# Desarrollo gonadal en medaka: El rol de *ndrg1b* en la proliferación de las células germinales y el éxito reproductivo

Bióloga. Luisa Fernanda Arias Padilla

Director: Dr. Juan I. Fernandino

Tesis para optar por el título de "Doctora en Biología Molecular y Biotecnología"

Universidad Nacional de San Martín

Chascomús, Argentina 2021

Laboratorio de Biología del desarrollo
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas
Instituto Tecnológico Chascomús
IIB-INTECH-CONICET



# RESUMEN

La producción de un número adecuado de gametos es un proceso esencial para la transmisión de información genética a la siguiente generación. Para esto es fundamental que se completen las diferentes etapas del desarrollo gonadal, desde el embrión a la adultez. La proliferación de las células germinales es una de las etapas claves y está presente a lo largo del ciclo de vida en ambos sexos. Previo a la meiosis tiene lugar la proliferación cística de las células germinales la cual es bastante conservada entre invertebrados y vertebrados. Sin embargo, sus reguladores moleculares permanecen sin ser elucidados. En el presente trabajo de tesis postulamos al gen ndrg1b como un regulador de la proliferación cística en el desarrollo gonadal del pez medaka. Nuestros resultados muestran que ndrg1b se expresa en la gónada de modo diferencial entre hembras y machos, de manera opuesta a los momentos de la proliferación cística. Al generar mutaciones bialélicas de ndrg1b, empleando la estrategia CRISPR/Cas9, hemos identificado una reducción en el número de células germinales, producto de alteración de la proliferación cística, en diferentes momentos del desarrollo gonadal, inclusive en la adultez. Dichas alteraciones han impactado directamente en la producción de ovocitos y espermatozoides, y en el éxito reproductivo, sin perturbar la morfología gonadal, características sexuales secundarias, niveles de 11-KT y proporción de sexos. Adicionalmente, se ha identificado alteraciones en el comportamiento sexual masculino, particularmente reducción de parámetros comportamentales relacionados a la fecundación. De esta forma, los resultados de este trabajo añaden importancia al estudio de la proliferación de las células germinales en el desarrollo gonadal y su efecto en la producción de gametos, reproducción y comportamiento sexual.

Palabras clave: ndrg1b, proliferación, gametogénesis, reproducción, CRISPR/Cas9.

# **ABSTRACT**

The production of an adequate number of gametes is an essential process for the transmission of genetic information to the next generation. For this process is fundamental that different steps of gonadal development be completed from embryogenic to adult stages. The proliferation of germ cells is an important step during all life cycle in both sexes. Prior to the beginning of meiosis take place the germ cells cystic proliferation, step that is well conserved in vertebrates and invertebrates. However, the molecular regulators of this proliferation remain elusive. Here in this thesis project, we have reported that *ndrg1b* is an important regulator of cystic proliferation in gonadal development of medaka fish. Our results have showed that ndrg1b expression is present in gonad in a differential way between female and male, and is opposite to cystic proliferation moments. We have generated biallelic mutants of *ndrg1b* using the CRISPR/Cas9 strategy, leading to a reduction of germ cells number, due to the disruption of cystic proliferation in different moments of gonadal development, including adult stages. Those alterations have impacted in the production of oocytes and spermatozoids, and reproductive parameters without modify the gonadal morphology, sex secondary characteristics, 11-KT levels and sex ratio. Additionally, we have identified alterations in the male sexual behavior, particularly a decrease of behavior relationated to the fertilization. In this way, results of this thesis add importance to the study of germ cells proliferation during gonadal development, and its effect in the gamete production, reproduction and sexual behavior.

**Keywords:** *ndrg1b*, proliferation, gametogenesis, reproduction, CRISPR/Cas9.

# Tabla de contenido

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE CONCEPTOS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	14
CAPITULO I	15
INTRODUCCIÓN	16
Desarrollo gonadal en vertebrados	16
Medaka como modelo para estudiar el desarrollo gonadal	20
Familia Ndrg y su rol en la proliferación celular	23
Familia Ndrg en el desarrollo gonadal	25
PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Peces y muestreos	29
Diseño y síntesis de sondas de ARN marcadas con Digoxigenina	30
Hibridación in situ en cuerpo entero de embriones	31
Montaje de embriones en gelatina	32
Extracción de ADNg con solución salina	32
Sexado genético	33
Extracción de ARNm y síntesis de ADN copia (ADNc)	33
PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)	33
Diseño de guías para el sistema CRISPR/Cas9	34

Síntesis de las guías de ARN	35
Síntesis del ARN de la Cas9	36
Microinyección del sistema CRISPR/Cas9 en embriones de medaka	36
Detección de mutaciones en embriones microinyectados por medio de HMA	37
Chequeo del sistema CRISPR/Cas9: off-targets y secuenciación	37
Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina	38
Análisis de muerte celular programada (apoptosis) por medio de la técnica de	TUNEL.39
Análisis histológico	40
Análisis microscópico y cuantificación celular	40
Análisis estadístico	40
RESULTADOS	42
Expresión de ndrg1 durante el desarrollo gonadal	42
Establecimiento de mutantes bialélicos para ndrg1b mediante CRISPR/Cas9	44
Mutación de <i>ndrg1b</i> afecta el desarrollo gonadal en embriones	48
La mutación de <i>ndrg1b</i> afecta el desarrollo gonadal en juveniles	52
DISCUSIÓN	54
CAPITULO II	57
INTRODUCCIÓN	58
Morfología de los ovarios	60
Morfología de los testículos	62
Características sexuales secundarias	64
Comportamiento sexual en medaka	66
PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVO PRINCIPAL	70
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Muestreo de medaka	71

Análisis histológico de ovarios y testículos	71
Cuantificación de esperma	72
Análisis de proporción de sexos	72
Análisis de parámetros reproductivos	72
Análisis del comportamiento sexual	73
Extracción de ARNm y síntesis de ADNc de testículos y cerebro	74
PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)	74
Hibridación in situ en testículos y cerebro	75
Medición de niveles de 11-cetotestosterona (11-KT) en plasma de machos	76
Análisis estadístico	76
RESULTADOS	77
La mutación de <i>ndrg1b</i> no alteran las características sexuales secundarias en ac	dultos77
La mutación de <i>ndrg1b</i> altera la gametogénesis en estadíos adultos	78
La mutación de <i>ndrg1b</i> no altera la proporción de sexo biológico	80
La mutación de <i>ndrg1b</i> afecta los parámetros reproductivos en adultos	81
Mutación de ndrg1b repercute en el comportamiento sexual de machos	83
Mutación de <i>ndrg1b</i> no modifica los niveles de 11-KT en machos	85
ndrg1b no se expresa en el cerebro de machos adultos	86
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES GENERALES	93
FUTURAS DIRECCIONES	94
LISTA DE PUBLICACIONES	95
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	96

# **AGRADECIMIENTOS**

Hacer un doctorado no es simplemente una etapa de crecimiento profesional, es un camino de retos personales, y cada proceso es único; algunos son tan cortos que llegan pronto a la meta, mientras que otros parecen eternos; algunos están llenos de respuestas, y otros generan más preguntas que respuestas; algunos inspiran a grandes, y otros a chicos. En lo personal, recorrer este camino no hubiese sido posible sin la colaboración y motivación de sin fin de personas e instituciones:

Agradezco al CONICET por financiar este proyecto, ayudarme a cumplir este sueño y abrirme las puertas de este maravilloso país, donde hacer ciencia es posible y da esperanzas a Latinoamérica.

Agradezco especialmente a Juani por confiar en mí, por darme la libertad de hacer ciencia, por tener la mejor predisposición para sacar adelante este proyecto, por motivarme y darme una palmadita en la espalda cuando era necesario, mil gracias por ser humano antes que jefe. Gracias a LBD, a Pablo por su orden y enseñanzas, a cada una de las personas que han transitado por el lab, es bastante larga la lista, de cada una he aprendido cosas increíbles y les recuerdo con cariño, pero agradezco especialmente a Diani y Nagif por su colaboración y motivación, a Omar, Cami, Estefi, Sergi, Leti, Nico, Agus, Yanel, gracias infinitas por todas las enseñanzas y momentos compartidos en el lab y fuera del lab.

Gracias a INTECH, dada su diversidad encontré una visión más amplia de Latinoamérica y del significado de comunidad, gracias por la predisposición y colaboración de siempre. Agradezco especialmente a LPA, UB2 y UBP por tener sus puertas abiertas para cualquier inquietud, préstamos y ayudas histológicas. Gracias a Javi, Pame, Ane, Juan, Paulina, Marisol, Agus, Lau, Liz, Susi, por el cariño, mates, risas y momentos compartidos.

Gracias a mi familia adoptiva en Chascomús, a "colchas" por las incontables risas, fiestas, comidas y viajes (el último primer viaje argentino), a Julisilla, a los tíos Susi y Javi, a las ches, a Marce y Nata, gracias por hacerme sentir en casa, siempre están en mi corazón. Gracias a las chicas de *sadhana*, por recordarme lo esencial de la vida y ser soporte en la última parte de esta etapa.

Gracias a mi FAMILIA, por ese amor que trasciende tiempo y kilómetros de distancia, gracias mami y papi por apoyar y alimentar mis sueños, a pesar de que la distancia duela. Gracias a todas

las maravillosas mujeres, abuelitas, tías, primas, mona, a Mateito y al tio más loquis, son una gran fuente de motivación, gracias por acompañarme desde la distancia, les amo y extraño.

Gracias a mi hermana adoptiva por estar presente en cada momento al otro lado del teléfono, a mis amigas del alma por trascender en tiempo y distancia, siempre están en mi corazón.

### **Dedicatoria**

A esa personita que me ha acompañado y motivado desde el momento en el que la biología cruzó nuestros caminos, anhelos y pasiones. Gracias por llegar ese viernes a la tarde, convertirte en mi mejor amigo, llenar mi vida de alegría e iluminarla en los momentos difíciles con tu paciencia y amor. Por más biología y aventuras de ciencia y viajes.

Te amo infinito compañero de doctorado, de vida y alma.

# LISTA DE ABREVIATURAS

μm micrómetro

**ADNc** Ácido Desoxirribonucleico copia o complementario

ADNg Ácido Desoxirribonucleico genómico

ARNm Ácido Desoxirribonucleico mensajero

**ARNt** Ácido Ribonucleico de transferencia

CAP Análogo [m7G(5')ppp(5')G]

**CGs** Células Germinales

CHAPS 3[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

Cr. Cromosoma

CRISPR/Cas9 Del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/

CRISPR associated protein 9

**DEPC** dietilpirocarbonato

**DIG** Digoxigenina

dmy Del inglés DM domain gene on Y chromosome

dpe días post eclosión

dpf días post fecundación

**EDTA** Ácido etilenoadiaminotretacético

**ESPG** Espermatogonia **ESPZ** Espermatozoide

FITC del inglés Fluorescein isothiocyanate

foxl3 Del inglés Forkhead-box protein L3

**G0-1-2** Generación 0, 1 y 2 de individuos mutados

gsdf Del inglés Gonadal soma-derived factor

HIS Hibridación in situ

**HMA** Ensayo de movilidad de heteroduplex (del inglés, Heteroduplex mobility

assay)

**Ndrg** Del inglés *N-myc downstream regulated gene* 

**nl** nanolitro

O Ovogonias

olvas Homólogo de vasa en medaka

**OPV** Ovocitos pre-vitelogénicos

OV Ovocitos vitelogénicos

**pb** pares de bases

**PBSw** Buffer fosfato salino con Tween 100

**PCNA** Del inglés Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

**PGCs** Células primordiales germinales (del inglés *Primordial Germ Cells*)

**rpl7** gen de la proteína ribosomal L7

**RT-qPCR** PCR cuantitativa en Tiempo Real

**sgARN** guía de ARN

sgN1b individuos mutados para ndrg1b, G0 microinyectados con cas9 +

sg1ARN\_ndrg1b.

sry Del inglés Sex determining region Y

**TESPA** 3-aminopropiltrietoxisilina

TUNEL Del inglés TdT-mediated dUTP Nick End Labeling, TdT: Terminal

deoxynucleotidyl Transferase

# LISTA DE CONCEPTOS

Células troncales También referidas como células madres totipotentes

Cistos Grupos de células germinales interconectadas generadas por divisiones

celulares con citocinesis incompleta, dichos cistos están rodeados de

células somáticas

Citocinesis También conocida como citoquinesis, consiste en la separación física

del citoplasma de las células hijas resultado de la división celular

Convulsiones Manifestación de golpes o convulsiones fuertes efectuados por parte

del macho en la región abdominal de la hembra de medaka durante el

comportamiento sexual

**Cubrición** Acción y efecto de cubrir el macho a la hembra durante el

comportamiento sexual

**Disgerminoma** Tipo de tumor de las células germinales presente en ovarios

Gonias Células germinales presentes en ovarios y testículos, es decir

ovogonias y espermatogonias

*indels* Inserciones y deleciones de nucleótidos

off-targets Potenciales sitios del genoma donde se podrían generar cortes

inespecíficos

**Primordio** Conjunto inicial de células embrionarias que darán lugar a un tejido o

un órgano durante el desarrollo

**Proliferación tipo I** Nombre recibido en medaka a la división celular de autorrenovación

de las células germinales

**Proliferación tipo II** Nombre recibido en medaka a la proliferación cística de las células

germinales, la cual se trata de una división celular sucesiva, sincrónica

e incompleta, generando los conocidos cistos

Seminoma Tipo de tumor de las células germinales presente en testículos

**Temblor** Manifestación de vibraciones o temblores suaves y rápidos de los

cuerpos de hembra y macho durante el comportamiento sexual de

medaka

# LISTA DE FIGURAS

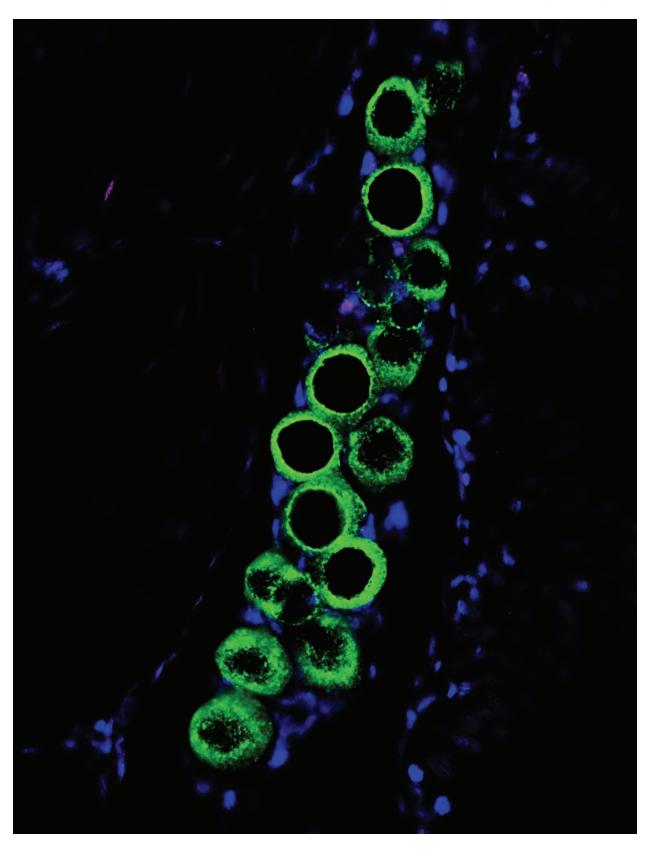
Figura 1. Representación esquemática del desarrollo gonadal en vertebrados	19
Figura 2. Migración PGCs y establecimiento del primordio gonadal en medaka.	21
Figura 3. Proliferación tipo I y tipo II durante el desarrollo gonadal en medaka.	22
Figura 4. Árbol filogenético de los miembros de la familia NDRG.	25
Figura 5. Estadíos de desarrollo gonadal seleccionados para estudiar la prolifera	ación30
Figura 6. Árbol filogenético de los miembros de la familia ndrg en medaka	31
Figura 7. Expresión de ndrg1 durante el desarrollo gonadal	42
Figura 8. ndrg1b tiene una expresión opuesta a la proliferación tipo II cística	durante el
desarrollo gonadal.	43
Figura 9. CRISPR/Cas9: diseño de sg1ARN_ndrg1b y sg2ARN_ndrg1b, eficien	cia y HMA.
	44
Figura 10. Eficiencia y especificidad de la sg1ARN_ndrg1b: análisis de sitios off	-target y de
indels generados con el sistema CRISPR/Cas9.	46
Figura 11. Selección de indel $\Delta 31$ para obtener la línea homocigota mutante de $n$	ı <b>drg1b.</b> 47
Figura 12. Mutación de <i>ndrg1b</i> afecta el desarrollo gonadal en estadío 39	49
Figura 13. Apoptosis de células germinales en embriones XX y XY mutados par	a <i>ndrg1b</i> en
estadío 39.	50
Figura 14. Mutación generada con la guía 2 de <i>ndrg1b</i> afecta el desarrollo gonada	al en estadío
39	51
Figura 15. La mutación de <i>ndrg1b</i> afecta el desarrollo gonadal a los 20 dpe	53
Figura 16. Proliferación durante la morfogénesis en ratones y medaka	59
Figura 17. Representación esquemática de la estructura ovárica en medaka	62

Figura 18. Representación esquemática de la estructura de testículos en medaka64
Figura 19. Representación esquemática y descripción de las características sexuales
secundarias en medaka
Figura 20. Representación esquemática del comportamiento reproductivo de medaka69
Figura 21. Mutantes bialélicos de ndrg1b no exhiben características sexuales secundarias
alteradas
Figura 22. Mutación de <i>ndrg1b</i> altera la gametogénesis en ambos sexos en la adultez79
Figura 23. Mutación de <i>ndrg1b</i> altera la espermatogénesis en machos adultos80
Figura 24. Mutación de <i>ndrg1b</i> altera el éxito reproductivo en ambos sexos en la adultez82
Figura 25. Mutación de <i>ndrg1b</i> altera el comportamiento sexual en machos84
Figura 26. Mutación de <i>ndrg1b</i> no modifica los niveles de 11-KT en adultos de medaka86
Figura 27. Expresión de <i>ndrg1b</i> en cerebro y testículos de machos controles
Figura 28. Modelo hipotético de la participación de ndrg1b en la proliferación cística durante
la embriogénesis, estadíos juveniles y la etapa reproductiva93

# LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Expresión y función de la familia Ndrg en las gónadas de vertebrados.
- Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en técnicas de caracterización de *ndrg1* en la presente tesis.
- Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en el sistema CRISPR/Cas9 para mutar ndrg1b.
- Tabla 4. Proporción de sexos de los mutantes ndrg1b.

# **CAPITULO I**



# INTRODUCCIÓN

#### Desarrollo gonadal en vertebrados

Durante el desarrollo embriológico se da lugar a la formación de tejidos y órganos a partir de un primordio constituido inicialmente por unas pocas células, las cuales deberán pasar por diferentes etapas, como migración, diferenciación, cambios morfológicos, proliferación, e incluso muerte celular (Jenkins *et al.*, 2003). Dentro de los diferentes órganos, el desarrollo de las gónadas es un proceso muy interesante porque a partir de un primordio se pueden desarrollar dos órganos completamente diferentes: un ovario o un testículo. Este proceso está altamente conservado, e incluye la migración, proliferación y diferenciación de las células germinales y somáticas, la determinación del sexo biológico, la morfogénesis de ovarios o testículos, y finalmente la producción de ovocitos y espermatozoides respectivamente, que transmitirán la información genética a la siguiente generación (**Figura 1**). Es por esto que defectos en cualquiera de estas etapas del desarrollo gonadal podrían conducir a problemas reproductivos, como infertilidad y reversión sexual (Tanaka *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2016).

Independientemente del tipo de determinación del sexo biológico, que puede ser genético o ambiental (Bachtrog et al., 2014; Barske and Capel, 2008; Cutting et al., 2013; DeFalco and Capel, 2009; Hattori et al., 2020), para direccionar el desarrollo morfológico de la gónada, las células germinales son las únicas células capaces de transmitir información a través de las generaciones. El punto de partida del desarrollo gonadal está constituido por unas pocas células germinales, denominadas células primordiales germinales o PGCs (del inglés *Primordial Germ Cells*) (Figura 1), que están desde el desarrollo embrionario temprano, incluso desde el primer clivaje celular en algunas especies (Extavour and Akam, 2003; Kathleen Molyneaux and Christopher Wylie, 2004). Estas células se formarán de dos maneras, por preformación o por epigénesis. En la preformación o especificación mediada por herencia, las PGCs se forman a partir del plasma germinal, material citoplasmático especializado que contiene ARN y proteínas heredados directamente del óvulo. Este tipo de formación se ha identificado tanto en invertebrados (*Drosophila melanogaster y Caenorhabditis elegans*), como en vertebrados (pollo *Gallus gallus*, pez cebra *Danio rerio y* medaka *Oryzias latipes*) (Extavour and Akam, 2003; Whittle and Extavour, 2016; Whittle and Extavour, 2017). En la epigénesis o especificación inductiva, no hay plasma germinal y las PGCs

se desarrollan a partir de señales inductivas secretadas por otras células en tejidos embrionarios y extraembrionarios. Este tipo de formación se ha estudiado especialmente en algunas especies de salamandras y en ratones (*Mus musculus*) (Ewen and Koopman, 2010; Extavour and Akam, 2003; Richardson and Lehmann, 2010; Whittle and Extavour, 2017).

Una vez que las PGCs se han especificado, se da lugar a la migración de las mismas para alcanzar el primordio gonadal, lugar donde junto a las células somáticas precursoras se dará inicio a la formación de la gónada (Figura 1). Aunque existen diferentes mecanismos de migración según la especie, comúnmente las PGCs tienen que viajar largas distancias desde regiones extraembrionarias o endodérmicas hasta la región gonadal ubicada en el mesodermo (DeFalco & Capel, 2009b; Molyneaux & Wylie, 2004). Por ejemplo en ratones, las PGCs son transportadas desde el endodermo parietal y una membrana extraembrionaria denominada alantoides, luego en el endodermo son incorporadas en el intestino grueso y finalmente migran hasta llegar al mesodermo gonadal (Ewen and Koopman, 2010; McLaren, 2000). En pollo las PGCs se agregan en la región extraembrionaria anterior y entran al sistema vascular extraembrionario, viajando por la aorta dorsal y pasando por las paredes de los vasos sanguíneos hasta alcanzar la región anterior del mesodermo gonadal (DeFalco and Capel, 2009). En el pez cebra las PGCs pasan del borde anterior del mesodermo a los laterales del mesodermo (Raz, 2003). Para que puedan avanzar tales migraciones de las PGCs, en la mayoría de especies existe una importante regulación de señales y factores, tales como las quimioquinas o citosinas quimiotácticas y las proteínas de adhesión celular (Molyneaux & Wylie, 2004; Richardson & Lehmann, 2010).

Si bien hay un número relativo de PGCs previo a su especificación, durante la migración y el establecimiento del primordio gonadal pueden presentarse divisiones celulares sin aumentar de manera considerable el número de las PGCs. Se trata de divisiones celulares similar a la autorrenovación de las células troncales, que aseguran un número apropiado de PGCs para la consiguiente formación de la gónada (DeFalco and Capel, 2009). A continuación, se da inicio a divisiones celulares de manera sucesiva, sincrónica, y con citocinesis incompleta, conocidas como proliferación cística, ya que genera grupos celulares interconectados conocidos como cistos, los cuales están rodeados de células somáticas (**Figura 1**). La proliferación cística es fundamental para aumentar el número de PGCs considerablemente. Por ejemplo, en ratones, tras el inicio de la

proliferación cística, se inicia con 150 PGCs en el estadío 8,5 días post coito (dpc) y llega a 25.000 células en el estadío 13,5 dpc (Lei and Allan C. Spradling, 2013). Como es de suponer, la proliferación formadora de cistos es un proceso altamente conservado y regulado desde invertebrados a vertebrados. En general el número de células por cisto es 2<sup>n</sup>, siendo n el número de divisiones; por ejemplo en *Drosophila y Xenopus* se pueden encontrar cistos de 16 células (DiNardo *et al.*, 2011; Hinnant *et al.*, 2017; Narbonne-Reveau *et al.*, 2006), y en ratones y medaka se pueden identificar cistos de hasta 32 células (Elkouby and Mullins, 2017; Lei and Allan C. Spradling, 2013).

Otro rasgo importante es la diferencia temporal entre hembras y machos en relación al inicio de la proliferación cística y la transición a la meiosis. Como muestra, en la mayoría de los mamíferos las hembras presentan proliferación cística únicamente en la etapa neonatal, y en los machos durante la etapa neonatal y en la adultez (Koubova et al., 2006; Lei and Allan C Spradling, 2013; Pepling, 2006; Tanaka, 2014). Por otro lado en el pez medaka la proliferación cística en las hembras se inicia en estadíos embrionarios, mientras que en machos inicia en estadíos larvales y en ambos sexos se mantiene hasta la adultez (Nishimura et al., 2018; Noriyuki Satoh, Egami, 1972; Schartl, 2004; Tanaka, 2019). En esta especie la proliferación en estadíos adultos también se observa en hembras porque conservan las células troncales germinales (Nakamura et al., 2010). Es por esto que la proliferación de las células germinales en la hembra es una de los primeros dimorfismos sexuales durante el desarrollo gonadal en vertebrados. Tanto en machos como en hembras tras varias rondas de proliferación cística se da inicio a la meiosis, y a su vez las células comienzan a diferenciarse. Es importante mencionar que en etapas post-embrionarias a las células germinales troncales comúnmente se les refiere como gonias, particularmente ovogonias y espermatogonias, que tras la ovogénesis y espermatogénesis dan lugar a los ovocitos y espermatozoides, respectivamente (Figura 1). Además, las células somáticas en hembras se diferencian en células de Granulosa y Teca, y en machos en células de Sertoli y Leyding (Brennan and Capel, 2004; DeFalco and Capel, 2009; Kurokawa et al., 2007; McLaren, 2000). En el capítulo II se detallarán los procesos de diferenciación y morfogénesis de ovarios y testículos.

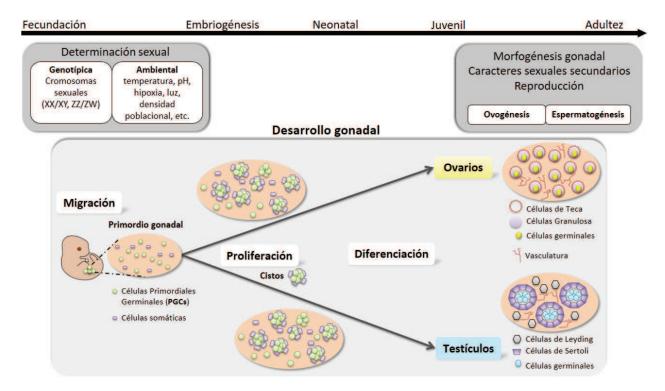


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo gonadal en vertebrados. El esquema ilustra las principales etapas del desarrollo gonadal, desde la fecundación hasta la adultez. En primer lugar, los diferentes componentes de la determinación del sexo biológico según la especie. La migración de las PGCs (del inglés, Primordial Germ Cells) en etapas tempranas del desarrollo embrionario, posteriormente la proliferación y formación de cistos, que darán lugar a la diferenciación de los diferentes tipos celulares que componen los ovarios y testículos durante etapas juveniles y de adultez. Una vez formadas las gónadas se da inicio a la ovogénesis y espermatogénesis, procesos fundamentales para la reproducción. Adaptado de Bachtrog et al., 2014 y DeFalco & Capel, 2009a.

Como he mencionado anteriormente, la regulación de estas etapas del desarrollo gonadal es fundamental para una morfogénesis satisfactoria y el consecuente éxito reproductivo de los individuos. Por tanto, fallas en estas podría generar severos problemas, como desarreglos morfológicos en ovarios, testículos y/o órganos genitales internos y externos, presencia de disgerminomas y seminomas en ovarios y testículos respectivamente, inversión sexual y problemas de infertilidad y subfertilidad (Brennan and Capel, 2004; Hutson *et al.*, 2014; Stévant and Nef, 2019). Una de las etapas de mayor grado de conservación, por ende, con menores variaciones tanto en invertebrados como vertebrados, es la proliferación de las PGCs (Saito *et al.*,

2007), de la cual aún se desconocen en profundidad los mecanismos moleculares que la regulan, y por lo tanto, ha sido de gran interés estudiar este proceso. Para estudiarlo se seleccionó al pez medaka como organismo modelo, debido a que presenta características idóneas para estudiar el desarrollo gonadal, especialmente la proliferación, las cuales serán detalladas a continuación.

