

DESXIFRANT LA BASE MOLECULAR DE LA FORMACIÓ DE L'OU EN ELS PEIXOS MARINS

JOAN CERDÀ

*Laboratori Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries,
Institut de Ciències del Mar (CSIC).*

Adreça per a la correspondència: Joan Cerdà. Laboratori IRTA, Institut de Ciències del Mar (CSIC). Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona.
Adreça electrònica: joan.cerda@irta.cat.

RESUM

La hidratació de l'òcit de peixos marins durant les darreres fases de la formació de l'ou és un factor crític per al desenvolupament i supervivència correctes de l'embrió. No obstant això, encara que s'ha avançat molt en el coneixement dels mecanismes que controlen la maduració meiòtica dels oòcits de peixos, els mecanismes moleculars implicats en la hidratació són molt desconeguts. En aquest treball es revisen estudis que han identificat els principals efectors osmòtics durant la hidratació de l'òcit de peixos, així com els darrers treballs que han descobert per primera vegada la funció d'un nou canal molecular d'aigua (aquaporina, AQP) durant aquest procés. El canal descobert, anomenat *aquaporina-1b* (Aqp1b), pertany a una nova subfamília d'AQP, similars a l'aquaporina-1 (AQP1) de mamífers, que ha evolucionat específicament en teleostis possiblement per duplicació gènica, seguida d'una divergència estructural de l'extrem carboxiterminal de la proteïna, amb adquisició de dominis reguladors del transport intracel·lular, i la neofuncionalització posterior en oòcits, per al transport d'aigua. Aquests estudis estan contribuint, per tant, a desxifrar la base molecular de la producció d'ous viables en peixos marins.

Paraules clau: teleostis, oòcit, hidratació, proteïnes del vitel, aquaporina.

SUMMARY

The hydration of the oocyte of marine fish during the last stages of egg formation is a critical factor for the correct development and survival of the embryo. However, although increasing information is available on the mechanisms that control meiotic maturation in fish oocytes, the identification of the molecular mechanisms involved in oocyte hydration remain elusive. In this work, I review the studies that have identified the main osmotic effectors playing a role during oocyte hydration, as well as recent works that have discovered

for first time the function of a novel molecular water channel (aquaporin, AQP) during this process. This channel, called aquaporin-1b (Aqp1b), belongs to a new subfamily of AQPs, similar to the mammalian aquaporin-1 (AQP1), that has evolved specifically in teleosts possibly by gene duplication, followed by structural divergence at the C terminus of the protein and acquisition of regulatory domains for the control of intracellular transport, and further neofunctionalization in oocytes for water uptake. These studies are thus contributing to uncover the molecular basis of the production of viable eggs in marine fish.

Key words: teleosts, oocyte, hydration, yolk proteins, aquaporin.

INTRODUCCIÓ

Com en altres vertebrats inferiors, els oòcits de teleostis passen una sèrie d'etapes de desenvolupament dins de l'ovari, que culminen eventualment en la producció d'un gàmeta femení madur o ou. Durant la majoria d'aquest temps la meiosi en els oòcits està detinguda en la profase I, i les despeses energètiques es concentren en la síntesi i la incorporació de diverses substàncies (p. ex., la vitellogenina) que són essencials per al desenvolupament tant de l'oòcit com del futur embrió. Després d'aquesta etapa de creixement de l'oòcit, la meiosi és activada per senyals hormonals, i llavors es «trenca» el nucli de l'oòcit, la meitat dels cromosomes són eliminats en un petit corpuscle polar mitjançant la citocinesi, i la resta s'alinea en una segona metafase meiótica en el pol animal. Durant aquest procés, anomenat *maduració meiótica*, o simplement *maduració*, generalment té lloc l'ovulació, és a dir, l'alliberament de l'oòcit madur de les capes de cèl·lules somàtiques (fol·liculars) que l'envolten. Poc després, arriba la segona metafase meiótica, i aleshores l'oòcit esdevé capaç de ser fertilitzat i, per tant, es converteix en un ou.

Els oòcits de teleostis marins experimenten un augment de volum molt significatiu com a conseqüència de l'entrada massiva d'aigua durant el procés de maduració meiótica. Aquest mecanisme fisiològic de teleostis marins, únic entre vertebrats, co-

negut com *hidratació de l'oòcit*, va ser descrit fa més de cent anys (Fulton, 1898), encara que els mecanismes moleculars i cel·lulars implicats han estat ignorats durant molt de temps. No obstant això, ara es reconeix que aquest procés té implicacions fisiològiques i ecològiques molt importants, especialment en teleostis pelàgics, en els quals l'alt contingut en aigua dels ous contribueix a la flotabilitat en aigua de mar, fet que facilita l'intercanvi d'oxigen amb l'atmosfera i la dispersió dels ous i embrions en l'oceà, i això n'augmenta la supervivència (Craik i Harvey, 1987; Mellinger, 1994; Nissling *et al.*, 2003). Tanmateix, l'elevada hidratació dels ous i embrions de peixos marins, encara que necessària per al seu desenvolupament, complica enormement els mètodes de congelació (criopreservació), i aquesta és una de les raons que han fet que aquests mètodes, que facilitarien la creació de bancs genètics i programes de selecció genètica en peixos, no hagin estat encara desenvolupats. Per tant, el procés d'hidratació de l'oòcit de peixos té també un gran interès en biotecnologia i aqüicultura.

Durant els últims anys una quantitat considerable d'estudis han contribuït notablement al coneixement dels mecanismes que creen les condicions osmòtiques necessàries en l'oòcit de peixos marins per a l'entrada d'aigua. No obstant això, no ha estat fins recentment que han estat esbrinats els mecanismes cel·lulars responsables del ràpid transport d'aigua a l'oòcit, i això ha forn-

informació nova sobre la base molecular de la formació dels ous de peixos marins. En aquest treball, tots aquests estudis són revisats, i es presenten dades recents que suggereixen per primera vegada que la hidratació de l'oòcit de peixos durant la maduració és, de fet, un procés altament controlat.

MADURACIÓ I HIDRATACIÓ DE L'OÒCIT DELS PEIXOS

La maduració dels oòcits en els peixos està regulada pels esteroides inductors de la maduració (MIS), com la $17\alpha,20\beta$ -dihidroxioprogesterona, la qual és produïda per les cèl·lules fol·liculars que envolten l'oòcit en resposta a l'hormona luteïnizant (LH). El MIS interacciona amb un receptor de membrana de l'oòcit i estimula les vies intracel·lulars que provoquen l'activació de la meiosi mitjançant l'activació del factor promotor de la maduració (MPF) (revisat per Suwa i Yamashita, 2007). A diferència d'altres vertebrats, el 67-75 % del volum final de l'ou dels teleostis s'obté durant la maduració, a causa de la captació d'aigua (vegeu la figura 1). El contingut en aigua dels oòcits madurs en les espècies que produeixen ous molt hidratats i flotants (ous pelàgics), que s'anomenen *pelagòfiles* (pràcticament només espècies marines), pot contribuir fins al 90-95 % del seu pes. Les espècies que produeixen ous poc hidratats, amb una flotabilitat nul·la o molt reduïda (demersals) es denominen *bentòfiles* (espècies d'aigua dolça i algunes espècies marines).

Els aminoàcids lliures com a efectors osmòtics

Fa aproximadament vint anys, Wallace *et al.* van descriure per primera vegada en el fúndul (*Fundulus heteroclitus*) el procés d'hi-

dròlisi de les proteïnes del vitel de l'oòcit, que ocorre específicament durant la maduració i hidratació (Wallace i Selman, 1985; Wallace i Begovac, 1985). Aquest mecanisme d'hidròlisi, únic en vertebrats ovípars, s'ha observat després en moltes altres espècies de teleostis (vegeu la figura 2), però és especialment més pronunciat en les espècies pelagòfiles marines (revisat per Cerdà *et al.*, 2007). Thorsen *et al.* (1996) van observar que existeix un perfil similar d'abundància d'aminoàcids entre els aminoàcids lliures disponibles (*free amino acids*, FAA) dels ous i algunes proteïnes del vitel de l'oòcit, fet que indica que els FAA s'originen molt probablement a partir d'aquestes proteïnes. En algunes espècies s'ha demostrat que els processos d'hidròlisi i acumulació de FAA tenen una correlació positiva amb el contingut d'aigua dels ous, i això confirma el paper dels FAA com a efectors osmòtics durant la hidratació de l'oòcit (Cerdà *et al.*, 2007). Hi ha, a més, una sèrie d'evidències que donen suport a aquesta hipòtesi. En primer lloc, s'ha observat que algunes espècies pelagòfiles que viuen en zones del mar Bàltic amb salinitat oscil·lant poden ajustar la flotabilitat dels ous mitjançant el control de la hidròlisi del vitel i la consegüent producció de FAA, i d'aquesta manera es regula la hidratació i la flotabilitat dels ous (Thorsen *et al.*, 1996). En segon lloc, els ous no flotants de peixos pelagòfils que es produeixen sovint quan s'indueix la reproducció mitjançant tractaments hormonal mostren un contingut menor de FAA i aigua que els ous flotants (p. ex., Seoka *et al.*, 2003). Finalment, s'ha demostrat que la inhibició de la hidròlisi del vitel durant la maduració *in vitro* de l'oòcit bloca la producció de FAA i redueix la hidratació (Selman *et al.*, 2001; Fabra *et al.*, 2006) (vegeu la figura 3). No obstant això, cal assenyalar que generalment només la meitat de l'osmolaritat dels ous pelàgics pot ser atribuïda als

FAA i, per tant, l'acumulació d'altres compostos de baix pes molecular podria tenir també una funció osmòtica (vegeu més endavant).

