structures associate with the ovarian luminal epithelium forming the trophotaenial placenta through which nutrients are transferred to the embryo (Lombardi & Wourms, 1985; Schindler & Hamlett, 1993). Gonadal primordia fuse during embryonic development forming an unpaired gonad; a feature which resembles other viviparous teleosts and differs from oviparous teleosts and other vertebrate groups (Wourms, 1981).

The barred splitfin *Chapalichthys encaustus* (Jordan & Snyder 1899) is a viviparous goodeid endemic to the central Mexican plateau, which may be found in the lower Lerma River basin, Chapala and Orandino Lakes, and in La Luz Spring (Wischnath, 1993; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2005b). The mean total length (L_T) for the adult male is 63 mm and 61 mm for the adult female (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2005b). Studies on species reproduction include a description of the adult ovary as an unpaired organ with an internal cavity (Hubbs & Turner, 1939), and histological alterations of the ovary in adult females during oogenesis and gestation (Guerrero, 2005). Fertilization is internal, gestation occurs within the ovary lumen and lasts from 6 to 8 weeks, after which an average of 15 fry are born (Wischnath, 1993).

The objective of this study was to describe the morphological characteristics of gonadal sex differentiation processes in *C. encaustus* by light and electron microscopy. The protein of the *Vasa* gene, a germ-cell marker, was detected by immunofluorescence.

MATERIALS AND METHODS

FISH

Adult male and female *C. encaustus* were collected with a net at La Luz Spring, in Jacona, State of Michoacan, Mexico (27° 55' N; 101° 17' W) in the environs of the neovolcanic axis at an altitude of 1633 m a.s.l. (Vera-Martínez & CRM, 1995). Individuals were transported to the aquarium at the Science Faculty of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). They were kept in 100 l aquaria and reproduced in conditions of standard temperature (26° C, range $\pm 1^\circ$ C) and photoperiod (12L:12D) and were fed with commercial flakes (Wardley; www.hartz.com) and larvae (*Artemia* sp.).

SAMPLING

Gestating females were anaesthetized with 2% NaHCO₃ solution and killed by decapitation. The ovary was dissected and embryos were removed and classified according to the developmental stage (E1–E6) based on the description for the Chapultepec splitfin *Girardinichthys viviparus* (Bustamante 1837), a goodeid for which six developmental stages have been proposed according to morphological characters (Díaz-Pardo & Ortiz-Jiménez, 1986). One day-after-birth (dab) fry were also sacrificed by decapitation, after anaesthetization with a 2% NaHCO₃ solution. Gonads of 1 dab fry and embryos (stages 4, 5 and 6) were isolated by micro-dissection, which initially consisted of the release of the mesentery which longitudinally connects the gonad with the swimbladder, using a thin needle. Subsequently, the ends of the mesenteries were cut with micro-scissors and finally with the last cut, the gonad was removed and then placed in an aqueous medium. All procedures were done in accordance with the Guide of Laboratory Animal Use of the Ethical Committee of the Biomedical Research Institute (UNAM).

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY

The caudal region obtained from embryos (stages 2–6) and gonads isolated by micro-dissection from embryos (stages 4–6) and 1 dab fry were processed for high-resolution light microscopy and for transmission electron microscopy (TEM). Initially, tissues were fixed with Karnovsky solution (paraformaldehyde 1.0%-glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) (Karnovsky, 1965) for 12 h, washed with cacodylate buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide (OsO₄) in Zetterqvist's buffer for 1 h, washed with distilled water and dehydrated in a gradual alcohol series and acetone; finally, they were embedded in Epon 812 resin (Electron Microscopy Sciences; www.emsdiasum.com). Semi-thin sections (1 μ m) were obtained and dyed with toluidine blue. Fine sections (60–90 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for transmission electron microscopy (TEM).

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND IMMUNOFLUORESCENCE

Germ cells were identified using an antibody against the *Vasa* protein, a germ-cell marker. Immunohistochemistry was performed to detect the *Vasa* protein in transversal sections of the caudal region of *C. encaustus* embryos in stage 2. Briefly, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde solution (PFA, Sigma; www.sigmaaldrich.com) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.1, Gibco; www.invitrogen.com) for 20 min, washed in PBS and left overnight in 30% sucrose in PBS. Later, tissues were embedded in Tissue-Tek (Tissue-Tek, Sakura Finetek; www.sakuraus.com) and frozen in hexane (J. T. Baker; www.jtbaker.nl) on dry ice. Frozen transversal sections of *c.* 15 μ m were obtained. These were washed with PBS for 5 min in a humid chamber and thereafter blocked with endogenous peroxidase (Blocking Reagent, Biocare Medical PX968MM; www.biocare.net). After three 5 min washings with PBS, the sections were treated for 10 min with 1 \times Triton (Sigma Aldrich) in PBS and then blocked with 1% bovine serum albumin (BSA, Gibco) for 2 h. Next, they were incubated overnight at 4° C with the primary anti-*Vasa* antibody (Abcam ab 13840-100,

1:250; www.abcam.com). Subsequently, after three 5 min washings with PBS, sections were incubated with a horseradish peroxidase (HRP)–goat–anti-rabbit secondary antibody (Zymed 62-6120, 1:1000; www.zymed.com) for 1 h and later washed with PBS. The samples were revealed with diaminobenzidine (DAB Chromogen K3466, Dako; www.dako.com), mounted in aqueous solution (Dako) and examined with the optical microscope. Negative controls were included using the same protocol for immunohistochemistry on experimental sections, with the exception of *Vasa* primary antibody.

The caudal regions of embryos (stages 3–6) were treated for immunofluorescence to detect *Vasa* protein on sections. First, the caudal regions were fixed in 4% PFA in PBS for 20 min, then washed in PBS and left in 30% sucrose overnight. Later, tissues were embedded in Tissue-Tek and frozen in hexane on dry ice. Serial frozen transversal sections of *c.* 20 μ m were obtained. Sections were placed in a humid chamber and treated with PBS, with 1 \times Triton in PBS for 10 min and then blocked with 1% BSA in PBS for 2 h at room temperature (RT). Sections were then incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with anti-*Vasa* antibody (Abcam ab 13840-100, 1:250). They were subsequently washed with PBS, blocked with 1% BSA for 15 min at RT and incubated with a rhodaminated anti-rabbit secondary antibody [Calbiochem 401321, 1:100 (Merck Chemical International; www.merck-chemicals.com)] for 1 h at RT. After 4 washings with PBS, sections were mounted in aqueous solution (Dako).

For *Vasa* immunofluorescence on the complete gonad, isolated gonads from embryos (E5 and E6) and 1 dab fry were fixed in 4% PFA for 15 min, washed in PBS and left overnight in 3% sucrose in PBS at 4 $^{\circ}$ C. They were subsequently washed with PBS, incubated with 1 \times Triton (in 0.1% BSA in PBS) for 3 h and then blocked overnight with 1% BSA in PBS. Then, they were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with primary anti-*Vasa* antibody (Abcam ab 13840-100, 1:250). After three 30 min washings with PBS, they were blocked with BSA for 15 min and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with a rhodaminated anti-rabbit secondary antibody (Calbiochem 401321, 1:100). After three 1 h washings with PBS, complete gonads were mounted in aqueous solution (Dako). Negative controls were included using the same protocol described above omitting *Vasa* primary antibody. Samples were examined with a laser confocal microscope (LSM5 Pascal, Zeiss; www.zeiss.com) and photographs were obtained and saved in LSM files.

RESULTS

Gestating *C. encaustus* females (*c.* 75 mm L_T) [Fig. 1(a)] carry the developing embryos within the ovarian cavity [Fig. 1(b)]. At birth, *c.* 15 completely developed fry are released showing the typical species pigmentation. Table I shows the developmental stages, size of individuals, morphological features, number of individuals employed and the corresponding gonadal developmental stage. In this study, embryos were classified at different stages (2–6) according to the goodeid developmental table described for *G. viviparus* (Díaz-Pardo & Ortiz-Jiménez, 1986). Stage 2 embryos measure nearly 3 mm L_T ; they show yolk sac and trophotaeniae, posterior gut extensions through which they absorb nutrients from the ovarian fluid [Fig. 1(c)]. Stage 3 embryos measure *c.* 5 mm L_T , trophotaeniae are visible but the yolk sac has shrunk, although its vestiges remain [Fig. 1(d)]. Stage 4 embryos are *c.* 7 mm L_T , trophotaeniae are visible but the yolk sac has disappeared and fin primordia are developing [Fig. 1(e)]. Stage 5 embryos measure *c.* 10 mm L_T , with trophotaeniae [Fig. 1(f)] and a membrane which gives continuity to the dorsal and ventral fins with the caudal fin. Stage 6 embryos are at terminus, are *c.* 15 mm L_T , the trophotaeniae are still visible [Fig. 1(g)] and the fins are well defined; dorsal and ventral fins are not continuous with the caudal fin. One dab fry measures close to 16 mm L_T and trophotaeniae detach at birth [Fig. 1(h)].