#### Medaka como modelo para estudiar el desarrollo gonadal

El pez medaka se ha establecido como organismo modelo relevante en investigaciones relacionadas a la biomedicina, toxicología y biología del desarrollo (Wittbrodt et al., 2002), convirtiéndose en uno de los mejores modelos para estudiar la determinación sexual y el desarrollo gonadal en vertebrados no mamíferos (Chakraborty et al., 2016; Matsuda, 2005). Medaka presenta un sistema de determinación sexual XX – XY como en mamíferos, aunque a diferencia de estos el gen determinante del sexo es el dmy (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002), el cual corresponde al segundo gen determinante del sexo identificado en vertebrados, después del Sry en mamíferos (Kinoshita et al., 2012a; Koopman, 1991). El gen dmy está ligado al cromosoma Y, y es el resultado de una duplicación del locus autosómico que contiene el gen DMRT1. Este gen determinante del sexo codifica para una proteína que presenta el dominio DM (del inglés DNAbinding Domain) el cual también está presente en factores de transcripción relacionados a la determinación del sexo en nematodos y moscas (Kobayashi et al., 2004; Nanda et al., 2002; Ohmuro-Matsuyama et al., 2003; Volff et al., 2003). Adicionalmente, en trabajos recientes se ha propuesto que dmy determina el sexo masculino a través de la activación del gen gsdf (del inglés gonadal soma derived factor), uno de los principales inductores del desarrollo testicular temprano (Chakraborty et al., n.d.; Shibata et al., 2010; Zhang et al., 2016), mientras que el gen autosómico dmrt1 participaría en el mantenimiento del sexo masculino (Volff et al., 2003; Zhang et al., 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, las PGCs en medaka son especificadas por preformación, por lo tanto, el plasma germinal es de origen materno (Kinoshita *et al.*, 2012a). En medaka las PGCs son reconocidas desde gástrula temprana (estadío 13 o a las 13 horas post fecundación) en el polo animal próximo a la región del blastodermo. A partir de gástrula tardía (estadío 16 o 21 horas post fecundación) comienzan a migrar hasta alinearse bilateralmente formando dos grupos celulares a lo largo de la región del tronco (estadío 20 o 31 horas post fecundación), hasta llegar

al plato lateral del mesodermo, a la altura del intestino en desarrollo (estadío 26 o 50 horas post fecundación). Finalmente, estos dos grupos de PGCs empiezan a migrar hacia la región dorsal del intestino, donde se combinan para dar lugar al primordio gonadal (estadío 30-33, 4 días post fecundación) (Figura 2). Las PGCs son atraídas al lugar del primordio gonadal por precursores gonadales somáticos, los cuales están presentes mucho antes de la formación del primordio gonadal (Kurokawa et al., 2007; Nakamura et al., 2006; Sasado et al., 2008; Tanaka et al., 2001). El estudio de la especificación, migración y proliferación de las PGCs ha avanzado ampliamente gracias a la identificación del marcador olvas, un homólogo del gen vasa, el cual también es importante para la especificación y formación de PGCs en otras especies (Li et al., 2009; Li et al., 2015; Saito et al., 2006; Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2002).

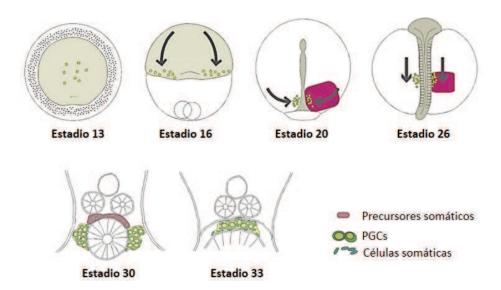


Figura 2. Migración PGCs y establecimiento del primordio gonadal en medaka. Representación de la migración de las PGCs a partir de estadío 13, gástrula temprana, momento en el cual están ubicadas en el polo animal próximo a la región del blastodermo. En estadío 16, gástrula tardía, comienzan a migrar hasta alinearse bilateralmente formando dos grupos celulares a lo largo de la región del tronco en estadío 20, específicamente a la altura del intestino en desarrollo en el estadío 26. La formación del primordio gonadal se da entre los estadíos 30 y 33, momento en el cual las PGCs migran hacia la región dorsal del intestino, atraídas por precursores somáticos. Modificada de M Tanaka *et al.*, 2001.

Tras la formación del primordio gonadal, las PGCs de ambos sexos se dividen de manera intermitente, denominándose tipo I en medaka. Esta proliferación es importante para la

autorrenovación de las células germinales durante toda la vida, como una división típica de las células troncales, que también se observa en otras especies. En los estadíos de proliferación tipo I (estadío 35, 5 días post fecundación) las gónadas de hembras y machos aparecen morfológicamente indistinguibles, y presentan aproximadamente 30-60 células germinales separadas entre sí y rodeadas por células somáticas (Nishimura and Tanaka, 2014; Noriyuki Satoh, Egami, 1972; Saito et al., 2007; Schartl, 2004; Tanaka, 2014). El primer dimorfismo sexual gonadal observado en estadíos embrionarios está dado por el inicio de la proliferación cística, o proliferación tipo II en medaka, la cual al igual de las demás especies se trata de una división sucesiva, sincrónica e incompleta, generando los ya nombrados cistos. Si bien la proliferación tipo II en hembras comienza en el estadío 37 (7 días post fecundación), es en el estadío 39 (9 días post fecundación) donde se puede identificar claramente la primera diferencia morfológica con respecto a machos (Figura 3). Generalmente se pueden observar gónadas con cistos de 4-16 células, lo que representaría un total 200 células germinales aproximadamente, mientras que en los machos no se observan cistos y el número total de células germinales es alrededor de 80. En hembras la proliferación tipo I y II continua activamente, algunas células entran en meiosis a parir del estadío 39, y la estructura ovárica se establece alrededor de los 20 días post eclosión. Por otro lado, en las gónadas de machos recién en este momento, 20 días post eclosión, se da inicio a la proliferación cística tipo II, tras haber estado arrestada en proliferación tipo I, y por lo tanto la meiosis comienza recién alrededor de los 40 y 50 días post eclosión (Nishimura and Tanaka, 2014; Noriyuki Satoh, Egami, 1972; Saito et al., 2007; Schartl, 2004; Tanaka, 2014).

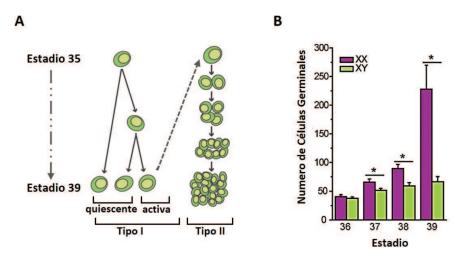


Figura 3. Proliferación tipo I y tipo II durante el desarrollo gonadal en medaka. (A) Representación esquemática de los diferentes tipos de proliferación del desarrollo gonadal temprano, en estadío 35,

momento en el que las gónadas aparecen morfológicamente indistinguibles entre hembras y machos, y solo hay presencia de proliferación tipo I. En estadío 39, previo a la eclosión, las gónadas son sexualmente dimórfica, dado que las hembras presentan cistos por el inicio de la proliferación tipo II. (B) Cambio en el número de células germinales (CGs) durante el desarrollo temprano de hembras (XX) y machos (XY), a partir de estadío 37 se presenta un aumento en el número de CGs de hembras, como resultado del inicio de la proliferación tipo II, la cual permanece activa en estadíos posteriores. Tomada y modificada de D. Saito et al., 2007.

Como ya se ha mencionado, la proliferación en el desarrollo gonadal es un mecanismo altamente conservado que precede a la gametogénesis y es crucial para el éxito reproductivo. Sin embargo, su regulación molecular permanece sin resolver (DiNardo et al., 2011; Hinnant et al., 2017; Narbonne-Reveau et al., 2006; Saito et al., 2007). Esto ha llevado a que en los últimos años numerosos laboratorios hayan dedicado un gran esfuerzo en la búsqueda e identificación de genes potenciales pro- o anti-proliferativos, que establecen el número correcto de células germinales durante el desarrollo gonadal, tanto en hembras como en machos. En medaka particularmente ha sido de gran interés distinguir la proliferación tipo I de la II, así como el inicio de la meiosis, por medio de la expresión de algunos marcadores moleculares y endócrinos, y así avanzar con el análisis para comprender la regulación de ambas proliferaciones y la conservación en vertebrados (Saito et al., 2007). Por ejemplo, hay factores de transcripción como el foxl3, el cual se ha detectado únicamente en células germinales tipo II de hembras durante estadíos embrionarios y larvales; sin embargo, este factor de transcripción no actúa como regulador de dicha proliferación, sino que puntualmente actúa como supresor del inicio de la espermatogénesis (Nishimura et al., 2015; Tanaka, 2019). Recientemente se han identificado genes con expresión en células germinales mitóticas que no están regulados por foxl3, sugiriendo que quizá puedan tener un rol en la regulación de la proliferación y no en la supresión de la meiosis. Dentro de estos genes se encuentran ndrg1 y ndrg3, miembros de la familia Ndrg (M Kikuchi et al., 2019), genes de gran interés para nuestro grupo de trabajo, que describiré a continuación.

# Familia Ndrg y su rol en la proliferación celular

La familia Ndrg (del inglés *N-myc downstream regulated gene*) consiste en 4 miembros, *ndrg1*, *ndrg2*, *ndrg3* y *ndrg4*, los cuales comparten un alto porcentaje de homología, entre 55-70% según

la especie. Las proteínas NDRG se caracterizan por presentar una región NDR y una α/β hidrolasa, las cuales son altamente homologas entre las 4 proteínas. Sin embargo, ninguno de los 4 miembros presenta el motivo catalítico requerido para las funciones de proteínas hidrolasas (Shaw *et al.*, 2002). Análisis filogenéticos (**Figura 4**) indican agrupaciones de homología claramente separadas para cada uno de los miembros de la familia NDGR, agrupando a su vez a los mamíferos de las especies distantes como *Xenopus tropicalis* y el pez cebra. Los miembros de la familia NDRG surgen de múltiples eventos de duplicación durante la evolución, y presentan un grado de conservación alto entre especies de organismos multicelulares, al igual que entre los diferentes miembros en una misma especie. La familia ndrg esta subdividida en dos subfamilias, una compuesta por *ndrg1* y *ndrg3*, y la otra por *ndrg2* y *ndrg4* (Fang *et al.*, 2014; Melotte *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013).

El rol de los miembros de ndrg ha sido estudiado en múltiples sistemas modelos bajo diversas condiciones, indicando que todos estos miembros contribuyen a la proliferación celular, desarrollo, diferenciación y respuesta a estrés (Lee et al., 2016; Melotte et al., 2010; Schonkeren et al., 2019; Yang et al., 2013; Yu et al., 2019). En un sistema en el cual se ha investigado ampliamente la función de estos genes es en cáncer. Mediante técnicas de sobreexpresión y silenciamiento, tanto en modelos in vitro e in vivo, en los cuales se ha observado roles predominantes para cada subfamilia. Por ejemplo, para la subfamilia 1 se ha visto que el silenciamiento de NDRG1 resulta en la reducción de la proliferación celular e invasión en diferentes carcinomas (Croessmann et al., 2015; Sun et al., 2013; Wu et al., 2019; Yan et al., 2008), mientras que la sobreexpresión de NDRG3 promueve el crecimiento tumoral (Lee et al., 2015; Wang et al., 2009), por lo tanto, ambos genes tendrían un rol oncogénico, ya que promueven la proliferación celular y la invasión (Melotte et al., 2010; Sun et al., 2013; Yang et al., 2013). Al contrario, en el caso de la subfamilia 2 se ha observado que la sobreexpresión de NDRG2 resulta en la supresión del crecimiento tumoral de líneas de celulares de glioblastoma humano, y su silenciamiento ha generado aumento de la proliferación celular (Kim et al., 2009; Li et al., 2013). Adicionalmente, la sobreexpresión de NDRG4 ha generado reducción en la proliferación e invasión en diferentes líneas de carcinomas (Chu et al., 2015; Ding et al., 2012; Melotte et al., 2009); por consiguiente, estos genes se han propuesto como supresores tumorales ya que inhiben la proliferación e invasión (Hwang et al., 2011; Melotte et al., 2010). Si bien todos los miembros de la familia Ndrg tienen un rol fundamental en la proliferación celular en modelos de cáncer, aún hay pocos estudios de su rol durante el desarrollo (Melotte *et al.*, 2010), y particularmente menos estudios durante el desarrollo gonadal.

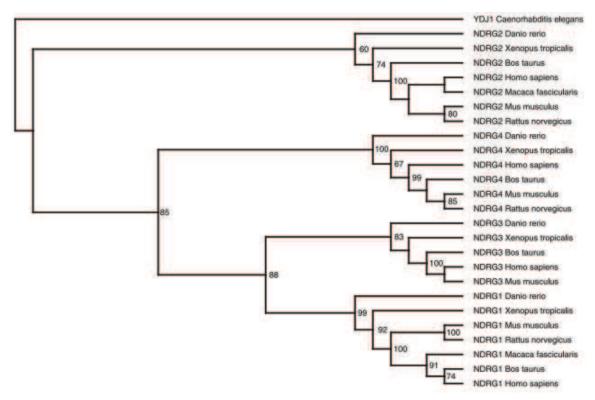


Figura 4. Árbol filogenético de los miembros de la familia NDRG. Secuencias de las proteínas de todos los miembros de la familia (NDRG1–4) de diferentes especies (humano, *Homo sapiens*; macaco cangrejo, *Macaca fascicularis*; vaca, *Bos taurus*; ratón, *Mus musculus*; rata, *Rattus norvegicus*; rana, *Xenopus tropicalis*; y pez cebra, *Danio rerio*). Como grupo externo se eligió la proteína relacionada YDJ1 de *Caenorhabditis elegans*. Árbol filogenético visualizado usando TreeView ClustalW tomado de Melotte *et al.*, (2010).

## Familia Ndrg en el desarrollo gonadal

Se ha estudiado la expresión de los miembros de Ndrg en diversas especies de vertebrados, tanto en estadíos embrionarios como en adultos. Todos los miembros presentan expresión en diversos órganos y tejidos, como esqueleto, músculo, conductos néfricos, cerebro, corazón, entre otros, sugiriendo que estos miembros presentan funciones en mecanismos celulares generales, como por

ejemplo la regulación de la proliferación (Fang et al., 2014; Fernandino et al., 2011; Kyuno et al., 2003; Melotte et al., 2010; Pan et al., 2017; Zhong et al., 2015). En relación a la expresión de las subfamilias en gónadas, se ha identificado que NDRG1 se expresa durante el desarrollo de órganos reproductivos y urinarios en la rana africana Xenopus laevis (Kyuno et al., 2003; Melotte et al., 2010), y en testículos de oveja (Ovis orientalis aries) (Qu et al., 2019); sin embargo, su función en las gónadas no ha sido elucidada. Por otro lado, la expresión de NDRG3 se ha observado en ovarios y testículos de vertebrados, principalmente en testículos de ratones, humanos (Homo sapiens) y peces (Fernandino et al., 2011; Qu et al., 2002; Yang et al., 2013; Zhao et al., 2001), donde además de estar regulado por andrógenos (González et al., 2014; Wang et al., 2009), se ha identificado que tiene un rol fundamental durante la espermatogénesis de ratones (Pan et al., 2017). En cuanto a NDRG2 se ha observado expresión en ovarios y testículos de mamíferos (Hou et al., 2009; Li et al., 2008), pero su función está relacionada a la apoptosis de las células germinales, células de Leyding y Sertoli (Hou et al., 2010; Li et al., 2012). Finalmente, hasta el momento no se ha identificado expresión de NDRG4 ni en ovarios ni testículos de ningún organismo modelo.

Tabla 1. Expresión y función de la familia ndrg en las gónadas de vertebrados.

	Expresión	Especie	Función identificada	Referencia
	gonadal			
NDRG1	Gónadas en	Rana africana (Xenopus	No identificada	Kyuno et al., 2003;
	desarrollo y	laevis); oveja (Ovis		Melotte et al., 2010; Y.
	testículos adultos	orientalis aries)		H. Qu et al., 2019
NDRG2	Testículos y	Rata (Rattus norvegicus);	Apoptosis de las	W. G. Hou et al., 2009; S.
	ovarios adultos	humano (Homo sapiens);	células germinales,	Li, Huang, Lim, & Kim,
		ratón (Mus musculus)	células de Leyding y	2008; W. Hou et al.,
			Sertoli	2010; T. Li et al., 2012.
NDRG3	Testículos y	Ratón (Mus musculus);	Regulación de la	Zhao et al., 2001; Wang
	ovarios adultos	humano (Homo sapiens);	profase meiótica	et al., 2009; Fernandino
		Pez Pejerrey (Odontesthes	durante la	et al., 2011; Pan et al.,
		bonariensis)	espermatogénesis	2017.
NDRG4	No identificada		No identificada	

En base a los antecedentes de la familia Ndrg en proliferación y expresión gonadal, en la presente tesis se ha decidido explorar la función de el gen ndrgl, debido a que, de los miembros de Ndrg que se han identificado en gónadas de vertebrados, ndrgl es el único del cual no se le ha elucidado su rol durante el desarrollo gonadal (**Tabla 1**).

# PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dada la importancia del desarrollo gonadal para el éxito reproductivo, el grado de conservación de la proliferación durante el desarrollo gonadal y la carencia de información de sus reguladores moleculares, sumado a los antecedentes de Ndrg1 en la regulación de proliferación de células cancerígenas, y su expresión en gónadas de diferentes especies de vertebrados, hipotetizamos que *ndrg1* cumple un rol regulatorio en el desarrollo gonadal, especialmente en la proliferación de células germinales.

En base al marco conceptual y la pregunta de investigación, nuestro principal objetivo ha sido estudiar la participación de *ndrg1* en el desarrollo gonadal, especialmente en la proliferación de células germinales, usando como modelo experimental al pez medaka.

En base al objetivo principal nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- Identificar la expresión de *ndrg1* durante el desarrollo gonadal, especialmente en los momentos importantes de proliferación de células germinales en medaka.
- Generar la pérdida de función de *ndrg1* para estudiar su participación durante el desarrollo gonadal temprano.
- Analizar el rol de *ndrg1*, en diferentes momentos del desarrollo gonadal tanto en hembras como en machos.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# Peces y muestreos

Todos los experimentos realizados en esta tesis fueron llevados a cabo con la línea hi-medaka (ID: MT835) de la especie *Oryzias latipes*, perteneciente al orden Beloniformes y familia Adrianichthyidae. Esta línea fue suministrada por el Proyecto Nacional de Recursos Biológicos de Japón (National BioResource Project: NBRP) (www. shigen.nig.ac.jp/medaka/). Todos los peces fueron mantenidos y alimentados según las condiciones y protocolos estándar establecidos para medaka por Kinoshita et al. (2012) y la UFAW (*Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, <a href="http://www.ufaw.org.uk">http://www.ufaw.org.uk</a>). Los huevos fertilizados fueron incubados en placas de Petri de 35 mm con medio para embriones (17 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 0.27 mM CaCl2·2H2O y 0.66 mM MgSO4; pH 7) (Porazinski *et al.*, 2010) hasta la eclosión, y los juveniles y adultos mantenidos en tanques de 2L de agua, en condiciones estándar de fotoperiodo 14 horas luz/10 horas oscuridad a 26°C (±1°C).

Las muestras fueron tomadas en diferentes estadíos de desarrollo de medaka: estadíos embrionarios 35 y 39 (5 y 9 días post fecundación respectivamente) y estadíos juveniles de 10 y 20 días post eclosión (dpe) (Figura 5), en base a las descripciones del desarrollo de medaka (Iwamatsu, 2004). Como se ha mencionado anteriormente en la introducción, estos estadíos son de importancia en el desarrollo gonadal de medaka, y quisiera mencionarlo de manera puntual en este apartado. El estadío 35 presenta una gónada indiferenciada en ambos sexos, con presencia únicamente de proliferación tipo I, la cual precede al inicio de proliferación tipo II cística en gónadas de hembras XX entre el estadío 37 y 39. El estadío 39 presenta un considerable aumento de la proliferación cística en hembras, dando lugar al primer dimorfismo gonadal entre sexos antes del momento de eclosión. A los 10 dpe la proliferación cística continua activa únicamente en hembras, mientras que en machos recién a los 20 dpe se observa presencia de esta. En todos los estadíos la recolección de individuos se realizó tras la inmersión en tricaina 30-50 mg/L (Sigma-Aldrich), y fueron procesados de acuerdo a la técnica para la cual se iban a utilizar. En la mayoría de casos la cola y cabeza se separaban para realizar las extracciones de ADNg.

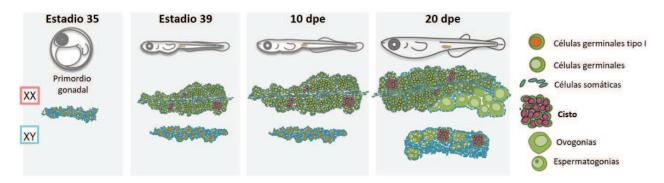
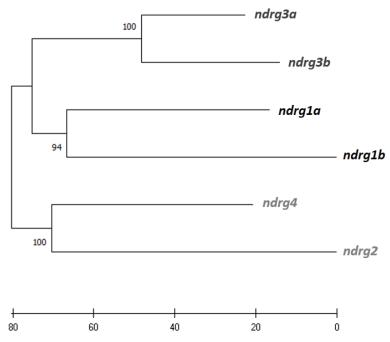


Figura 5. Estadíos de desarrollo gonadal seleccionados para estudiar la proliferación. Estadíos de desarrollo empleados en el presente capitulo. Estadío 35 presenta únicamente proliferación tipo I y gónada indiferenciada en hembras (XX) y machos (XY). En estadío 39 solo las hembras presentan cistos dado a la proliferación tipo II. 10 días post eclosión (dpe) la proliferación cística continua activa únicamente en hembras. A los 20 dpe en los machos hay presencia de la proliferación tipo II.

# Diseño y síntesis de sondas de ARN marcadas con Digoxigenina

La subfamilia I de Ndrg presenta varios parálogos en medaka (ndrg1a, ndrg1b y ndrg3a, ndrg3b), como resultado de la duplicación del genoma en peces teleósteos (Guo et al., 2011; Kasahara et al., 2007; Mable et al., 2011). Los miembros de la familia Ndrg en medaka presentan alrededor de 60% de identidad entre ellos (Figura 6) similar a otras especies. Para construir las sondas de los genes ndrg1 (ndrg1a y ndrg1b), se amplificaron dichos genes empleando oligonucleótidos específicos para cada uno (Tabla 2) por medio de PCR usando ADNc de embriones de medaka en diferentes estadíos de desarrollo, y su posterior clonación en el vector pGEM®-T (Promega). Para sintetizar las sondas de ARN se procedió a la linealización de 10 µg de cada plásmido con enzimas de restricción específicas. La linealización se realizó hacia el extremo 5' de la secuencia del gen con la finalidad de sintetizar una sonda de ARN antisentido. Tras purificar el ADN linealizado y se procedió a realizar la transcripción in vitro utilizando las ARN polimerasas SP6, T7 o T3, según la orientación de cada inserto, y una mezcla de ribonucleótidos cuyos uracilos están marcados con digoxigenina (DIG labeling mix, Roche). Las sondas marcadas fueron purificadas en columnas Sephadex G50 (GE Healthcare), diluidas 10 veces y almacenadas como stock a -20°C en solución de hibridación (formamida 50%, SSC 1.3X pH 5, EDTA 5mM pH 8, ARNt 200µg/µl, Tween 20 0.1%, CHAPS 0.1%, heparina sódica 100 µg/µl).



**Figura 6.** Árbol filogenético de los miembros de la familia ndrg en medaka. Árbol filogenético que muestra la relación entre los miembros de la familia Ndrg en medaka, fue obtenido usando el método Neighbor-Joining y el test Bootstrap en el programa MEGA 7.0 software. La escala de abajo del árbol refleja las distancias entre las secuencias. Se emplearon secuencias de ENSEMBL, con los siguientes números de acceso a las secuencias: ndrg1a, ENSORLP00000004441; ndrg1b, ENSORLP00000006022; ndrg3a, ENSORLP000000017330; ndrg3a, ENSORLP000000029943; ndrg4, ENSORLP000000034803; ndrg2, ENSORLP000000038714.

# Hibridación in situ en cuerpo entero de embriones

Se realizó la HIS en embriones enteros según el protocolo descripto por Nakamura et al., (2006). Inicialmente, los embriones fueron fijados en paraformaldehído PFA 4% durante 16 horas a 4°C. Al día siguiente se eliminó el corion de los embriones con pinzas de disección, tras lavados en PBSw-DEPC (PBS-DEPC, Tween 20 0,1%) a temperatura ambiente. Adicionalmente, los embriones fueron permeabilizados utilizando Proteinasa K (10μg/ml) a temperatura ambiente durante distintos tiempos dependiendo del estadío embrionario, seguido de lavados con 2mg/ml de glicina - PBSw-DEPC, para frenar la permeabilización. Posteriormente, se hibridó a 68°C durante 16 horas con la sonda de ARN marcada con DIG correspondiente para cada gen. Seguido de lavados a 68°C con solución de lavado (formamida 50%, SSC 1,3X pH 5, EDTA 5mM pH8,

Tween20 0.1%, CHAPS 0,1%), e incubación de 2 horas a temperatura ambiente con Suero Fetal Bovino 20%, BBR 2% (Blockin Reagent, Roche), para la consecuente incubación con un anticuerpo anti-DIG-Alkaline Phosphatatase (Roche) en una dilución 1:2000 durante 2 horas a 4°C. Finalmente, la detección del anticuerpo se realizó a temperatura ambiente en presencia de los sustratos NBT/BCIP (tetrazolio nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-idolil fosfato). Una vez que se obtuvo la coloración deseada se detuvo la reacción con lavados de TrisHCl 100mM pH 9.5. Las fotos fueron tomadas utilizando un estereoscopio (ZEISS SteREO Discovery.V12). Algunos de los embriones posteriormente fueron embebidos en gelatina (ver a continuación) y seccionados en criostato en cortes de 14-16μm, para ser fotografiados.

## Montaje de embriones en gelatina

Para realizar los cortes histológicos en criostato los embriones fueron embebidos en PBS-sucrosa 5% a 4°C, transcurridas 16 horas se pasaron a PBS-sucrosa 15% a 4°C, posterior a otras 16hs, se incubaron en PBS-sucrosa 15% y gelatina 7,5% (Sigma-Aldrich) mínimo por 4 horas a 37°C. Finalmente, las muestras fueron ubicadas en moldes, las cuales fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su procesamiento en el criostato. Los cortes se realizaron en criostato (Leica) a -30°C, generando secciones transversales de 14-16μm en portaobjetos tratados con TESPA (Sigma-Aldrich), la posterior desgelatinización se realizó con lavados de PBS a 42°C durante 10 minutos.

#### Extracción de ADNg con solución salina

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) se empleó el protocolo de extracción de ADN con solución salina (NaCl 0.4 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 2 mM pH8) adaptado de Aljanabi & Martinez, (1997). Se incubaron la cola y/o cabeza de cada individuo en solución salina, con SDS 20% y proteinasa K, durante 60 minutos a 65° C. Seguido de la precipitación del ADNg empleando alcohol isopropílico y NaCl 5 M, durante 30 minutos a -20°C y la posterior elución del ADNg en agua Ultra Pura para realizar el sexado genético.

# Sexado genético

Para determinar el sexo de los individuos muestreados se procedió primero a identificar por PCR la presencia del gen que determina el sexo en machos de medaka, *dmy/dmrt1by* (Patil and Hinze, 2008), para lo cual se emplearon oligonucleótidos especificos para amplificar la presencia este gen (Nanda *et al.*, 2002), y como control de carga de ADNg se utilizó el gen autosomal β-actina (**Tabla 2**). Los productos de amplificacion fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa 1%.