Processament de les proteïnes del vitel

En teleostis, igual que en altres vertebrats ovípars, la vitellogenina (Vg) és produïda en el fetge en resposta a estrògens, secretada a la circulació sanguínia i incorporada per l'oòcit mitjançant un procés d'endocitosi mitjançada per receptor, seguida del processament en proteïnes del vitel (revisat per Babin *et al.*, 2007). La seqüència d'aminoàcids de les Vg pot dividir-se en una sèrie de dominis localitzats de manera lineal en la seqüència: NH₂-cadena pesada de lipovitellina (LvH)-fosvitina (domini poliserina)-cadena lleugera de lipovitellina (LvL)-component β'(β'-C)-COOH (vegeu la figura 4a). Cadascun dels dominis de les Vg

correspon a les diferents proteïnes del vitel, lipovitellines (lipoproteïnes), fosvitines i fosvetes (proteïnes molt fosforilades) i el β'-C, les quals són emmagatzemades per l'oòcit en grànuls o glòbuls distribuïts pel citoplasma. Estudis recents indiquen que en teleostis i altres vertebrats inferiors existeixen almenys tres Vg diferents, una sense el domini fosvitina, i totes són incorporades per l'oòcit.

Durant la maduració de l'oòcit de teleostis marins les proteïnes del vitel són processades una vegada més, i generen FAA i pèptids petits. Durant aquest procés els glòbuls de vitel es fusionen i formen eventualment una gran massa central de vitel líquid. Al mateix temps les estructures cristal·lines dels glòbuls de vitel es disgreguen, fet que confereix als oòcits madurs la característica transparència (vegeu la figura 1, estat 4). La hidròlisi de les proteïnes del vitel durant la maduració de l'oòcit, però, és diferent per a cada tipus de proteïna (Cerdà *et*

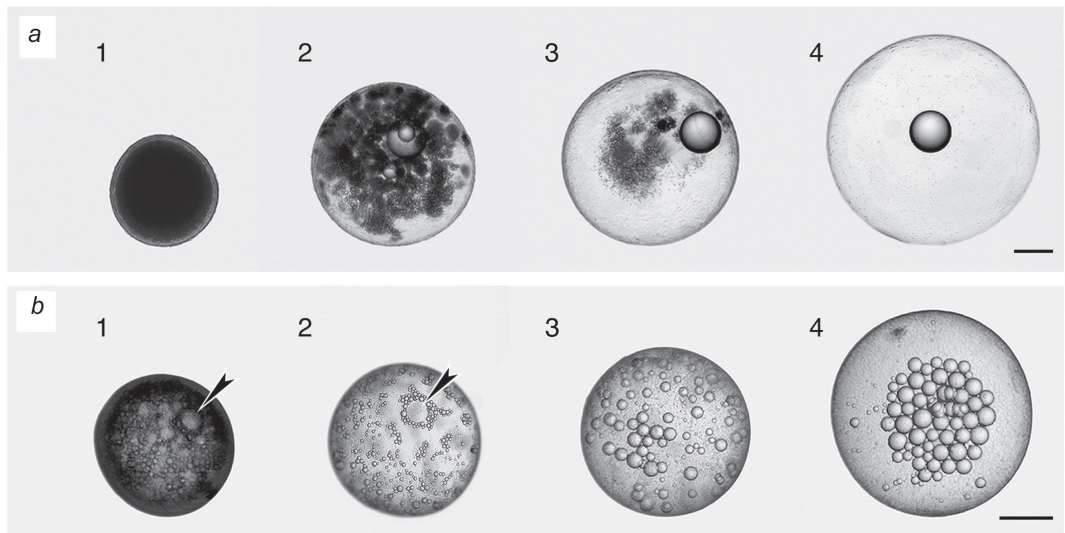


FIGURA 1. Fotografies de fol·licles ovàrics (oòcits envoltats de les cèl·lules fol·liculars) de teleostis durant la maduració. a) Fol·licles d'una espècie pelagòfila, l'orada (*Sparus aurata*) (barra: 200 µm); b) fol·licles d'una espècie bentòfila, el fúndul (*Fundulus heteroclitus*); la fletxa indica el nucli de l'oòcit (barra: 500 µm). 1: oòcits postvitel·logènics just abans de la maduració; 2-3: oòcits en maduració; 4: oòcits madurs abans de l'ovulació.

al., 2007). En l'òocit postvitel·logènic d'espècies pelagòfiles, existeixen dues molècules de LvH, LvH1 i LvH2, derivades de la Vg1

i la Vg2 (també denominades VgA i VgB), respectivament (vegeu la figura 4b). Durant la maduració de l'òocit la proteïna LvH2 és dissociada en dos monòmers, mentre que la LvH1 és hidrolitzada completament per produir FAA. Les fosvitines i el β -C són també molt degradats durant la maduració, mentre que les LvL1 i LvL2 són només hidrolitzades parcialment. D'aquesta manera, la degradació de la LvH1 contribueix fonamentalment a la disponibilitat de FAA emprats per a la hidratació de l'òocit, mentre que les LvH2 i la LvL romanen emmagatzemades en l'òocit, possiblement com a font de nutrients per al desenvolupament embrionari posterior. La Vg, que no té el domini fosvitina, solament s'hidrolitza lleugerament durant la maduració i, per tant, no sembla que contribueixi a la hidratació de l'òocit o en la generació de nutrients.

En espècies bentòfiles, com el fúndul, en què també s'han trobat dos Vg diferents, el model d'incorporació de Vg i el processament de les proteïnes derivades és diferent (vegeu la figura 4B). En aquesta espècie, els oòcits postvitel·logènics presenten dues LvH1 d'elevat pes molecular (de 122 i 103 kDa) derivades de la Vg1, mentre que la Vg2 sembla que s'incorpora molt poc en els oòcits. Durant la maduració, només la LvH1 de 122 kDa i les fosvitines són degradades, i la reserva de FAA augmenta només lleugerament.

En peixos pelagòfils, les LvH1 i LvH2 cobreixen la mateixa regió dels seus corresponents precursors (Vg1 i Vg2), fet que indica que aquestes proteïnes poden estar subjectes als mateixos mecanismes de proteòlisi. No obstant això, com ja s'ha esmentat, durant la maduració i hidratació de l'òocit la LvH1 es degrada completament, mentre que la LvH2 només es processa parcialment. Una situació similar ocorre en el fúndul, en què les dues LvH1 es processen de manera diferent. Aquesta hidròlisi

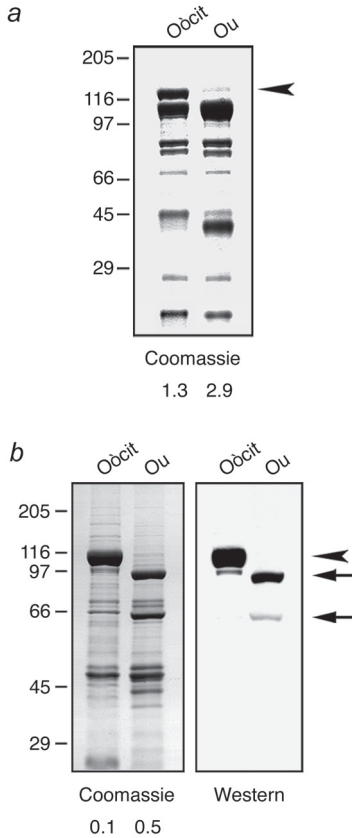


FIGURA 2. Perfil electroforètic de les proteïnes del vitel en oòcits i ous de fúndul (a) i orada (b). Les proteïnes del vitel han estat acolorides amb el colorant blau Coomassie i detectades mitjançant transferència *western* amb un anticòs antivitel·logenina. Les puntes de fletxa indiquen lipovitellines d'aproximadament 122 i 103 kDa en el fúndul i l'orada, respectivament. Les fletxes indiquen pèptids més petits que possiblement resulten de la hidròlisi de les lipovitellines. Els valors de massa molecular estan indicats a l'esquerra en kDa, i el volum dels oòcits i els ous (en mm³) per a cada espècie apareixen sota cada panell.

diferencial de les LvH podria estar relacionada amb diferències en la seqüència d'aminoàcids, en la seva estructura secundària, o amb una compartimentació diferent a l'interior dels glòbuls de vitel, fet que permetria a les proteases (catepsines) distingir entre les dues LvH (revisat per Cerdà *et al.*, 2007). No obstant això, els mecanismes intracel·lulars específics per a l'activació de les catepsines i el processament diferencial de les LvH en l'oòcit dels peixos romanen encara desconeguts.