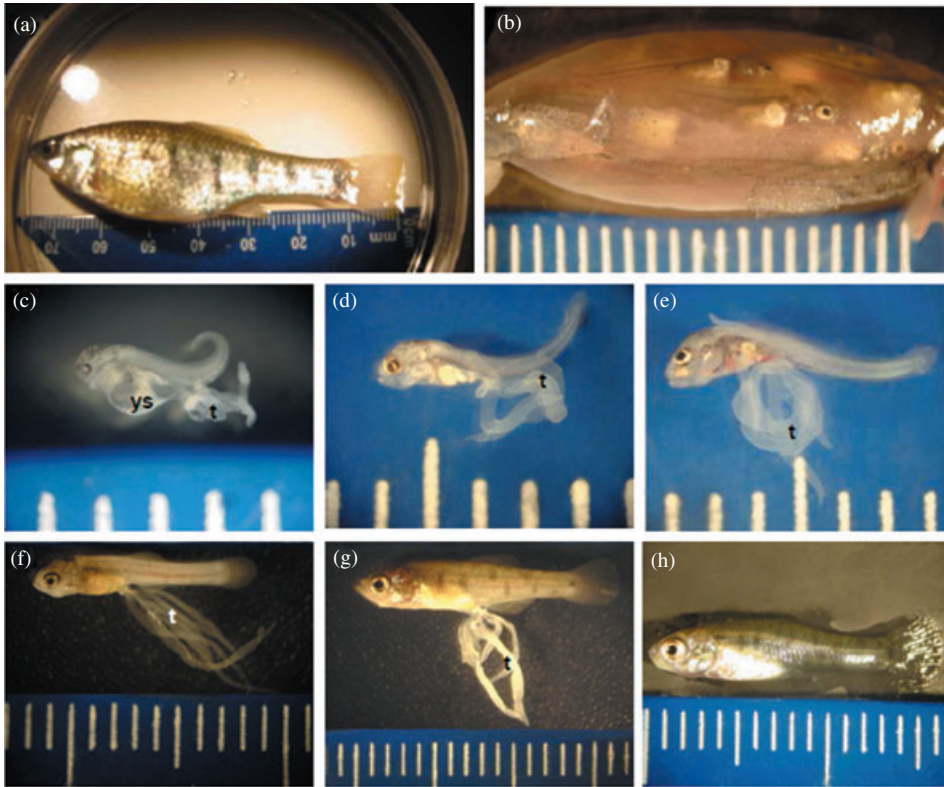


FIG. 1. Gestating female and embryos of *Chapalichthys encaustus*. (a) Gestating *C. encaustus* female. (b) Ovary with embryos arranged within the ovarian cavity. (c) Stage 2 embryo. (d) Stage 3 embryo. (e) Stage 4 embryo. (f) Stage 5 embryo. (g) Stage 6 embryo (full term). (h) Fry, one day-after-birth (dab). t, trophotaeniae (extensions of the embryonic intestine); ys, yolk sac.

GONADAL MORPHOGENESIS

Undifferentiated gonad: stage 2 and 3 embryos

Transversal sections of the stage 2 embryo caudal region show gonads which appear as paired structures situated over the coelomic epithelium, between the developing kidneys and the intestine [Fig. 2(a), (b)]. This is an early stage of gonadal development, specifically the gonadal primordium is being formed, which in turn consists of a few germ cells and some somatic cells. Germ cells (usually in transversal section) are relatively large, roundish to oval shaped [Fig. 2(b)] with a large nucleus containing one or two nucleoli. At the ultrastructural level, a transversal section of the gonadal primordium shows one germ cell surrounded by somatic cells [Fig. 2(c)]. The nucleus of each germ cell contains finely granular euchromatin and a prominent eccentrically located nucleolus [Fig. 2(d)]. The cytoplasm contains abundant mitochondria with tubular cristae, disperse endoplasmic reticulum and nuage, an electron-dense material associated with mitochondria [Fig. 2(d)]. Somatic cells are of irregular shape, they have a nucleus with heterochromatin and generally one nucleolus [Fig. 2(c)].

TABLE I. Morphological features of individuals of *Chapalichthys encaustus* at different developmental stages and the corresponding gonadal stage

Developmental stage	L_T (mm)	Morphological features	Number of individuals	Gonadal stage
2	3	Yolk sac, trophotaeniae	5	Gonadal primordium
3	5	Shrunken yolk sac, trophotaeniae	5	Undifferentiated gonad
4	7	No yolk sac, trophotaeniae, developing fin primordia	5	Differentiating gonad
5	10	No yolk sac, trophotaeniae, dorsal and ventral fins in continuity with caudal fin	7	Differentiating gonad
6	15	No yolk sac, trophotaeniae, fins well defined	10	Differentiated gonad
1 dab	16	No trophotaeniae	10	Differentiated gonad

dab, day after birth; L_T , total length.

For the development stage 3, the gonad becomes suspended from the ventral edge of the swimbladder [Fig. 2(e)]. This stage corresponds to the establishment of the undifferentiated gonad, which is composed of germ and somatic cells; the germ cells have increased in number with regard to the previous stage and as a result, the gonad increases in size and several germ cells are observed in transversal sections [Fig. 2(e)]. The somatic cells are of irregular shapes. It is possible to distinguish two types of somatic cells according to their location in the gonad: peripheral somatic cells that surround the gonad [Fig. 2(e)] and internal somatic cells which are associated with germ cells [Fig. 2(e), (f)]. Ultrastructurally, germ cells show features of undifferentiated germ cells such as round nuclei with finely granular chromatin [Fig. 2(f)].

Differentiating gonad: stage 4 and 5 embryos

Transversal sections of isolated gonads of stage 4 embryos showed undifferentiated germ cells containing one or two nucleoli and abundant somatic cells [Fig. 3(a), (b)]. Gonads of stage 4 and 5 embryos isolated by micro-dissection [Figs 3(c) and 4(a)] and analysed in longitudinal sections, however, showed copious dividing germ cells as well as germ cells which were not dividing (undifferentiated germ cells) [Figs 3(d) and 4(b), (c)]. Both the dividing and the undifferentiated germ cells formed groups surrounded by somatic cells [Fig. 4(e)]. A compartmentalization of the gonad is therefore already visible into meiotic germ-cell groups and undifferentiated germ-cell groups [Fig. 4(c)]. Meiosis was revealed by the presence of synaptonemal complexes at the ultrastructural level [Fig. 4(f)]. Undifferentiated germ cells did not show these structures [Figs 3(f) and 4(g), (h)], but they showed features of earlier stage germ cells, such as spherical mitochondria [Fig. 4(g)], and nuage [Figs 3(f) and 4(g), (h)] in the cytoplasm, and a large nucleus with homogeneously distributed chromatin [Figs 3(f) and 4(g), (h)] and one or two nucleoli [Figs 3(f) and 4(h)].

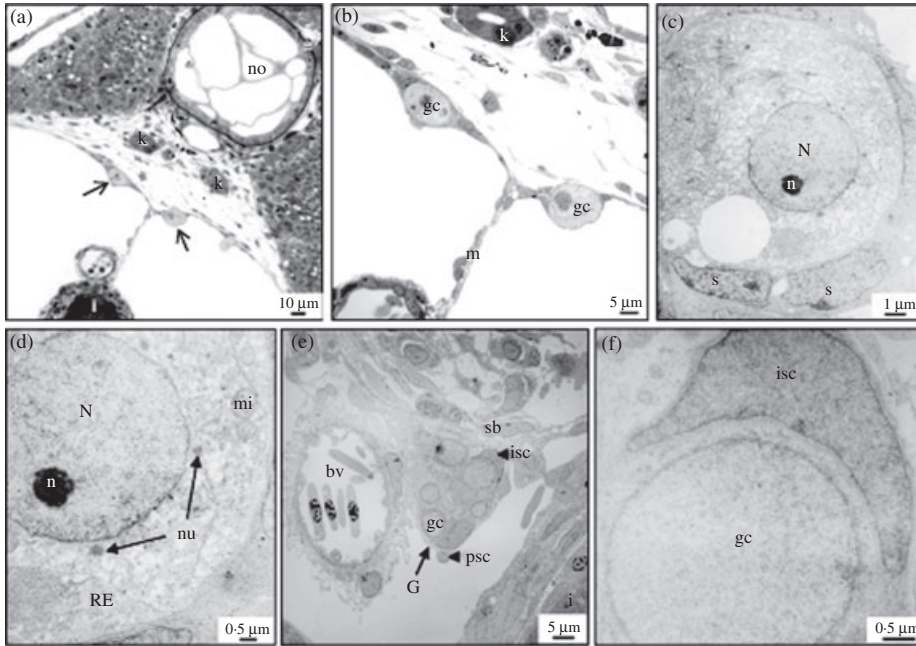


FIG. 2. *Chapalichthys encaustus* undifferentiated gonad stage. (a) Transversal section of the caudal region of a stage 2 embryo; gonadal primordia are located above the coelomic epithelium (—>). (b) Detail showing germ cells. (c) Electron micrograph of a gonadal primordium with primordial germ cell surrounded by somatic cells. (d) Ultrastructural detail of a germ cell containing finely granular chromatin and prominent nucleolus; the cytoplasm shows abundant mitochondria, RE and nuage, an electron-dense material. (e and f) Undifferentiated gonad of stage 3 embryo. (e) Undifferentiated gonad (—>) suspended from the swimbladder close to a blood vessel. Several germ cells are visible close to somatic cells. These may be peripheral (psc) or internal (isc). (f) Detail of germ cell showing homogeneously distributed chromatin within the nucleus; the cell is associated to an internal somatic cell. bv, blood vessel; G, gonad; gc, germ cell; i, intestine; isc, internal somatic cell; k, developing kidney; m, mesentery; mi, mitochondria; no, notochord; N, nucleus; n, nucleolus; nu, nuage; psc, peripheral somatic cell; RE, endoplasmic reticulum; sb, swimbladder; s, somatic cell.