# Extracción de ARNm y síntesis de ADN copia (ADNc)

La región del tronco donde se encuentra la gónada fue escindida para cada individuo en estadío 35, 39, 10 y 20 días post eclosión, y luego fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C de manera individual; mientras que las colas y cabezas se procesaron inmediatamente para realizar el sexado genético por PCR. Una vez identificado el sexo de cada individuo se procedió a realizar la extracción de ARNm utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante del producto. Para los estadíos embrionarios se realizaron extracciones de conjuntos (pools) de 5 individuos del mismo sexo, y para el resto de los estadíos de muestreo las extracciones se realizaron en forma individual. El ARNm fue cuantificado en el espectrofotómetro Synergy H<sub>1</sub> (Hybrid Reader) y se descartaron las muestras con relaciones de absorbancias A260/280 que no estuvieran en el rango 1,9 - 2,1. Posterior al tratamiento con DNaseI-Amplification Grade (Invitrogen), se realizó la síntesis de ADNc a partir de 500 ng de ARN para cada muestra, utilizando la trasncriptasa reversa SuperScriptII (Invitrogen) y oligonucleotidos dT (Life Technology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

# PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)

Para llevar a cabo los ensayos de RT-qPCR se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen (**Tabla 2**) usando el software Primer3plus (<a href="http://www.bioinformatics.nl">http://www.bioinformatics.nl</a>). Previo al uso de cada oligonucleótido se validó su especificidad y se determinó su eficiencia de amplificación (100 ± 10%, R2 > 0.98). Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos en el termociclador de tiempo real Agilent MX3005P Multiplex qPCR (Stratagene). Cada reacción fue llevada a cabo con 2x Fast Start SYBR Green Universal Master Mix con ROX (Roche), empleando

condiciones estándar de amplificación con un ciclo inicial de 1 minuto a 95°C, seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 30 segundos. Para cada amplificación se realizó dos replicas técnicas, y al final de cada amplificación se analizó las curvas de *melting* para verificar la amplificación específica de cada producto, descartando aquellas muestras que presentaran algún desvío de la normalidad. En cada experimento se incluyeron controles negativos, sin ADNc, para confirmar la ausencia de productos amplificables en el medio de la reacción. Finalmente, el método de cuantificación empleado fue el delta-delta Ct (ΔΔCt), utilizando como gen de referencia el gen de la proteína ribosomal L7 (*rpl7*) (Zhang and Hu, 2007), y las diferencias estadísticas de los valores de Ct fueron analizados con el software fgStatistics (Di Rienzo et al. 2010).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en técnicas de caracterización de ndrg1 en la presente tesis.

Gen	Numero de acceso a Secuencia oligonucleótidos (5'-3')		Experimento
	ENSEMBL		
u dua 1 a	ENSORLG00020002065	Fw:GACGATATCCAGGTTGTCGAGTCC	
ndrg1a	ENSORLG00020002003	Rv:CGATGATATGGTTGCGATATCTCGC	
1 11	ENSORLG00020022631	Fw:CATGTTGAGGCTCCAGGACAAC	HIS
ndrg1b	ENSORLG00020022031	Rv:CTGCAGCTCGTTGGTATGTGAG	шэ
Oct4	ENCORI C0000010471 2	Fw:GGCCCCGGCTTTCTTTG	
	ENSORLG00000010471.2	Rv:CTCCGCTTCCTCTTCCTGGTG	
1	ENSORLG00000020486	Fw:CAACTTTGTCCAAACTCTGA	
dmy		Rv:TGATGCAGCATTTTGACACATTTA	Sexado
Q activ	-actin ENSORLG0000001367	Fw:GGATGACATGGAGAAGATCTGG	genético
β-actin	ENSORLG0000001307	Rv:ATGGTGATGACCTGTCCGTC-3'	
u due 1h	ENSORLG00020022631	Fw:ATGTCAACCCCAATGCTGAG	
ndrg1b		Rv:CGTTGGACTGGTTCATGGTT	RT-qPCR
rpl7	ENSORLG00000007967.2	Fw:CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT	K1-q1 CK
	ENSORLGUUUUUUU/907.2	Rv:AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT	

# Diseño de guías para el sistema CRISPR/Cas9

En base a la secuencia genómica disponible en la base de datos Ensembl (Ensembl gene: ENSORLG00020022631) se procedió a identificar y diseñar secuencias guías con la ayuda del

predictor online CCTop – CRISPR/Cas9 diseñado para Medaka (CCTop, http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/) (Stemmer *et al.*, 2015), se identificaron dos secuencias target en el exón 6 de *ndrg1b* (**Tabla 3 y figura 9**) según el sitio PAM (NGG – del inglés *Protoespacer Adjacent Motif*) identificado "5'-N21GG-3" o "5'-CCN21-3", basándose en los criterios previamente establecidos por Ansai & Kinoshita, (2014).

# Síntesis de las guías de ARN

Cada guía de ARN (sgARN) fue sintetizada siguiendo los parámetros de Ansai & Kinoshita, (2014). Como paso inicial se procedió a realizar la hibridación de cada par de oligonucleótidos inversamente complementarios para cada guía (Tabla 3), utilizando 100 uM de cada oligonucleótido en solución de hibridación (100mM Tris-HCl pH 7,5; 1M NaCl; 10mM EDTA en agua libre de RNAsas), calentando 5 minutos a 95°C y dejando enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Posteriormente cada par de oligonucleótidos hibridados fueron clonados en el vector pDR274 (Addgene, #42250) previamente purificado y digerido con la enzima de restricción BsaI (Biolabs). Cada vector clonado se chequeo por PCR de colonias bacterianas y se envió a secuenciar para su confirmación, empleando los oligonucleótidos forward (Fw) de cada guía y el oligonucleótido forward M13 de unión al vector pDR274 (Tabla 3). Previo a la síntesis de ARN cada vector fue linealizado con la enzima DraI (Biolabs) y se purificaron utilizando una incubación de 30 minutos a 55°C con proteinasa K y SDS 10% para eliminar las RNAsas residuales, seguido de una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con etanol. Tras purificar el ADN linealizado se procedió a realizar la transcripción in vitro utilizando una concentración mínima de 1 µg de cada plásmido como templado y la ARN polimerasas T7 del kit de transcripción MEGAshortscript (Thermo Fisher Scientific), seguido del tratamiento con la DNasa TURBO durante 15 minutos a 37°C, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, cada ARN guía (sgARN) sintetizada fue purificada usando el mini kit de purificación RNeasy (Qiagen), cuantificada en el espectrofotómetro Synergy H<sub>1</sub> (Hybrid Reader), confirmando que la relación de absorbancias A260/280 estuviera en el rango 1,9 - 2,1 para así proceder a diluir en agua libre de RNAsas a una concentración de 100 ng/µl y guardar a -80°C hasta su posterior uso en las microinyecciones.

#### Síntesis del ARN de la Cas9

Siguiendo los parámetros de Ansai & Kinoshita, (2014), se procedió a la linealización de 10 μg del plásmido pCS2-nCas9n vector (Addgene, #47929) con la enzima NotI (biolabs). La digestión fue chequeada por electroforesis en un gel de agarosa del 2%, donde una digestión exitosa debe liberar un fragmento de 285 pb. Seguidamente se realizó una incubación de 30 minutos a 55°C con proteinasa K y SDS 10% para eliminar las RNAsas residuales, seguido de una purificación con el kit QIAquick (Qiagen). Posteriormente, se procedió a realizar la transcripción *in vitro* utilizando una concentración de 1 μg del plásmido linealizado y la ARN polimerasas SP6 del kit de transcripción mMessage mMachine (Thermo Fisher Scientific) en presencia de CAP, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras el tiempo de transcripción se realizó el tratamiento con la DNasa TURBO durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, el ARN de la Cas9 con caperusa (*cas9*) fue purificado usando el mini kit de purificación RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y cuantificado en el espectrofotómetro Synergy H<sub>1</sub> (Hybrid Reader), confirmando que la relación de absorbancias A260/280 estuviera en el rango 1,9 - 2,1 para proceder a diluir en agua libre de RNAsas a una concentración de 200 ng/μl y guardar a -80°C hasta su posterior uso en las microinyecciones.

# Microinyección del sistema CRISPR/Cas9 en embriones de medaka

Todas las microinyecciones se llevaron a cabo en embriones en estadío de una célula. Para obtener embriones en este estadío, se separaron los machos y las hembras la noche previa a la microinyección para controlar la hora de fecundación de los huevos desovados. Al día siguiente se juntaron los machos y hembras 15-20 minutos previos a la hora de recolección de los embriones. Una vez recolectadas las ovas se procedió a la limpieza, separación y selección de los huevos fecundados, descartando todos los embriones que estuvieran en estadíos posteriores a una célula. Los embriones se mantuvieron a 4-10°C durante todo el proceso para ralentizar la división celular. Para microinyectar se utilizó el Nanoject II Auto-Nanoliter con micromanipulador (Drummond Scientific) acoplado a un estereoscopio (Olympus). El volumen aproximado de inyección fue de 4,6 nl por embrión. Para chequear la eficiencia de cada guía de ARN se siguió el siguiente esquema de inyección: cada embrión fue inyectados con 100 ng/µl de ARN de Cas9 junto a 50 ng/ul de la sg1ARN\_ndrg1b, y 50 ng/ul de la sg2ARN\_ndrg1b respectivamente, y como control fueron inyectados embriones únicamente con 100 ng/µl de ARN de Cas9 y el agua empleada para diluir

las ARN guías. La definición de las concentraciones optimas de inyección fue previamente evaluado y establecido para Medaka por Ansai & Kinoshita, (2014).

# Detección de mutaciones en embriones microinyectados por medio de HMA

Para analizar la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 se realizaron ensayos de movilidad de heteroduplex (del inglés, Heteroduplex mobility assay HMA) (Ota *et al.*, 2013). Para ello se extrajo el ADNg de cada individuo mediante una solución de lisis alcalina (25mM NaOH, 0.2mM EDTA) a 95°C durante 5 minutos y luego diluido en solución neutralizante (40mM Tris-HCl, pH8.0) en embriones 3 días post microinyección y se procedió a la extracción adaptada de Aljanabi & Martinez, (1997) para el caso de muestras de colas y/o cabezas de individuos de estadíos más avanzados. Cada ADNg se utilizó como templado en la PCR usando oligonucleótidos que amplifican la región que flanquea el sitio de unión de las ARN guías (**Tabla 3**) empleando condiciones estándar de amplificación con un ciclo adicional final de 60°C. Los productos de amplificacion fueron analizados por medio de electroforesis en gel de acrilamida 12% y teñido con bromuro de etidio. La tasa de eficiencia de cada ARN guía de *ndrg1b* fue calculada en base al numero de multiples bandas de heteroduplex generadas en las amplificaciones de PCR en 20 embriones inyectados con cada guía. Para cada una de las subsecuentes metodologias cada individuo fue analizado por HMA usando ADNg de un porcion de cola, cabeza o aleta.

## Chequeo del sistema CRISPR/Cas9: off-targets y secuenciación

Una vez elegida la ARN guía de mayor eficiencia se procedió a analizar la especificad y eficiencia del sistema CRISPR/Cas9, para lo cual se realizaron ensayos de análisis de *off-targets* y seguidos de una secuenciación. Los sitios *off-targets*, es decir potenciales lugares del genoma donde se podrían generar cortes inespecíficos por parte de la Cas9 debido a la posible unión de la guía de *ndrg1b*, fueron buscados usando la herramienta "Pattern Match" en el sitio web de Medaka – NBRP (http://viewer.shigen.info/medakavw/patternmatch) y con el predictor online CCTop-CRISPR/Cas9 (CCTop, <a href="http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/">http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/</a>) (Stemmer *et al.*, 2015). El criterio de selección de los mismos fue basado en el trabajo de Ansai & Kinoshita (2014), según la ubicación y tamaño de la microhomología de las secuencias, debido a que los efectos *off-target* varían dependiendo de dónde se encuentre el desarreglo en el apareamiento o *mismatch* y el número de

ellos, teniendo mayor relevancia aquellos *mismatches* adyacentes al sitio PAM (NGG). Todos los potenciales sitios identificados fueron analizados por HMA usando oligonucleótidos específicos para cada uno (**Tabla 3**) y ADNg de embriones inyectados con la Cas9 y guía de *ndrg1b*. Adicionalmente, se confirmó los indels generados en los mutantes bialélicos de *ndrg1b* por medio de secuenciación de individuos de generación 1, para lo cual individuos adultos de generación 0 (G0 o individuos microinyectados) fueron cruzados con individuos salvajes de Medaka. Luego se envió a secuenciar productos de PCR que presentaron múltiples bandas en el HMA, los cuales fueron amplificados con los oligonucleótidos específicos para *ndrg1b* (**Tabla 3**) usando como templado ADNg de una porción de aleta extraído con el protocolo adaptado de Aljanabi & Martinez, (1997) mencionado anteriormente.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en el sistema CRISPR/Cas9 para mutar ndrg1b.

Nombre	Numero de acceso a	Secuencia oligonucleótidos (5´- 3´)	Experimento
	ENSEMBL		
ndrg1b	ENSORLG00020022631	Fw:taggGATTTAGTGGACGGGCTG	
guía 1		Rv:aaacAGCCCGTCCACTAAATCA	Diseño guías
ndrg1b	ENSORLG00020022631	Fw:taggGCAGGAGCATACATCCTG	CRISPR/Cas9
guía 2		Rv:aaacCAGGATGTATGCTCCTGC	
M13		Fw:GTAAAACGACGGCCAGT	Chequeo guías pDR274
ndrg1b	ENSORLG00020022631	Fw:CTTGACATGCCTTTATCTAGAGAC	HMA y
		Rv:CATTTCTGTCACCAGCTTAAG	secuenciación
Cr. 1	chr1:5601523-5601805	Fw:GGGTGAATGTTGCAGAAGTTG	
		Rv:GGACTGTTGGAATGTGGGTG	
Cr. 3	chr3:4654886+4655208	Fw:CTCTGTGGTCCAGTACCAACTG	Análisis de
		Rv:GGTGAGTTGATAATGCGGTC	Off-targets
Cr. 7	chr7:21163167+21163418	Fw:GGAGCCGCCTGTTAGCTTC	
		Rv:CTGGCTCGTGTGACACATACG	

## Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina

Los individuos mutados y controles de estadío 39 fueron fijados en solución de Bouin (Formol, Ácido Pícrico y Ácido Acético), embebidos en parafina y cortados sagitalmente cada 5 µm en

micrótomo de deslizamiento (Leica) ubicándolos en portaobjetos previamente tratados con TESPA (Sigma-Aldrich). Posteriormente se procedió a desparafinar las muestras con xileno, rehidratarlas con concentraciones decrecientes de etanol y permeabilizarlas con PBS-T (PBS pH 7.4, TritónX100 0,5%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se bloqueó en PBS-T, BSA 0,5% (albúmina sérica bovina, Sigma-Aldrich) por 1 hora a temperatura ambiente, previo a la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente para cada experimento diluidos 1:200, anti-OLVAS (conejo, Abcam 209710) y/o anti-PCNA (ratón, Sigma P8825). Tras la incubación, los cortes fueron lavados en PBS-T e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos 1:2000, anticonejo IgG conjugado a un Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, A-11008) y/o anti-ratón IgG conjugado a un Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, A32742). Tras la incubación los cortes fueron lavados en PBS y montados con medio de montaje Fluoromount (Sigma-Aldrich) que contenía 4',6-diamidino-2-phenylindole 1μg/ml (DAPI, Life Technologies) para ser analizados y fotografiados en el microscopio.

# Análisis de muerte celular programada (apoptosis) por medio de la técnica de TUNEL

Los individuos mutados y controles de estadío 39 fueron fijados en solución de Bouin (Formol, Ácido Pícrico y Ácido Acético), embebidos en parafina y cortados sagitalmente cada 5 µm en micrótomo de deslizamiento (Leica) ubicándolos en portaobjetos tratados con TESPA (Sigma-Aldrich). Tras desparafinar los cortes se procedió con la técnica de TUNEL (del inglés, TdT-mediated dUTP Nick End Labeling, TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase), la cual marca el fragmento terminal de los ácidos nucleicos resultado del corte de ADN generado durante la apoptosis (en otras palabras: el Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa), para lo cual se utilizó el kit de detección de muerte celular in situ con fluoresceína (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante, permeabilizando con PBS-T (PBS pH 7.4, TritónX100 0,1% y citrato de sodio 0.1%), seguido de la reacción de marcaje durante 1 hora a 37°C. Adicionalmente se prosiguió con la inmunodetección de OLVAS tal como se describió anteriormente analizando y fotografiando en el microscopio.

# Análisis histológico

Los individuos mutados y controles de 20 días post eclosión fueron fijados en solución de Bouin (Formol, Ácido Pícrico y Ácido Acético), embebidos en parafina y cortados transversalmente cada 5 µm en micrótomo de deslizamiento (Leica). Posteriormente se procedió a desparafinar las muestras con xileno, rehidratarlas con concentraciones decrecientes de etanol, teñirlas con Hematoxilina & Eosina (H&E; Biopack) y montarlas en bálsamo de Canada sintético (Biopack), para ser analizados y fotografiados en el microscopio.

## Análisis microscópico y cuantificación celular

Todas las fotografías de inmunodetecciones y tinciones de H&E fueron tomadas usando la cámara Nikon Digital Sight DSQi1Mc acoplada en el microscopio Nikon Eclipse E600, y la cámara AmScope MU1003 10MP CMOS Digital acoplada al microscopio ZEISS Axio Observer Led colibri 7. Las imágenes fueron analizadas usando el programa FIJI (https://imagej.nih.gov/ij/). Las células fueron contadas manualmente usando la herramienta de conteo celular de FIJI. En el caso de las imágenes de las inmunodetecciones de estadío 39, se contaron todas las células inmunoreactias para OLVAS, PCNA y TUNEL presentes en los cortes sagitales de la gónada. En el caso del conteo de células tipo I y II se siguieron los parámetros establecidos por Saito et al., (2007), donde las células aisladas se contaron como tipo I y el conjunto de más de dos células se contaron como tipo II. Por otro lado, en las imágenes de las tinciones en 20 días post eclosión, los conteos se realizaron en mínimo 3 cortes transversales elegidos al azar evitando los extremos gonadales, además se tuvo en cuenta de que tuvieran una separación minina de 20 - 100 μm entre sí, para evitar el conteo de una misma célula en diferentes cortes.

#### Análisis estadístico

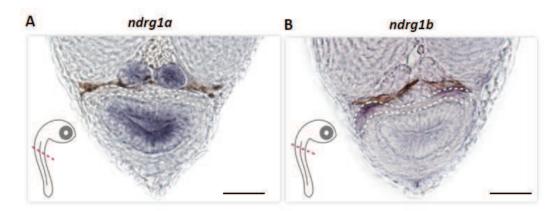
Los análisis estadísticos de las comparaciones relativas de las expresiones del transcripto de *ndrg1b* por RT-qPCR se llevaron a cabo usando el programa FgStatistics software (<a href="http://sites.google.com/site/fgStatistics/">http://sites.google.com/site/fgStatistics/</a>) según lo establecido por Pfaffl, (2001). Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Las variables de dos grupos fueron comparadas por medio de la prueba de Student de dos "colas" sin emparejar, aplicando la corrección de "Wlech" para varianzas diferentes. Para las

variables de más de dos grupos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicando la corrección de Tukey, comparando la media de cada grupo experimental. Se consideraron diferencias estadísticas significativas con valores P<0,05.

# RESULTADOS

# Expresión de *ndrg1* durante el desarrollo gonadal

Con el fin de identificar la expresión de *ndrg1* durante el desarrollo gonadal de medaka, se analizó la presencia de los transcriptos de los parálogos *ndrg1a* y *ndrg1b* por medio de hibridación *in situ* en estadío 35 (**Figura 7**). *ndrg1a* se detectó en conductos néfricos e intestino, pero no en el primordio gonadal (**Figura 7A**), mientras que *ndrg1b* se observó específicamente en gónadas (**Figura 7B**).



**Figura 7. Expresión de ndrg1 durante el desarrollo gonadal.** Cortes transversales de la región gonadal (línea roja) de embriones enteros en estadío 35 para detectar los transcriptos de *ndrg1a* (**A**) y *ndrg1b* (**B**) por medio de la técnica hibridación in situ en cuerpo entero. La región gonadal está rodeada por líneas punteadas color blanco. La barra de escala representa 20μm.

Teniendo en cuenta que *ndrg1b* fue el único parálogo de *ndrg1* del cual se observó expresión en la gónada durante el desarrollo embrionario, y con el fin de comprender el rol del mismo durante el desarrollo gonadal, se procedió a cuantificar el nivel de transcripto de *ndrg1b* mediante RT-qPCR en los momentos claves de proliferación de células germinales (**Figura 8**). Particularmente, en el estadío 35, cuando las gónadas de hembra (XX) y machos (XY) aparecen morfológicamente indistinguibles y las células germinales solo presentan proliferación tipo I, no se detectaron diferencias en los niveles de transcripto de *ndrg1b* entre hembras y machos (**Figura 8A**). Posteriormente, en los estadíos 39 y los 10 y 20 días post eclosión (dpe) se observó una expresión sexualmente dimórfica de *ndrg1b* (**Figura 8B, C, D**). En el estadío 39 y los 10 dpe, momentos en

los cuales las gónadas de hembras presentan un mayor número de células germinales en comparación de los machos debido a la proliferación tipo II, o proliferación cística, se detectó un mayor nivel de transcripto de *ndgr1b* en machos con respecto a hembras (**Figura 8B, C**). El perfil opuesto de transcripción de *ndgr1b* fue observado a los 20 dpe (**Figura 8D**), siendo mayor en hembras que en machos, momento en el cual la proliferación tipo II ha comenzado en los machos. Estos resultados indican que la expresión de *ndrg1b* es opuesta a los momentos de proliferación tipo II cística de las células germinales en ambos sexos.

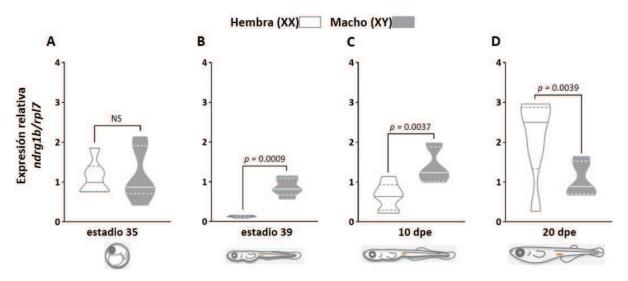


Figura 8. ndrg1b tiene una expresión opuesta a la proliferación tipo II cística durante el desarrollo gonadal. Nivel de abundancia relativa del transcripto de ndrg1b en hembras (XX) y machos (XY) en diferentes estadíos de desarrollo gonadal: (A) estadío 35, (B) estadío 39, (C) 10 días post eclosión (dpe) y (D) 20 dpe. La cuantificación se llevó a cabo usando el método 2<sup>-ΔΔCt</sup> y los valores fueron normalizados al gen rpl7. El sexado genético fue determinado por la presencia/ausencia de el gen dmy a partir de muestras de ADNg de cola y cabeza, el resto del cuerpo se empleó para cuantificar el transcripto de ndrg1b. Las hembras (XX) están representadas con violines vacíos, y los machos (XY) con barras violines rellenos de color gris. n= 5-6 pool de 5 individuos por sexo en estadío 35 y 39, n=7 individuos por sexo en 10 dpe y n=5 individuos por sexo en 20 dpe. Los valores P están indicados cuando los grupos difieren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Se aplicó el método de comparación relativa de expresión genética (Pfaff1, 2001).

# Establecimiento de mutantes bialélicos para ndrg1b mediante CRISPR/Cas9

Para explorar el rol de *ndrg1b* durante el desarrollo gonadal y la proliferación tipo II cística se generaron mutantes bialélicos de *ndrg1b*, es decir individuos G0 con *indels* (presencia de inserciones o deleciones) generados por la tecnología de CRISPR/Cas9, mediante la inyección de Cas9 y una guía de ARN. Se diseñaron y sintetizaron dos guías en el exón 6 de *ndrg1b* (Figura 9A), las cuales fueron inyectadas separadamente en embriones de una célula (Figura 9B). La eficiencia de mutagénesis de cada guía fue evaluada por medio del ensayo HMA (Figura 9C, D) a partir de ADNg de los embriones inyectados con cada una (Ota *et al.*, 2013), en los cuales se puede observar los diferentes heteroduplex formados tras los diferentes cortes posibles que puede generar la Cas9 en cada sitio target de *ndrg1b*, comparado con los individuos controles inyectados con *cas9*, en los cuales se observa una única banda. En cuanto a la eficiencia de mutagénesis de cada guía, calculada con 20 individuos inyectados, fue de 96.6% para la sg1ARN\_*ndrg1b* (Figura 9C) y de 80% para sg2ARN\_*ndrg1b* (Figura 9D). Por lo tanto, se seleccionó la sg1ARN\_*ndrg1b* para los análisis posteriores.

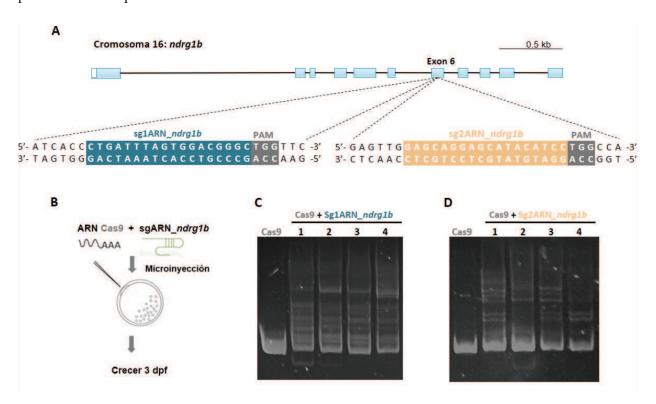


Figura 9. CRISPR/Cas9: diseño de sg1ARN\_ndrg1b y sg2ARN\_ndrg1b, eficiencia y HMA. (A) Representación esquemática del locus de ndrg1b en el cromosoma 16. Las regiones codificantes exonicas están representadas con cajas solidas azules, la secuencia target de la guía 1 sg1ARN\_ndrg1b está indicada

con una caja color cian, y la secuencia target de la guía 2 sg2ARN\_ndrg1b está indicada con una caja color naranja, ambas guías adyacentes a las respectivas regiones PAM (protospacer adjacent motif) con la secuencia NGG en una caja color gris. (B) Representación esquemática del procedimiento de microinyección para generar los mutantes CRISPR/Cas9. (C-D) Imágenes del ensayo de HMA en embriones inyectados con cas9 como controles (única banda), y 4 embriones (múltiples bandas) inyectados con (C) cas9 + sg1ARN\_ndrg1b y (D) cas9 + sg2ARN\_ndrg1b.

En segunda instancia se analizó por medio de un ensayo de HMA la presencia de *indels* en los sitios *off-target* (potenciales sitios del genoma donde se podría unir la guía inespecíficamente) seleccionados *in silico*. En total se analizaron 3 sitios *off-target* ubicados en diferentes cromosomas de medaka, para los cuales no se detectaron *indels* en los embriones inyectados con *cas9*+sg1ARN\_*ndrg1b*, mostrando un porcentaje de mutagenesis de 0%, al igual que los controles inyectados con *cas9* (**Figura 10A, B**). Este resultado indica que la sg1ARN\_*ndrg1b* seleccionada es específica para *ndrg1b*.

Adicionalmente, algunos individuos mutantes bialélicos (inyectados con  $cas9 + sg1ARN\_ndrg1b$ ) generación 0 (G0) fueron cruzados con individuos controles (inyectados con cas9), con el fin de obtener la generación 1 (G1) de individuos heterocigotos, y secuenciar el sitio target de  $sg1ARN\_ndrg1b$  para confirmar y conocer los *indels* observados por medio de HMA en la G0. Se identificaron 7 *indels* diferentes, entre ellos una sustitución, y 6 deleciones ( $\Delta$ ) de 1, 2, 3, 4 y 31 pares de bases (pb) en diferentes individuos (ind.) (**Figura 10C**). De manera que la  $sg1ARN\_ndrg1b$  seleccionada es específica y eficiente para generar mutaciones en ndrg1b.