Ions inorgànics i altres efectors osmòtics de baix pes molecular

En espècies bentòfiles diversos estudis han proporcionat proves del paper dels ions inorgànics com a efectors osmòtics principals durant la hidratació de l'oòcit (Cerdà *et al.*, 2007). En el fúndul, tant el K^+ com el Na^+ estan presents en concentracions relativament elevades, tant en fol·licles ovàrics just

després de la maduració com en ous no fertilitzats, i aquestes concentracions són més elevades que les de FAA. Experiments *in vitro*, però, han demostrat que en aquesta espècie la hidratació de l'oòcit és estrictament dependent de la concentració de K^+ en el medi de cultiu, i això suggereix que aquest ió és el principal responsable de la hidratació. No obstant això, durant la maduració de l'oòcit d'altres espècies bentòfiles que es reproduïxen en aigua dolça o en àrees de baixa salinitat, com l'ayu (*Plecoglossus altivelis*), només s'observa un augment de Na^+ durant la maduració (Chen *et al.*, 2003).

En espècies pelagòfiles, el K^+ també s'ha relacionat amb l'augment de l'osmolaritat dels oòcits durant la hidratació. En dues espècies de reig, *Micropogonias undulatus* i *Cynoscion nebulosus*, LaFleur i Thomas (1991) van detectar un augment de K^+ durant la maduració de l'oòcit, encara que també es va trobar un increment de Mg^{2+} i Ca^{2+} . Igual que en el fúndul, la hidratació de l'oòcit *in vitro* en aquestes espècies és dependent de

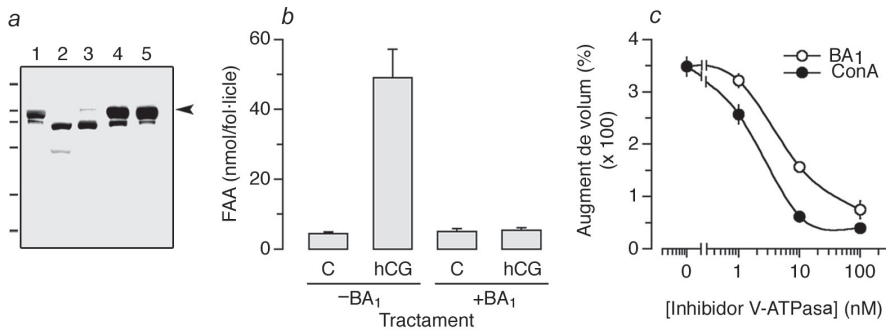


FIGURA 3. Hidròlisi de les proteïnes del vitel, generació de FAA i hidratació de l'oòcit en teleostis pelagòfils. *a*) Transferència *western* de les proteïnes del vitel de l'orada. Fol·licles amb oòcits immadurs (carril 1) i fol·licles estimulats amb MIS en absència (carril 2) o presència d'1, 10 i 100 nM de bafilomicina A1 (BA1), un inhibidor de l'ATPasa vacuolar (V-ATPasa) (carrils 3, 4 i 5, respectivament). Les proteïnes del vitel són detectades utilitzant un anticòs anti-Vg. La punta de fletxa indica que la degradació d'una proteïna del vitel d'aproximadament 100 kDa, possiblement lipovitellina, és inhibida pel tractament amb BA1. La posició (barres) dels marcadors de pes molecular és indicat a l'esquerra (de dalt a baix: 200, 116, 97, 66, 45 i 29 kDa). *b*) Efecte de BA1 sobre la generació de FAA durant la maduració de l'oòcit induïda amb gonadotrofina coriònica humana (hCG) en *Centropristis striata*. *c*) El tractament de fol·licles amb BA1 i concanamina A (ConA), un altre inhibidor de la V-ATPasa, inhibeix la hidratació dels oòcits de l'orada. Les dades en *b* i *c* són de Selman *et al.* (2001).

pelagòfils, els FAA derivats de la hidròlisi del vitel contribueixen aproximadament al 50 % de l'osmolaritat de l'oòcit, mentre que els ions, com K^+ , Cl^- , Pi i NH_4^+ , completarien el 50 % restant.

Els mecanismes de transport i acumulació d'ions en l'oòcit dels peixos són, però, molt desconeguts. En algunes espècies, mitjançant experiments *in vitro* amb inhibidors específics, s'ha suggerit la funció d'ATPases Na^+ i K^+ , encara que la localització cel·lular d'aquests enzims o la seva regulació hormonal no ha estat encara demostrada (LaFleur i Thomas, 1991; Chen *et al.*, 2003). En el fúndul, contràriament, no s'han obtingut evidències de l'acció d'ATPases Na^+ i K^+ durant la hidratació de l'oòcit (Wallace *et al.*, 1992). En aquesta espècie, la comunicació intercel·lular entre l'oòcit i les cèl·lules foliculars a través de les unions gap s'ha demostrat que és essencial per a la hidratació, fet que suggereix que aquests canals són emprats per al transport de K^+ cap a l'oòcit (Wallace *et al.*, 1992; Cerdà *et al.*, 1993).

LES AQUAPORINES I EL SEU PAPER EN LA HIDRATAció DE L'OÒCIT

Durant molt temps s'ha assumit que el transport d'aigua a l'oòcit durant la maduració ocorria per simple difusió a través de les membranes lipídiques seguint el gradient osmòtic creat per l'acumulació d'ions i FAA. Tanmateix, el descobriment dels canals moleculars d'aigua, o aquaporines (AQP), en pràcticament tots els organismes vius (King *et al.*, 2004) ha portat recentment a investigar amb més detall els mecanismes moleculars implicats en la hidratació de l'oòcit de teleostis marins.

Estructura i funció de les AQP

Les AQP són proteïnes de la membrana cel·lular d'uns 250-300 aminoàcids, que transporten aigua segons la direcció del gradient osmòtic. Molt hidrofòbiques, aquestes proteïnes s'organitzen en sis segments d'estructura α -hèlix que travessen la membrana de costat a costat, units per cinc llaços connectors (A-E) (vegeu la figura 5). Dos dels llaços (un d'extracel·lular, E, i un altre d'intracel·lular, B) es pleguen cap a la membrana i s'aproximen per formar el canal per on passa l'aigua (King *et al.*, 2004). Aquest particular plegament, en forma de rellotge de sorra, posa en contacte els triplets asparagina-prolina-alanina (NPA) per formar el lloc més estret del canal. En el llaç E, proper al triplet NPA, es troba una cisteïna, que és la responsable de la sensibilitat de moltes AQP a compostos de mercuri. Encara que cada AQP constitueix per si sola un canal, aquestes proteïnes poden acoblar-se en grups de quatre en la membrana cel·lular.

Actualment es coneixen tretze AQP diferents en mamífers, mentre que les plantes presenten la major varietat, amb trenta-cinc representants (King *et al.*, 2004; Chrispeels *et al.*, 2001). Sobre la base de les propietats de permeabilitat de les AQP quan s'expressen artificialment en oòcits de la granota *Xenopus laevis*, es poden dividir en dos subgrups: les que són només permeables a l'aigua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP8), i les que són també permeables a la urea, el glicerol i altres soluts petits (AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10), que es denominen *aquagliceroporines* (King *et al.*, 2004). L'aquaporina-6 (AQP6) és una AQP particular, ja que, encara que transporta lleugerament l'aigua, també funciona com un canal iònic amb selectivitat per a anions. Algunes AQP són també permeables a altres soluts, com l'AQP9, que pot transportar arsenit i

una varietat de soluts no carregats, l'AQP1, que pot transportar CO_2 , i l'AQP8, que pot transportar $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. Les AQP11 i AQP12 no presenten els típics triplets NPA i les seves propietats de permeabilitat no són ben conegudes, encara que almenys l'AQP11 sí que sembla que transporta aigua (Yakata *et al.*, 2006).

En mamífers, les AQP estan distribuïdes per tots els teixits i tipus cel·lulars, incloent-hi l'ovari (Takata *et al.*, 2004). Estudis recents han mostrat que l'AQP1 i AQP2 són essencials per a la reabsorció d'aigua en el ronyó (Nielsen *et al.*, 2002), mentre que l'AQP4 està implicada en el balanç hídric cerebral, la migració d'astròcits i la transfusió del senyal neuronal (Verkman *et al.*, 2006), i l'AQP3 i l'AQP7 també sembla que tenen funcions importants en la hidratació de la pell i el metabolisme d'adipòcits (Hara-Chikuma i Verkman, 2006). No obstant això, la funció fisiològica de la majoria d'AQP de mamífers és desconeguda.