Differentiated gonad: stage 6 embryos and 1 day-after-birth fry

The gonads of stage 6 embryos and 1 dab fry destined to the ovarian differentiation pathway showed germ cells localized along the gonad, which appeared as a compact structure without lumen [Fig. 5(a), (b)]. Germ cells were mainly oocytes in previtellogenic phase corresponding to the chromatin–nucleolus and perinucleolar stages [Fig. 5(c)], surrounded by a layer of flat follicular cells [Fig. 5(d)]. At the ultrastructural level, developing oocytes cytoplasm showed nuage [Fig. 5(d)]. The 1 dab fry showed similar features.

The testes of stage 6 embryos and 1 dab fry showed a lobular morphological array [Fig. 5(e), (f)]. In the testicular lobules, germ cells (spermatogonia) were surrounded by somatic cells [Fig. 5(g)]. At an ultrastructural level, spermatogonia were seen in mitotic arrest, with cytoplasmic mitochondria and nuage and a round nucleus usually containing one nucleolus [Fig. 5(h)]. Spermatogonia were surrounded by differentiating Sertoli cells containing an irregular-shaped nucleus [Fig. 5(h)]. The 1 dab fry showed similar features.

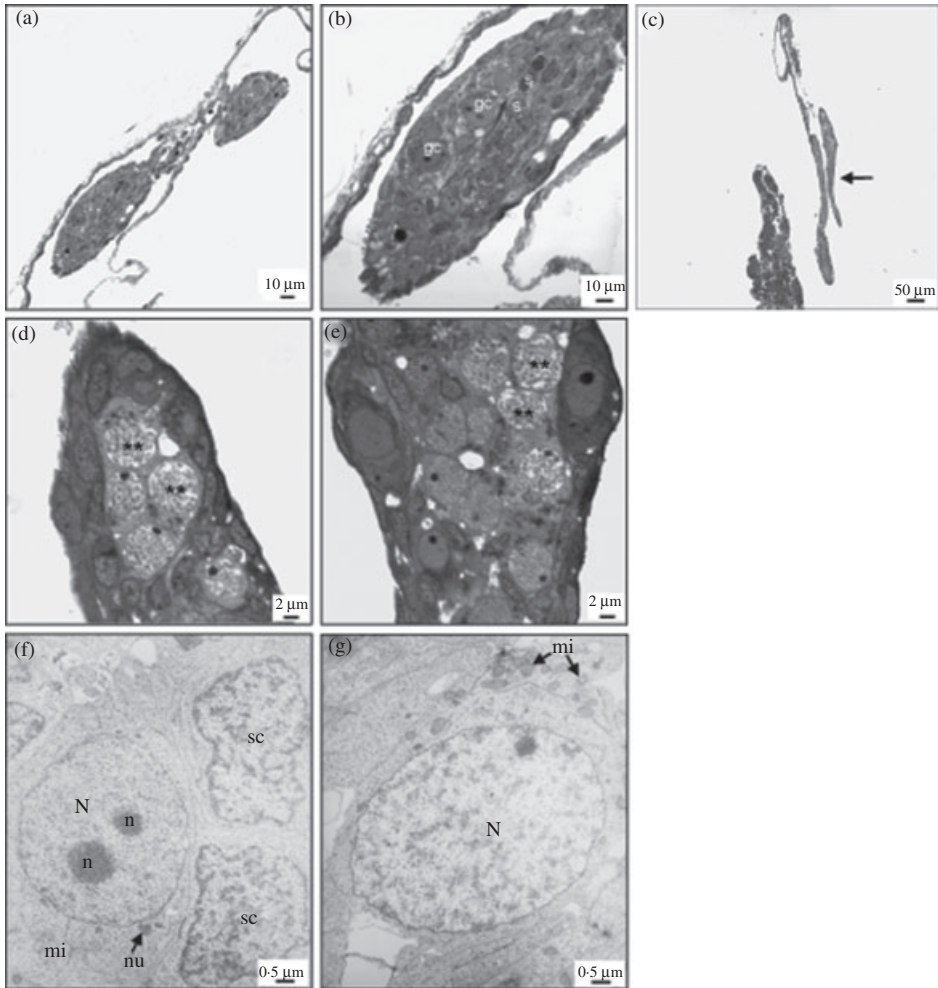


FIG. 3. *Chapalichthys encaustus* differentiating gonad stage. (a) Transversal section of isolated gonad of stage 4 embryo. (b) Detail showing the gonad with some germ cells and abundant somatic cells. (c) Longitudinal section of an isolated gonad (→). (d) Detail of isolated gonad showing a group of dividing germ cells (**) surrounded by somatic cells. (e) Dividing germ cells (**). (f) Ultrastructure of an undifferentiated non-dividing germ cell close to two somatic cells; the germ cell nucleus contains two nucleoli and the cytoplasm shows nuage and mitochondria. (g) Dividing germ cell; the cytoplasm shows abundant mitochondria. gc, germ cell; mi, mitochondria; N, nucleus; n, nucleolus; nu, nuage; sc, somatic cell.

VASA PROTEIN DETECTION

The *Vasa* protein was detected in the gonads of specimens from all stages in this study (2–6 and 1 dab) [Fig. 6]. The *Vasa* protein was detected in germ cells of the gonadal primordium which is located on the coelomic epithelium of stage 2 embryos [Fig. 6(a), (b)], as well as in the undifferentiated gonad of stage 3 embryos which is located on the developing swimbladder [Fig. 6(c)]; specifically in germ cells [Fig. 6(d)]. Likewise, *Vasa* was detected in the differentiating gonad [Fig. 6(e)–(h)], which is located above the swimbladder [Fig. 6(e), (g)]; *Vasa* was restricted to germ