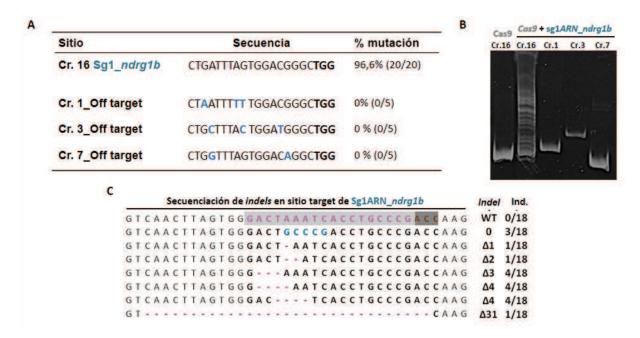


Figura 10. Eficiencia y especificidad de la sg1ARN\_ndrg1b: análisis de sitios off-target y de indels generados con el sistema CRISPR/Cas9. (A) Lista de potenciales sitios off-target con su respectivo cromosoma (Cr.), su secuencia (en negrita el sitio PAM, y en celeste los mismatches), y el porcentaje de mutación detectado en base al análisis por HMA, entre paréntesis el número de individuos. (B) Los sitios off-target fueron analizados por el ensayo de HMA usando ADNg de embriones inyectados con cas9 + sg1ARN\_ndrg1b, el control corresponde a embriones inyectados como Cas9 (única banda, Cr. 16). (C) Secuenciación de indels en la G1 de embriones inyectados con cas9+sg1ARN\_ndrg1b, la secuencia del sitio blanco de la sg1ARN\_ndrg1b está indicada con una caja gris, con su respectivo sitio PAM a la derecha, las letras celestes indican una inserción, y las líneas rosas las diferentes deleciones (Δ) identificadas, el tamaño de los indels está indicado al lado derecho de cada secuencia, seguido del número de individuos que presentaron dicho indel en un total de 18 individuos secuenciados.

Por otro lado, se eligió el  $\Delta 31$  (deleción de 31 pb) como fundadora para obtener la línea mutante homocigota, para lo cual se dejó crecer los individuos heterocigotos ( $ndrg1b^{\Delta 31+/-}$ ) G1. Luego de realizar el entrecruzamiento entre individuos  $ndrg1b^{\Delta 31+/-}$  para obtener la G2, la cual estaría compuesta por individuos heterocigotos ( $ndrg1b^{\Delta 31+/-}$ ), homocigotos controles ( $ndrg1b^{\Delta 31+/+}$ ) y mutados ( $ndrg1b^{\Delta 31-/-}$ ) (**Figura 11A**), se procedió al análisis por HMA a partir de ADNg. Los individuos heterocigotos presentan 4 bandas diferentes (**Figura 11C**), mientras que los homocigotas y controles presentan una sola banda. Para distinguir entre homocigotos mutados y controles, se procedió a combinar cada producto de PCR con el producto de un individuo control

inyectado con cas 9, realinear y analizar nuevamente por HMA (**Figura 11D**). De los 50 individuos G2 analizados, no fue posible identificar individuos homocigotos mutados  $ndrg 1b^{\Delta 31-/-}$ , identificando únicamente 56% de individuos heterocigotos y 44% de homocigotas salvajes (**Figura 11B**).

De igual modo, en estudios previos en medaka se ha observado una altísima eficiencia de mutaciones bialélicas en G0 usando la técnica CRISPR/Cas9 (Castañeda Cortés *et al.*, 2019; Edvardsen *et al.*, 2014; Sawamura *et al.*, 2017), mayores al 90%. Además, la alta especificidad y eficiencia de sg1ARN\_ndrg1b observada en la G0, sumado a los menores tiempos para analizar los fenotipos en G0, nos llevó a decidir continuar con el análisis del posible rol de ndrg1b en el desarrollo gonadal, particularmente en la proliferación tipo II de los individuos de la G0.

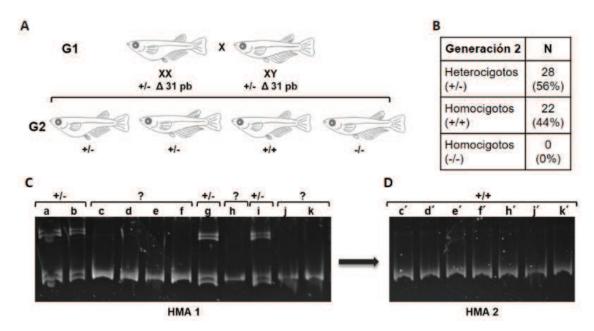


Figura 11. Selección de *indel*  $\Delta$ 31 para obtener la línea homocigota mutante de *ndrg1b*. (A) selección de hembra (XX) y macho (XY) heterocigotos ( $ndrg1b^{A3I+/-}$ ) de la G1, para producir la G2 la cual estaría compuesta por individuos heterocigotos ( $ndrg1b^{A3I+/-}$ ), homocigotos controles ( $ndrg1b^{A3I+/+}$ ) y mutados ( $ndrg1b^{A3I-/-}$ ), según la ley de segregación de alelos de Mendel. (B) Composición de la Generación 2 analizada. (C) Imagen de la primera ronda de HMA de individuos de la G2, en el cual se pueden identificar individuos heterocigotos (a, b, g, i) y los posibles homocigotos controles ( $ndrg1b^{A3I+/+}$ ) y mutados ( $ndrg1b^{A3I-/-}$ ) los cuales están indicados con signo de pregunta (c, d, e, f, h, j, k). (D) Imagen de la segunda ronda de HMA, en la cual cada producto de PCR del ensayo de HMA 1 de los individuos identificados como posibles homocigotos, se mezcló con el producto de PCR de un individuo salvajes, para realizar un

segundo HMA. Todos los individuos (c, d, e, f, h, j, k) se identificaron como homocigotos controles  $(ndrg 1b^{d3l+/+})$ .

### Mutación de *ndrg1b* afecta el desarrollo gonadal en embriones

En primera instancia se procedió a analizar el desarrollo de la gónada en ambos sexos en dos momentos claves de la proliferación tipo II en medaka, en los cuales se observó expresión diferencial de *ndrg1b*, que son los estadíos 39 y 20 dpe (**Figura 12B, C**). A partir de este punto todos los individuos controles microinyectados con *cas9*, serán referidos como Cas9, y los individuos mutados G0 (microinyectados con *cas9* + sg1ARN\_*ndrg1b*) serán referidos como *sgN1b*.

Inicialmente se contó el número de células germinales, identificadas como células inmunoreactivas al anti-OLVAS, en estadío 39 (Figura 12A, B, C). El número total de células germinales en machos sgNIb no fue alterado respecto a los machos Cas9; sin embargo, dicho número sí se vio reducido en hembras sgNIb comparadas con hembras controles (Figura 12D), fenocopiando el número de células ir-OLVAS de los individuos machos controles (Cas9). Adicionalmente, cuando se cuantificó el número de células en proliferación tipo I y II, se observó que solo se alteró la proliferación tipo II cística en las hembras mutadas sgNIb, en comparación con las hembras controles Cas9 (Figura 12F). Además, el número de células germinales en cada cisto fue inferior en las hembras sgNIb con respecto a las hembras controles Cas9 (Figura 12E).

A continuación, nos preguntamos si la disminución en el número de células germinales en las hembras mutadas sgNlb se debía a una reducción de la proliferación, para lo cual se realizó inmunodetección del marcador de células en mitosis PCNA (**Figura 12B, C**). Identificando que el número de células germinales en proliferación tipo I con respecto al número total de células germinales, no difieren entre hembras y machos Cas9 y sgNlb en estadío 39, pero si difieren las células germinales en proliferación tipo II de hembras sgNlb comparadas con hembras control Cas9 (**Figura 12G**). Entre los machos sgNlb y control Cas9 no se observaron diferencias de la proliferación de tipo II, ya que no presentan este tipo de proliferación en este estadío estudiado.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de TUNEL con el fin de evaluar si la disminución en el número de células germinales en las hembras sgN1b se debía a un aumento de células en apoptosis en estos individuos. Sin embargo, no se detectó presencia de células TUNEL positivas en ningún individuo sgN1b y control Cas9 de ambos sexos (**Figura 13**). En definitiva, las hembras mutadas para ndrg1b presentaron menor proliferación de células germinales tipo II císticas, conllevando a la reducción del número total de células germinales en estos individuos con respecto a las hembras controles Cas9, semejando a las gónadas masculinas en estadío 39.

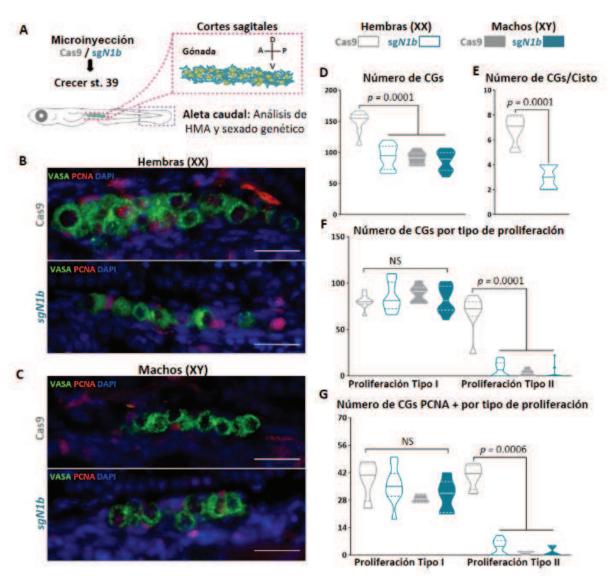


Figura 12. Mutación de *ndrg1b* afecta el desarrollo gonadal en estadío 39. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental empleado para analizar el efecto de las mutaciones de *ndrg1b* en el estado gonadal en individuos de estadío 39, (A: anterior, P: posterior, D: dorsal and V: ventral). (B)

Cortes sagitales con fluorescencia de embriones de embriones XX y (C) XY en estadío 39, controles inyectados con cas9 y mutados sgN1b inyectados con cas9 + sg1ARN\_ndrg1b, las células germinales fueron detectadas usando un anticuerpo anti-OLVAS (verde), núcleo teñido con DAPI (azul) y células proliferantes con anticuerpo anti-PCNA (rojo), la barra de escala representa 20 µm. Se cuantificó manualmente el (D) número total de células germinales (CGs) en hembras (XX) y machos (XY) cas9 y sgN1b, (E) el número de CGs por cisto en hembras (XX) cas9 y sgN1b, (F) el número de CGs según proliferación tipo I y II en hembras (XX) y machos (XY) cas9 y sgN1b, y (G) el número de CGs positivas para PCNA según proliferación tipo I y II en hembras (XX) y machos (XY) cas9 y sgN1b, las hembras Cas9 están representadas con violines vacíos color gris, las hembras sgN1b con violines vacíos color cian, los machos Cas9 con violines rellenos color gris, y los machos sgN1b con violines rellenos de color cian, n=8 por cada grupo control y n=12 por cada grupo mutado, a excepción de grafico G (n=4 controles y n=8 sgN1b). Los valores P están indicados cuando los grupos difieren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Para el grafico E se aplicó la prueba de Student y para los demás ANOVA aplicando la corrección de Tukey.

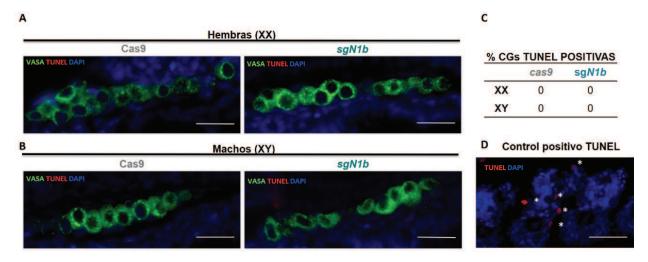


Figura 13. Apoptosis de células germinales en embriones XX y XY mutados para *ndrg1b* en estadío 39. (A) Cortes sagitales de embriones XX y (B) XY en estadío 39 de controles inyectados con cas9 y mutados sgN1b inyectados con cas9 + sg1ARN\_*ndrg1b*. Las células germinales fueron detectadas usando un anticuerpo anti-OLVAS (verde), los núcleos fueron teñido con DAPI (azul) y las células en apoptosis detectadas con TUNEL (rojo), la barra de escala representa 20 μm. (C) Porcentaje de células germinales (CGs) positivas para TUNEL en estadío 39 en 10 cortes sagitales por individuo (n=4). (D) Células de los arcos branquiales positivas para TUNEL.

Como un control adicional de la especificidad de la técnica de CRISPR/Cas9 se decidió analizar si el fenotipo observado en estadío 39 también lo podríamos observar con la guía 2 de *ndrg1b*, para lo cual se realizaron conteos de las células germinales ir-OLVAS en estadío 39, previamente inyectados con la guía 2 de *ndrg1b* (sg2\_*ndrg1b*) o con *cas9* como control (**Figura 14A, B**). El número total de células germinales en machos sg2\_*ndrg1b* no fue alterada respecto a los machos Cas9; sin embargo, el número se vio reducido en hembras sg2\_*ndrg1b* comparadas con hembras controles (**Figura 14C**). Este fenotipo es el mismo observado anteriormente en los mutantes generados con la guía 1 de *ndrg1b* (**Figura 12**), reforzando los resultados y la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 para mutar el gen *ndrg1b*.

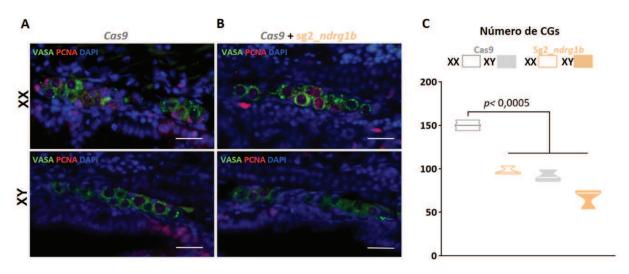


Figura 14. Mutación generada con la guía 2 de *ndrg1b* afecta el desarrollo gonadal en estadío 39. (A-B) Cortes sagitales en embriones en estadío 39 XX y XY, de controles inyectados con cas9 (A) y mutados inyectados con cas9 + sg2\_*ndrg1b* (B) las células germinales fueron detectadas usando un anticuerpo anti-OLVAS (verde), núcleo teñido con DAPI (azul) y células proliferantes con anticuerpo anti-PCNA (rojo), la barra de escala representa 50 μm. (C) Número total de células germinales en hembras (XX) y machos (XY) cas9 y sg2\_*ndrg1b*. Las hembras Cas9 están representadas con violines vacíos de color gris, las hembras mutadas con violines vacíos de color naranja, los machos Cas9 con violines rellenos de color gris, y los machos mutados con violines de color naranja, n=3 por grupo. Los valores P están indicados cuando los grupos difieren estadísticamente (P<0.05). Se aplicó ANOVA con corrección de Tukey.

# La mutación de *ndrg1b* afecta el desarrollo gonadal en juveniles

Otro momento de gran interés para analizar el fenotipo de los mutantes de *ndrg1b* es a los 20 días post eclosión, no solo debido al patrón de expresión observado para *ndrg1b* durante el desarrollo gonadal y momento de inicio de proliferación tipo II en machos, sino además para explorar qué sucede con los machos mutados, en los cuales no se observó alteraciones en estadío 39. Para ello se analizó la morfología gonadal en los juveniles de 20 dpe de ambos sexos usando la tinción con H&E en cortes transversales (**Figura 15A**). Los análisis histológicos evidenciaron ovarios y testículos con desarrollo aparentemente normal (**Figura 15B, E**); sin embargo, se observó una disminución en el número de ovogonias y ovocitos previtelogénicos en las hembras *sgN1b* comparadas con las hembras control Cas9 (**Figura 15C, D**). Con respecto a los machos se observó una reducción significativa en el número de cistos y número de células germinales por cisto en los machos *sgN1b* c comparadas con machos Cas9 (**Figura 15F, G**). Dichas reducciones indican que el número de células germinales es afectado en los mutantes de *ndrg1b* en ambos sexos en los momentos claves de proliferación tipo II cística.

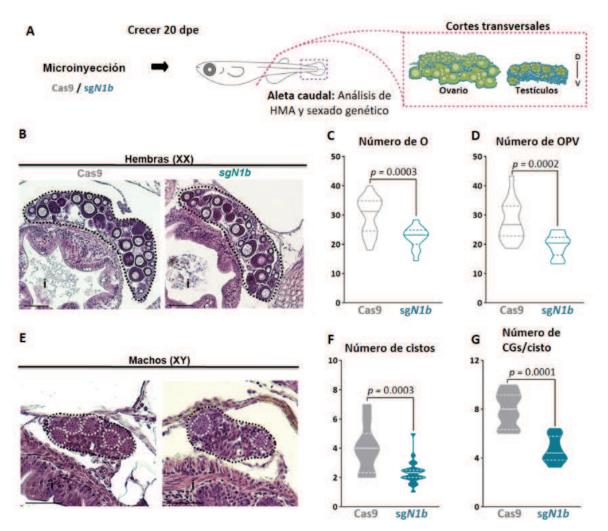


Figura 15. La mutación de *ndrg1b* afecta el desarrollo gonadal a los 20 dpe. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental empleado para analizar el efecto de la mutación de *ndrg1b* en la histología gonadal a los 20 días post eclosión (20 dpe) en hembras (XX) y machos (XY) controles y mutados (D: dorsal, V: ventral). (B) Cortes histológicos transversales de hembras controles inyectadas con cas9 (Cas9) e inyectadas con cas9+sg1\_*ndrg1b* (sgN1b). Cada ovario está encerrado por una línea punteada negra. Se contó manualmente (C) el número de ovogonias (O) y (D) el número de ovocitos previtelogénicos (OPV). Las hembras Cas9 están representadas con violines vacíos color gris, y las hembras sgN1b con violines vacíos de color cian, n=16 por grupo. (E) Cortes histológicos transversales de machos controles y sgN1b, los testículos están encerrados por una línea punteada negra, y cada cisto está encerrado por una línea punteada blanca. Se contó manualmente (F) el número de cistos y (G) el número de células germinales (CG) por cisto. Los machos Cas9 están representados con violines vacíos de color gris, y los machos sgN1b con violines rellenos de color cian, n=20 por grupo. La i señala el intestino y la barra de escala representa 50 μm. Los valores P están indicados cuando los grupos difíeren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Se aplicó la prueba de Student.

# DISCUSIÓN

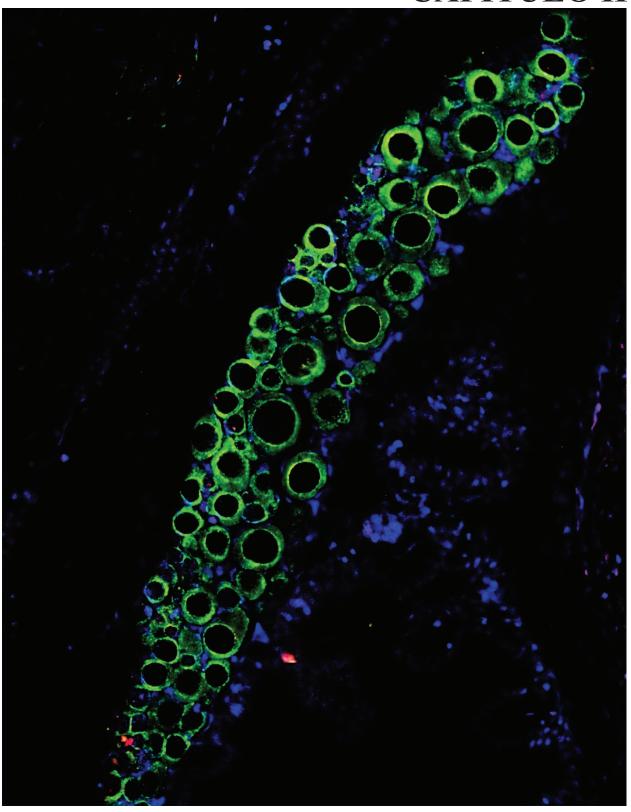
La producción de un número adecuado de gametos en ambos sexos es un proceso fundamental para el éxito reproductivo, y puede verse afectada tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta. A pesar de la importancia de este proceso, todavía se conoce muy poco de los reguladores moleculares de la proliferación de las células germinales, en particular la proliferación cística. Los resultados de este capítulo indican que *ndrg1b* se expresa en la gónada de modo diferencial entre hembras (XX) y machos (XY) y de manera opuesta a los momentos de proliferación tipo II cística en ambos sexos. Al generar mutaciones bialélicas en este gen, se dio lugar a la reducción de células germinales en ambos sexos de medaka, particularmente debido a la alteración de la proliferación tipo II en estadío 39 y 20 dpe, indicando que este gen es un regulador clave en el número de células germinales embrionarias.

En las investigaciones en modelos de cáncer, donde han realizado disrupción de NDRG1 mediante diversas técnicas, han encontrado una reducción en la proliferación de los diferentes tipos de células cancerígenas estudiadas, como hepatocarcinoma, cáncer endometrial, cáncer colorectal, entre otras (Cheng et al., 2011; Croessmann et al., 2015; Sun et al., 2013; Wu et al., 2019; Yan et al., 2008). Adicionalmente, en trabajos recientes han identificado que NDRG1 participa en el ciclo celular, siendo necesario para que se dé satisfactoriamente la mitosis, debido a que NDRG1 podría interactuar con PCNA, y además ser sustrato de proteínas quinasas para ser fosforilado en los centrómeros durante la fase G1/S y G2/M del ciclo celular (McCaig et al., 2011; Zhang et al., 2019). Probablemente por la importancia de este gen en procesos críticos, la secuencia de Ndrg1 está altamente conservado entre invertebrados y vertebrados (Fang et al., 2014; Kovacevic et al., 2013; Sun et al., 2013); y en particular en medaka, hay dos parálogos, ndrg1a y ndrg1b. De estos parálogos solo observamos que ndrg1b se expresa en las gónadas, y aunque con la técnica de hibridación *in situ* no hemos tenido la resolución para determinar en qué tipo de células gonadales se está transcribiendo, resultó muy interesante el patrón de expresión identificado por medio de análisis de expresión cuantitativa. La expresión de ndrg1b en estadío 35 donde únicamente hay presencia de proliferación tipo I y no hay dimorfismo sexual gonadal no se detectaron diferencias en los niveles de transcripto entre hembras y machos genotípicos, sin embargo, este gen presentó una transcripción opuesta a la proliferación tipo II cística en ambos sexos. Tal patrón de expresión diferencial entre sexos durante el desarrollo gonadal se ha observado en otros genes en medaka, tal como *foxl3* que es un gen interruptor involucrado en la decisión del destino sexual de la línea germinal (Kikuchi *et al.*, 2020), el cual se puede detectar en ambos sexos en estadío 35, y a partir de estadío 39 se expresa de manera dimórfica, siendo mayor en hembras con respecto a machos (Nishimura *et al.*, 2015). Adicionalmente, en un trabajo reciente de *foxl3* se identificó a *ndrg1* en células germinales mitóticas de ovarios, mostrando una expresión opuesta a *foxl3* (M Kikuchi *et al.*, 2019). Sin embargo, en los trabajos donde identificaron a *ndrg1* en gónadas de otras especies, como la rana africana (*Xenopus laevis*) y oveja (*Ovis aries*), no dilucidaron el linaje celular en el cual se expresaba (Kyuno *et al.*, 2003; Melotte *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2019), siendo necesario ampliar los estudios para identificar la localización de la expresión de *ndrg1* en las gónadas de diferentes organismos modelos en estadíos tempranos del desarrollo.

Como mencionamos anteriormente, en mamíferos se ha establecido que ndrg1 ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación de diferentes células cancerígenas (Chang et al., 2014; McCaig et al., 2011; Xi et al., 2017; Zhang et al., 2019), sin embargo, su rol en la proliferación de células germinales, desarrollo gonadal y por lo tanto en la reproducción, aún es desconocido (Burl et al., 2018; M Kikuchi et al., 2019; Kyuno et al., 2003; Qu et al., 2019; Stévant and Nef, 2019). Por lo tanto, los resultados expuestos en la presente tesis aportan información apreciable en el área de estudio del desarrollo gonadal, principalmente de la proliferación tipo II cística, cuya regulación molecular permanece sin resolver (DiNardo et al., 2011; Hinnant et al., 2017; Narbonne-Reveau et al., 2006). En el presente estudio hemos generado mutantes bialélicos en la G0 usando la técnica CRISPR/Cas9, mostrando que la disrupción de ndrg1b conduce a la reducción en el número total de células germinales, debido principalmente a la reducción de la proliferación tipo II cística en ambos sexos. Principalmente observamos la alteración de la proliferación cística identificada en hembras en estadío 39 se mantiene hasta los 20 dpe, donde las gónadas de ambos sexos se observaron afectadas, abriendo el interrogante de si tal alteración repercute en el estado gonadal en adultos, el cual es estudiado en el Capítulo II. A pesar de que no hemos explorado de manera minuciosa los detalles que componen la división celular, hemos evaluado el resultado final de la proliferación tipo II, que corresponde a los cistos y número de células, representando valiosa evidencia y la puerta de entrada para estudiar a ndrg1b como regulador de la proliferación cística en ambos sexos de medaka, y por qué no en otros vertebrados, teniendo en cuenta los interrogantes que aún no se han resuelto en el estudio de tal proliferación.

Cabe señalar que el fenotipo observado en los mutantes de ndrg1b podrían sorprender, debido a que es opuestos a lo esperado de un inhibidor de la proliferación celular, según el patrón de expresión observado en hembras y machos en estadío 39 y 20 dpe. Sin embargo, se ha observado fenotipos en medaka de manera semejante al de ndrg1b, tal es el caso de foxl3, mencionado anteriormente, el cual se detecta en ambos sexos en estadío 35, y de manera dimórfica en estadío 39, siendo inversa a la expresión de *ndrg1b* (Nishimura *et al.*, 2015), corroborado también en ovarios de hembras knock out de foxl3 (M Kikuchi et al., 2019). El fenotipo de los mutantes de foxl3 también sorprendió inicialmente, debido a que las hembras mutadas desarrollaron ovarios típicos y proliferación tipo II normal en los estadíos donde su expresión es superior en gónadas de hembras con respecto a las de machos (Nishimura et al., 2015; Tanaka, 2019). Estos casos indicarían dos posibles hipótesis: la primera es que en tales momentos de desarrollo gonadal de medaka estarían actuando diferentes vías moleculares en paralelo, dependientes de foxl3, e independientes de foxl3, donde estaría actuando ndrg1b según lo propuesto por M. Kikuchi et al., (2020). La segunda hipótesis es que *ndrg1b* requiere un aumento inicial de su expresión antes de la proliferación, y una disminución posterior de la misma para desencadenar la proliferación tipo II. Este trabajo de tesis deja abierta estas hipótesis para ser corroborada en futuros trabajos, necesarios para dilucidar de forma más minuciosa la red de regulación molecular en este proceso necesario para la reproducción.

# **CAPITULO II**



# INTRODUCCIÓN

La temporalidad en la proliferación de las células germinales es un rasgo variable entre las diferentes especies, ya que se ha observado que este proceso puede estar presente únicamente durante la embriogénesis en algunas, mientras que en otras la proliferación se da a lo largo de toda la vida, jugando un rol importante en la adultez (Koubova et al., 2006; Lei and Allan C Spradling, 2013; Pepling, 2006; Tanaka, 2014). Además, la proliferación es temporalmente dimórfica si se toma en cuenta el sexo biológico. Por ejemplo, en la mayoría de las hembras de mamíferos la proliferación solo se ha observado durante la embriogénesis, por lo tanto, no ocurre en el ovario adulto, limitando el número de ovocitos durante la etapa reproductiva, o en otras palabras, el reservorio ovárico. Por ejemplo en las hembras de ratón, en las cuales la proliferación se da en los días 12,5 y 13,5 post coito, todas las células entran en meiosis en el periodo prenatal (Di Carlo and De Felici, 2000; Pepling, 2006). Algo similar ocurre en mujeres, donde las ovogonias, después de dividirse sincrónicamente de forma cística, se detienen en metafase de la primera división meiótica y permanecen arrestadas, es decir, sin cambios hasta la pubertad, que es cuando se reinicia la maduración del ovocito primario por medio de un proceso de selección, reclutamiento y maduración folicular (Biason-Lauber, 2010; Findlay et al., 2015). Por el contrario en vertebrados con fecundidad alta, como por ejemplo los peces, el número de ovocitos es ilimitado durante la vida reproductiva, observándose proliferación en los ovarios adultos, lo que permite el suministro de ovocitos continuamente (Nakamura et al., 2011). Tal es el caso de medaka (Figura 16), donde hace una década se encontró que el ovario adulto presenta ovogonias, y que la proliferación I y II se dan a lo largo de todo el desarrollo gonadal (Kurokawa et al., 2007; Nakamura et al., 2011). Todavía cabe señalar que, en la mayoría de las especies, los machos presentan proliferación durante toda la vida reproductiva para asegurar la producción continua de un alto número de espermatozoides (Figura 16), por lo tanto, los testículos presentan espermatogonias para dar inicio a la espermatogénesis durante la adultez (Schulz et al., 2010a). Si bien medaka representa un buen modelo para estudiar la proliferación, tanto en hembras como en machos a lo largo de todo el desarrollo gonadal, hasta el momento no se tienen dilucidados los mecanismos moleculares subyacentes a la continua proliferación en ambos sexos, ni en esta ni en otras especies.