En teleostis, l'anàlisi de la seqüència del genoma d'algunes espècies model, com el peix zebra, revela l'existència d'un disset AQP diferents, i la majoria són funcionals quan s'expressen en oòcits de *X. laevis* (Calusinska, Tingaud-Sequeira i Cerdà, da-

des no publicades). En aquesta espècie no existeixen els gens d'AQP2, AQP5, AQP6 i AQP7, típics de mamífers. No obstant això, s'observen duplicacions d'alguns dels altres gens, les quals no han ocorregut en mamífers, fet que resulta en un nombre elevat d'AQP. La distribució similar d'AQP en el genoma de teleostis i mamífers pot suggerir l'existència de funcions equivalents, encara que les propietats específiques de les AQP de teleostis són encara molt desconegudes. En el fúndul, no obstant això, s'ha clonat l'AQP0, la qual s'expressa específicament en el cristallí de l'ull i mostra una elevada permeabilitat a l'aigua i certa permeabilitat al CO_2 , però no al glicerol o la urea (Virkki *et al.*, 2001). En l'orada (*Sparus aurata*) s'ha aïllat una aquagliceroporina similar a l'AQP10 de mamífers, la qual és permeable a l'aigua, el glicerol i la urea, i s'expressa de manera elevada en l'intestí posterior i el ronyó (Santos *et al.*, 2004). En l'anguila (*Anguilla anguilla*), s'han trobat dues AQP1 diferents (AQP1 i AQP1dup) i l'AQP3, les quals també es localitzen en òrgans osmoreguladors, com l'intestí posterior i les brànquies, i l'expressió de les quals sembla que es troba sota regulació osmòtica (Cutler i Cramb, 2002; Lignot *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2003;

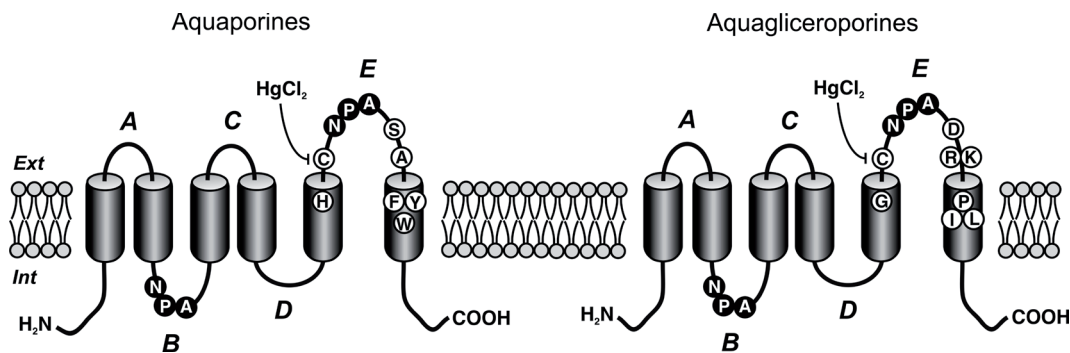


FIGURA 5. Estructura de les aquaporines i les aquagliceroporines. Els cilindres representen els sis dominis transmembranosos, i s'indiquen els dos triplets asparagina-prolina-alanina (NPA) en els llaços B i E, que formen el canal d'aigua o soluts. S'indiquen els aminoàcids que generalment es troben conservats entre aquaporines i aquagliceroporines al voltant del laç E. Les posicions amb dos aminoàcids indiquen substitucions conservades.

Martínez *et al.*, 2005). No obstant això, malgrat aquests estudis, la funció fisiològica de les AQP en òrgans osmoreguladors de teleosts és pràcticament desconeguda.

Funció de les aquaporines durant la hidratació de l'òocit

Recentment, el nostre grup va plantejar la hipòtesi que l'elevada hidratació de l'òocit de l'orada (92 % d'aigua), que s'assoleix aproximadament en 2 h, podria estar facilitada per la presència d'AQP (Fabra *et al.*, 2005). Per demostrar aquesta hipòtesi es van emprar tecnologies de PCR amb les quals es va aïllar el cDNA codificant d'una AQP en l'ovari. L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids d'aquesta proteïna indica la presència de sis segments transmembranosos i dos triplets NPA, que són les característiques típiques de les AQP. La seqüència d'aminoàcids d'aquest pèptid mostra una elevada homologia amb l'AQP1 de mamífers, així com els residus típicament conservats entre les AQP selectives d'aigua. D'acord amb això, es va veure que l'expressió del corresponent cRNA en òocits de *X. laevis* conferia als òocits permeabilitat específica a l'aigua, la qual podia ser inhibida amb $HgCl_2$ i tetratilamoni (TEA), de manera similar al que ocorre amb l'AQP1 de mamífers (Fabra *et al.*, 2005). No obstant això, l'homologia de l'AQP de l'ovari de l'orada amb l'AQP1 de mamífers és relativament baixa (60 % idèntic). A més, a diferència de l'AQP1, l'AQP de

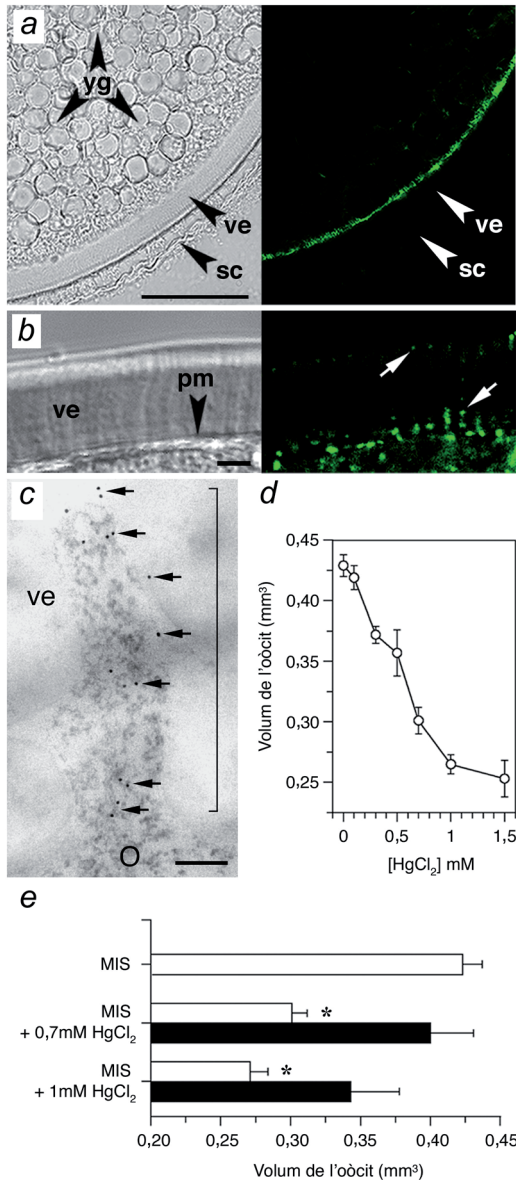


FIGURA 6. Localització cel·lular i funció de l'Aqp1b en l'òocit de l'orada. *a-c*) Imatges d'immunofluorescència (*a* i *b*) i de microscòpia electrònica amb anticossos (*c*), que indiquen la localització de la SaAQP1o sota la membrana d'òocits postvitel·logènics (*a*) i posteriorment en els microvil·lis de l'òocit durant la maduració (*b* i *c*). En *a* i *b*, els panells de l'esquerra mostren les imatges en contrast de fase, i a la dreta es mostren les imatges d'epifluorescència. Les fletxes indiquen reacció amb l'anticòs anti-Aqp1b. *d*) Inhibició sobre l'augment de volum dels òocits d'orada durant la maduració meiótica *in vitro* amb dosis creixents de $HgCl_2$. *e*) Inhibició de la hidratació amb $HgCl_2$ (barres blanques) i reversibilitat de l'efecte del mercuri mitjançant tractament amb β -mercaptoetanol (barres negres). Yg: vesícules de vitel; sc: cèl·lules fol·liculars; ve: zona pellúcida; pm: membrana plasmàtica (modificat de Fabra *et al.*, 2005, 2006).

l'orada s'expressa en molts pocs teixits i de manera predominant en l'ovari.

Experiments d'immunocitoquímica amb un anticòs específic han demostrat que l'AQP ovàrica de l'orada es localitza exclusivament en l'oòcit, i es detecta per primera vegada en el citoplasma d'oòcits previtel·logènics (Fabra *et al.*, 2005, 2006; vegeu la figura 6). A mesura que avança la vitel·logènesi, la proteïna apareix en la zona més perifèrica del citoplasma de l'oòcit. Durant la maduració i hidratació, just quan aparentment es crea la pressió osmòtica més elevada en l'oòcit com a resultat de l'acumulació d'ions i FAA, l'AQP és translocada a les microvellositats de l'oòcit que travessen la zona pellúcida, on pot actuar en el transport d'aigua (Fabra *et al.*, 2006). Per demostrar, per tant, que aquesta AQP podria estar implicada en la hidratació de l'oòcit, es van dur a terme experiments *in vitro* en els quals els fol·licles ovàrics de daurada es van induir a la maduració i hidratació amb MIS en presència dels inhibidors HgCl₂ i TEA. Els resultats d'aquests experiments indiquen que ambdós inhibidors redueixen la hidratació dels oòcits *in vitro* amb un efecte dependent de la dosi, i en el cas del HgCl₂, la inhibició pot ser revertida amb β-mercaptoetanol (Fabra *et al.*, 2005, 2006). Aquestes observacions, per tant, proporcionen proves de la funció de l'AQP ovàrica de l'orada durant el procés d'hidratació, en què possiblement facilita el flux d'aigua a l'interior de l'oòcit. El procés d'hidratació de l'oòcit apareix, doncs, com un mecanisme altament controlat basat en la interacció entre la proteòlisi del vitel, per a la creació d'un gradient osmòtic, i l'AQP, per al transport d'aigua (vegeu la figura 7).