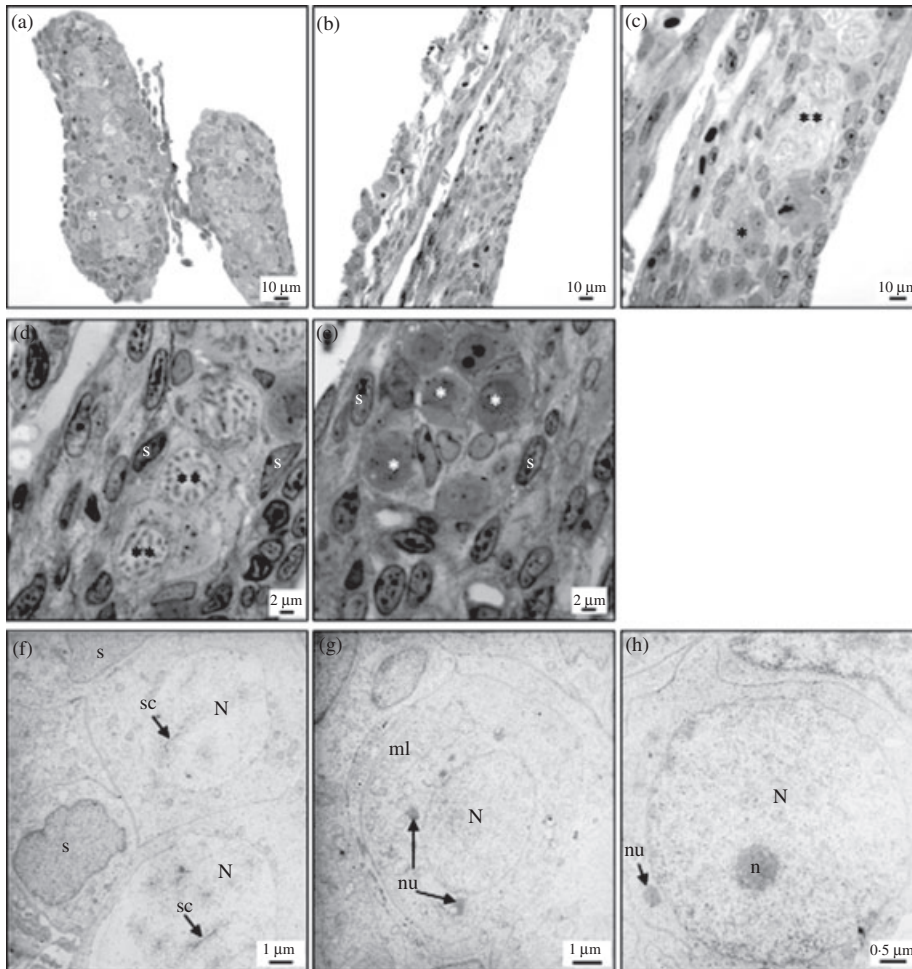


FIG. 4. *Chapalichthys encaustus* differentiating gonad stage. (a and b) Longitudinal sections of an isolated gonad of stage 5 embryo; the two lobules are seen in (a). (c) Detail from (b) showing dividing germ cells (***) and undifferentiated non-dividing germ cells (*). (d) Dividing germ cells (***) surrounded by somatic cells. (e) Group of undifferentiated germ cells (*) surrounded by somatic cells. (f) Fine section of dividing germ cells showing synaptonemal complexes (—) indicating meiosis. (g and h) Electron-dense nuage associated with mitochondria in the cytoplasm of undifferentiated germ cells; nucleus with fine granular chromatin and one nucleolus. ml, mitochondria; N, nucleus; n, nucleolus; nu, nuage; s, somatic cell; sc, synaptonemal complexes.

cells, both in stage 4 [Fig. 6(f)] and stage 5 embryos [Fig. 6(h)]. In differentiating gonads isolated from stage 5 embryos, *Vasa* protein was detected specifically in the germ-cell cytoplasm [Fig. 6(h)].

In differentiated gonads, *Vasa* was found both in ovaries [Fig. 6(i), (j)] and testis [Fig. 6(k), (l)] of stage 6 embryos, as well as in gonads of 1 dab fry [Fig. 6(m)–(p)]. In isolated ovaries of stage 6 embryos, *Vasa* was specifically found in the cytoplasm of developing oocytes [Fig. 6(i), (j)]. Likewise, in ovaries isolated from 1 dab fry, *Vasa* was detected in developing oocytes along the ovary [Fig. 6(m), (n)]. In isolated

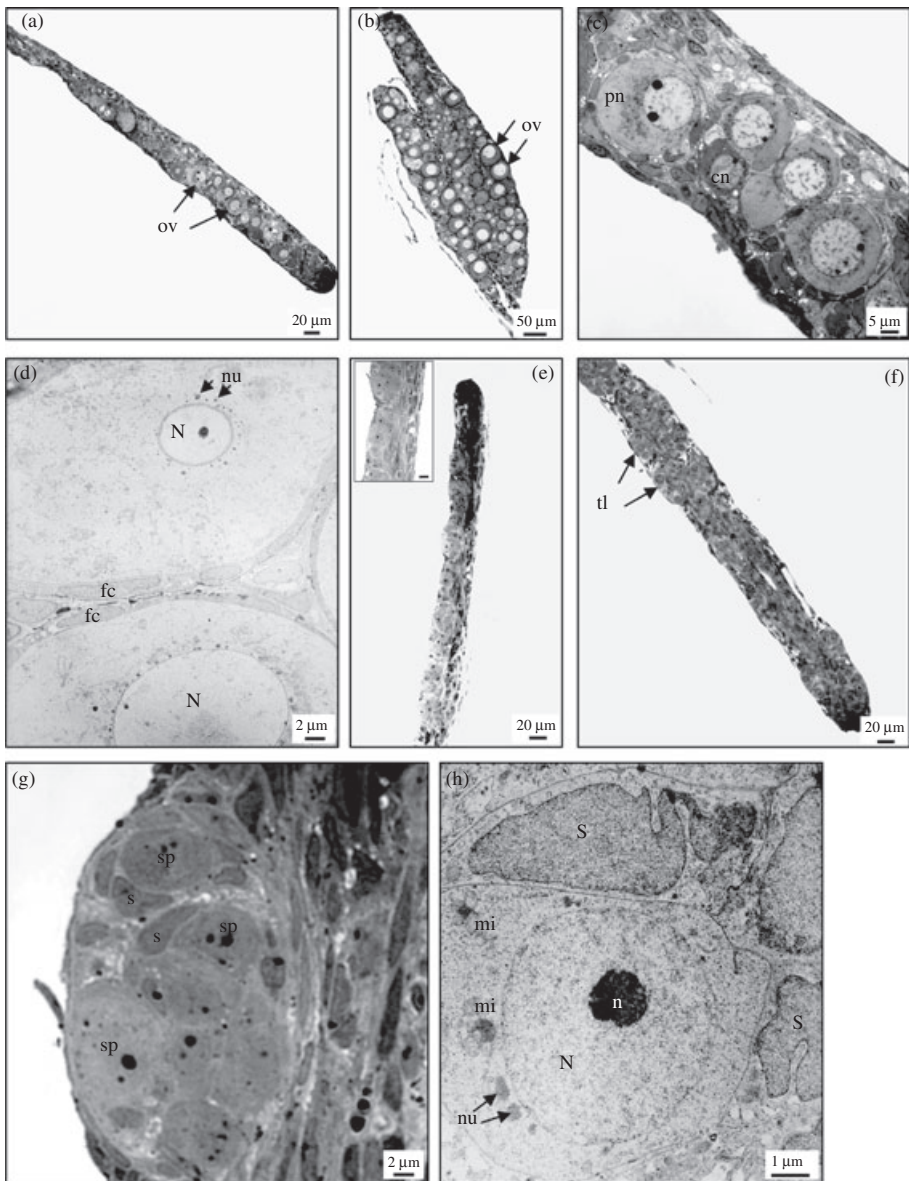


FIG. 5. *Chapalichthys encaustus* differentiated gonad. (a–d) Stage 6 embryo and 1 day-after-birth (dab) fry ovarian morphology. (a) Longitudinal section of an isolated stage 6 embryo ovary. (b) Longitudinal section of an isolated 1 dab fry ovary. (c) Detail from (a) showing oocytes at chromatin–nucleolus and perinucleolar phases. (d) Fine section of two oocytes surrounded by follicular cells; electron-dense nuage material in the cytoplasm. (e–h) Stage 6 embryo and 1 dab fry testis morphology. (e) Isolated stage 6 embryo testis. Inset: detail from the developing testicular lobules, scale bar = 5 μ m. (f) Isolated testis from 1 dab fry showing testicular lobules. (g) Detail of stage 6 embryo developing testicular lobule, composed of germ cells (spermatogonia) and somatic cells. (h) Fine section of a spermatogonium neighbouring two Sertoli cells. The spermatogonium cytoplasm shows mitochondria and nuage. cn, oocyte in chromatin–nucleolus stage; fc, follicular cell; ov, oocyte; N, nucleus; n, nucleolus; nu, nuage; pn, perinucleolar oocyte; S, Sertoli cell; s, somatic cell; sp, spermatogonium; tl, testicular lobule.