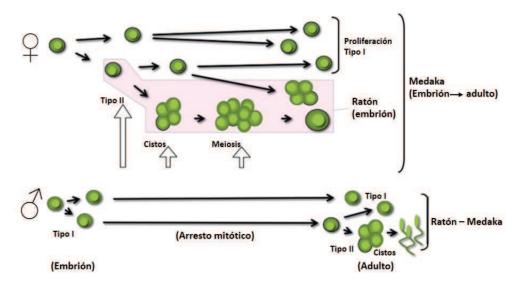


Figura 16. Proliferación durante la morfogénesis en ratones y medaka. Diagrama de la prevalencia de proliferación tipo I y cística durante el desarrollo embrionario y la morfogénesis gonadal en la adultez, en hembras (panel superior) y machos (panel inferior) de ratones y medaka. En hembras de ratones, todas las células germinales presentan proliferación tipo I y tipo II en estadíos embrionarios y no en el ovario adulto, mientras que en medaka se observan ambas proliferaciones tanto en estadíos embrionarios como en el ovario adulto. En machos de ratones y medaka, la mitosis de las células germinales suele quedar arrestada, reanudándose en estadíos juveniles y en la adultez para dar lugar a la proliferación tipo I y tipo II. Tomada y modificada de Minoru Tanaka, (2014).

La proliferación inicial de las células germinales es un proceso clave para la subsiguiente diferenciación y especificación de las mismas, así como de las células somáticas, y dependerá del componente genético de cada sexo, así como del entorno del primordio gonadal, para formar los ovarios o los testículos (Tanaka, 2019). Las gonias se diferencian en ovocitos y espermatocitos, y las células somáticas en células de Granulosa y Teca, y en células de Sertoli y Leyding, en ovarios y testículos respectivamente. Las células que le dan soporte a las células germinales son las células de la Granulosa y Sertoli, mientras que las encargadas de producir las hormonas esteroideas sexuales son las células de Teca y de Leyding (Kurokawa *et al.*, 2007). Sin bien la morfogénesis de las gónadas despliega una gran diversidad entre especies y entre ovarios y testículos, la mayoría de los vertebrados poseen un par de gónadas, que comprende un lóbulo derecho y un lóbulo izquierdo. Aunque, en varios peces teleósteos como medaka, tales lóbulos se encuentran

fusionados y localizados en la región dorsal de la cavidad abdominal (Kinoshita *et al.*, 2012a). En los siguientes apartados se hará una descripción de la estructura de ovarios y testículos en medaka.

### Morfología de los ovarios

A pesar de que el ovario puede variar ampliamente a nivel morfológico en vertebrados, en la mayoría de los grupos su ubicación y compartimientos no cambia, encontrándose localizado en la cavidad abdominal debajo de la vejiga y superior al intestino. El ovario está englobado por un epitelio ovárico, y presenta dos compartimientos, el estromal y la cavidad ovárica, separados en entre sí por el epitelio germinal. En el compartimiento estromal se encuentran las células germinales indiferenciadas u ovogonias, las cuales dan origen a los diferentes estadíos de ovocitos. Los ovocitos maduros son ovulados en la cavidad ovárica, que se convierte en un oviducto que se despliega a lo largo del intestino y termina en la cloaca o papila urogenital (Brennan and Capel, 2004; DeFalco and Capel, 2009; Ditewig and Yao, 2005; Nakamoto *et al.*, 2009).

En peces teleósteos, se han descrito tres tipos de desarrollo ovárico, basados en la distribución de los ovocitos en el ovario, conocidos como sincrónico, sincrónico por grupo y asincrónico (Wallace and Selman, 1981). En los ovarios con desarrollo sincrónico todos los ovocitos se desarrollan, maduran y son ovulados simultáneamente. Por otro lado, en los ovarios con desarrollo sincrónico por grupos hay al menos dos poblaciones de ovocitos presentes al mismo tiempo; el grupo de ovocitos de mayor tamaño corresponde a los huevos que potencialmente serán liberados durante el ciclo reproductivo. Por último, en los ovarios con desarrollo asincrónico hay presencia simultánea de ovocitos en todos los estados de desarrollo, y su distribución es continua (Kinoshita et al., 2012a; Lubzens et al., 2010).

Medaka presenta un ovario asincrónico, por lo tanto, exhibe todas las etapas de desarrollo de los ovocitos al mismo tiempo (**Figura 17A**). El desarrollo de los ovocitos en medaka, al igual que en el resto de teleósteos, está clasificado en cuatro fases diferentes: previtelogénica, vitelogénica, postvitelogénica y ovulatoria (**Figura 17B**), según la morfología y tamaño de los ovocitos (Iwamatsu and Nakashima, 1996). Todos los ovocitos son diferenciados a partir de las ovogonias, las cuales se mantienen temporalmente por proliferación tipo I (Nakamura *et al.*, 2010), y se

multiplican por proliferación II para luego dar inicio a la meiosis y pasar por las siguientes fases del desarrollo (Nishimura and Tanaka, 2014).

La fase previtelogénica presenta cuatro etapas (Figura 17B), las cuales dependen del diámetro del ovocito, el cual puede ir desde 20 hasta 150 µm. Por lo general en estas fases el núcleo se tiñe bien con hematoxilina, y en la fase más avanzada se pueden observar vacuolas en el citoplasma (Iwamatsu and Nakashima, 1996; Kinoshita et al., 2012a). La fase vitelogénica se caracteriza por la aparición de vesículas o alveolos de vitelo en el citoplasma. Con la tinción convencional de H&E, estas estructuras se observan como esferas huecas. Estas vesículas aumentan de tamaño y número hasta formar varias filas en la periferia del citoplasma, dando origen a los alveolos corticales, los cuales serán liberados posteriormente durante la fecundación. A medida que las vesículas aumentan de tamaño, el diámetro del ovocito también aumenta, lo cual define las cuatro etapas de la fase vitelogénica, que van desde 151 hasta 800 µm (Figura 17B). Los ovocitos vitelogénicos están rodeados por dos capas de células, una capa exterior estereidogénica o teca y otra interior de soporte o granulosa, separadas entre sí por una membrana basal. En la fase postvitelogénica o de maduración (Figura 17B), los ovocitos tienen un diámetro de 801-1200 μm, el vitelo ocupa la mayor parte del ovocito, las vesículas de vitelo se encuentran dispersas en la parte externa del citoplasma y la envoltura del huevo está bien desarrollada y todavía está unida a la capa folicular (Kinoshita *et al.*, 2012b).

En la fase de ovulación, el ovocito tiene 1200 μm de diámetro, están separados de la capa folicular y son ovulados dentro de la cavidad ovárica. La superficie de la envoltura del huevo presenta varias vellosidades cortas y algunos filamentos adheridos, los cuales quedan dentro de la papila urogenital, favoreciendo la adherencia de los huevos a esta papila por un largo periodo de tiempo una vez los huevos han sido desovados y fecundados. Hay que señalar que la ovulación y el desove son dos procesos totalmente separados, controlados por distintos mecanismos. La ovogénesis se da durante todo el año y el número de huevos desovados varía entre 20-40 por día, con algunas variaciones individuales dependiendo de las condiciones ambientales y el tamaño (Iwamatsu and Nakashima, 1996; Kinoshita *et al.*, 2012a).

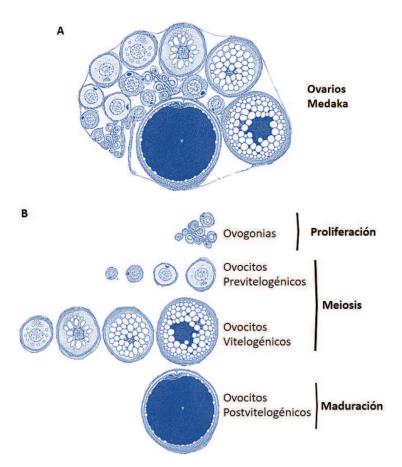


Figura 17. Representación esquemática de la estructura ovárica en medaka. (A) ovario asincrónico de medaka con presencia de todas las fases de desarrollo de los ovocitos. (B) Fases de desarrollo de los ovocitos, partiendo de las ovogonias, las cuales se autorrenuevan por proliferación tipo I y se multiplican por proliferación II, para dar lugar a las siguientes fases del desarrollo, previtelogénica, vitelogénica, postvitelogénica y ovulatoria. Los ovocitos previtelogénicos presentan cuatro etapas dependiendo del diámetro del ovocito. Los ovocitos vitelogénicos presentan vesículas de vitelo en el citoplasma y presentan cuatro etapas dependiendo del diámetro del ovocito. Los ovocitos postvitelogénicos o de maduración, el vitelo ocupa la mayor parte del ovocito. Representación tomada y modificada de (Kinoshita *et al.*, 2012a).

#### Morfología de los testículos

En todos los vertebrados, desde peces hasta mamíferos, los testículos están compuestos de dos compartimientos principales, el intertubular o intersticial y el tubular o germinal, ambos separados por una membrana basal. El compartimiento intertubular contiene las células estereidogénicas de Leyding, los vasos linfáticos y sanguíneos, macrófagos y mastocitos, células del tejido conectivo y nervioso. Por otro lado, el compartimiento tubular contiene las células somáticas de Sertoli, las

cuales brindan soporte a las células germinales en sus diferentes fases de división y diferenciación celular (Nishimura *et al.*, 2016).

En peces teleósteos, se han descrito dos tipos de disposición espacial para los testículos, basados en la distribución de las espermatogonias en el compartimiento germinal (Grier, 1981). El primer tipo de distribución restricta, es encontrado principalmente en Atheriniformes, Cyprinodontiformes y Beloniformes, y se caracteriza porque las regiones distales del compartimiento germinal están ocupadas por células de Sertoli rodeando a las espermatogonias indiferenciadas. El segundo tipo de distribución irrestricta, presenta un patrón más primitivo y es encontrado en Cypriniformes, Characiformes, y Salmoniformes, se caracteriza porque las espermatogonias están distribuidas a lo largo de todo el compartimiento testicular (Parenti & Grier, 2004; Schulz et al., 2010).

Medaka presenta testículos restrictos (Figura 18A), por lo tanto, las espermatogonias más indiferenciadas se encuentran en la región distal de cada túbulo, denominadas espermatogonias tipo A, las cuales se dividen por proliferación tipo I para autorrenovarse y mantener su población, y por proliferación tipo II cística para diferenciarse a espermatogonias tipo B (Figura 18B). Ambos tipos de espermatogonias son de gran tamaño, comparándolas con el resto de células del testículo. Sin embargo, las espermatogonias A presentan núcleo grande y nucléolo conspicuo y las espermatogonias tipo B son de menor tamaño y con nucléolo menos conspicuo (Kinoshita et al., 2012a; Lacerda et al., 2014; Nóbrega et al., 2010). Las espermatogonias tipo B entran luego en meiosis dando lugar a espermatocitos primarios, los cuales se encontrarán en profase meiótica. Una vez avanza la meiosis se producen los espermatocitos secundarios haploides de vida corta, que rápidamente avanzan dando lugar a las espermatidas (Figura 18B). Estas espermatidas haploides se transformarán en espermatozoides durante las espermiogénesis, que involucra el empaquetamiento de la cromatina y la formación del flagelo. Es por esto que la gametogénesis procede desde la zona distal en cada cisto de espermatogonias hasta el ducto eferente interno, donde el esperma es guardado hasta su eyaculación (Kinoshita et al., 2012a; Schulz et al., 2010b). Finalmente, el esperma de medaka tiene una morfología primitiva, redondeada, el núcleo condensado de 2-3 µm de diámetro y un flagelo de aproximadamente 25 µm de largo (Grier, 1981;

Iwai *et al.*, 2006). La espermatogénesis ocurre diariamente durante todo el año, con algunas variaciones individuales dependiendo de las condiciones ambientales (Kinoshita *et al.*, 2012a).

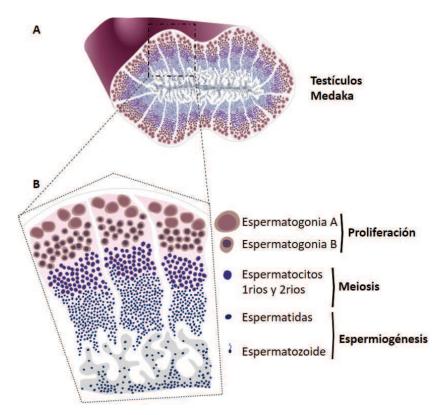


Figura 18. Representación esquemática de la estructura de testículos en medaka. (A) Testículos restrictos de medaka con presencia de las espermatogonias en la región distal. (B) Composición de cada túbulo testicular, en la parte externa encontramos las espermatogonias tipo A, las cuales se dividen por proliferación tipo I para autorrenovarse, y por proliferación tipo II cística para diferenciarse a espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo B entran a meiosis dando lugar a los espermatocitos primarios (1rios), y una vez avanzada la meiosis se da lugar a los espermatocitos secundarios (2rios), que rápidamente avanzan dando lugar a las espermatidas. Las espermatidas se transforman en espermatozoides, durante las espermiogénesis. Esquema modificado de Iwai et al., (2006).

## Características sexuales secundarias

Como se ha mencionado anteriormente, los ovarios y testículos son los órganos donde se da la producción de gametos, lo cual está bajo un estricto control hormonal, con la producción de hormonas esteroideas gonadales, además de las hormonas producidas en las glándulas pituitaria,

la uropófisis y la pineal, las cuales se ha visto que tienen un efecto no solo en la gametogénesis, sino también en características corporales secundarias (Kinoshita *et al.*, 2012a), tales características secundarias presentan gran diversidad entre las especies (Arnegard *et al.*, 2010), existiendo modificaciones corporales exclusivas para la reproducción e incluso para el comportamiento. Las aletas de los peces son un buen ejemplo porque en varias especies se han modificado para atraer o para facilitar la cópula. En particular diversas especies del genero *Oryzias* presentan dimorfismo sexual, como la aleta dorsal y anal, siendo generalmente más largas en machos comparando con hembras, para lo cual se ha indicado que este rasgo está relacionado con el éxito reproductivo en machos (Fujimoto *et al.*, 2014).

Las características sexuales secundarias de medaka pueden ser fácilmente identificadas por observación del tamaño y la forma de la aleta anal y dorsal, y la papila urogenital (Kinoshita *et al.*, 2012a). La aleta dorsal del macho es más larga que la de la hembra y el borde distal presenta una forma "aserrada" y el margen posterior tiene una hendidura, formada por la separación de los rayos posteriores de la aleta al cuerpo del macho (**Figura 19**), en cuanto a la aleta anal, es más pequeña que en machos y presenta una forma triangular en ángulo recto y extremo posterior estrecho, al contrario de la forma de paralelogramo en machos y con el margen posterior bifurcado. Otra característica importante es la presencia de pequeñas osificaciones entre la raya 6 y 8 de la aleta anal de machos. Adicionalmente la papila urogenital es una protuberancia ubicada en la superficie ventral posterior al ano, la cual está más desarrollada en las hembras, y pobremente desarrollada en machos (**Figura 19**) (Kinoshita *et al.*, 2012a).

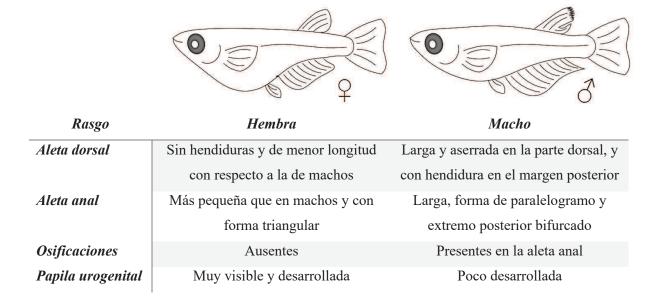


Figura 19. Representación esquemática y descripción de las características sexuales secundarias en medaka. En la parte superior se representa esquemáticamente una hembra  $\mathcal{Q}$  y un macho  $\mathcal{O}$  adultos. En la parte inferior se describe de cada característica sexual secundaria presente en cada sexo.

# Comportamiento sexual en medaka

Como se ha mencionado anteriormente, existe gran diversidad de las características sexuales secundarias entre las especies, incluidas las modificaciones y ornamentos exclusivos para la reproducción y el comportamiento socio sexual, las cuales han sido seleccionadas sexualmente durante la evolución de las diferentes especies, conduciendo a una amplia diversidad y complejidad de los rasgos de comportamiento socio sexual en invertebrados y vertebrados (Arnegard et al., 2010; Fujimoto et al., 2014; Jones and Ratterman, 2009; Mank and Avise, 2009). El comportamiento socio-sexual es exhibido comúnmente tras la morfogénesis gonadal y la maduración sexual de hembras y machos (Isoe et al., 2016), y a pesar de la gran diversidad entre las especies, hay rasgos característicos que involucran pasos casi ritualizados que pueden ser identificados y cuantificados fácilmente, debido a que han sido sujetos a procesos de selección sexual pre-copulatoria y post-copulatoria (Jones and Ratterman, 2009). Dentro de los rasgos pre-copulatorios, se pueden identificar las relaciones intrasexuales o de competencia, presentes generalmente entre machos para poder establecer una pareja, un rasgo fundamental es el despliegue del cortejo sexual, el cual favorece la elección y aceptación de la pareja para continuar

a la fase copulatoria, el cual según la especie puede incluir la exhibición de caracteres secundarios, la producción de sonidos, movimientos específicos, seguimientos a la pareja, etc. (Freeberg, 2000; Hiraki-Kajiyama *et al.*, 2019; Okuyama *et al.*, 2017). Dentro de los rasgos post-copulatorios, por lo general adquiere importancia la calidad de los gametos, la eficacia de la copula en las relaciones intersexuales para asegurar el éxito reproductivo biológico, es decir la fecundación (Eberhard, 2009; Jones and Ratterman, 2009; Kelly and Jennions, 2011; Sekii *et al.*, 2013; Trejo-Sánchez *et al.*, 2020).

El pez medaka es un organismo que se ha utilizado ampliamente para el estudio del comportamiento socio-sexual (Isoe *et al.*, 2016; Okuyama *et al.*, 2017). Dentro de sus rasgos precopulatorios se ha identificado competencia intrasexual entre machos, los cuales en relaciones tríadicas (2 machos y 1 hembras) exhiben comportamientos agresivos. Por lo general hay presencia de un macho dominante que permanece cerca de la hembra, bloqueando la posibilidad de familiarización entre el macho rival y la hembra, y así aumentar el éxito de copula del macho dominante (Okuyama *et al.*, 2017; Yokoi *et al.*, 2015). Adicionalmente, las hembras son capaces de discriminar visualmente a los machos conspecíficos, prefiriendo socializar con machos familiares y rechazar a los machos que no le son familiares, de allí la importancia de la familiarización visual para la reproducción de esta especie, ya que no se ha identificado que sea mediado por feromonas (Isoe *et al.*, 2016; Okuyama *et al.*, 2014; Okuyama *et al.*, 2017).

Una vez que la hembra de medaka empieza a ser receptiva a un determinado macho familiar, el comportamiento sexual consiste en un ritual compuesto por los siguientes pasos: primero, el macho se aproxima a la hembra y empieza a perseguirla muy de cerca (Figura 20A), paso llamado "seguimiento". Si la hembra no escapa, el macho comienza a descender ubicándose en la parte diagonal inferior a la hembra, a aproximadamente 2 centímetros de distancia, y empieza a nadar lentamente por unos segundos haciendo que la hembra se desplace de la misma manera que el macho, denominándose a este paso como "orientación del cortejo" (Figura 20B). A continuación, el macho empieza a manifestar su cortejo sexual, nadando rápidamente formando un círculo justo en frente de la hembra y regresando apresuradamente a su posición de orientación del cortejo, este patrón es denominado "baile" (Figura 20C). Dicho rasgo de "baile" puede ser repetido varias veces hasta que la hembra empieza a estar receptiva al cortejo exhibido por el macho (Ono and Uematsu, 1957). Una vez que la hembra es receptiva al macho, el macho se mantiene inmóvil muy

cerca a la hembra, paso referido como "flotación" (**Figura 20D**). En seguida se da lugar a la "copulación", el cual es el patrón primario del comportamiento sexual, y empieza cuando el macho sostiene o cubre a la hembra con su aleta dorsal y anal, llevando su poro urogenital cerca al poro urogenital de la hembra en posición horizontal, paso denominado "cubrición" (**Figura 20E**) (Kinoshita *et al.*, 2012b; Ono and Uematsu, 1957).

Llegados al punto de copulación suceden dos pasos importantes para el proceso de desove: el primero es la manifestación de vibraciones o temblores suaves y rápidos de ambos cuerpos por aproximadamente 15 – 30 segundos, paso denominado como "temblor" (Figura 20F). El segundo es la manifestación de golpes o convulsiones fuertes efectuados por parte del macho en la región abdominal de la hembra, paso conocido como "convulsiones" (Figura 20G). Estos últimos dos pasos son claves para que la hembra libere los ovocitos y el macho el esperma, dando lugar a la fecundación (Figura 20H). Finalmente, la pareja se separa lentamente (Figura 20I), y ambos dejan de manifestar comportamiento sexual, sin embargo, en algunos casos el macho vuelve a intentar realizar cubriciones (Figura 20J), en el caso de que el macho no logre cubrir a la hembra con su aleta anal, se le denomina intersección. La hembra continúa nadando durante varias horas con los huevos unidos entre sí a su abdomen, gracias a los filamentos que presentan los huevos (Figura 20K), hasta ser liberados en el fondo de la pecera o en vegetación asociada (Kinoshita et al., 2012a; Ono and Uematsu, 1957). Cabe recordar que la hembra y el macho de medaka pueden reproducirse diariamente bajo condiciones adecuadas, tales como fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad, temperatura del agua de 26-28°C, alimentación ad libitum, densidad optima de peces por pecera, y que haya compatibilidad y familiarización en las parejas.

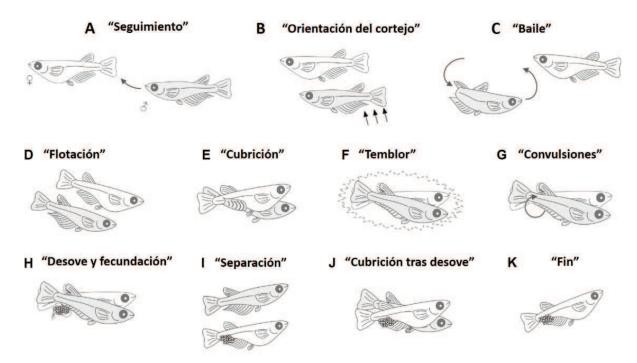


Figura 20. Representación esquemática del comportamiento reproductivo de medaka. (A) El macho d' (gris) se aproxima a la hembra \$\partial\$ (blanco), y la empieza a seguir, (B) el macho se ubica en la parte diagonal inferior de la hembra, manifestando la orientación del cortejo. (C) El macho empieza a exhibir su cortejo sexual, nadando rápidamente formando un círculo justo en frente de la hembra y regresando rápidamente a su posición de orientación del cortejo. (D) Una vez la hembra es receptiva al macho, el macho "flota" muy cerca a la hembra (E) El macho sostiene o cubre a la hembra con su aleta dorsal y anal, llevando su poro urogenital cerca al poro urogenital de la hembra en posición horizontal, paso denominado "cubrición". (F) Hembra y macho manifiestan vibraciones o temblores suaves y rápidos. (G) El macho ejerce golpes o convulsiones fuertes en la región abdominal de la hembra. (H) Se presenta la liberación de los huevos y esperma, dando lugar a la fecundación. (I) La pareja se separa lentamente. (J) En algunos casos el macho vuelve a realizar cubriciones. (K) Finalmente la hembra continúa nadando durante varias horas con los huevos unidos entre sí a su panza gracias a sus filamentos, hasta ser liberados en el fondo de la pecera o en plantas.

# PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVO PRINCIPAL

Debido a la importancia de la proliferación tipo II cística durante el desarrollo gonadal y su prevalencia en las gónadas adultas para asegurar la generación constante de células germinales, nos preguntamos si la alteración de la proliferación tipo II observada en estadíos tempranos del desarrollo debido a la mutación de *ndrg1b* afectará el estado de los ovarios y testículos de los individuos adultos, y por ende en la reproducción, comportamiento y presencia de caracteres sexuales secundarios, de igual modo que en la proporción de sexos, debido a la importancia de la proliferación de células germinales en el destino gonadal.

En base al marco conceptual y las preguntas generadas, nuestro principal objetivo es explorar el estado de las gónadas en los individuos adultos mutados, y con ello el éxito reproductivo y comportamental sexual, las características sexuales secundarias y la proporción de sexos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

#### Muestreo de medaka

Todos los individuos empleados en este capítulo fueron adultos de 80 días post eclosión (dpe). En todos los experimentos en los que se requirió eutanasia, se procedió a realizar anestesia por inmersión en tricaina 30-50 mg/L (Sigma-Aldrich), y posteriormente procesados de acuerdo a la técnica requerida. En la mayoría de casos la cola y/o cabeza se separaban para realizar las extracciones de ADNg.

### Análisis histológico de ovarios y testículos

Los ovarios y testículos de los individuos controles (Cas9) y mutados bialélicamente para ndrg1b (sgN1b) fueron fijados en solución de Bouin (Formol, Ácido Pícrico y Ácido Acético) durante 16 horas a 4°C, mientras que las colas y cabezas fueron usadas para analizar las mutaciones de ndrg1b por medio de HMA tal como se describió anteriormente en la metodologia del capitulo I. Las gonadas de individuos mutados positivos, que presentaron indel por HMA, fueron embebidas en parafina y cortadas transversalmente cada 5 µm en micrótomo de deslizamiento (Leica). Posteriormente se procedió a desparafinar los cortes histológicos, rehidratarlos con concentraciones decrecientes de etanol, teñirlos con H&E (Biopack) y conservarlos en bálsamo de Canada sintético (Biopack), para ser analizadas y fotografiadas en el microscopio. Todas las fotografías fueron tomadas usando la cámara Nikon Digital Sight DSQi1Mc acoplada en el microscopio Nikon Eclipse E600. Las imágenes fueron analizadas usando el programa FIJI (https://imagej.nih.gov/ij/) y los diferentes tipos celulares fueron contados manualmente usando la herramienta de conteo celular de FIJI. En los ovarios se contó el número de ovogonias y ovocitos en estadíos de previtelogénesis y vitelogénesis, según las descripciones mencionadas anteriormente en la introducción (Kinoshita et al., 2012a). En testículos se contó el número de cistos espermatogoniales y el número de espermatogonias, basándose en el trabajo de (Iwasaki et al., 2009). Los conteos tanto en ovarios como en testículos se realizaron en mínimo 3 cortes transversales seleccionados al azar evitando los extremos gonadales, además se tuvo en cuenta de que tuvieran una separación minina de 20 - 100 µm entre sí, para evitar el conteo de una misma célula en diferentes cortes.

# Cuantificación de esperma

El esperma fue colectado de machos controles y mutados previamente analizados por HMA usando ADNg de aleta, tras anestesiarlos sumergiéndolos en tricaina 30-50 mg/L (Sigma-Aldrich). Cada macho fue ubicado en un soporte de espuma con el poro urogenital hacia arriba observándolo con la ayuda de un estereoscopio, el poro urogenital fue secado con papel absorbente y el esperma fue colectado con una micropipeta mientras se ejercía una leve presión abdominal en cada lateral del cuerpo, en dirección al poro urogenital usando pinzas de disección. El esperma fue colectado con especial cuidado evitando contaminación con orina. Cada muestra de esperma fue diluida 5000 veces en solución de Ringer Ph 7,4 (NaCl 120 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1 mM, Na₂HPO 0,08 mM, KH₂PO₄ 0,01mM) y mantenida en hielo hasta su posterior análisis. El conteo de esperma fue determinado usando una cámara de Neubauer (Bright-Line, Hausser Scientific), usando 10 μl de cada suspensión espermática, previamente mezclada varias veces. Por cada individuo se realizaron 3 réplicas de conteo y por cada conteo se analizaron 5 cuadrantes (1/25 mm²), magnificado 200 veces utilizando el microscopio Nikon Eclipse E600.