IDENTIFICACIÓ DE LA SUBFAMÍLIA Aqp1b DE TELEOSTIS

L'aïllament i caracterització molecular de l'AQP de l'ovari de l'orada va portar a cercar en aquesta espècie altres AQP més similars a l'AQP1 de mamífers. Mitjançant el cribratge d'una genoteca de cDNA de ronyó es va aïllar un nou cDNA que presentava una identitat elevada, pel que fa a la seva seqüència d'aminoàcids, amb les seqüències de l'AQP1 de mamífers (63-67 %) i d'altres peixos (88-94 %), i només era idèntica a l'AQP ovàrica en un 60 %. Aquest segon cDNA és també selectivament permeable a l'aigua i sensible al HgCl₂ quan s'expressa en oòcits de *X. laevis*, i s'expressa en pràcticament tots els teixits de l'adult (Fabra *et al.*, 2005, Raldúa *et al.*, 2008).

Per investigar les relacions entre les dues AQP de l'orada i amb altres AQP de vertebrats selectives d'aigua, es van cercar seqüències similars en diferents espècies de teleostis mitjançant clonatge per homologia i cerca en genomes seqüenciats. Aquesta recerca ha confirmat la presència en teleostis de dues isoformes similars estructuralment i funcionalment a l'AQP1 de mamífers, que s'han anomenat Aqp1a i Aqp1b (és a dir, l'AQP ovàrica). Aquestes isoformes coexisteixen exclusivament en peixos teleostis, ja que l'Aqp1b no ha estat identificada en altres vertebrats. La reconstrucció filogenètica d'AQP similars a l'AQP1 en vertebrats indica que l'Aqp1a i l'Aqp1b comparteixen un mateix origen i probablement han evolucionat a partir d'un avantpassat comú (vegeu la figura 8), ja que ambdues isoformes estan presents en espècies de teleostis que pertanyen a grups taxonòmics distants, des de grups basals (com els anguilliformes) fins a més moderns (com gasterosteiformes, perciformes, pleuronectiformes i tetraodontiformes) (Inoue *et al.*, 2003). Aquesta duplicació pot ser antiga i probablement ha afectat

la majoria de teleostis. Com s'ha suggerit per a molts gens duplicats de teleostis, l'origen de l'Aqp1b podria ser la duplicació sencera del genoma (*whole genome duplication*, WGD), que va ocórrer específicament en el llinatge dels actinopterigis després de separar-se del llinatge dels tetràpodes fa uns 350 milions d'anys (Meyer i Peer, 2005). No obstant això, en tots els teleostis examinats els locus *aqp1a* i *aqp1b* estan localitzats en tàndem en el genoma, fet que indica que el gen *aqp1b* possiblement va sorgir per duplicació local més que del cromosoma o del genoma.

Actualment es pensa que els teleostis marins van colonitzar els oceans després d'aproximadament 250 milions d'anys d'evolució en aigua dolça, tal i com sugge-

reixen les dades de fòssils, la condició hiposmòtica i la presència d'un ronyó glomerular en les espècies actuals (revisat per Finn i Kristoffersen, 2007). La radiació de teleostis en l'oceà va requerir molt probablement l'evolució de nous mecanismes osmoreguladors en ous i embrions per alleujar la pèrdua passiva d'aigua imposada per l'entorn hiperosmòtic. En aquest escenari, és possible que la duplicació del gen *aqp1* de teleostis permetés a una de les còpies codificar una proteïna amb funcions noves mitjançant mutacions en seqüències estructurals o reguladores (com la neofuncionalització). Aquest sembla el cas per a l'Aqp1b de l'orada, la qual mostra una funció fisiològica especialitzada en la captació d'aigua durant la maduració meiótica. En altres es-

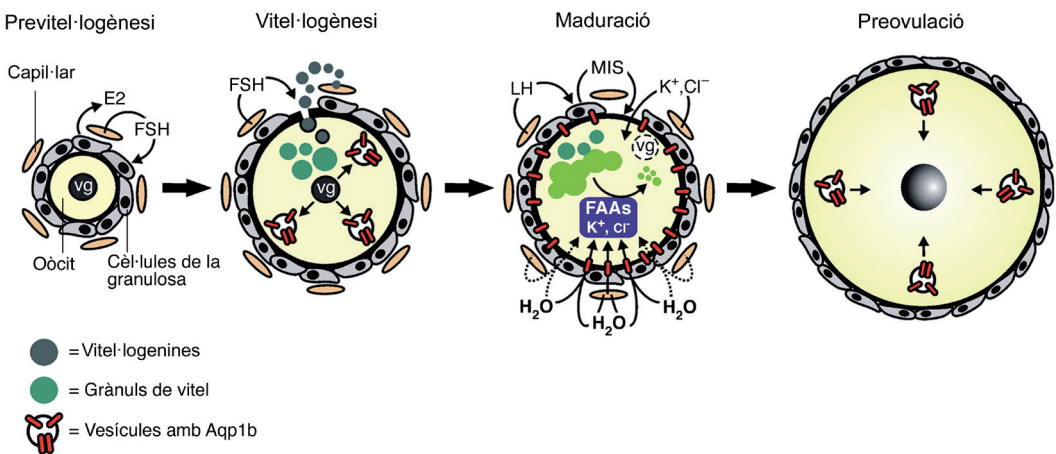


FIGURA 7. Processos fisiològics durant la hidratació de l'òocit en teleostis pelagòfils i model d'acció de l'Aqp1b. Durant la previtel·logènesi, les cèl·lules fol·liculars associades a l'òocit sintetitzen 17 β -estradiol (E2) en resposta a l'hormona fol·liculoestimulant (FSH), la qual estimularà la producció de vitel·logenines (Vg) en el fetge. Durant el creixement de l'òocit (vitel·logènesi), les Vg s'incorporen en l'òocit per un mecanisme d'endocitosi mediat per receptor. Les Vg s'hidrolitzen en l'òocit i donen lloc a diverses proteïnes del vitel, que s'emmagatzemen en glòbuls. A l'inici de la vitel·logènesi, l'Aqp1b se sintetitza en l'òocit i es transporta per l'interior de vesícules cap a la membrana plasmàtica de l'òocit. Durant la maduració, les cèl·lules de la granulosa són estimulades per l'hormona luteïnitzant (LH) perquè produeixen l'MIS i s'iniciï la progressió de la meiosi. Durant aquest procés la vesícula germinal (Vg) migra cap al pol animal de l'òocit i es trenca, els glòbuls de vitel es fusionen i s'activa la hidròlisi de les proteïnes del vitel, fet que produeix aminoàcids lliures (FAA). Al mateix temps, alguns ions inorgànics, com el K⁺, s'acumulen en l'òocit, i això fa augmentar encara més la pressió osmòtica a dins. En aquest moment, l'Aqp1b s'insereix en la membrana plasmàtica de l'òocit, on pot actuar en el transport d'aigua (línies sòlides). El flux d'aigua cap a l'òocit, però, també pot ocórrer per simple difusió a través de les membranes de les cèl·lules fol·liculars i de l'òocit (línies de punts). Quan finalitza la hidròlisi del vitel, l'Aqp1b és retirada de la membrana de l'òocit i finalitza la hidratació (modificat de Fabra *et al.*, 2006).

pècies marines i catàdromes (les que creixen en aigua dolça i es reproduïxen en el mar) que, igual que l'orada, també produeixen ous molt hidratats, com el llenguado i l'anguila, el gen *aqp1b* també codifica una proteïna funcional i el seu RNA s'acumula predominantment en l'ovari (vegeu la figura 9), i això suggereix una funció similar a la de l'Aqp1b durant la hidratació de l'oòcit. Contràriament, en el peix zebra, espècie d'aigua dolça en la qual no s'observa gairebé hidratació en l'oòcit (Cerdà *et al.*, 2007), el patró d'expressió és completament diferent i la seqüència d'aminoàcids de la proteïna

presenta un índex de mutació més elevat. D'acord amb aquestes dades, hem suggerit que en teleostis marins que produeixen ous molt hidratats el gen *aqp1b* possiblement codifica un canal d'aigua neofuncionalitzat en els oòcits (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008). Finn i Kristoffersen (2007) han proposat recentment que la neofuncionalització de gens de Vtg duplicats, que va permetre que un dels paràlegs fos hidrolitzat en FAA durant la maduració dels oòcits, va ser un esdeveniment clau en l'evolució i l'èxit dels teleostis en l'entorn oceànic. La duplicació i neofuncionalització del gen *aqp1b* pot haver