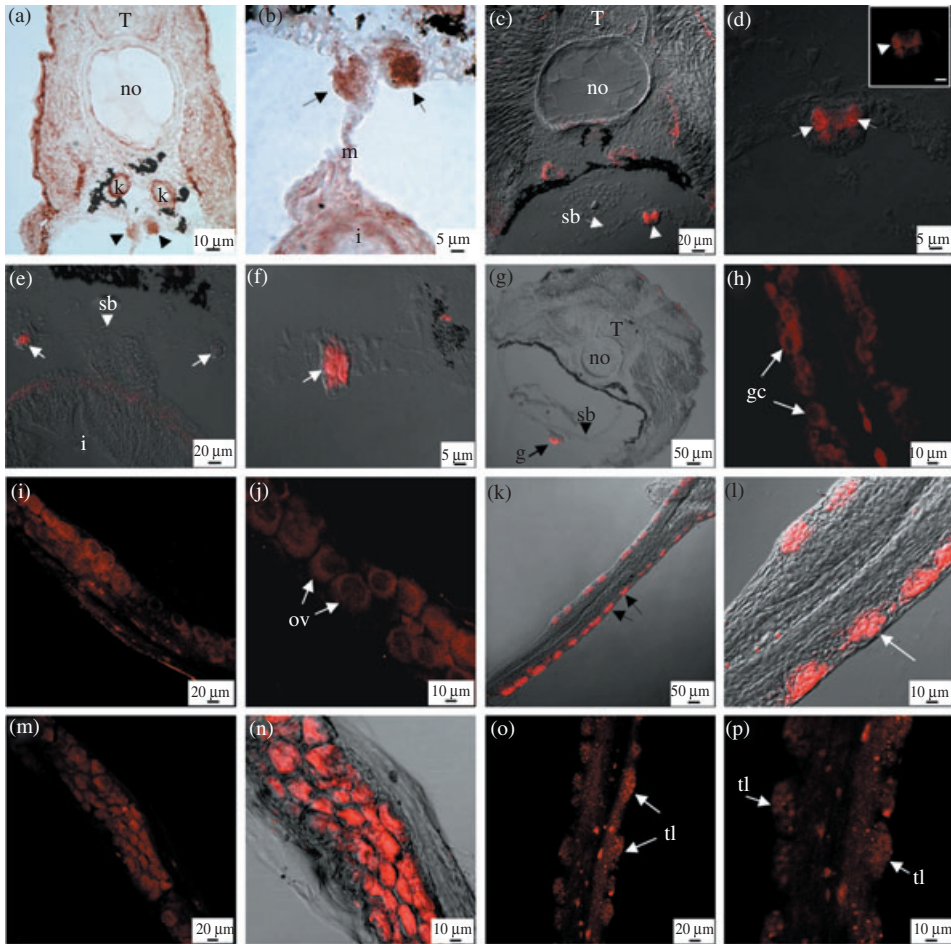


FIG. 6. *Vasa* protein detection in stage 2–6 embryos and 1 day-after-birth (dab) fry of *Chapalichthys encaustus* gonads. (a–d) *Vasa* protein detection in the undifferentiated gonad (E2 and E3). (a and b) Immunohistochemistry of *Vasa* protein in transversal sections of a stage 2 embryo. The protein was detected in the gonadal primordia (▶). (c and d) Immunofluorescence of *Vasa* in transversal sections of a stage 3 embryo. (c) The protein was detected in the undifferentiated gonad (▶), which is suspended from the swimbladder (→). (d) Specifically, *Vasa* was detected in germ cells (→ and ▶ in inset) scale bar = 10 μm. (e–h) Immunofluorescence for *Vasa* in differentiating gonads (E4 and E5). (e and f) *Vasa* protein detection in transversal sections of a stage 4 embryo. (e) *Vasa* was detected in the gonads (→) located above the swimbladder and is specific for germ cells (→ in f). (g and h) *Vasa* protein detection in stage 5 embryo gonad. (g) Transversal section showing *Vasa* in the gonad (→), which is suspended from the swimbladder. (h) Immunofluorescence of *Vasa* in isolated stage 5 embryo gonad. *Vasa* is specifically found in the cytoplasm of germ cells. (i–p) Immunofluorescence for *Vasa* in the differentiated gonad (stage 6 embryo and 1 dab fry). (i–l) *Vasa* protein detection in isolated gonads of stage 6 embryos. In the ovary, *Vasa* was specifically found in the oocyte cytoplasm (i and j). In the testicles, *Vasa* was specifically detected in spermatogonia (→) (k and l). (m–p) *Vasa* protein detection by immunofluorescence in ovary and testicle isolated from 1 day-after-birth fry. In the ovary, *Vasa* was found in oocytes along the gonad (m and n). In the testicle, *Vasa* was detected in spermatogonia which forms the developing testicular lobules (o and p). g, gonad; gc, germ cell; k, developing kidney; i, intestine; m, mesentery; no, notochord; ov, oocyte; sb, swimbladder; T, neural tube; tl, testicular lobule.

testis of stage 6 embryos [Fig. 6(k), (l)] and of 1 dab fry [Fig. 6(o), (p)], *Vasa* was specifically localized in germ cells (spermatogonia) forming a characteristic lobular array.

DISCUSSION

GONADAL PRIMORDIUM AND BIPOTENTIAL UNDIFFERENTIATED GONAD

In *C. encaustus*, the gonadal primordium is formed during stage 2 of development and in stage 3 the undifferentiated gonad is established containing a larger number of cells which have proliferated by mitosis. Embryonic gonads during these two stages are morphologically undifferentiated and contain primordial germ cells surrounded by somatic cells. The primordial germ cells are considered to be similar and bipotential in the two sexes (Devlin & Nagahama, 2002; Rasmussen *et al.*, 2006).

The genital crest in teleosts is formed by a thickening of the mesoderm which projects into the coelomic cavity, just below the developing kidney (Devlin & Nagahama, 2002). Primordial germ cells in teleosts, as in other vertebrates, originate at extragonadal sites and migrate to colonize the genital crests (Braat *et al.*, 1999). The *C. encaustus* gonadal primordia are a couple of structures located on the coelomic epithelium. This position is the same as described for other teleosts and vertebrates (Hoar, 1969; Devlin & Nagahama, 2002). The origin of the gonadal primordium in teleosts has been amply discussed and is generally accepted to be of unitary origin, from the coelomic epithelium or peritoneal wall, in contrast with the gonad of other vertebrates which receive a contribution from the mesonephric blastema (Hoar, 1969; Nakamura *et al.*, 1998).

In *C. encaustus*, as in other teleosts, the gonadal primordium is composed of a limited number of germ cells surrounded by somatic cells, forming a simple structure of associated cells that does not show histological signs of sexual differentiation in either germ or somatic cells. In teleosts, as in other vertebrates, germ cells interact with somatic cells as gonadal sex differentiation occurs (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998).

Transversal sections of the *C. encaustus* gonadal primordium show each germ cell surrounded by some somatic cells. The primordium increases in size due to mitotic proliferation of germ cells (Patiño & Takashima, 1995) and to the arrival of new germ cells (Grandi & Colombo, 1997). In some species such as *O. latipes*, intense mitotic activity occurs at the germline upon arrival of germ cells at the genital ridge (Hamaguchi, 1982). In other species, such as *C. dimerus*, (Meijide *et al.*, 2005) germ-cell proliferation is preceded by a period of quiescence. Undifferentiated *C. encaustus* germ cells have the typical germ-cell characteristics of teleosts and vertebrates in general: roundish to oval form, relatively large size, large nucleus with one or two prominent nucleoli, finely granular chromatin, cytoplasm with scarce organelles and mitochondria with tubular cristae and nuage (Flores & Burns, 1993; Patiño & Takashima, 1995; Meijide *et al.*, 2005).

In *C. encaustus* germ cells, electron-dense material generally associated with mitochondria was seen in the cytoplasm at all developmental stages. This organelle is known as nuage and is specific to the germ line cells in various organisms (Eddy,

1975). Nuage granules have been described as associated with mitochondria in germ cells, spermatogonia, oogonia and oocytes in several fish species (Eddy, 1975; Hamaguchi, 1982; Wallace & Selman, 1990; Flores & Burns, 1993; Grandi & Colombo, 1997; Meijide *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006). Thus, the presence of nuage is a good ultrastructural marker of germ cells in *C. encaustus* and, generally, in fishes. These granules are part of the nuclear material, they contain ribonucleoproteins which migrate through the nuclear membrane pores and assemble in the cytoplasm (Azevedo, 1984; Flores & Burns, 1993).

The undifferentiated bipotential gonad of vertebrates possesses remarkable plasticity (De Falco & Capel, 2009). Primordial germ cells remain undifferentiated until they are exposed to certain hormonal environments or to the action of genes expressed at the same gonad, which influence their morphological differentiation and they transform into spermatogonia or oogonia (Devlin & Nagahama, 2002).

DIFFERENTIATING GONAD

According to the classification by Yamamoto (1969), *C. encaustus* is a gonochoristic species because adults have separate sexes and maintain their sex throughout their adult life. Gonochoristic fishes may in turn be classified into either differentiated or undifferentiated species. In the first case, the undifferentiated gonad develops directly as an ovary or a testis, as in *O. latipes* (Hamaguchi, 1982), *C. dimerus* (Meijide *et al.*, 2005) and the eelpout *Zoarces viviparus* (L. 1758) (Rasmussen *et al.*, 2006). In the second case, all individuals initially develop hermaphroditic gonads, known as juvenile hermaphroditism, which has been reported in *D. rerio* (Takahashi, 1977; Maack & Segner, 2003), the European eel *Anguilla anguilla* (L. 1758) (Grandi & Colombo, 1997) and the mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird & Girard 1853) (Koya *et al.*, 2003). Both types of sexual differentiation have been described in oviparous and viviparous species.

Gonads of stage 4 and 5 *C. encaustus* embryos are in the process of differentiation. At these stages, most gonads have both differentiating germ cells, which have started meiosis, and undifferentiated germ cells. Taking into account these features, this stage of gonadal development could be considered an ambisexual gonad. The presence of ambisexual gonads from which either an ovary or a testis develop has been described in *A. anguilla*, an undifferentiated gonochoristic species (Grandi & Colombo, 1997). In contrast with observations in *C. encaustus*, in *A. anguilla* ovarian follicles and spermatogonia are present in the same gonad.