#### Análisis de proporción de sexos

Se cuantificó la proporción de sexos de los individuos controles y mutados, empleados en el análisis histológico de 20 días post eclosión del capítulo anterior y los adultos de este capítulo. Para lo cual se cuantificó el sexo genético y fenotípico de cada individuo, en base al sexado genético, la histología gonadal y la presencia de caracteres secundarios.

## Análisis de parámetros reproductivos

Para evaluar el éxito reproductivo de los mutantes de *ndrg1b* se seleccionaron hembras y machos adultos previamente analizados por HMA usando ADNg extraído de la aleta caudal. Para seleccionar los individuos controles y mutados, todos debian tener tamaño similar y estar activos reproductivamente, por ejemplo, seleccionando únicamente hembras que presentaran desoves. Posteriormente se organizaron de a 1 pareja de hembra y macho por tanque en 3 categorías diferentes: 1 hembra control - 1 macho mutado, 1 hembra mutada - 1 macho control y 1 hembra control - 1 macho control. Se permitió la aclimatación durante 5 días para asegurar la

familiarización visual y homogeneizar condiciones reproductivas, como frecuencia de alimentación y limpieza de peceras. Para analizar los diferentes parámetros reproductivos se colectaron el total de huevos desovados por día durante 10 días consecutivos en cada pareja. Los huevos fueron ubicados en placas de Petri separadas para determinar el número de total de huevos desovados, incluyendo aquellos fecundados y no fecundados, la tasa de fecundación (número de huevos fecundados/ total de huevos desovados), y la tasa de eclosión (número de larvas eclosionadas/ total de huevos fecundados).

# Análisis del comportamiento sexual

Para evaluar el comportamiento sexual de los machos mutantes de *ndrg1b*, previamente analizados por HMA usando ADNg de aleta caudal, se seleccionaron hembras y machos adultos, de tamaño similar, y activos reproductivamente. En el caso de hembras se seleccionaron aquellas que ya estuvieran desovando. Se organizaron en parejas individuales (hembra - macho) por pecera en 2 categorías diferentes: 1 hembra control - 1 macho mutado y 1 hembra control - 1 macho control. Se permitió la aclimatación durante 5 días para asegurar la familiarización visual y homogeneizar condiciones reproductivas, como frecuencia de alimentación y limpieza de peceras. Para el análisis de comportamiento solo se utilizaron las parejas que estuvieran desovando activamente, para lo cual se realizaron grabaciones de video durante 5 días consecutivos de cada pareja en base a lo descrito en Okuyama et al. (2014). Machos y hembras fueron separados todas las tardes (18:00– 19:00) previas al ensayo, usando separadores transparentes con pequeños huecos que permiten el intercambio de agua y el contacto visual. A la mañana siguiente cada pareja fue grabada durante 20 minutos justo en el momento que macho y hembra se pusieron juntos por la remoción del separador. Las grabaciones se realizaron en peceras exclusivas para esto, las cuales se mantuvieron en las mismas condiciones, con la misma temperatura y sin flujo de agua. El orden de las grabaciones de cada pareja fue aleatorio y alternado cada día, para evitar sesgos de horario. Los videos fueron analizados en orden aleatorio por dos personas diferentes que desconocían la categoría de cada pareja (doble ciego). Además, cada parámetro fue analizado por duplicado para evitar errores de cuantificación. Los parámetros analizados fueron identificados usando como base las descripciones de Ono & Uematsu, (1957) y Walter & Hamilton, (1970), tales como la latencia desde que las parejas empiezan a nadar hasta el primer cortejo sexual, la latencia desde el primero cortejo sexual hasta que la cubrición que resultó en desove, el número de intersecciones antes y después del desove, la duración de la intersección que resultó en desove, y durante la intersección se midió la duración del temblor y el número de convulsiones.

## Extracción de ARNm y síntesis de ADNc de testículos y cerebro

Se procedió a realizar eutanasia de machos controles de 80 dpe, se extrajo testículos y cerebro completo, los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido e inmediatamente se procedió a realizar la extracción de ARNm de manera individual, utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante del producto. El ARNm fue cuantificado en el espectrofotómetro Synergy H<sub>1</sub> (Hybrid Reader) y se descartaron las muestras con relaciones de absorbancias A260/280 que no estuvieran en el rango 1,9 - 2,1. Posterior al tratamiento con DNaseI-Amplification Grade (Invitrogen), se realizó la síntesis de ADNc a partir de 500 ng de ARN para cada muestra, utilizando la trasncriptasa reversa SuperScriptII (Invitrogen) y oligonucleotidos dT (Life Technology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

# PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)

Para llevar a cabo los ensayos de RT-qPCR se emplearon los oligonucleótidos validados previamente en el capítulo I (Tabla 2). Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos en el termociclador de tiempo real Agilent MX3005P Multiplex qPCR (Stratagene). Cada reacción fue llevada a cabo con 2x Fast Start SYBR Green Universal Master Mix con ROX (Roche), empleando condiciones estándar de amplificación con un ciclo inicial de 1 minuto a 95°C, seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 30 segundos. Para cada amplificación se realizó dos replicas técnicas, y al final de cada amplificación se analizó las curvas de *melting* para verificar la amplificación específica de cada producto, descartando aquellas muestras que presentaran algún desvío de la normalidad. En cada experimento se incluyeron controles negativos, sin ADNc, para confirmar la ausencia de productos amplificables en el medio de la reacción. Finalmente, el método de cuantificación empleado fue el delta-delta Ct (ΔΔCt), utilizando como referencia el gen de la proteína ribosomal L7 (rpl7) (Zhang and Hu, 2007), y las diferencias estadísticas de los valores de Ct fueron analizados con el software fgStatistics (Di Rienzo et al. 2010).

## Hibridación in situ en testículos y cerebro

Para construir las sondas de los genes ndrg1b y oct4 (marcador de células troncales, también conocido como pou5f1; Wang et al., 2011), se emplearon oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para amplificarlos por medio de PCR, clonarlos en el vector pGEM®-T (Promega), y finalmente llevar a cabo la transcripción in vitro. Para sintetizar las sondas de ARN se procedió a la linealización de 10 µg de cada plásmido con enzimas de restricción específicas. La linealización se realizó hacia el extremo 5' de la secuencia del gen con la finalidad de sintetizar una sonda de ARN antisentido. Tras purificar el ADN linealizado se procedió a realizar la transcripción in vitro utilizando la ARN polimerasa T7, el marcaje de la sonda del gen *ndrg1b* se realizó con una mezcla de ribonucleótidos con uracilos marcados con Isotiocianato de fluoresceína FITC (del inglés Fluorescein isothiocyanate, FITC RNA labeling mix, Roche Mannheim Germany), y el marcaje de la sonda del gen oct4 se realizó con una mezcla de ribonucleótidos con uracilos marcados con digoxigenina (DIG labeling mix, Roche), marcaje previamente empleado en el capítulo I. Para llevar a cabo la hibridación in situ (HIS) se colectaron testículos y cerebros de machos controles de 80 dpe, fijándolos en paraformaldehído PFA 4% durante 16 horas a 4°C. En el caso de las hibridaciones con la sonda oct4 de ARN marcada con DIG, se utilizaron los testículos enteros y se siguió el protocolo de HIS empleado en el capítulo I, hibridando a 66°C durante 16 horas, lavando e incubando con anticuerpo anti-DIG-Alkaline Phosphatatase (Roche), para su posterior detección en presencia de los sustratos NBT/BCIP (tetrazolio nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-idolil fosfato). Posteriormente se procedio a embeber en gelatina y cortar en criostato cada 14-16µm. En el caso de las hibridaciones con la sonda de ndrg1b ARN marcada con FITC se procedió a deshidratar en concentraciones crecientes de etanol, embeber los testículos y cerebros en parafina y cortar transversalmente cada 5 µm en micrótomo de deslizamiento (Leica). Posteriormente se procedió a desparafinar con xileno, permeabilizar con Proteinasa K (10µg/ml) a 37°C durante 12 minutos y lavar con 2mg/ml de glicina - PBSw-DEPC, para frenar la permeabilización. Se hibridó a 66°C durante 16 horas con la sonda de ndrg1b ARN marcada con FITC, seguido de lavados con solución de lavado a 66°C (formamida 50%, SSC 1,3X pH 5, EDTA 5mM pH8, Tween20 0.1%, CHAPS 0,1%), y con solución NTE a 37°C (500 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Tras los lavados los cortes fueron montados con medio de montaje Fluoromount (Sigma-Aldrich) que contenía 4',6-diamidino-2-phenylindole 1µg/ml (DAPI, Life Technologies) para ser analizados y fotografiados en el microscopio.

## Medición de niveles de 11-cetotestosterona (11-KT) en plasma de machos

Se emplearon machos controles y mutados previamente analizados por HMA usando ADNg de aleta y organizados en parejas individuales (hembra - macho) por pecera en 2 categorías diferentes: 1 hembra control - 1 macho mutado y 1 hembra control - 1 macho control, con las condiciones de aclimatación y reproducción empleadas previamente en los experimentos de comportamiento y reproducción, incluyendo el uso de separadores transparentes la tarde previa a la extracción de sangre. Tras anestesiar los individuos en tricaina 30-50 mg/L (Sigma-Aldrich), se procedió a extraer la sangre directamente de la vena caudal empleando tubos capilares de vidrio, con la cual se realizó la extracción de esteroides empleando acetato de etilo hexano según la metodología de Royan *et al.*, (2020). Las concentraciones de 11-KT de plasma de cada individuo fueron medidas por duplicado por medio de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA (del inglés, Enzyme-linked immunosorbent assay, Cayman 582751) siguiendo las recomendaciones del fabricante en base a una curva estándar.

#### Análisis estadístico

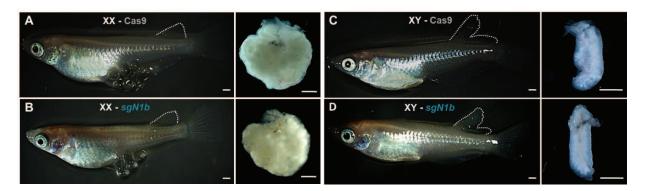
Los análisis estadísticos de las comparaciones relativas de las expresiones del transcripto de *ndrg1b* por RT-qPCR se llevaron a cabo usando el programa FgStatistics software (<a href="http://sites.google.com/site/fgStatistics/">http://sites.google.com/site/fgStatistics/</a>) según lo establecido por Pfaffl, (2001). Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Las variables de dos grupos, como número de células y parámetros comportamentales, fueron comparadas por medio de la prueba de Student de dos "colas" sin emparejar, aplicando la corrección de "Wlech" para varianzas diferentes. Para las variables de más de dos grupos, como los parámetros reproductivos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicando la corrección de Tukey, comparando la media de cada grupo experimental. Se consideraron diferencias estadísticas significativas con valores P<0,05.

## RESULTADOS

Para evaluar si la alteración de la proliferación tipo II durante estadíos tempranos del desarrollo en ambos sexos de medaka podría afectar el estado morfológico de las gónadas, la gametogénesis y el éxito reproductivo en la adultez, se procedió a examinar las características sexuales secundarias, la morfología gonadal y diversos parámetros reproductivos en machos y hembras.

#### La mutación de ndrg1b no alteran las características sexuales secundarias en adultos

Inicialmente se realizó un análisis morfológico de los adultos. Los individuos mutados *sgN1b* alcanzaron la adultez sin presentar alteraciones morfológicas evidentes y en un tiempo igual a los individuos controles Cas9. En cuanto a su madurez sexual, no se observaron alteraciones en sus características sexuales secundarias. Tal como se ha mencionado anteriormente, los adultos de medaka presentan rasgos sexuales fácilmente distinguibles, principalmente en relación al tamaño y forma de las aletas. Por lo tanto, las hembras *sgN1b* invariablemente presentaron la aleta dorsal sin hendiduras (**Figura 21A, B**), la aleta anal de forma triangular, y la papila urogenital bien desarrollada y visible; y los machos *sgN1b* presentaron la aleta dorsal aserrada y con la hendidura en el margen posterior (**Figura 21C, D**), la aleta anal con forma de paralelogramo y extremo posterior bifurcado y la papila urogenital poco desarrollada.



**Figura 21.** Mutantes bialélicos de *ndrg1b* no exhiben características sexuales secundarias alteradas. (A) hembra control Cas9 adulta con sus respectivos ovarios, (B) hembra mutada sgN1b adulta con sus respectivos ovarios, (C) Macho control Cas9 adulto con sus respectivos testículos (D) Macho mutado sgN1b adulto con sus respectivos testículos. Las líneas blancas punteadas indican la aleta dorsal, la cual es larga, aserrada, y presenta una hendidura en el margen posterior en machos. Las barras de escala representan 1mm.

La presencia invariable de las características sexuales secundarias en los individuos mutados sgNIb con respecto a los controles nos indicaría que la alteración en la proliferación tipo II en estadíos tempranos no repercute en características morfológicas sexuales externas en los adultos de ambos sexos, por lo que entonces se centró nuestro interés en la morfología gonadal y la reproducción de estos individuos.

#### La mutación de *ndrg1b* altera la gametogénesis en estadíos adultos

Al examinar los cortes histológicos de las gónadas de individuos adultos mediante tinciones con H&E (**Figura 22A**) se observó que los ovarios *sgN1b* presentan una morfología y desarrollo normal, tal como en los ovarios controles Cas9, mostrando un ovario asincrónico, con ovocitos en todas las fases de desarrollo (**Figura 22B**). Sin embargo, en un análisis minucioso de las diferentes fases de la ovogénesis se pudo apreciar una reducción en el número de las células germinales, especialmente en el número de ovogonias (O) (**Figura 22C**), en el número de ovocitos previtelogénicos (OPV) (**Figura 22D**), y en el número de ovocitos vitelogénicos (OV) (**Figura 22E**), en ovarios mutados *sgN1b* en comparación con los ovarios controles Cas9.

Con respecto a los machos, se observó que los testículos presentaron la morfología común de testículos restrictos, y todos los tipos celulares durante la espermatogénesis tanto en los mutados sgN1b y los controles Cas9 (Figura 22F). Sin embargo, y al igual que en las hembras, cuando se procedió a contar las células germinales y los diferentes estadíos de la espermatogénesis se evidenció una disminución en el número de espermatogonias por cisto (Figura 22G), repercutiendo en el número total de espermatogonias (Figura 22H) en testículos mutados sgN1b en comparación con testículos controles Cas9. No se observaron cambio en el número de cistos que contienen las espermatogonias (Figura 22I), cuyo número proviene de la proliferación I. Adicionalmente cuando se procedió a analizar el esperma de los machos controles y mutados (Figura 23A), no se encontraron diferencias en el volumen del esperma entre individuos controles y mutados sgN1b (Figura 23B). No obstante, cuando se cuantificó el número de espermatozoides se observó una reducción en el número total en los mutados sgN1b con respecto a los individuos controles (Figura 23C). Cabe señalar que no se observaron alteraciones en la morfología de los

espermatozoides, todos presentaron una cabeza y una cola como los espermatozoides controles, sin embargo, no se realizaron análisis más detallados.

Estos resultados indican que durante la fase reproductiva también se altera la proliferación cística en los mutantes de *ndrg1b*, al igual que lo observado en la proliferación tipo II en estadíos tempranos de desarrollo. Esta disminución de la proliferación cística repercute directamente sobre el número de células germinales durante la gametogénesis en ambos sexos, aunque sin llegar a alterar la morfología gonadal y las características morfológicas sexuales externas.

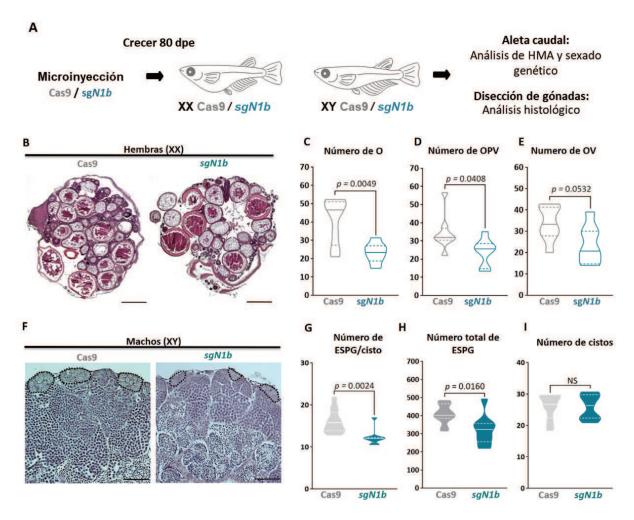


Figura 22. Mutación de *ndrg1b* altera la gametogénesis en ambos sexos en la adultez. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental empleado para analizar el efecto de la perdida de ndrg1b en el estado gonadal en individuos de 80 días post eclosión (dpe). (B) Cortes histológicos transversales de ovarios de hembras (XX) controles y sgN1b, la barra de escala representa 500 μm. Se contó

manualmente (C) el número de ovogonias (O), (D) el número de ovocitos pre-vitelogénicos (OPV), y (E) el número de ovocitos vitelogénicos (OV). Las hembras Cas9 están representadas con violines vacíos de color gris, y las hembras sgN1b con violines vacíos de color cian, n=8 por grupo. (F) Cortes histológicos transversales de testículos de machos (XY) controles y sgN1b, cada cisto de espermatogonias está encerrado por una línea punteada negra, la barra de escala representa 50 μm. Se contó manualmente (G) el número de espermatogonias (ESPG) por cada cisto, (H) el número total de espermatogonias (ESPG) y (I) el número de cistos que contiene espermatogonias. Los machos Cas9 están representados con violines rellenos de color gris, y los machos sgN1b con violines rellenos de color cian, n=10 por grupo. Los valores P están indicados cuando los grupos difieren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Se aplicó la prueba de Student.

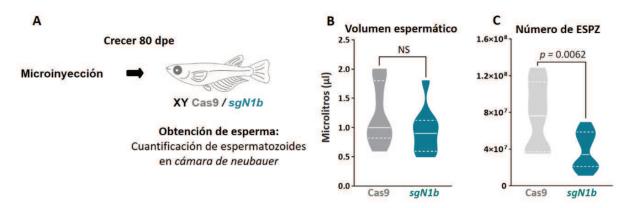


Figura 23. Mutación de *ndrg1b* altera la espermatogénesis en machos adultos. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental empleado para analizar el efecto de la perdida de *ndrg1b* en la cantidad espermática de machos (XY) controles y sgN1b de 80 días post eclosión (dpe). (B) Se cuantificó el volumen espermático de cada individuo y (C) el número total de espermatozoides (ESPZ). Los machos Cas9 están representados con violines rellenos de color gris, y los machos sgN1b con violines rellenos de color cian, n=10 por grupo. Los valores P están indicados cuando los grupos difieren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Se aplicó la prueba de Student.

## La mutación de *ndrg1b* no altera la proporción de sexo biológico

Adicionalmente se determinó la proporción de sexos de los individuos mutados para *ndrg1b*, ya que en trabajos previos se había señalado que el número de células germinales en embriones es necesario para el destino sexual gonadal (Kurokawa *et al.*, 2007; Morinaga *et al.*, 2007; S.

Nakamura *et al.*, 2012). Por lo tanto, es fundamental identificar la proporción de sexos en los individuos mutados en estadios post-embrionarios, dada la reducción de células germinales observada en estadios tempranos del desarrollo en el capítulo I, para lo cual se analizó el fenotipo sexual basándose en la histología gonadal de todos los individuos sexados genéticamente. Si bien se identificó la presencia de individuos invertidos sexualmente para ambos genotipos, se observó una proporción de sexos equilibrada entre los individuos mutados *sgN1b* y los controles Cas9 (**Tabla 4**). Estos resultados establecen que la proliferación cística tipo II no es necesaria para el establecimiento del sexo gonadal, ya que la proporción de sexos no se vio alterada.

Tabla 4. Proporción de sexos de los mutantes ndrg1b.

	Cas9		sgN1b		% cambio
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	
XX	26	0	21	2	8,70
XY	0	30	1	28	3,45

#### La mutación de *ndrg1b* afecta los parámetros reproductivos en adultos

Para evaluar si la reducción en el número de células germinales en diferentes fases de desarrollo en ovarios y testículos afecta el éxito reproductivo de los individuos, se procedió a analizar diferentes parámetros reproductivos, como el desove, la fecundidad y la eclosión, en tres categorías diferentes de parejas: categoría control (hembra Cas9 - macho Cas9), categoría hembra mutada (macho Cas9 - hembra sgN1b) y categoría macho mutado (hembra Cas9 - macho sgN1b) (Figura 24A). Para la categoría hembra mutada se observó una disminución en el número de huevos desovados diariamente, sin embargo, el porcentaje de fecundación y eclosión no se vio alterada, con respecto a la categoría control (Figura 24B, C, D). En el caso de la categoría machos mutados, se observó una reducción del porcentaje de fecundación y eclosión, y sorpresivamente también una disminución en el desove diario por parte de las hembras controles (Figura 24B, C, D).

Estos resultados nos indicarían que la reducción en el número de ovogonias y ovocitos influye directamente en el número de huevos desovados por las hembras mutadas sgN1b, sin afectar los parámetros reproductivos de los machos, tales como la fecundación. Adicionalmente el bajo número de espermatogonias que resulta en un bajo número de espermatozoides influye

directamente en el porcentaje de fecundación de los machos *sgN1b*, y sorpresivamente en el número de huevos desovados por parte de las hembras controles, lo cual nos llevó a explorar el comportamiento sexual de estos individuos tal como se describe a continuación.

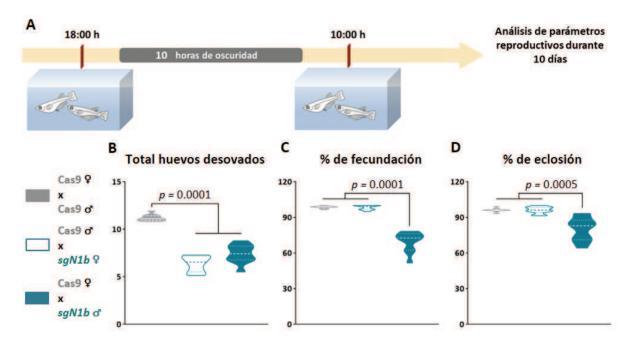


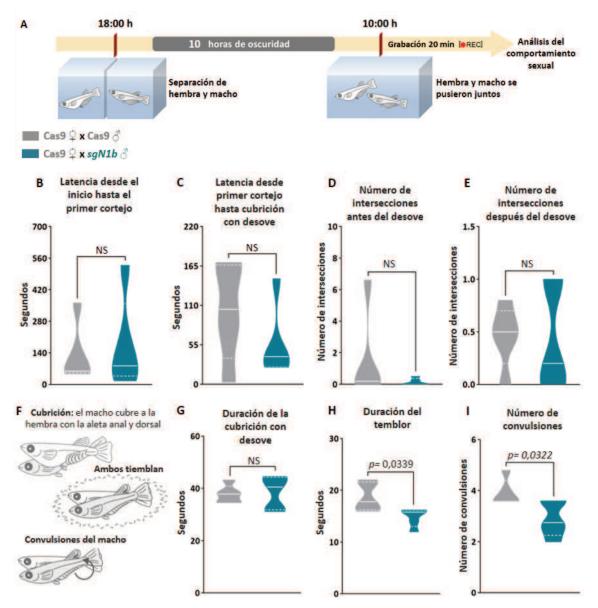
Figura 24. Mutación de *ndrg1b* altera el éxito reproductivo en ambos sexos en la adultez. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental empleado para analizar el efecto de la perdida de ndrg1b en el éxito reproductivo en individuos de 80 días post eclosión (dpe), se evaluaron tres categorías diferentes de parejas, categoría control (hembra Cas9 - macho Cas9) representada con color gris, categoría hembra mutada (macho Cas9 - hembra *sgN1b*) representada con color cian y categoría macho mutado (hembra Cas9 - macho *sgN1b*) representada con color cian relleno. Para todas las categorías se evaluó (B) el número total de huevos desovados al día, (C) el porcentaje de fecundación de los huevos desovados, y (D) el porcentaje de eclosión de los huevos fecundados, los controles representados por violines rellenos color gris, la categoría hembra mutada representada con violines vacíos color cian y la categoría macho mutado representada con violones rellenos color cian, n=10 por grupo. Los valores P están indicados cuando los grupos difieren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Se aplicó ANOVA con corrección de Tukey.

## Mutación de *ndrg1b* repercute en el comportamiento sexual de machos

Para intentar responder el interrogante de la reducción de huevos desovados de parejas conformadas por hembras controles con machos mutados de *ndrg1b*, nos planteamos analizar el comportamiento sexual, ya que la estimulación de las hembras es primordial para el desove. Gracias a que medaka presenta una secuencia de acciones específicas durante el comportamiento sexual, las cuales son fácilmente identificables y medibles, tal como se ha mencionado anteriormente (Hiraki-Kajiyama *et al.*, 2019; Ono and Uematsu, 1957; Walter and Hamilton, 1970), se procedió a medir diferentes parámetros durante el comportamiento sexual (**Figura 25A**).

De los análisis se observó que todas las parejas manifestaron los rasgos típicos del comportamiento socio sexual en medaka, tales como el cortejo sexual y la cubrición necesaria para el desove. Particularmente no se observaron diferencias en los parámetros medidos antes y durante el cortejo sexual, tales como la latencia desde el inicio de la grabación hasta la manifestación del primer cortejo sexual (Figura 25B), la latencia desde la manifestación del primer cortejo sexual hasta la cubrición que dio como resultado el desove (Figura 25C) y el número de intersecciones de 2 segundos de duración antes (Figura 25D) y después (Figura 25E) del desove. Mientras que en relación a los parámetros medidos durante la copulación o cubrición que resultó en desove (Figura 25F-G), se observaron diferencias específicamente en las acciones claves para la estimulación del desove de la hembra y la consecuente fecundación por parte del macho, tales como la duración del temblor (Figura 25H) y el número de convulsiones (Figura 25I) efectuados por parte del macho en la región abdominal de la hembra. En concreto se observó una disminución en la duración del temblor y en el número de convulsiones en las parejas de machos mutados con respecto a las parejas controles.

Estos experimentos comportamentales nos indicarían que el número de espermatogonias y espermatozoides resultantes corresponden a factores que podrían impactar directamente en el comportamiento reproductivo de un individuo, particularmente durante la cubrición, que es el momento clave para que se dé la liberación de los huevos y el esperma, para la consecuente fecundación. A continuación, decidimos explorar los niveles del andrógeno 11-cetotestosterona (11-KT), el principal esteroide sexual en peces teleósteos.



**Figura 25. Mutación de** *ndrg1b* **altera el comportamiento sexual en machos. (A)** Representación esquemática del procedimiento experimental empleado durante 5 días consecutivos, para analizar el comportamiento reproductivo de 5 parejas por cada categoría. La categoría control corresponde a parejas compuestas por hembras y machos Cas9 (gris), y la categoría mutante corresponde a parejas compuestas por hembras Cas9 (gris) y machos *sgN1b* (cian). Las parejas fueron separadas cada tarde (18:00) usando recipientes transparentes para permitir el contacto visual. A la mañana siguiente las parejas se ubicaron en

un mismo recipiente y se procedió a grabar el video durante 20 minutos. Cada video fue analizado y se determinó los siguientes parámetros: (**B**) la latencia desde el inicio de la grabación hasta la manifestación del primer cortejo sexual, (**C**) la latencia desde la manifestación del primer cortejo sexual hasta la cubrición que dio como resultado el desove, (**D**) el número de intersecciones de 2 segundos de duración antes del desove, (**E**) el número de intersecciones de 2 segundos de duración después del desove, (**F**) durante la manifestación de cubrición que resultó en desove, se midieron parámetros claves para el desove como: (**G**) duración de la cubrición, (**H**) duración del temblor y (**I**) número de convulsiones efectuadas por el macho. La categoría control está representada con violines rellenos color gris, y la categoría con machos sgN1b con violines rellenos color cian. n=5 por categoría. Los valores P están indicados cuando los parámetros sexuales medidos difieren estadísticamente (P<0.05). NS, cuando no hay diferencias estadísticas. Prueba de Student. Los videos representativos de la cubrición que resultó en desove están en los siguientes enlaces:

https://www.youtube.com/watch?v=KrI8t90 tMA&feature=youtu.be
representa la pareja control y
https://www.youtube.com/watch?v=MCjhYG7lfwM&feature=youtu.be
representa la categoría mutante.