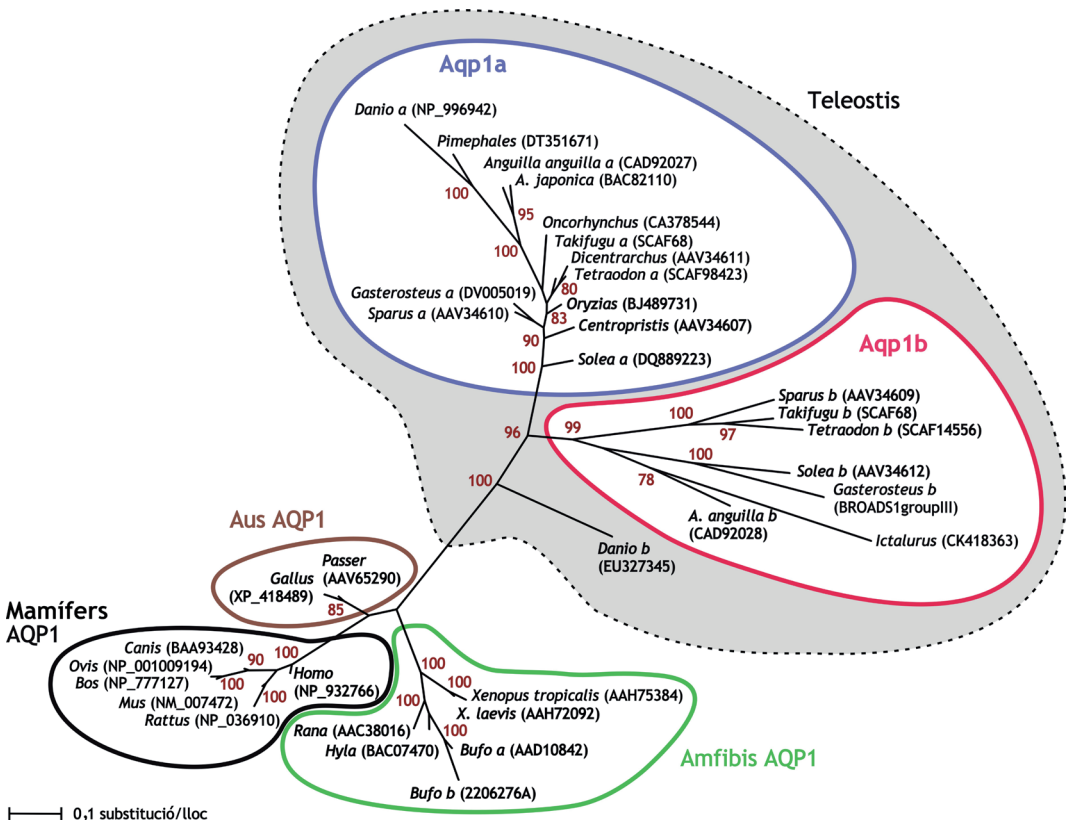


FIGURA 8. Relacions filogenètiques entre les AQP1 de vertebrats. L'arbre mostra l'existència de dues subfamílies d'AQP1 en teleostis. La longitud de les branques és proporcional al nombre de substitucions d'aminoàcids. El nombre d'accés del GenBank, la seqüència genòmica o el grup cromosòmic està indicat entre parèntesis per a cada seqüència (modificat de Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008).

ocorregut, doncs, en paral·lel a aquest mecanisme per facilitar el transport d'aigua en els oòcits.

La isoforma Aqp1b de teleostis d'aigua dolça que produeixen ous no hidratats, com el peix zebra, podria haver estat desactivada per mutacions, o ser eventualment eliminada del genoma. A aquesta hipòtesi dóna suport l'absència del gen *aqp1b* en espècies d'aigua dolça més modernes, com el *medaka* (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008). No obstant això, en altres teleostis d'aigua dolça que van sorgir més tard durant l'evolució, com *Tetraodon nigroviridis*, el gen *aqp1b* és retinut en el genoma. Les causes d'aquesta retenció són desconegudes, ja que sembla que en la majoria de genomes de teleostis mo-

derns s'ha donat una eliminació massiva de DNA després de la WGD, i això ha resultat en la conservació de només un subconjunt dels gens duplicats (Amores *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005). És possible especular, però, que l'evolució recent dels tetraodontiformes no ha estat prou llarga per permetre la divergència específica del genoma i, per tant, del gen *aqp1b*. El relativament alt percentatge d'identitat (77 %) de la seqüència d'aminoàcids de l'Aqp1b entre el fugu (*Takifugu rubripes*), un tetraodontiforme que produeix ous hidratats, i *T. nigroviridis*, pot donar suport a aquesta idea. En tot cas, són necessaris més estudis sobre l'expressió i la distribució tissular de la proteïna Aqp1b en

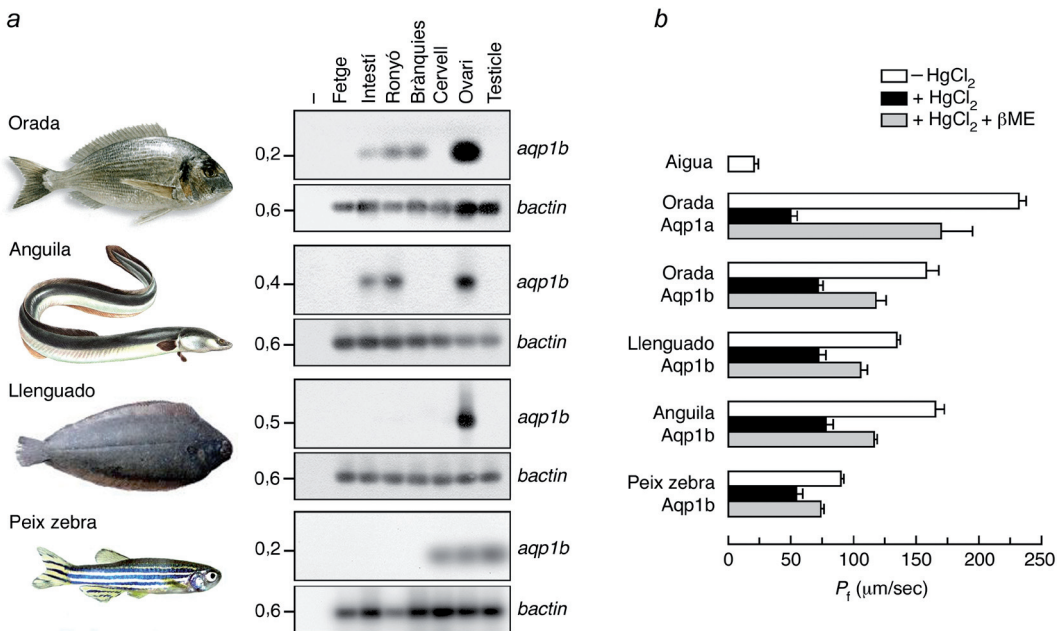


FIGURA 9. Patró d'expressió i caracterització funcional de l'Aqp1b de teleostis. *a*) Anàlisi de l'expressió d'*aqp1b* (plafons superiors) i β -actina (*bactin*, plafons més baixos) en diferents teleostis mitjançant RT-PCR. El menys indica absència de RT durant la síntesi de cDNA. La mida (kb) dels marcadors moleculars s'indica a l'esquerra. *b*) Permeabilitat osmòtica a l'aigua (P_i) i inhibició amb mercuri d'oòcits de *Xenopus laevis* que expressen l'Aqp1a o l'Aqp1b de teleostis. Alguns oòcits tractats amb HgCl₂ són incubats amb 5 mM de β -mercaptoetanol (β EM) 15 min abans de determinar-ne la permeabilitat. Els valors representen la mitjana \pm SEM ($n = 6-10$ oòcits) d'un experiment representatiu (modificat de Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008).

espècies de teleostis d'aigua dolça per entendre l'evolució d'aquesta isoforma.

Divergència estructural i funcional de l'Aqp1b

L'estructura primària del dominis transmembranosos TM2 i TM5, així com dels bucles connectors B i E, de l'Aqp1a i l'Aqp1b, els quals estan implicats en la formació del

canal selectiu d'aigua, està molt conservada entre teleostis i mamífers. No obstant això, l'Aqp1a i l'Aqp1b mostren una eficiència diferent en la permeabilitat a l'aigua quan s'expressen oòcits de *X. laevis*; a més, l'Aqp1b mostra una marcada divergència estructural en l'extrem carboxiterminal de la proteïna respecte a l'Aqp1a i l'AQP1 de mamífers (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008). Experiments funcionals amb oòcits de *X. laevis* amb l'expressió artificial de l'Aqp1a i l'Aqp1b d'orada intactes, així com de proteïnes quimèriques en les quals el C terminal de l'Aqp1a és substituït pel de l'Aqp1b, i viceversa, han revelat que l'extrem carboxiterminal de l'Aqp1b produeix la fosforilació de la proteïna i una retenció parcial en vesícules intracel·lulars (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008). Aquestes observacions suggereixen, per tant, que l'Aqp1b ha adquirit independentment dominis específics de regulació en la regió carboxiterminal, potser dependents de fosforilació, per al control del trànsit intracel·lular d'Aqp1b.