On the other hand, *D. rerio* is an undifferentiated gonochoristic species in which, at the moment of differentiation, the gonads of all organisms have oocytes, indicating ovarian differentiation (Takahashi, 1977). This phenomenon is known as juvenile hermaphroditism (Takahashi, 1977; Maack & Segner, 2003) and has also been described in the Sumatra barb *Puntius tetrazona* (Bleeker 1855) and the masu salmon *Oncorhynchus masou* (Brevoort 1856) (Nakamura *et al.*, 1998). In *D. rerio*, approximately half of the gonads undergo a process of oocyte degeneration, and these gonads develop as testis (Maack & Segner, 2003). A proposed mechanism by which oocyte loss occurs is apoptosis (Uchida *et al.*, 2002). Thus, developing testis show both spermatocytes cysts and degenerating oocytes. Gonads classified as presumptive testis contain few perinucleolar oocytes and numerous undifferentiated germ cells (De Falco & Capel, 2009). Even though in *C. encaustus*

stage 5 gonads show ambisexual characteristics regarding germ cells, in developing *C. encaustus* testis no degenerating oocytes were found which could indicate juvenile hermaphroditism.

OVARIAN DIFFERENTIATION

In *C. encaustus*, germline differentiation was first observed during stages 4 and 5 and was revealed by the ultrastructural presence of synaptonemal complexes, which indicated the onset of meiosis. Synaptonemal complexes have been used as markers of meiosis in teleosts and other vertebrates, and they appear during the pachytene and cytogene stages of the first meiotic division (Devlin & Nagahama, 2002).

Common features of ovarian differentiation in teleosts are intense proliferation of germ cells, onset of meiosis and somatic cell arrangements which eventually lead to the formation of an ovarian cavity (Kanamori *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1998). One element that marks the onset of gonadal sex differentiation in teleosts is the appearance of meiotic figures in a small fraction of the germ cells of presumptive ovaries (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998). Taking this into account, the presence of meiotic germ cells may serve as an indicator of ovarian differentiation in *C. encaustus*. This has also been observed in *C. dimerus* (Meijide *et al.*, 2005).

In some species, before the onset of meiosis, an increase in germ-cell proliferation in presumptive ovaries is visible so that the first indicator of sexual differentiation is disparity in the number of germ cells between the sexes, *i.e.* more primordial germ cells are seen in the feminine gonad as in the case of *O. latipes* (Satoh & Egami, 1972; Hamaguchi, 1982; Kobayashi *et al.*, 2004), *O. mykiss* (Lebrun *et al.*, 1982) and the Argentinian silverside *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835) (Strüssmann *et al.*, 1996). Meiosis onset seems to be accompanied by a rise in mitosis, and in some species this rise is observed before meiosis (Patiño & Takashima, 1995).

Two patterns of proliferation of primordial germ cells have been described in *O. latipes*. In the first, primordial germ cells proliferate independently in a linear pattern. In the second, cells divide synchronously and increase their number exponentially (Saito *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008). Cells stemming from the type I division are isolated within the gonad and surrounded by somatic cells, while those stemming from the type II division form groups of cells which constitute cysts of germ cells formed *via* cytokinesis. Early XY gonads of *O. latipes* only show type I primordial germ cells and XX gonads show both types. In stage 4 and 5 *C. encaustus* gonads, groups of germ cells form cysts, which are not separated by somatic cells and could correspond to cells resulting from the type II division reported in *O. latipes*. Equally, isolated germ cells are seen surrounded by somatic cells, which would correspond to the type I division.

In *C. encaustus*, differentiation of the ovarian germline precedes differentiation of the somatic component and occurs during stages 4 and 5. This agrees with the events in most teleost species and contrasts with those in the viviparous fish *Z. viviparus* in which the first sign of ovarian differentiation is the initial development of the ovarian cavity, followed by the appearance of few early meiotic oocytes (Rasmussen *et al.*, 2006). In tilapia species, organization of the somatic component (ovarian cavity formation) may begin before meiosis, such as in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852), while in other species, these events

occur simultaneously, as in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L. 1758) and the blue tilapia *Oreochromis aureus* (Steindachner 1864) (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998).

In *C. encaustus*, the process of primary oocyte growth, *i.e.* previtellogenesis, is similar to that of other teleosts. In stage 6 embryo ovaries and at birth, oocytes are seen in the chromatin–nucleolus and perinucleolar phases in which folliculogenesis has occurred (Selman & Wallace, 1989; Patiño & Takashima, 1995; Devlin & Nagahama, 2002). The chromatin–nucleolus phase comprises several chromosomal stages from leptotene to the onset of pachytene during prophase I of meiosis. Homologous chromosome pairing occurs during the cygotene in which synaptonemal complexes also appear (Patiño & Takashima, 1995). Onset of the perinucleolar phase is marked by the appearance and migration of multiple nucleoli in the nucleoplasm periphery. The diplotene phase initiates at this point. Appearance of multiple nucleoli indicates intense transcription of ribosomal RNA (Selman & Wallace, 1989; Patiño & Takashima, 1995).

The course of gonadal differentiation may be mediated by certain actions of the somatic component of the gonad over the associated germ component (Nakamura *et al.*, 1998). Follicular *C. encaustus* cells probably stem from epithelial cells which, in turn, derive from the coelomic epithelium, as proposed by various authors for other teleost species (Grier, 2000; Grier & Parenti, 2004; Meijide *et al.*, 2005), whereas theca cells derive from the connective tissue which gives origin to the stroma. In the common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792), stroma cells are distributed around the follicle forming the theca (Grier, 2000). According to Grier (2000), the follicle is defined by its origin in the germ epithelium and consists of the oocyte and the surrounding follicular cells. The term follicular complex proposed by Grier & Lo Nostro (2000) includes the follicle, the basal membrane, the theca and the blood vessels.

TESTICULAR DIFFERENTIATION

In *C. encaustus*, the testis starts to differentiate approximately at stage 6 of development, *i.e.* later than the onset of ovarian differentiation, coinciding with the description for teleosts in which testis remains histologically undifferentiated for longer than in ovaries (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006). In some tilapia species, however, testis and ovaries may begin differentiation at the same time (Nakamura & Nagahama, 1989; Patiño & Takashima, 1995).

In teleosts, one of the first signs of testis differentiation is the formation of the efferent ducts in the stroma (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Meijide *et al.*, 2005). Other signs include the appearance of blood vessels close to the efferent ducts and of lobular structures of the testis, precursors of the testicular lobules (Patiño & Takashima, 1995; Nakamura *et al.*, 1998). Testis differentiation in *C. encaustus* was clearly evident at stage 6 in the somatic component as the formation of lobular structures corresponding to the precursors of the testicular lobules. Appearance of lobular structures seems to be the most important sign of testis differentiation in *C. encaustus*, earlier than formation of efferent ducts. On the other hand, the appearance of blood vessels close to efferent ducts seems not to be a criterion indicating early testis differentiation in *C. encaustus*.

In 10 days post hatching (dph) *O. latipes* and channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818), testis differentiation is indicated by initial formation of lobular structures and appearance of blood vessels (Kanamori *et al.*, 1985; Patiño & Takashima, 1995). In *O. latipes*, the male sex-determining gene *dmy/dmrt1by* is first expressed before birth in XY gonads and the *sox9a* gene early in the development of both sexes; however, *sox9a* turns specific in males when the testicular acini are formed (Nanda *et al.*, 2002). Likewise, in *Z. viviparus* and in *P. promelas*, the formation of spermatic ducts, blood vessels and lobular structures are indicators of testicular differentiation (Van Aerle *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2006). Contrariwise, in viviparous fishes of the genus *Poecilia*, aggregation of stromal cells at the hilar region indicates onset of testicular differentiation (Takahashi, 1974; Nakamura *et al.*, 1998).

On the other hand, the *C. encaustus* testicular germline remains undifferentiated during embryonic development, while in females the germline differentiates precociously (during embryonic development) compared with the male germline (during postnatal stages). At birth, *C. encaustus* testis only contains spermatogonia surrounded by Sertoli and stromal cells. In teleosts, germ cells in gonads destined to turn into testis usually remain quiescent for a long period (Nakamura *et al.*, 1998). An earlier onset of oogenesis compared to spermatogenesis has been widely reported in teleost fishes: in *Oreochromis* spp (Nakamura *et al.*, 1998), *G. affinis* (Koya *et al.*, 2003) and *Z. viviparus* (Rasmussen *et al.*, 2006). In *C. dimerus*, however, differentiation of the somatic component occurs simultaneously with the onset of meiosis in males (Meijide *et al.*, 2005).

Sertoli cells of *C. encaustus* probably derive from epithelial cells, as in other teleosts (Grier, 1993; Grier & Parenti, 2004). Sertoli cells make contact by desmosomes and close tight junctions, which results in the formation of a barrier of Sertoli cells (Grier, 1993; Grier & Parenti, 2004; Meijide *et al.*, 2005). As in most teleosts, in *C. encaustus*, an epithelioid array of Sertoli and germ cells constitutes the germinal epithelium, *i.e.* germ and Sertoli cells within the lobules do not border a lumen or tube directly (Grier, 2000; Grier & Parenti, 2004).