## Mutación de ndrg1b no modifica los niveles de 11-KT en machos

Aunque observamos que los mutantes de *ndrg1b* exhiben las características sexuales típicas de cada sexo (**Figura 21**), en especial la aleta dorsal aserrada y la hendidura en el margen posterior, características que están relacionadas con la presencia de andrógenos en machos (Ngamniyom et a., 2009), poniendo en evidencia que estos individuos tienen el rasgo de sintetizar esteroides sexuales, lo cual es necesario corroborar midiendo los niveles de andrógenos.

La cuantificación de los niveles de 11-KT no mostro diferencias entre machos controles y mutados (**Figura 26B**), apoyando la idea de que la reducción de proliferación cística y de número de células germinales en machos no afectaría la producción de andrógenos.

Considerando que los niveles de andrógenos no se vieron alterados en los mutantes de *ndrg1b*, pero si su comportamiento reproductivo, se procedió a analizar si el gen *ndrg1b* se está expresando en tejidos extra gonadales, especialmente en el cerebro.

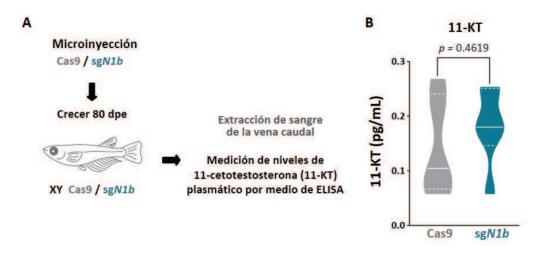


Figura 26. Mutación de *ndrg1b* no modifica los niveles de 11-KT en adultos de medaka. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental empleado para medir los niveles del andrógeno 11-cetotestosterona (11-KT) por medio de ELISA. (B) Cuantificación de niveles de 11-KT plasmático en machos adultos, los controles cas9 están representados con violines rellenos color gris, y los mutados (*sgN1b*) con violines rellenos color cian. n= 6 individuos por grupo. El valor P está indicado. Prueba de Student.

#### ndrg1b no se expresa en el cerebro de machos adultos

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento reproductivo, especialmente el cortejo, ha sido asociado a una regulación cerebral (Hiraki-Kajiyama *et al.*, 2019; Yamashita *et al.*, 2020), y por lo tanto es necesario analizar la presencia de *ndrg1b* en este órgano. Se observó que la expresión de *ndrg1b* está limitada a testículos, ya que no se detectó transcripto en el cerebro de machos adultos, tanto por RT-qPCR (**Figura 27A**), como por HIS (**Figura 27B, E**). Particularmente en los testículos se observó a *ndrg1b* en las espermatogonias tipo A, en la zona más periférica del túbulo donde se encuentras las células *oct4* positivas, el cual es un marcador de ESPGA.

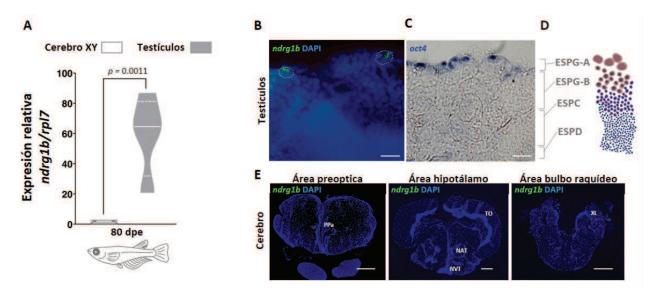


Figura 27. Expresión de ndrg1b en cerebro y testículos de machos controles. (A) Nivel de abundancia relativa del transcripto de ndrg1b en machos (XY) adultos (80dpe). La cuantificación se llevó a cabo usando el método 2<sup>-ΔΔCt</sup> y los valores fueron normalizados al gen rpl7. El cerebro está representado con violines vacíos, y los testículos con violines rellenos de color gris. n= 5 individuos por órgano. El valor P está indicado cuando difieren estadísticamente (P<0.05). Se aplicó el método de comparación relativa de expresión genética (Pfaffl, 2001). (B) Cortes histológicos transversales de testículos de machos controles (XY) para detectar los transcriptos de ndrg1b por medio de la técnica hibridación in situ con sonda de ARN marcada con FITC (verde) y DAPI (azul). La barra de escala representa 50 um. (C) Cortes histológicos transversales de testículos de machos controles (XY) para detectar los transcriptos de oct4 por medio de la técnica hibridación in situ con sonda de ARN marcada con DIG (azul) en la porción distal del lóbulo del testículo. La barra de escala representa 50µm. (D) Representación esquemática de corte transversal de testículos en medaka con sus diferentes tipos celulares, las espermatogonias tipo A (ESPG-A) en la parte distal, las espermatogonias tipo B (ESPG-B), los espermatocitos primarios (ESPC), y las espermatidas (ESPD). Las espermatidas se transforman en espermatozoides, durante las espermiogénesis. Esquema modificado de Iwai et al., (2006). (E) Cortes histológicos transversales de diferentes áreas del cerebro de machos controles (XY) para detectar los transcriptos de ndrg1b por medio de la técnica hibridación in situ con sonda de ARN marcada con FITC (verde) y DAPI (azul). Ubicación del núcleo preóptico parvocelular anterior (PPa), tectum óptico (TO), Núcleo tuberal anterior (NAT), núcleo ventralis tuberis (NVT) y lobus vagi (XL) tomada de Ishikawa et al., (1999). La barra de escala representa 100µm.

# DISCUSIÓN

El desarrollo gonadal implica una sucesión de diferentes etapas que se encuentran altamente reguladas, de las cuales una de las más importantes es la proliferación, que se da por lo general de manera temporal y sexualmente dimórfica, y desde estadios embrionarios hasta la adultez, condicionando de esta forma el número de células germinales durante toda la vida (Hinnant *et al.*, 2017; Lei and Allan C. Spradling, 2013; Tanaka, 2019; Windley and Wilhelm, 2016). De allí la importancia de analizar la gonadogénesis tanto en estadios tempranos como en la adultez, que es el momento clave para la reproducción. Colectivamente los resultados de este capítulo nos indican que las alteraciones de la proliferación tipo II cística en medaka observadas en estadíos embrionarios y juveniles en el capítulo anterior, repercuten en la gametogénesis de ambos sexos, condicionando la presencia en los ovarios y testículos de un número reducido de células germinales. Además, dicha reducción influye en el éxito reproductivo de los individuos, inclusive en el comportamiento sexual en machos, sin que esto requiera un cambio en la morfología gonadal, en las características sexuales secundarias y en la proporción de ambos sexos.

En medaka la proliferación tipo I de autorenovación prevalece en ovarios y testículos adultos, y es fundamental para mantener la población de ovogonias y espermatogonias, y así asegurar la continuidad de la ovogénesis y espermatogénesis (Hansen and Schedl, 2006; Hinnant *et al.*, 2017; Inaba *et al.*, 2011; Nishimura and Tanaka, 2014; Papagiannouli and Mechler, 2009; Tanaka, 2019). En efecto, el número de gonias influye en el número de gametos, como fue estudiado en un trabajo de Iwasaki y colaboradores (Iwasaki *et al.*, 2009), donde observaron que una disminucion en la proliferacion de espermatogonias en machos adultos de medaka resultó en una disminucion de las celulas diferenciadas, incluyendo los espermatozoides. En base a estos análisis histologicos podíamos esperar que los parametros reproductivos se vieran afectados, debido a que cuando hay una alteración en el control de la gametogenesis, se puede alterar el suministro de la cantidad de ovocitos y esperma necesarios para la fecundación (Adolfi *et al.*, 2019; Iwai *et al.*, 2006; Matta *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2011), parámetro importante teniendo en cuenta por ejemplo que el número total de espermatozoides es el rasgo eyaculatorio que mejor predice el éxito de la fecundación masculina y para el cual hay mayor evidencia de selección sexual durante la evolución (Kelly and Jennions, 2011; Parker and Pizzari, 2010).

Adicionalmente es importante destacar que la mutación de ndrg1b de medaka no conllevó a alteraciones en la morfología y en la proporción de ambos sexos. Estas observaciones se corresponden con resultados previos descritos por Nishimura y colaboradores (Nishimura et al., 2018) analizando los mutantes de figla, meioC y dazl en medaka, en los cuales a pesar de haber una alteración en la formación de folículos y en la ovogénesis, no hubo alteración en la proporción sexual, es decir, todas las hembras mutadas presentaron características sexuales secundarias de hembras controles y las estructuras ováricas correspondientes, demostrando que hay un mecanismo previo a la existencia de las células germinales o del estado de gonia que define el sexo del individuo (Nishimura et al., 2018). Probablemente esta determinación sexual de las células germinales puede ser antes o durante la proliferación tipo I, mucho antes de que inicie la proliferación tipo II císitica, ya que mutantes que exhiben reversión sexual en medaka, presentan alteraciones particularmente durante la migración o proliferación tipo I. Tal es el caso del mutante de cxcr4 en el que se observaron hembras genotípicas con fenotipo de macho. El cxcr4 es un gen que codifica para un receptor de la quimio-atrayente cxc, fundamental en la migración de las células primordiales germinales durante la gastrulación en medaka. Dicha reversión sexual se le atribuye a la deficiencia de PGCs de esos mutantes (Kurokawa et al., 2007). Por el contrario, en el mutante hotei de medaka se observaron machos genotípicos con fenotipo gonadal de hembra. Tal reversión sexual es generada por la híper-proliferación de las PGCs, debido a la pérdida del gen amhrII, miembro de la familia TGF-β, conocido por regular la proliferación tipo I de células germinales en medaka (Morinaga et al., 2007; Shuhei Nakamura et al., 2012). Por lo tanto, si bien el número de células germinales es importante para la determinación del sexo biológico, y por lo tanto de la diferenciación sexual gonadal, nuestros resultados y los de otros mutantes establecerían que la proliferación cística no es un inductor de esta diferenciación gonadal.

Una observación interesante y sorpresiva ha sido el número reducido de huevos desovados por las hembras salvajes cruzadas con los machos *ndrg1b* mutados. Como mencionamos, se ha establecido que el comportamiento sexual está ligado con el éxito reproductivo (Oshima *et al.*, 2003), y gracias a las descripciones y cuantificaciones del comportamiento sexual de medaka realizadas previamente (Hiraki-Kajiyama *et al.*, 2019; Ono and Uematsu, 1957; Walter and Hamilton, 1970), hemos podido efectuar una aproximación comportamental para intentar explicar esta observación. Es trascendental considerar que todos los individuos mutados exhibieron las

acciones típicas del comportamiento sexual de medaka, y que solo se encontraron diferencias en las acciones relacionadas a la cubrición que resultó en desove, específicamente en la duración del temblor y en el número de convulsiones, momentos claves para la estimulación del desove de la hembra y la consecuente fecundación por parte del macho. Esto es debido a que las vibraciones generadas durante el temblor y la presión abdominal ejercida por el macho durante las convulsiones genera una presión que hace que los ovocitos sean expulsados a través del poro urogenital de la hembra, al mismo tiempo que el macho libera el esperma (Ono and Uematsu, 1957). Estas acciones parecen estar conservadas en vertebrados, ya que en ratones se ha observado que la eyaculación generalmente está acompañada por vibraciones y contracciones abdominales rítmicas (Qin et al., 2017).

Durante décadas se ha estudiado la relación entre el comportamiento socio-sexual con diversos circuitos neuronales y la regulación de hormonas esteroideas sexuales en cada sexo (Hiraki-Kajiyama et al., 2019; McCarthy et al., 2012; McCarthy and Arnold, 2011; Mitchell et al., 2020; Munakata and Kobayashi, 2010; Yang and Shah, 2014). En vertebrados los esteroides sexuales son sintetizados principalmente en las gonadas y en las glándulas endocrinas, y junto a sus receptores juegan un rol importante en amplias funciones cerebrales, y no exclusivamente en la regulacion del comportamiento socio-sexual. Ademas, estos esteroides sexuales no solo actuan a nivel cerebral, tambien se ha visto que actuan de manera autocrina/paracrina en las gonadas, como es el caso de GnIH (neurohormona que inhibe la sintesis y liberacion de gonadotropinas en la pituitaria) y su receptor, que se expresan en las células germinales y esteroidogenicas de las gónadas, para suprimir la produccion de esteroides sexuales y la diferenciacion de células germinales en aves y mamiferos (Tsutsui and Ubuka, 2020; Ubuka et al., 2020). Aunque mucho se ha estudiado en relación al comportamiento sexual en vertebrados, aún quedan diversos interrogantes por resolver, y en nuestro caso en particular no es del todo clara la regulación de las acciones de temblor y convulsión durante la cubrición o cópula en vertebrados y el nivel de conservación, debido a que en mamíferos este momento adquiere mayor complejidad y no solo es importante para la reproducción, sino también para el bienestar, salud y placer (Qin et al., 2017).

Aquí es importante resaltar que las hormonas esteroideas sexuales secretadas por las gónadas son importantes además en el desarrollo de las diferentes características sexuales secundarias (Sato *et* 

al., 2008; Ogino et al 2013; Nakamura et al 2014; Y. Kikuchi et al., 2019). En el presente trabajo observamos que las hembras y machos mutantes de *ndrg1b* exhiben las características sexuales típicas de cada sexo, poniendo en evidencia que estos individuos tienen el rasgo de sintetizar esteroides sexuales. Rasgo justificado al cuantificar los niveles del andrógeno 11-KT, del cual no se detectaron diferencias entre los individuos controles y los mutados para ndrg1b, estableciendo que efectivamente la síntesis de andrógenos no se encuentra alterada en estos individuos. No obstante, cuando indagamos los fenotipos comportamentales de individuos medaka a los cuales se les ha alterado la regulación de hormonas sexuales, por ejemplo, en machos tratados con 17β-Estradiol, encontraron que estos presentan cambios en las acciones relacionadas al cortejo, tales como la frecuencia de seguimiento, baile y flotación (Oshima et al., 2003). Por otro lado, cambios en los niveles de andrógenos gonadales se han asociado a comportamientos agresivos machomacho, mediando la estimulación de grelina en neuronas del área preóptica medial (Yamashita et al., 2020), aunque no directamente al cortejo con la hembra. Así mismo, en medaka con alteración del neuropeptido B, un mediador de la acción del estrógeno en el cerebro de hembras, observaron cambios comportamentales asociados a la latencia desde el primer cortejo sexual hasta la cubrición que resulto en desove (Hiraki-Kajiyama et al., 2019). De forma similar, en estudios donde han alterado reguladores cerebrales, tales como arginina-vasotocina (avt) (Yokoi et al., 2015), el ligando de oxitocina (oxt) (Yokoi et al., 2020), y el nervio terminal de hormona liberadora de gonadotropina 3 (GnRH3) (Okuyama et al., 2014), han observado cambios en la motivación y despliegue del cortejo sexual, en la latencia hasta la cubrición y número de cortejos sexuales, y en la latencia hasta la cubrición, respectivamente. Lo dicho hasta aquí supone que las alteraciones a nivel hormonal y cerebral observadas en medaka generan cambios especialmente en las acciones relacionadas al cortejo y motivación sexual, previas a la cubrición, y dichas acciones no se observaron alteradas en los mutantes de *ndrg1b*, que estuvieron relacionadas con el vigor sexual. Estas observaciones nos llevan a realizarnos la siguiente pregunta: ¿las acciones de temblor y convulsión estarán relacionadas exclusivamente con el bajo número de espermatogonias y espermatozoides en machos? Como he mencionado anteriormente, aún quedan diversos interrogantes por resolver en cuanto al comportamiento sexual, especialmente a la regulación del comportamiento del temblor y convulsión durante la cubrición o cópula en vertebrados y requerirían experimentos adicionales.

Hasta el momento solo hemos encontrado un estudio en medaka con fenotipo similar al observado en los machos mutados de *ndrg1b*, en el cual observaron una disminución de estas acciones durante la cubrición en machos en los cuales se les había generado una reducción de las reservas espermáticas inducida por copulas constantes durante 19 días, observando una reducción en la tasa de fecundación, e inclusive la respuesta por parte de las hembras fue la disminución del tamaño del desove (Weir and Grant, 2010). Por otro lado, en pez cebra se ha reportado que la produccion de esperma condiciona el comportamiento sexual en modelos de envejecimiento, ya que se ha visto que a mayor edad menor producción de esperma (Kanuga *et al.*, 2011). Dado que no hay suficiente estudios que analicen la relación entre la cantidad de esperma con el comportamiento reproductivo, es necesario futuras investigaciones para corroborar esta relación en diferentes modelos de vertebrados, abarcando analisis del eje cerebral, endocrino y gonadal.

#### **CONCLUSIONES GENERALES**

En la presente tesis hemos identificado la expresión de *ndrg1b* durante el desarrollo gonadal en medaka, presentando un patrón inverso a la proliferación tipo II en ambos sexos. A su vez observamos una alteración de esta proliferación al generar mutantes bialélicas de *ndrg1b*. Dicha alteración ha conducido a una reducción en el número de células germinales, durante todo el desarrollo tanto en hembras como en machos, afectando los ovarios y testículos, la consecuente reproducción e incluso el comportamiento sexual en machos, sin que eso implique cambios en las características sexuales secundarias, los niveles de 11-KT y la proporción de sexos de los individuos. En base a estos resultados hemos establecido un modelo abreviado en la **Figura 27**. Por todo esto se ha corroborado la importancia de la proliferación cística para el establecimiento de un número adecuado de células germinales, que establecen el éxito reproductivo en ambos sexos e impactan directamente sobre el vigor sexual de los machos. Además, el establecimiento de un regulador de la proliferación cística nos permitirá estudiar en mayor detalle este proceso, y otros reguladores río arriba y abajo del mismo, para dilucidar la red regulatoria molecular.

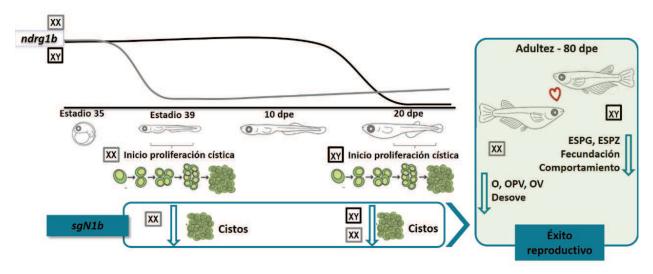


Figura 28. Modelo hipotético de la participación de *ndrg1b* en la proliferación cística durante la embriogénesis, estadíos juveniles y la etapa reproductiva.

#### **FUTURAS DIRECCIONES**

Los datos presentados en esta tesis corresponden a datos originales que han generado nuevos y diversos interrogantes, los cuales constituyen posibles direcciones para futuras investigaciones. Algunas han sido mencionadas brevemente en ambos capítulos, sin embargo, nos pareció importante destacar las más importantes en este apartado.

• Regulación de la expresión de ndrg1b: Como primera medida será necesario identificar la localización celular de la expresión de ndrg1b en las gónadas durante todo el desarrollo gonadal, empleando diferentes estrategias, como la generación de un anticuerpo específico o por medio de un knock-in de una etiqueta en el gen de ndrg1b que nos permita realizar un seguimiento detallado de la expresión de ndrg1b. Con estas herramientas podremos además estudiar la regulación de ndrg1b durante la proliferación tipo II, para identificar los reguladores moleculares y epigenéticos de ndrg1b, que generan esta expresión opuesto a la proliferación tipo II de las células germinales.

#### LISTA DE PUBLICACIONES

**ARIAS PADILLA LF**, CASTAÑEDA-CORTÉS DC, ROSA IF, MORENO ACOSTA OD, HATTORI RS, NÓBREGA RH, FERNANDINO JI **(2021)**. Cystic proliferation of germline stem cells is necessary to reproductive success and normal mating behavior in medaka. *Elife*. 2021 Mar 1;10:e62757. doi: 10.7554/eLife.62757.

HATTORI RS, CASTAÑEDA-CORTÉS DC, **ARIAS PADILLA LF**, STROBL-MAZZULLA PH, FERNANDINO JI **(2020)**. Activation of stress response axis as a key process in environment-induced sex plasticity in fish. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Nov;77(21):4223-4236. doi: 10.1007/s00018-020-03532-9.

CASTAÑEDA CORTÉS DC, **ARIAS PADILLA LF**, LANGLOIS VS, SOMOZA GM, FERNANDINO JI **(2019).** The central nervous system acts as a transducer of stress-induced masculinization through corticotropin-releasing hormone B. **Development**. 2019 Apr 23;146(8):dev172866. doi: 10.1242/dev.172866.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADOLFI MC, FISCHER P, HERPIN A, REGENSBURGER M, KIKUCHI M, TANAKA M, SCHARTL M (2019). Increase of cortisol levels after temperature stress activates dmrt1a causing female-to-male sex reversal and reduced germ cell number in medaka. *Mol Reprod Dev* 86: 1405–1417.
- ALJANABI SM, MARTINEZ I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25: 4692–4693.
- ANSAI S, KINOSHITA M (2014). Targeted mutagenesis using CRISPR / Cas system in medaka. : 1–10.
- ARNEGARD ME, MCINTYRE PB, HARMON LJ, ZELDITCH ML, CRAMPTON WGR, DAVIS JK, SULLIVAN JP, LAVOUÉ S, HOPKINS CD (2010). Sexual signal evolution outpaces ecological divergence during electric fish species radiation. *Am Nat* 176: 335–356.
- BACHTROG D, MANK JE, PEICHEL CL, KIRKPATRICK M, OTTO SP, ASHMAN TL, HAHN MW, KITANO J, MAYROSE I, MING R, et al. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol* 12: 1–13.
- BARSKE L a., CAPEL B (2008). Blurring the edges in vertebrate sex determination. *Curr Opin Genet Dev* 18: 499–505.
- BIASON-LAUBER A (2010). Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 163–186. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2009.12.002.
- BRENNAN J, CAPEL B (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5: 509–521.
- BURL RB, CLOUGH S, SENDLER E, ESTILL M, KRAWETZ SA (2018). Sperm RNA elements as markers of health. *Syst Biol Reprod Med* 64: 25–38. Available at: https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1393583.
- DI CARLO A, DE FELICI M (2000). A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Dev Biol* 226: 209–219.
- CASTAÑEDA CORTÉS DC, ARIAS PADILLA LF, LANGLOIS VS, SOMOZA GM, FERNANDINO JI (2019). The central nervous system acts as a transducer of stress-induced masculinization through corticotropin-releasing hormone B. *Dev* 146: 1–10.
- CHAKRABORTY T, ZHOU LY, CHAUDHARI A, IGUCHI T, NAGAHAMA Y (2016). Dmy

- initiates masculinity by altering Gsdf/Sox9a2/Rspo1 expression in medaka (Oryzias latipes). *Sci Rep* 6: 1–11. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/srep19480.
- CHAKRABORTY T, ZHOU LY, CHAUDHARI A, IGUCHI T, NAGAHAMA Y, RELATIONS C Title: D my initiates masculinity by altering Gsdf / Sox9a2 / Rspo1 expression in medaka (Oryzias latipes).
- CHANG X, XU X, MA J, XUE X, LI Z, DENG P, ZHANG S, ZHI Y, CHEN J, DAI D (2014). NDRG1 expression is related to the progression and prognosis of gastric cancer patients through modulating proliferation, invasion and cell cycle of gastric cancer cells. *Mol Biol Rep* 41: 6215–6223.
- CHENG J, XIE HY, XU X, WU J, WEI X, SU R, ZHANG W, LV Z, ZHENG SHUSEN S, ZHOU L (2011). NDRG1 as a biomarker for metastasis, recurrence and of poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 310: 35–45. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.001.
- CHU D, ZHANG Z, ZHOU Y, LI Y, ZHU S, ZHANG J, ZHAO Q, JI G, WANG W, ZHENG J (2015). NDRG4, a novel candidate tumor suppressor, is a predictor of overall survival of colorectal cancer patients. *Oncotarget* 6: 7584–7596.
- CROESSMANN S, WONG HY, ZABRANSKY DJ, CHU D, MENDONCA J, SHARMAA A, MOHSENI M, ROSEN DM, SCHARPF RB, CIDADO J, et al. (2015). NDRG1 links p53 with proliferation-mediated centrosome homeostasis and genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 11583–11588.
- CUTTING A, CHUE J, SMITH C a. (2013). Just how conserved is vertebrate sex determination? *Dev Dyn* 242: 380–387.
- DEFALCO T, CAPEL B (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 457–482.
- DINARDO S, OKEGBE T, WINGERT L, FREILICH S, TERRY N (2011). Lines and bowl affect the specification of cyst stem cells and niche cells in the Drosophila testis.

  \*Development 138: 1687–1696.
- DING W, ZHANG J, YOON JG, SHI D, FOLTZ G, LIN B (2012). NDRG4 is downregulated in glioblastoma and inhibits cell proliferation. *Omi A J Integr Biol* 16: 263–267.
- DITEWIG AC, YAO HHC (2005). Organogenesis of the ovary: A comparative review on vertebrate ovary formation. *Organogenesis* 2: 36–41.

- EBERHARD WG (2009). Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. 106: 10025–10032.
- EDVARDSEN RB, LEININGER S, KLEPPE L, SKAFTNESMO KO, WARGELIUS A (2014). Targeted mutagenesis in atlantic salmon (Salmo salar L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 Generation. *PLoS One* 9.
- ELKOUBY YM, MULLINS MC (2017). Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis New findings from early vertebrate oogenesis. *Dev Biol* 430: 275–287. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.06.029.
- EWEN KA, KOOPMAN P (2010). Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* 323: 76–93. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.013.
- EXTAVOUR CG, AKAM M (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: Epigenesis and preformation. *Development* 130: 5869–5884.
- FANG BA, KOVAČEVIĆ Ž, PARK KC, KALINOWSKI DS, JANSSON PJ, LANE DJR, SAHNI S, RICHARDSON DR (2014). Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1845: 1–19.
- FERNANDINO JI, POPESKU JT, PAUL-PRASANTH B, XIONG H, HATTORI RS, OURA M, STRÜSSMANN CA, SOMOZA GM, MATSUDA M, NAGAHAMA Y, TRUDEAU VL (2011). Analysis of sexually dimorphic expression of genes at early gonadogenesis of pejerrey odontesthes bonariensis using a heterologous microarray. *Sex Dev* 5: 89–101.
- FINDLAY JK, HUTT KJ, HICKEY M, ANDERSON RA (2015). How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol Reprod* 93: 1–7.
- FREEBERG TM (2000). Culture and courtship in vertebrates: a review of social learning and transmission of courtship systems and mating patterns. 51: 177–192.
- FUJIMOTO S, KAWAJIRI M, KITANO J, YAMAHIRA K (2014). Female Mate Preference for Longer Fins in Medaka. *Zoolog Sci* 31: 703–708.
- GONZÁLEZ A, FERNANDINO JI, SOMOZA GM (2014). Effects of 5α-dihydrotestosterone on expression of genes related to steroidogenesis and spermatogenesis during the sex determination and differentiation periods of the pejerrey, Odontesthes bonariensis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 182C: 1–7. Available at:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499236.
- GRIER HJ (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Integr Comp Biol* 21: 345–357.
- GUO B, WAGNER A, HE S (2011). Duplicated Gene Evolution Following Whole-Genome Duplication in Teleost Fish. *Gene Duplic*.
- HANSEN D, SCHEDL T (2006). The Regulatory Network Controlling the Proliferation-Meiotic Entry Decision in the Caenorhabditis elegans Germ Line. *Curr Top Dev Biol* 76: 185–215.
- HATTORI RS, CASTAÑEDA-CORTÉS DC, ARIAS PADILLA LF, STROBL-MAZZULLA PH, FERNANDINO JI (2020). Activation of stress response axis as a key process in environment-induced sex plasticity in fish. *Cell Mol Life Sci.* Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-020-03532-9.
- HINNANT TD, ALVAREZ AA, ABLES ET (2017). Temporal remodeling of the cell cycle accompanies differentiation in the Drosophila germline. *Dev Biol* 429: 118–131. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.001.
- HIRAKI-KAJIYAMA T, YAMASHITA J, YOKOYAMA K, KIKUCHI Y, NAKAJO M, MIYAZOE D, NISHIIKE Y, ISHIKAWA K, HOSONO K, KAWABATA-SAKATA Y, ANSAI S, KINOSHITA M, NAGAHAMA Y, OKUBO K (2019). Neuropeptide B mediates female sexual receptivity in medaka fish, acting in a female-specific but reversible manner. *Elife* 8: 1–28.
- HOLE W (1981). Oocyte Growth in Teleosts 1. 343: 325–343.
- HOU W, HU J, LI Y, ZHAO J, LI Z, LIU X, YAO L, ZHANG Y (2010). Altered Expression of NDRG2 in the Testes of Experimental Rat Model of Cryptorchidism. *Urology* 75: 985–991. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2009.05.032.
- HOU WG, ZHAO Y, SHEN L, ZHAO J, LIU XW, LI Z, LIU XP, YAO LB, ZHANG YQ (2009). Differential expression of N-Myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) in the rat testis during postnatal development. *Cell Tissue Res* 337: 257–267.
- HUTSON JM, GROVER SR, O'CONNELL M, PENNELL SD (2014). Malformation syndromes associated with disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol* 10: 476–487. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.83.
- HWANG J, KIM Y, KANG HB, JAROSZEWSKI L, DEACON AM, LEE H, CHOI WC, KIM KJ, KIM CH, KANG BS, LEE JO, OH TK, KIM JW, WILSON I a., KIMA MH (2011).