Per investigar les potencials regions reguladores en l'extrem carboxiterminal de l'Aqp1b, diversos residus seleccionats de l'Aqp1b de l'orada han estat mutats amb Ala

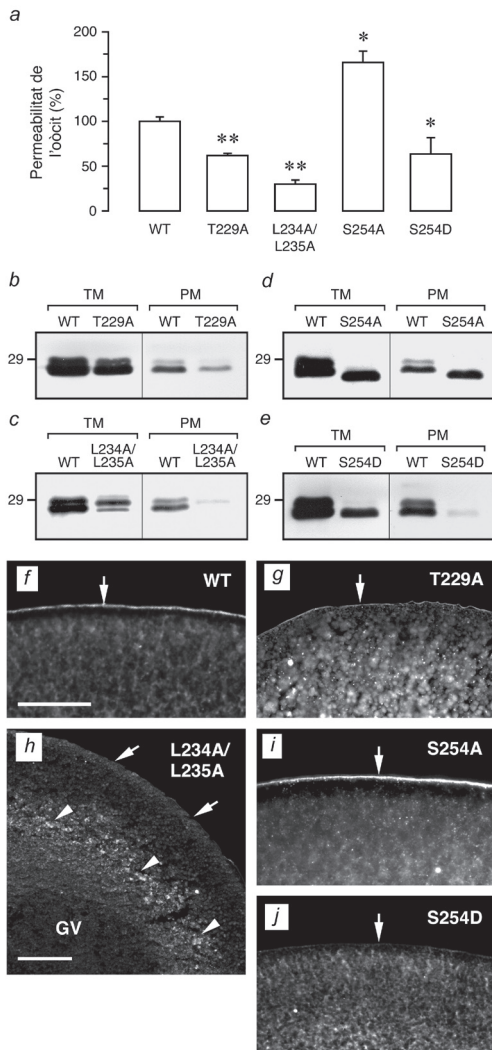


FIGURA 10. Funció del C terminal de l'Aqp1b de l'orada per al trànsit intracel·lular en oòcits. *a*) Permeabilitat a l'aigua d'oòcits que expressen Aqp1b intacta (WT) o mutada en residus específics del C terminal: Aqp1b-T229A, Aqp1b-L234A/L235A, Aqp1b-S254A i Aqp1b-S254D. La permeabilitat és expressada en percentatge respecte als oòcits injectats amb WT. Els valors representen la mitjana \pm SEM de 3-5 experiments ($n = 10-15$ oòcits per tractament). Els asterisks indiquen diferències estadísticament significatives (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). *b-e*) Immunotransferències de proteïnes totals de membrana (TM) o només de membrana plasmàtica (PM) d'oòcits que expressen WT o Aqp1b mutada. La massa molecular aparent d'un marcador de 29 kDa s'indica a l'esquerra. *f-j*) Localització de l'Aqp1b intacta o mutada en oòcits. La membrana plasmàtica s'indica amb fletxes, i la retenció de l'Aqp1b-L234A/L235A en el reticle endoplasmàtic s'indica amb puntes de fletxa (H) (barres: 100 μ m) (modificat de Tingaud-Sequeira *et al.*, 2008).

o Asp i les proteïnes resultants han estat expressades en oòcits per determinar la localització intracel·lular i les propietats de permeabilitat (vegeu la figura 10). Aquests experiments indiquen que el domini di-Leu comú en l'extrem carboxiterminal de l'Aqp1b, comú en moltes espècies de teleostis i que podria estar implicat en el transport de proteïnes de membrana des de la xarxa trans-Golgi al compartiment lisosomal-endosomal, és necessari per a la localització de l'Aqp1b en la membrana plasmàtica (vegeu les figures 10a, c i h). Més notablement, però, altres resultats revelen que els residus Thr²²⁹ i Ser²⁵⁴ poden estar implicats en la translocació de l'Aqp1b des de les vesícules intracel·lulars a la membrana plasmàtica. La probabilitat de fosforilació de la Thr²²⁹ és baixa i, consegüentment, el mutant Aqp1b-T229A no afecta l'estat de fosforilació de l'Aqp1b, tot i que inhibeix l'expressió de l'Aqp1b en la superfície de la cèl·lula i la permeabilitat de l'oòcit en l'aigua (vegeu les figures 10a, b i g). Ja que la Thr²²⁹ no coincideix amb cap domini de consens per a cinases, la funció específica d'aquest residu és, de moment, desconeguda. No obstant això, s'ha observat que el mutant Aqp1b-S254A inhibeix la fosforilació i augmenta el transport de l'Aqp1b des de les vesícules intracel·lulars a la membrana plasmàtica, mentre que el mutant Aqp1b-S254D, el qual imita un estat constant de fosforilació, manté l'Aqp1b en les vesícules intracel·lulars (vegeu les figures 10a, d, e, i i j). Aquests resultats suggereixen, doncs, que la desfosforilació de la Ser²⁵⁴ indueix el transport de l'Aqp1b a la superfície de la cèl·lula, mentre que la fosforilació pot retenir la proteïna en vesícules intracel·lulars. Aquest mecanisme és aparentment oposat al descrit fins ara per a l'AQP2 de mamífers i amfibis, en què la inserció de la proteïna en la membrana plasmàtica de les cèl·lules del conducte col·lector del ronyó o de les cèl·lules granuloses

de la bufeta urinària és activada mitjançant fosforilació de residus Ser en l'extrem carboxiterminal de la proteïna (Balkom *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2005). Curiosament, en l'orada la Ser²⁵⁴ defineix un lloc de consens de fosforilació dirigida per Pro, el qual es troba conservat en teleostis marins més evolucionats que produeixen ous hidratats. Les cinases dirigides per Pro constitueixen una gran família de proteïnes, que inclou proteïnes cinases activades per mitògens (MAPK), algunes de les quals estan implicades en l'activació de l'MPF en oòcits d'amfibis, com la p38 MAPK (Perdigueró *et al.*, 2003). En l'orada el transport de l'Aqp1b a la membrana plasmàtica de l'oòcit és un procés estretament regulat que sembla que té lloc després de l'activació de l'MPF, just abans de la hidròlisi completa de les proteïnes del vitel i l'acumulació màxima d'ions K⁺ (Fabra *et al.*, 2006). Aquestes observacions suggereixen el possible paper de les cinases relacionades amb el cicle cel·lular, o d'altres cinases activades durant la maduració de l'oòcit, en la fosforilació de la Ser²⁵⁴ i el control del tràfic de l'Aqp1b, el qual està sent investigat actualment.

CONCLUSIONS

El recent descobriment de l'Aqp1b en l'orada ha provat un dels mecanismes moleculars clau en el procés d'hidratació de l'oòcit de teleostis marins. En aquesta espècie, les nostres observacions indiquen que el procés d'hidratació de l'oòcit és un mecanisme altament controlat basat en la interacció entre la proteòlisi del vitel, l'acumulació d'ions inorgànics i l'Aqp1b. Han estat identificades diverses AQP relacionades amb l'Aqp1b, sobretot en teleostis pelagòfils, i això suggereix que en aquestes espècies la isoforma Aqp1b està originada per un gen duplicat i neofuncionalitzat en oòcits per a

la regulació del procés d'hidratació induït per hormones. La neofuncionalització de l'Aqp1b ha estat acompanyada de l'adquisició de dominis específics en l'extrem carboxiterminal de la proteïna per al control del trànsit intracel·lular. Seran necessaris estudis futurs per esbrinar la possible regulació transcripcional i posttranscripcional del gen *aqp1b* i el control del transport intracel·lular de la proteïna i la seva funció en oòcits de peixos. La recerca sobre aquests interrogants contribuirà indubtablement a un coneixement més profund dels mecanismes moleculars implicats en la producció d'ous viables en peixos marins, els quals poden tenir importants aplicacions biotecnològiques en aqüicultura i per a la conservació de la biodiversitat.