In teleosts, the germline plays a critical role in gonadal sex differentiation (De Falco & Capel, 2009). In *O. latipes* and *D. rerio*, individuals which have been depleted of germ cells develop as adult males (Slanchev *et al.*, 2005; Kurokawa *et al.*, 2007; Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008). Experimental observations in *O. latipes* revealed that supporting cells in the males initiate sexual differentiation independently of the genetic sex of the germ cell; conversely, in females, differentiation of the granulosa cells depends on the developing oocyte (Shinomiya *et al.*, 2001). Apparently, in males, germ cells are not needed for testis formation and individuals express genes characteristic of males (De Falco & Capel, 2009). This is still being debated. According to Slanchev *et al.* (2005), the gonad without gametes remains undifferentiated, while Siegfried & Nüsslein-Volhard (2008) maintain that normal testicular lobules are formed in the absence of germ cells.

VASA GENE EXPRESSION

Vasa is a germline marker gene which has been extensively reported in vertebrate and invertebrate species (Liang *et al.*, 1994; Molyneaux & Wylie, 2004). In this study, the expression of *Vasa* protein was detected specifically in germ cells of the

C. encaustus gonad at different stages of gonadal development: gonadal primordium, undifferentiated gonad, in process of differentiation and in the differentiated ovary and testicle. Thus, the *Vasa* gene may be used as germline marker in this species and probably in goodeid fishes at large. Identification of the germ cells by the *Vasa* gene is important for specification, migration and germline function studies.

In teleosts, the specific expression of *Vasa* in germ cells both during sexual differentiation and in adult gonads has been documented in several species: *D. rerio* (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997), *O. latipes* (Shinomiya *et al.*, 2000), *O. mykiss* (Yoshizaki *et al.*, 2000) and the European seabass *Dicentrarchus labrax* (L. 1758) (Blázquez *et al.*, 2011). In adult *O. latipes*, *Vasa* protein expression is restricted to spermatogonia and early spermatocytes in the testis and to previtellogenic and early vitellogenic oocytes in the ovary (Shinomiya *et al.*, 2000).

In *C. encaustus*, the *Vasa* protein was specifically detected in the germline cell cytoplasm. A similar distribution pattern of this protein has been reported in mammals (Fujiwara *et al.*, 1994; Castrillon *et al.*, 2000; Toyooka *et al.*, 2000), birds (Tsunekawa *et al.*, 2000) and frogs (Saotome *et al.*, 2010). In *O. latipes*, Shinomiya *et al.* (2000) detected *Vasa* transcripts specifically in germline cell cytoplasm and Aoki *et al.* (2008) reported spatial and temporal changes of the *Vasa* protein during sex differentiation. On the other hand, Bilinski *et al.* (2004) showed the presence of *Vasa*-like DEAD-box helicase in nuage of the African clawed frog *Xenopus laevis* and proposed a role for nuage in the microRNA and RNAi pathways, similar to the role of nuage in the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Findley *et al.*, 2003).

The *Vasa* gene codes for an RNA helicase of the DEAD-box proteins (Lasko & Ashburner, 1988) specific for the germline, and is phylogenetically conserved regarding protein sequence and intracellular site. Homologues of the *Vasa* gene have been cloned in vertebrates and a possible function of the *Vasa* protein may be binding the RNAs required for germline cell determination (Yoon *et al.*, 1997). In *D. rerio*, primordial germ cells are specified by cytoplasmic components including *Vasa*, which could play a role in the development of the germline in this species (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Raz, 2003). In *O. latipes*, Li *et al.* (2009) showed that the *Vasa* gene is required for migration of primordial germ cells. As in other teleosts, in *C. encaustus*, the *Vasa* gene may play a role in the development of the germline.

The authors wish to thank E. Cruz, Director of the aquarium of the Facultad de Ciencias, UNAM and I. Morales for fish maintenance. They are grateful to E. Lira-Romero for technical assistance and O. Domínguez-Domínguez of Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo for help in collecting and identifying the species. This work was supported by grants from SEP-CONACYT (Sol. 81269) and PAPIIT of DGAPA, UNAM, No. IN205011. S.G.-E. was a recipient of a scholarship from CONACYT. S.G.-E. thanks Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for PhD training.

References

- Álvarez del Villar, J. (1970). *Peces mexicanos (claves)*. México, DF: Comisión Nacional Consultiva de Pesca.
- Aoki, Y., Nagao, I., Saito, D., Ebe, Y., Kinjo, M. & Tanaka, M. (2008). Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. *Developmental Dynamics* **237**, 800–807. doi: 10.1002/dvdy.21448
- Azevedo, C. (1984). Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuages) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *Cell Tissue Research* **238**, 121–128. doi: 10.1007/BF00215152

- Bilinski, S. M., Jaglarz, M. K., Szymanska, B., Etkin, L. D. & Kloc, M. (2004). Sm proteins, the constituents of the spliceosome, are components of nuage and mitochondrial cement in *Xenopus* oocytes. *Experimental Cell Research* **299**, 171–178. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.05.016
- Blázquez, M., González, A., Mylonas, C. C. & Piferrer, F. (2011). Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology* **170**, 322–333. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.10.007
- Braat, A. K., Speksnijder, J. E. & Zivkovic, D. (1999). Germ line development in fishes. *International Journal of Developmental Biology* **43**, 745–760.
- Castrillon, D. H., Quade, B. J., Wang, T. Y., Quigley, C. & Crum, C. P. (2000). The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9585–9590. doi: 10.1073/pnas.160274797
- Contreras-Balderas, S. (2005). Conservation status of Mexican freshwater viviparous fishes. In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 415–423. Homestead, FL: New Life Publications.
- De Falco, T. & Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**, 457–482. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.13350
- De la Vega, M. Y. & Macías-García, C. (2005). Principal factors in the decline of the Mexican endemic livebearing fishes (Goodeinae: Goodeidae). In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 505–513. Homestead, FL: New Life Publications.
- Devlin, R. H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191–364. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00057-1
- Díaz-Pardo, E. & Ortiz-Jiménez, D. (1986). Reproducción y ontogenia de *Girardinichthys viviparus* (Pisces: Goodeidae). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Mexico)* **30**, 45–66.
- Doadrio, I. & Domínguez, O. (2004). Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**, 416–430. doi: 10.1016/j.ympev.2003.08.022
- Domínguez-Domínguez, O., Mercado-Silva, N. & Lyons, J. (2005a). Conservation status of Mexican goodeids: problems, perspectives and solutions. In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 515–523. Homestead, FL: New Life Publications.
- Domínguez-Domínguez, O., Mercado-Silva, N., Lyons, J. & Grier, H. (2005b). The viviparous goodeid fishes. In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 525–569. Homestead, FL: New Life Publications.
- Eddy, E. M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *International Review of Cytology* **43**, 229–280. doi: 10.1016/S0074-7696(08)60070-4
- Findley, S. D., Tamanaha, M., Clegg, N. J. & Ruohola-Baker, H. (2003). Maelstrom a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development* **130**, 859–871. doi: 10.1242/dev.00310
- Flores, J. A. & Burns, J. R. (1993). Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Cell Tissue Research* **271**, 263–270. doi: 10.1007/BF00318612
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M. & Noce, T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12258–12262.
- Grandi, G. & Colombo, G. (1997). Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla* [L.], Anguilliformes, Teleostei): a cytological and ultrastructural study. *Journal of Morphology* **231**, 195–216. doi: 10.1002/(SICI)1097-4687(199702)231:2<195::AID-JMOR8>3.0.CO;2-D