- Crystal structure of the human N-Myc downstream-regulated gene 2 protein provides insight into its role as a tumor suppressor. *J Biol Chem* 286: 12450–12460.
- INABA M, YUAN H, YAMASHITA YM (2011). String (Cdc25) regulates stem cell maintenance, proliferation and aging in Drosophila testis. *Development* 138: 5079–5086.
- ISOE Y, KONAGAYA Y, YOKOI S, KUBO T, TAKEUCHI H (2016). Ontogeny and Sexual Differences in Swimming Proximity to Conspecifics in Response to Visual Cues in Medaka Fish. *Zoolog Sci* 33: 246.
- ISHIKAWA Y, YOSHIMOTO M, ITO H. (1999) A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. Fish Biol J Medaka 10:1–26.
- IWAI T, YOSHII A, YOKOTA T, SAKAI C, HORI H, KANAMORI A, YAMASHITA M (2006). Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish Oryzias latipes. *Exp Cell Res* 312: 2528–2537.
- IWAMATSU T (2004). Stages of normal development in the medaka Oryzias latipes. *Mech Dev* 121: 605–618.
- IWAMATSU T, NAKASHIMA S (1996). Dynamic growth of oocytes of the medaka, Oryzias latipes I. A relationship between establishment of the animal-vegetal axis of the oocyte and its surrounding granulosa cells. *Zoolog Sci* 13: 873–882.
- IWASAKI Y, OHKAWA K, SADAKATA H, KASHIWADATE A, TAKAYAMA-WATANABE E, ONITAKE K, WATANABE A (2009). Two states of active spermatogenesis switch between reproductive and non-reproductive seasons in the testes of the medaka, Oryzias latipes. *Dev Growth Differ* 51: 521–532.
- JENKINS AB, MCCAFFERY JM, VAN DOREN M (2003). Drosophila E-cadherin is essential for proper germ cell-soma interaction during gonad morphogenesis. *Development* 130: 4417–4426.
- JONES AG, RATTERMAN NL (2009). Mate choice and sexual selection: What have we learned since Darwin? 106: 10001–10008.
- KANUGA MK, BENNER MJ, DOBLE JA, WILSON-LEEDY JG, ROBISON BD, INGERMANN RL (2011). Effect of aging on male reproduction in zebrafish (Danio rerio). *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 315 A: 156–161.
- KASAHARA M, NARUSE K, SASAKI S, NAKATANI Y, QU W, AHSAN B, YAMADA T,

- NAGAYASU Y, DOI K, KASAI Y, et al. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447: 714–719.
- KATHLEEN MOLYNEAUX AND CHRISTOPHER WYLIE (2004). Primordial Germ Cell Migration. *Xenopus Dev* 9781118492: 189–198.
- KELLY CD, JENNIONS MD (2011). Sexual selection and sperm quantity: Meta-analyses of strategic ejaculation. *Biol Rev* 86: 863–884.
- KIKUCHI M, NISHIMURA T, ISHISHITA S, MATSUDA Y, TANAKA M (2020). Foxl3, a sexual switch in germ cells, initiates two independent molecular pathways for commitment to oogenesis in medaka. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 201918556.
- KIKUCHI M, NISHIMURA T, SAITO D, SHIGENOBU S, TAKADA R, GUTIERREZ-TRIANA JA, CERDÁN JLM, TAKADA S, WITTBRODT J, SUYAMA M, TANAKA M (2019). Novel components of germline sex determination acting downstream of foxl3 in medaka. *Dev Biol* 445: 80–89. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.10.019.
- KIKUCHI Y, HIRAKI-KAJIYAMA T, NAKAJO M, UMATANI C, KANDA S, OKA Y, MATSUMOTO K, OZAWA H, OKUBO K (2019). Sexually Dimorphic neuropeptide b neurons in medaka exhibit activated cellular phenotypes dependent on estrogen. *Endocrinology* 160: 827–839.
- KIM YJ, YOON SY, KIM J-T, CHOI SC, LIM J-S, KIM JH, SONG EY, LEE HG, CHOI I, KIM JW (2009). NDRG2 suppresses cell proliferation through down-regulation of AP-1 activity in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 124: 7–15.
- KINOSHITA M, MURATA K, NARUSE K, TANAKA M (2012a). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Ed. John Wiley and Sons. John Wiley & Sons,

  Ltd., Ames, Iowa, USA.
- KINOSHITA M, MURATA K, NARUSE K, TANAKA M (2012b). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*.
- KOBAYASHI T, MATSUDA M, KAJIURA-KOBAYASHI H, SUSUKI A, SAITO N, NAKAMOTO M, SHIBATA N, NAGAHAMA Y (2004). Two DM domain genes, DMY DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the Medaka, Oryzias latipes. *Dev Dyn* 231: 518–526.
- KOOPMAN P et al (1991). development of chromosomally female mice transgenic for Sry. 351: 1996.

- KOUBOVA J, MENKE DB, ZHOU Q, CAPEL B, GRISWOLD MD, PAGE DC (2006).

  Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2474–2479.
- KOVACEVIC Z, CHIKHANI S, LUI GYL, SIVAGURUNATHAN S, RICHARDSON DR (2013). The iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 targets NEDD4L, PTEN, and SMAD4 and inhibits the PI3K and ras signaling pathways. *Antioxidants Redox Signal* 18: 874–887.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16958–16963.
- KYUNO JI, FUKUI A, MICHIUE T, ASASHIMA M (2003). Identification and characterization of Xenopus NDRG1. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 52–57.
- LACERDA SM dos SN, COSTA GMJ, DE FRANÇA LR (2014). Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen Comp Endocrinol* 207: 56–65. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.018.
- LEE DC, SOHN HA, PARK KC, YEOM Y II, LEE DC, SOHN HA, PARK Z, OH S, KANG YK, LEE K, KANG M (2015). Article A Lactate-Induced Response to Hypoxia Article A Lactate-Induced Response to Hypoxia. *Cell* 161: 595–609.
- LEE GY, CHUN YS, SHIN HW, PARK JW (2016). Potential role of the N-MYC downstream-regulated gene family in reprogramming cancer metabolism under hypoxia. *Oncotarget* 7: 57442–57451.
- LEI L, SPRADLING Allan C (2013). Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 8585–8590.
- LEI L, SPRADLING Allan C. (2013). Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. *Dev* 140: 2075–2081.
- LI M, HONG N, XU H, YI M, LI C, GUI J, HONG Y (2009). Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mech Dev* 126: 366–381. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2009.02.004.
- LI M, ZHAO H, WEI J, ZHANG J, HONG Y (2015). Medaka vasa gene has an exonic enhancer for germline expression. *Gene* 555: 403–408. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111914013018.

- LI R, YU C, JIANG F, GAO L, LI J, WANG Y, BECKWITH N, YAO L, ZHANG J, WU G (2013). Overexpression of N-Myc Downstream-Regulated Gene 2 (NDRG2) Regulates the Proliferation and Invasion of Bladder Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 8: 1–14.
- LI S, HUANG SM, LIM J, KIM J (2008). Expression profiling of the differentiation related protein N-myc downstream regulated gene 2 in normal human tissues. : 77–82.
- LI T, HU J, HE GH, LI Y, ZHU CC, HOU WG, ZHANG S, LI W, ZHANG JS, WANG Z, LIU XP, YAO LB, ZHANG YQ (2012). Up-regulation of NDRG2 through nuclear factor-kappa B is required for Leydig cell apoptosis in both human and murine infertile testes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1822: 301–313. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.013.
- LUBZENS E, YOUNG G, BOBE J, CERDÀ J (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165: 367–389. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022.
- MABLE BK, ALEXANDROU MA, TAYLOR MI (2011). Genome duplication in amphibians and fish: An extended synthesis. *J Zool* 284: 151–182.
- MANK JE, AVISE JC (2009). Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sex Dev* 3: 60–67.
- MATSUDA M (2005). Sex determination in the teleost medaka, Oryzias latipes. *Annu Rev Genet* 39: 293–307.
- MATSUDA M, NAGAHAMA Y, SHINOMIYA A, SATO T, MATSUDA C, KOBAYASHI T, MORREY CE, SHIBATA N, ASAKAWA S, SHIMIZU N, HORI H, HAMAGUCHI S, SAKAIZUMI M (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559–563.
- MATTA SLP, VILELA DAR, GODINHO HP, FRANÇA LR (2002). The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: The tilapia (Oreochromis niloticus) model. *Endocrinology* 143: 970–978.
- MCCAIG C, POTTER L, ABRAMCZYK O, MURRAY JT (2011). Phosphorylation of NDRG1 is temporally and spatially controlled during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 227–234. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.092.
- MCCARTHY MM, ARNOLD AP (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14: 677–683.

- MCCARTHY MM, ARNOLD AP, BALL GF, BLAUSTEIN JD, DE VRIES GJ (2012). Sex differences in the brain: The not so inconvenient truth. *J Neurosci* 32: 2241–2247.
- MCLAREN A (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* 163: 3–9.
- MELOTTE V, LENTJES MHFM, VAN DEN BOSCH SM, HELLEBREKERS DMEI, DE HOON JPJ, WOUTERS KAD, DAENEN KLJ, PARTOUNS-HENDRIKS IEJM, STESSELS F, LOUWAGIE J, et al. (2009). N-Myc Downstream-Regulated Gene 4 (NDRG4): A Candidate Tumor Suppressor Gene and Potential Biomarker for Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 916–927.
- MELOTTE V, QU X, ONGENAERT M, VAN CRIEKINGE W, DE BRUÏNE AP, BALDWIN HS, VAN ENGELAND M (2010). The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. *FASEB J* 24: 4153–4166.
- MITCHELL K, ZHANG WS, LU C, TAO B, CHEN L, HU W, TRUDEAU VL (2020). Targeted mutation of secretogranin-2 disrupts sexual behavior and reproduction in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci* 117: 12772 LP 12783.
- MORINAGA C, SAITO D, NAKAMURA S, SASAKI T, ASAKAWA S, SHIMIZU N, MITANI H, FURUTANI-SEIKI M, TANAKA M, KONDOH H (2007). The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9691–9696.
- MUNAKATA A, KOBAYASHI M (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 456–468.
- NAKAMOTO M, MURAMATSU S, YOSHIDA S, MATSUDA M, NAGAHAMA Y, SHIBATA N (2009). Gonadal sex differentiation and expression of Sox9a2, Dmrt1, and Foxl2 in Oryzias Iuzonensis. *Genesis* 47: 289–299.
- NAKAMURA S, KOBAYASHI D, AOKI Y, YOKOI H, EBE Y, WITTBRODT J, TANAKA M (2006). Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Dev Biol* 295: 678–688.
- NAKAMURA S, KOBAYASHI K, NISHIMURA T, HIGASHIJIMA SI, TANAKA M (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science (80-)* 328: 1561–1563.
- NAKAMURA S, KOBAYASHI K, NISHIMURA T, TANAKA M (2011). Ovarian germline

- stem cells in the teleost fish, medaka (Oryzias latipes). *Int J Biol Sci* 7: 403–409.
- NAKAMURA S., WATAKABE I, NISHIMURA T, PICARD J-Y, TOYODA a., TANIGUCHI Y, DI CLEMENTE N, TANAKA M (2012). Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Mullerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. Development 139: 2283–2287.
- NAKAMURA Shuhei, WATAKABE I, NISHIMURA T, PICARD JY, TOYODA A, TANIGUCHI Y, DI CLEMENTE N, TANAKA M (2012). Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Dev* 139: 2283–2287.
- NANDA I, KONDO M, HORNUNG U, ASAKAWA S, WINKLER C, SHIMIZU A, SHAN Z, HAAF T, SHIMIZU N, SHIMA A, SCHMID M, SCHARTL M (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, Oryzias latipes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11778–11783.
- NARBONNE-REVEAU K, BESSE F, LAMOUR-ISNARD C, BUSSON D, PRET AM (2006). fused regulates germline cyst mitosis and differentiation during Drosophila oogenesis. *Mech Dev* 123: 197–209.
- NGAMNIYOM, A., MAGTOON, W., NAGAHAMA, Y., & SASAYAMA, Y. (2009). Expression levels of hormone receptors and bone morphogenic protein in fins of medaka. *Zool Sci*, 26(1), 74–79.
- NISHIMURA T, NAKAMURA S, TANAKA M (2016). A structurally and functionally common unit in testes and ovaries of medaka (oryzias latipes), a teleost fish. *Sex Dev* 10: 159–165.
- NISHIMURA T, SATO T, YAMAMOTO Y, WATAKABE I, OHKAWA Y, SUYAMA M, KOBAYASHI S, TANAKA M (2015). Foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. *Science* (80-) 349: 328–331.
- NISHIMURA T, TANAKA M (2014). Gonadal development in fish. Sex Dev 8: 252–261.
- NISHIMURA T, YAMADA K, FUJIMORI C, KIKUCHI M, KAWASAKI T, SIEGFRIED KR, SAKAI N, TANAKA M (2018). Germ cells in the teleost fish medaka have an inherent feminizing effect. *PLoS Genet* 14: 1–18.
- NOBREGA RH, GREEBE CD, VAN DE KANT H, BOGERD J, DE FRANÇA LR, SCHULZ RW (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in

- zebrafish. PLoS One 5: 1-16.
- NORIYUKI SATOH, EGAMI N (1972). Sex differentiation of germ cells in the teleost, Oryzias latipes, during normal embryonic development. *Embryol Exp Morph* 28: 385–395.
- OHMURO-MATSUYAMA Y, MATSUDA M, KOBAYASHI T, IKEUCHI T, NAGAHAMA Y (2003). Expression of DMY and DMTR1 in Various Tissues of the Medaka (Oryzias latipes). *Zoolog Sci* 20: 1395–1398.
- OKUYAMA T, YOKOI S, ABE H, ISOE Y, SUEHIRO Y, IMADA H, TANAKA M, KAWASAKI T, YUBA S, TANIGUCHI Y, KAMEI Y, OKUBO K, SHIMADA A, NARUSE K, TAKEDA H, OKA Y, KUBO T, TAKEUCHI H (2014). A neural mechanism underlying mating preferences for familiar individuals in medaka fish. *Science* (80-) 343: 91–94.
- OKUYAMA T, YOKOI S, TAKEUCHI H (2017). Molecular basis of social competence in medaka fish. *Dev Growth Differ* 59: 211–218.
- ONO Y, UEMATSU T (1957). Mating Ethogram in Oryzias latipes. *J Fac Sci HOKKAIDO Univ Ser VI Zool* 13: 197–202.
- OSHIMA Y, KANG IJ, KOBAYASHI M, NAKAYAMA K, IMADA N, HONJO T (2003). Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to 17β-estradiol. *Chemosphere* 50: 429–436.
- OTA S, HISANO Y, MURAKI M, HOSHIJIMA K, DAHLEM TJ, GRUNWALD DJ, OKADA Y, KAWAHARA A (2013). Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays. : 1–9.
- PAN H, ZHANG X, JIANG H, JIANG X, WANG L, QI Q, BI Y, WANG J, SHI Q, LI R (2017). Ndrg3 gene regulates DSB repair during meiosis through modulation the ERK signal pathway in the male germ cells. *Sci Rep* 7: 1–14.
- PAPAGIANNOULI F, MECHLER BM (2009). Discs large regulates somatic cyst cell survival and expansion in drosophila testis. *Cell Res* 19: 1139–1149.
- PARENTI LR, GRIER HJ (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol* 44: 333–348.
- PARKER GA, PIZZARI T (2010). Sperm competition and ejaculate economics. *Biol Rev* 85: 897–934.
- PATIL JG, HINZE SJ (2008). Simplex PCR assay for positive identification of genetic sex in the

- Japanese medaka, Oryzias latipes. Mar Biotechnol 10: 641–644.
- PEPLING ME (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *genesis* 44: 622–632.
- PFAFFL MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886.
- PORAZINSKI SR, WANG H, FURUTANI-SEIKI M (2010). Dechorionation of medaka embryos and cell transplantation for the generation of chimeras. *J Vis Exp*: 1–5.
- QIN X, MA X, LIANG J, TU D, LUO Z, HUANG J, MO C (2017). Profiles of brain central nervous system gene expression associated with ejaculation behavior in male rats. *Behav Brain Res* 324: 21–29. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.047.
- QU X, ZHAI Y, WEI H, ZHANG C, XING G, YU Y, HE F (2002). Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem* 229: 35–44.
- QU YH, JIAN LY, CE L, MA Y, XU CC, GAO YF, MACHATY Z, LUO HL (2019).

  Identification of candidate genes in regulation of spermatogenesis in sheep testis following dietary vitamin E supplementation. *Anim Reprod Sci* 205: 52–61.
- RAZ E (2003). Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. *Nat Rev Genet* 4: 690–700.
- RICHARDSON BE, LEHMANN R (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 37–49. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrm2815.
- ROYAN, M. R., KANDA, S., KAYO, D., SONG, W., GE, W., WELTZIEN, F.-A., & FONTAINE, R. (2020). Gonadectomy and Blood Sampling Procedures in the Small Size Teleost Model Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *JoVE*, 166, e62006.
- 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. *Dev Biol* 310: 280–290.
- SAITO T, FUJIMOTO T, MAEGAWA S, INOUE K, TANAKA M, ARAI K, YAMAHA E (2006). Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int J*

- Dev Biol 50: 691–700.
- SASADO T, YASUOKA A, ABE K, MITANI H, FURUTANI-SEIKI M, TANAKA M, KONDOH H (2008). Distinct contributions of CXCR4b and CXCR7/RDC1 receptor systems in regulation of PGC migration revealed by medaka mutants kazura and yanagi. *Dev Biol* 320: 328–339.
- SATO T, SUZUKI A, SHIBATA N, SAKAIZUMI M, HAMAGUCHI S (2008). The novel mutant scl of the medaka fish, Oryzias latipes, shows no secondary sex characters. *Zoolog Sci* 25: 299–306.
- SAWAMURA R, OSAFUNE N, MURAKAMI T, FURUKAWA F, KITANO T (2017). Generation of biallelic F0 mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system. *Genes to Cells* 22: 756–763.
- SCHARTL M (2004). A comparative view on sex determination in medaka. *Mech Dev* 121: 639–645.
- SCHONKEREN SL, MASSEN M, HORST R Van Der, KOCH A, VAES N, MELOTTE V (2019). Nervous NDRGs: the N-myc downstream regulated gene family in the central and peripheral nervous system.: 173–186.
- SCHULZ RW, DE FRANÇA LR, LAREYRE JJ, LEGAC F, CHIARINI-GARCIA H, NOBREGA RH, MIURA T (2010a). Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 390–411. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013.
- SCHULZ RW, DE FRANÇA LR, LAREYRE JJ, LEGAC F, CHIARINI-GARCIA H, NOBREGA RH, MIURA T (2010b). Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 390–411. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013.
- SEKII K, VIZOSO DB, KUALES G, MULDER K De, LADURNER P, SCHA L (2013).

  Phenotypic engineering of sperm- production rate confirms evolutionary predictions of sperm competition theory.
- SHAW E, MCCUE LA, LAWRENCE CE, DORDICK JS (2002). Identification of a novel class in the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily: The N-myc differentiation-related proteins. *Proteins Struct Funct Genet* 47: 163–168.
- SHIBATA Y, PAUL-PRASANTH B, SUZUKI A, USAMI T, NAKAMOTO M, MATSUDA M, NAGAHAMA Y (2010). Expression of gonadal soma derived factor (Gsdf) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr Patterns*

- 10: 283–289. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.gep.2010.06.005.
- 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. *Dev Growth Differ* 42: 317–326.
- STEMMER M, THUMBERGER T, DEL SOL KEYER M, WITTBRODT J, MATEO JL (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* 10: e0124633.
- STÉVANT I, NEF S (2019). Genetic Control of Gonadal Sex Determination and Development. Trends Genet 35: 346–358.
- SUN J, ZHANG D, BAE DH, SAHNI S, JANSSON P, ZHENG Y, ZHAO Q, YUE F, ZHENG M, KOVACEVIC Z, RICHARDSON DR (2013). Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors. *Carcinogenesis* 34: 1943–1954.
- TANAKA M (2019). *Regulation of germ cell sex identity in medaka*, 1st ed. Elsevier Inc. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.010.
- TANAKA M (2014). Vertebrate female germline-the acquisition of femaleness. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3: 231–238.
- TANAKA M, KINOSHITA M, KOBAYASHI D, NAGAHAMA Y (2001). Establishment of medaka (Oryzias latipes) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2544–2549.
- TREJO-SÁNCHEZ I, PÉREZ-MONTER C, HUERTA-PACHECO S, GUTIÉRREZ-OSPINA G (2020). Male Ejaculatory Endophenotypes: Revealing Internal Inconsistencies of the Concept in Heterosexual Copulating Rats. *Front Behav Neurosci* 14.
- TSUTSUI K, UBUKA T (2020). Discovery of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), progress in GnIH research on reproductive physiology and behavior and perspective of GnIH research on neuroendocrine regulation of reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 514: 110914. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110914.
- UBUKA T, TRUDEAU VL, PARHAR I (2020). Editorial: Steroids and the Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 1–5.

- VOLFF JN, KONDO M, SCHARTL M (2003). Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet* 19: 196–199.
- WALTER RO, HAMILTON JB (1970). Head-up movements as an indicator of sexual unreceptivity in female medaka, Oryzias latipes. *Anim Behav* 18: 125–127.
- WANG W, LI Yuhua, LI Yang, HONG A, WANG J, LIN B, LI R (2009). NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth. *Int J Cancer* 124: 521–530.
- WANG D, MANALI D, WANG T, BHAT N, HONG N, LI Z, WANG L, YAN Y, LIU R, HONG, Y. (2011). Identification of pluripotency genes in the fish medaka. Inter J Biol Sci, 7(4), 440.
- WEIR LK, GRANT JWA (2010). Courtship rate signals fertility in an externally fertilizing fish. *Biol Lett* 6: 727–731.
- WHITTLE CA, EXTAVOUR CG (2017). Causes and evolutionary consequences of primordial germ-cell specification mode in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 5784–5791.
- WHITTLE CA, EXTAVOUR CG (2016). Refuting the hypothesis that the acquisition of germ plasm accelerates animal evolution. *Nat Commun* 7: 1–11. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12637.
- WINDLEY SP, WILHELM D (2016). Signaling Pathways Involved in Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Sex Dev* 9: 297–315.
- WITTBRODT J, SHIMA A, SCHARTL M (2002). Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* 3: 53–64.
- WU AY, HU Y, CANG W, LI D, WANG WJ, TIAN Q, GU LY, ZHANG N, JI F, QIU LH (2019). Suppressive effect of microRNA-449a on the NDRG1/PTEN/AKT axis regulates endometrial cancer growth and metastasis. *Exp Cell Res* 382: 0–1. Available at: https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.013.
- XI R, PUN IHY, MENEZES S V., FOUANI L, KALINOWSKI DS, HUANG MLH, ZHANG X, RICHARDSON DR, KOVACEVIC Z (2017). Novel thiosemicarbazones inhibit lysine-rich carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) coisolated (LYRIC) and the LYRIC-induced epithelial-mesenchymal transition via upregulation of N-Myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1). *Mol Pharmacol* 91: 499–517.
- YAMASHITA J, TAKEUCHI A, HOSONO K, FLEMING T, NAGAHAMA Y, OKUBO K (2020). Male-predominant galanin mediates androgen-dependent aggressive chases in

- medaka. Elife 9: 1–26.
- YAN X, CHUA MS, SUN H, SO S (2008). N-Myc down-regulated gene 1 mediates proliferation, invasion, and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 262: 133–142.
- YANG CF, SHAH NM (2014). Representing Sex in the Brain, One Module at a Time. *Neuron* 82: 261–278.
- YANG X, AN L, LI X (2013). NDRG3 and NDRG4, two novel tumor-related genes. *Biomed Pharmacother* 67: 681–684. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2013.04.009.
- YOKOI S, NARUSE K, KAMEI Y, ANSAI S, KINOSHITA M, MITO M, IWASAKI S, INOUE S, OKUYAMA T, NAKAGAWA S, YOUNG LJ, TAKEUCHI H (2020). Sexually dimorphic role of oxytocin in medaka mate choice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 4802–4808.
- YOKOI S, OKUYAMA T, KAMEI Y, NARUSE K, TANIGUCHI Y, ANSAI S, KINOSHITA M, YOUNG LJ, TAKEMORI N, KUBO T, TAKEUCHI H (2015). An Essential Role of the Arginine Vasotocin System in Mate-Guarding Behaviors in Triadic Relationships of Medaka Fish (Oryzias latipes). *PLoS Genet* 11: 1–25.
- YOSHIZAKI G, TAKEUCHI Y, KOBAYASHI T, IHARA S, TAKEUCHI T (2002). Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. *Fish Physiol Biochem* 26: 3–12.
- YU C, HAO X, ZHANG S, HU W, LI J, SUN J, ZHENG M (2019). Characterization of the prognostic values of the NDRG family in gastric cancer. *Therap Adv Gastroenterol* 12: 4–6.
- ZHANG F, LIANG D, LIN X, ZOU Z, SUN R, WANG X, LIANG X, KAYE KM, LAN K (2019). NDRG1 facilitates the replication and persistence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by interacting with the DNA polymerase clamp PCNA.
- ZHANG X, GUAN G, LI M, ZHU F, LIU Q, NARUSE K, HERPIN A, NAGAHAMA Y, LI J, HONG Y (2016). Autosomal gsdf acts as a male sex initiator in the fish medaka. *Sci Rep* 6: 1–13. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/srep19738.
- ZHANG Z, HU J (2007). Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (Oryzias latipes) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. *Toxicol Sci* 95: 356–368.
- ZHAO W, TANG R, HUANG Y, WANG W, ZHOU Z, GU S, DAI J, YING K, XIE Y, MAO Y (2001). Cloning and expression pattern of the human NDRG3 gene. *Biochim Biophys Acta*

1519: 134–138.

ZHONG C, ZHOU YK, YANG SS, ZHAO JF, ZHU XL, CHEN ZH, CHEN PC, HUANG LQ, HUANG X (2015). Developmental expression of the N-myc downstream regulated gene (Ndrg) family during Xenopus tropicalis embryogenesis. *Int J Dev Biol* 59: 511–517.

Luisa Fernanda Arias Padilla - 2021

Este manuscrito corresponde a la versión final de la tesis de doctorado, la cual

incluye todas las correcciones sugeridas por las jurados, Dra. Fabiana Lo Nostro

(FCEyN-UBA), Dra. Andreina Cesari (Instituto UNMdP) y Dra. Gabriela Vanina

Villanova (UNR).

Luisa Arias Padilla Luisa Fernanda Arias Padilla

Tesista

Juan Ignacio Fernandino

**Director**