AGRAÏMENTS

Els treballs del nostre grup citats en aquesta revisió han estat finançats per projectes del Ministeri d'Educació i Ciència (AGL2001-0364 i AGL2004-00316), la Comissió Europea (Q5RS-2002-00784-CRYOCYTE i MRTN-CT-2006-035995-Aquaglyceroporphins) i la Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFIA

- CUTLER, C. P.; CRAMB, G. (2002). «Branchial expression of an aquaporin 3 (AQP3) homologue is downregulated in the European eel, *Anguilla anguilla*, following seawater acclimation». *J. Exp. Biol.*, 205: 2643-2651.
- CHRISPEELS, M. J.; MORILLON, R.; MAUREL, C.; GERBEAU, P.; KJELLBOM, P.; JOHANSSON, I. (2001). «Aquaporins of plants: structure, function, regulation, and role in plant water relations». A: HOHMANN, S.; NIELSEN, S.; AGRE, P. [ed.]. *Aquaporins. Current topics in membranes*, vol. 51. San Diego: Academic Press, 277-334.
- FULTON, T. W. (1898). «On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleostean fishes». *16th Annu. Rep. Fish. Bd. Scotl.*, 3: 83-134.
- AMORES, A.; SUZUKI, T.; YAN, Y. L.; POMEROV, J.; SINGER, A.; AMEMIYA, C.; POSTLETHWAIT, J. H. (2004). «Developmental roles of pufferfish Hox clusters and genome evolution in ray-fin fish». *Genome Res.*, 14: 1-10.
- AOKI, M.; KANEKO, T.; KATOH, F.; HASEGAWA, S.; TSUTSUI, N.; AIDA, K. (2003). «Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted Japanese eel». *J. Exp. Biol.*, 206: 3495-3505.
- BABIN, P. J.; CARNEVALI, O.; LUBZENS, E.; SCHNEIDER, W. J. (2007). «Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish». A: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. [ed.]. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer, 39-76.
- BALKOM, B. W. VAN; SAVELKOUL, P. J.; MARKOVICH, D.; HOFMAN, E.; NIELSEN, S.; SLUIJS, P. VAN DER; DEEN, P. M. (2002). «The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel». *J. Biol. Chem.*, 277: 41473-41479.
- CERDÀ, J.; FABRA, M.; RALDÚA, D. (2007). «Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration». A: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. [ed.]. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer: 349-396.
- CERDÀ, J.; PETRINO, T. R.; WALLACE, R. A. (1993). «Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation». *Dev. Biol.*, 160: 228-235.
- CRAIK, J. C. A.; HARVEY, S. M. (1987). «The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts». *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 67: 169-182.
- CHEN, Y.-N.; HSIEH, S.-L.; KUO, C.-M. (2003). «Changes in oocyte and blood plasma osmotic components of ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel during oocyte maturation». *Aquaculture Res.*, 34: 859-867.
- FABRA, M.; RALDÚA, D.; BOZZO, M. G.; DEEN, P. M. T.; LUBZENS, E.; CERDÀ, J. (2006). «Yolk proteolysis and aquaporin-1o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption». *Dev. Biol.*, 295: 250-262.
- FABRA, M.; RALDÚA, D.; POWER, D. A.; DEEN, P. M. T.; CERDÀ, J. (2005). «Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated». *Science*, 307: 545.
- FINN, R. N.; KRISTOFFERSEN, B. A. (2007). «Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts». *PLoS ONE*, 2: e169.

- FINN, R. N.; OSTBY, G. C.; NORBERG, B.; FYHN, H. J. (2002). «In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx». *J. Exp. Biol.*, 205: 211-224.
- HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A. S. (2006). «Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins». *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 1386-1392.
- HASEGAWA, T.; SUZUKI, M.; TANAKA, S. (2005). «Immunocytochemical studies on translocation of phosphorylated aquaporin-h2 protein in granular cells of the frog urinary bladder before and after stimulation with vasotocin». *Cell Tissue Res.*, 322: 407-415.
- INOUE, J. G.; MIYA, M.; TSUKAMOTO, K.; NISHIDA, M. (2003). «Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish"». *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26: 110-120.
- KING, L. S.; KOZONO, D.; AGRE, P. (2004). «From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 687-698.
- LAFLÉUR, G. J. JR.; THOMAS, P. (1991). «Evidence for a role of Na⁺, K⁺-ATPase in the hydration of atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation». *J. Exp. Biol.* 258: 126-136.
- LIGNOT, J. H.; CUTLER, C. P.; HAZON, N.; CRAMB, G. (2002). «Immunolocalization of aquaporin-3 in the gill and the gastrointestinal tract of the European eel *Anguilla anguilla* (L.)». *J. Exp. Biol.*, 205: 2653-2663.
- MARTÍNEZ, A. S.; CUTLER, C. P.; WILSON, G. D.; PHILLIPS, C.; HAZON, N.; CRAMB, G. (2005). «Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression». *Biol. Cell*, 97: 615-27.
- MELLINGER, J. (1994). «La flottabilité des oeufs des téléostéens». *L'Année Biologique*, 33: 117-138.
- MEYER, A.; PEER, Y. VAN DER (2005). «From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FS-GD)». *Bioessays*, 27: 937-945.
- NIELSEN, S.; FROKIAER, J.; MARPLES, D.; KWON, T. H.; AGRE, P.; KNEPPER, M. A. (2002). «Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine». *Physiol. Rev.*, 82: 205-244.
- NISSLING, A.; MÜLLER, A.; HINRICHSEN, H.-H. (2003). «Specific gravity and vertical distribution of sprat eggs in the Baltic sea». *J. Fish Biol.*, 63: 280-299.
- PERDIGUERO, E.; PILLAIRE, M. J.; BODART, J. F.; HENNERSDORF, F.; FRÖDIN, M.; DUESBERY, N. S.; ALONSO, G.; NEBREDÀ, A. R. (2003). «Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C». *EMBO J.*, 22: 5746-5756.
- RALDÚA, D.; OTERO, D.; FABRA, M.; CERDÀ, J. (2008). «Differential localization and regulation of two aquaporin-1 homologs in the intestinal epithelia of the marine teleost *Sparus aurata*». *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294: R993-R1003.
- SANTOS, C. R. A.; ESTEVAO, M. D.; FUENTES, J.; CARDOSO, J. C. R.; FABRA, M.; PASSOS, A. L.; DETMERS, F. J.; DEEN, P. M. T.; CERDÀ, J.; POWER, D. M. (2004). «Isolation of a novel aquaglyceroporin from a marine teleost (*Sparus auratus*): function and tissue distribution». *J. Exp. Biol.*, 207: 1217-1227.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A.; CERDÀ, J. (2001). «Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly and meiosis during maturation of sea bass oocytes». *J. Exp. Zool.*, 290: 265-278.
- SEOKA, M.; YAMADA, S.; IWATA, Y.; YANAGISAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KUMAI, H. (2003). «Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*». *Aquaculture*, 216: 355-362.
- SUWA, K.; YAMASHITA, M. (2007). «Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation». A: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. [ed.]. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer: 323-347.
- TAKATA, K.; MATSUZAKI, T.; TAJIKA, Y. (2004). «Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane». *Prog. Histochem. Cytochem.*, 39: 1-83.
- THORSEN, A.; KJESBU, O. S.; FYHN, H. J.; SOLEMDAL, P. (1996). «Physiological mechanisms of buoyancy in eggs from brackish water cod». *J. Fish Biol.*, 48: 457-477.
- TINGAUD-SEQUEIRA, A.; CHAUVIGNÉ, F.; FABRA, M.; LOZANO, J.; RALDÚA, D.; CERDÀ, J. (2008). «Structural and functional divergence of two fish aquaporin-1 water channels following teleost-specific gene duplication». *BMC Evol. Biol.* [En premsa]
- VERKMAN, A. S.; BINDER, D. K.; BLOCH, O.; AUGUSTE, K.; PAPADOPOULOS, M. C. (2006). «Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice». *Biochim. Biophys. Acta*, 1758: 1085-1093.
- VIRKKI, L. V.; COOPER, G. J.; BORON, W. F. (2001). «Cloning and functional expression of a MIP (AQP0) homolog from killifish (*Fundulus heteroclitus*) lens». *Am. J. Physiol.*, 281: R1994-R2003.
- WALLACE, R. A.; BEGOVAC, P. C. (1985). «Phosvitins in *Fundulus* oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and electrophoretic analyses together with biological considerations». *J. Biol. Chem.*, 260: 11268-11274.
- WALLACE, R. A.; GREELEY, M. S. JR.; MCPHERSON, R.

- (1992). «Analytical and experimental studies on the relationship between Na⁺, K⁺, and water-uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro». *J. Comp. Physiol.*, 162B: 241-248.
- WALLACE, R. A.; SELMAN, K. (1985). «Major proteins changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes». *Dev. Biol.*, 110: 492-498.
- WOODS, I. G.; WILSON, C.; FRIEDLANDER, B.; CHANG, P.; REYES, D. K.; NIX, R.; KELLY, P. D.; CHU, F.; POSTLETHWAIT, J. H.; TALBOT, W. S. (2005). «The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes». *Genome Res.*, 15: 1307-1314.
- YAKATA, K.; HIROAKI, Y.; ISHIBASHI, K.; SOHARA, E.; SASAKI, S.; MITSUOKA, K.; FUJIYOSHI, Y. (2007). «Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity». *Biochim. Biophys. Acta*, 1768: 688-693.