- Grier, H. J. (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In *The Sertoli Cell* (Russell, L. D. & Griswol, M. D., eds), pp. 704–739. Clearwater, FL: Cache River Press.
- Grier, H. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology* **243**, 265–281. doi: 10.1002/(SICI)1097-4687(200003)243:3<265::AID-JMOR4>3.0.CO;2-I
- Grier, H. J. & Lo Nostro, F. (2000). The germinal epithelium in the fish gonads: the unifying concept. In *Proceeding of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Anderson, F. & Stefansson, S. O., eds), pp. 233–236. Bergen: University of Bergen.
- Grier, H. J. & Parenti, L. R. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology* **44**, 333–348. doi: 10.1093/icb/44.5.333
- Grier, H. J., Uribe, M. C., Parenti, L. R. & De la Rosa-Cruz, G. (2005). Fecundity, the germinal epithelium, and folliculogenesis in viviparous fishes. In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 191–216. Homestead, FL: New Life Publications.
- Guerrero, S. M. (2005). Estructura microscópica del ovario y la ovogénesis de dos especies de peces vivíparos: *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae) y *Chapalichthys encaustus* (Goodeidae). Tesis de Maestría (Biología Experimental), Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
- Guerrero-Estévez, S. & Moreno-Mendoza, N. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **20**, 101–121. doi: 10.1007/s11160-009-9123-4.
- Hamaguchi, S. (1982). A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Research* **227**, 139–151. doi: 10.1007/BF00206337
- Hoar, W. S. (1969). Reproduction. In *Fish Physiology*, Vol. 3 (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 1–72. New York, NY: Academic Press.
- Hubbs, C. L. & Turner, C. L. (1939). Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. XVI. A revision of the Goodeidae. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology University of Michigan* **42**, 1–80.
- Kanamori, A., Nagahama, Y. & Egami, N. (1985). Development of the tissue architecture in the gonads of the medaka *Oryzias latipes*. *Zoological Science* **2**, 695–706.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137A.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H. & Nagahama, Y. (2002). Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mechanisms of Development* **111**, 167–171. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00613-X
- 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*. *Developmental Dynamics* **231**, 518–526. doi: 10.1002/dvdy.20158
- Koya, Y., Fujita, A., Niki, F. & Ishihara, E. (2003). Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zoological Science* **20**, 1231–1242.
- Kurokawa, H., Saito, D., Nakamura, S., Katoh-Fukui, Y., Ohta, K., Baba, T., Morohashi, K. & Tanaka, M. (2007). Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16958–16963. doi: 10.1073/pnas.0609932104
- Lasko, P. F. & Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* **335**, 611–617. doi: 10.1038/335611a0
- Lebrun, C., Billard, R. & Jalabert, B. (1982). Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. *Reproduction, Nutrition, Development* **22**, 405–412.
- Li, J. Z., Zhou, Y. P., Zhen, Y., Xu, Y., Cheng, P. X., Wang, H. N. & Deng, F. J. (2009). Cloning and characterization of the SSB-1 and SSB-4 genes expressed in zebrafish gonads. *Biochemical Genetics* **47**, 179–190. doi: 10.1007/s10528-008-9215-1

- Liang, L., Diehl-Jones, W. & Lasko, P. (1994). Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* **120**, 1201–1211.
- Lombardi, J. & Wourms, J. P. (1985). The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish. I. Ultrastructure of the internal ovarian epithelium, the maternal component. *Journal of Morphology* **184**, 277–292. doi: 10.1002/jmor.1051840305
- Maack, G. & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* **62**, 895–906. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00074.x
- Medina-Nava, M., Lyons, J., Zubieta-Rojas, T., Solorio-Ornelas, E., Ramírez-Herrejón, J. P. & Galván-Morales, R. (2005). Conservation of two sites in Central Mexico with a high diversity of livebearing fishes. In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 499–504. Homestead, FL: New Life Publications.
- Meijide, F. J., Lo Nostro, F. L. & Guerrero, G. A. (2005). Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): a light and electron-microscopy study. *Journal of Morphology* **264**, 191–210. doi: 10.1002/jmor.10329
- Meyer, A. & Lydeard, C. (1993). The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placentas and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes), as inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene *X-src*. *Proceedings of the Royal Society B* **254**, 153–162. doi: 10.1098/rspb.1993.0140
- Molyneux, K. A. & Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology* **48**, 537–544. doi: 10.1387/ijdb.041833km
- Nakamura, M. & Nagahama, Y. (1989). Differentiation and development of Leydig cells, and change of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **7**, 211–219. doi: 10.1007/BF00004709
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T. & Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology* **281**, 362–372. doi: 10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S. & Winkler, C. (2002). A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11778–11783. doi: 10.1073/pnas.182314699
- Olsen, L. C., Aasland, R. & Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mechanisms of Development* **66**, 95–105. doi: 10.1016/S0925-4773(97)00099-3
- Patiño, R. & Takashima, F. (1995). Gonads. In *An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features* (Takashima, F. & Hibiya, T., eds), pp. 128–153. Tokyo: Kodanska/Gustav Fisher.
- Rasmussen, T. H., Jespersen, A. & Korsgaard, B. (2006). Gonadal morphogenesis and sex differentiation intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarcetes viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): a histological and ultrastructural study. *Journal of Morphology* **267**, 1032–1047. doi: 10.1002/jmor.10453
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics* **4**, 690–700. doi: 10.1038/nrg1154
- Saito, D., Morinaga, C., Aoki, Y., Nakamura, S., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H. & Tanaka, M. (2007). Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Developmental Biology* **310**, 280–290. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.07.039
- Saotome, K., Hayashi, K., Adachi, N., Nakamura, Y. & Nakamura, M. (2010). Isolation and characterization of Vasa in the frog *Rana rugosa*. *Journal of Experimental Zoology A* **313**, 452–459. doi: 10.1002/jez.617
- Satoh, N. & Egami, N. (1972). Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **28**, 385–395.
- Schindler, J. F. & Hamlett, W. C. (1993). Maternal-embryonic relations in viviparous teleosts. *Journal of Experimental Zoology* **266**, 378–393. doi: 10.1002/jez.1402660506
- Selman, K. & Wallace, R. A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science* **6**, 211–231.

- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y. & Hamaguchi, S. (2000). The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Development, Growth and Differentiation* **42**, 317–326. doi: 10.1046/j.1440-169x.2000.00521.x
- Shinomiya, A., Hamaguchi, S. & Shibata, N. (2001). Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Experimental Zoology* **290**, 402–410. doi: 10.1002/jez.1081
- Shinomiya, A., Shibata, N., Sakaizumi, M. & Hamaguchi, S. (2002). Sex reversal of genetic females (XX) induced by the transplantation of XY somatic cells in the medaka, *Oryzias latipes*. *International Journal of Developmental Biology* **46**, 711–717.
- Siegfried, K. R. & Nüsslein-Volhard, C. (2008). Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Developmental Biology* **324**, 277–287. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.09.025
- Slanchev, K., Stebler, J., De la Cueva-Méndez, G. & Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4074–4079. doi: 10.1073/pnas.0407475102
- Strüssmann, C. A., Moriyama, S., Hanke, E. F., Calsina Cota, J. C. & Takashima, F. (1996). Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *Journal of Fish Biology* **48**, 643–651. doi: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb01459.x
- Takahashi, H. (1974). Modification of the development of female reproductive organs in the guppy, *Poecilia reticulata*, following androgen treatment in their juvenile period. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* **25**, 174–199.
- Takahashi, H. (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* **28**, 57–65.
- Tanaka, M., Saito, D., Morinaga, C. & Kurokawa, H. (2008). Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Development, Growth and Differentiation* **50**, 273–278. doi: 10.1111/j.1440-169x.2008.01015.x
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M. & Noce, T. (2000). Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development* **93**, 139–149. doi: 10.1016/S0925-4773(00)00283-5
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T. & Noce, T. (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* **127**, 2741–2750.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. & Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology* **205**, 711–718.
- Uribe, M. C., De la Rosa, G. & García-Alarcón, A. (2005). The ovary of viviparous teleosts. Morphological differences between *Goodea atripinnis* and *Ilyodon whitei* (Goodeidae). In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 217–235. Homestead, FL: New Life Publications.
- Van Aerle, R., Runnals, T. J. & Tyler, C. R. (2004). Ontogeny of gonadal sex development relative to growth in fathead minnow. *Journal of Fish Biology* **64**, 355–369. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00296.x
- Vera-Martínez, A. & CRM (Consejo de Recursos Minerales) (1995). *Monografía geológico-minera del estado de Michoacán*. Mexico: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial, Coordinación General de Minería.
- Vizziano, D., Randuineau, G. L., Baron, D., Cauty, C. & Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics* **236**, 2198–2206. doi: 10.1002/dvdy.21212
- Von Hofsten, J. & Olsson, P. E. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3**, 63. doi: 10.1186/1477-7827-3-63
- Wallace, R. A. & Selman, K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy* **16**, 175–201.
- Webb, S. A., Graves, J. A., Macías-García, C., Magurran, A. E., Foighil, D. Ö. & Ritchie, M. J. (2004). Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes).

- Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 527–544. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00257-4
- Wischnath, L. (1993). *Atlas of Livebearers of the World*. Neptune City, NJ: Tropical Fish Hobbyist Publications Inc.
- Wourms, J. P. (1981). Viviparity: the maternal-fetal relationships in fishes. *American Zoologist* **21**, 473–515.
- Wourms, J. P. (2005). Functional morphology, development and evolution of Trophotaeniae. In *Viviparous Fishes* (Uribe, M. C. & Grier, H. J., eds), pp. 219–244. Homestead, FL: New Life Publications.
- Wourms, J. P., Grove, B. D. & Lombardi, J. (1988). The maternal-embryonic relationships in viviparous fishes. In *Fish Physiology*, Vol. XI (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 1–134. New York, NY: Academic Press.
- Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. In *Fish Physiology*, Vol. 3 (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 117–175. London: Academic Press.
- Yoon, C., Kawakami, K. & Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* **124**, 3157–3166.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S. & Takeuchi, T. (2000). Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *International Journal of Developmental Biology* **44**, 323–326.