



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Evaluación de la expresión de *star* durante el período de
diferenciación molecular del sexo en esturión siberiano
(*Acipenser baeri*)**

Bach. Germán Benech Correa

Orientadora: Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Co-orientador: Lic. André Lasalle Gerla

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

Julio 2021

A la Dra, Denise Vizziano por permitirme realizar la tesina de grado en su laboratorio y por dedicar parte de su tiempo a mi formación a pesar de un año tan complicado. Al Lic. André Lasalle que siempre me tuvo mucha paciencia en el laboratorio y estuvo permanentemente a disposición cuando lo necesité. Al resto de los compañeros del laboratorio por permitirme ser parte.

A mi madre y mi padre, hermanas, Bolila y Moni por estar pendientes y ser parte de mi vida. A Paula, que a pesar de que la vida nos llevó por caminos diferentes, definitivamente fue muy importante en la última etapa de mi vida.

Ceci, Jenni, Maite, Reni, Tito, Manu, Martín y Emma, por hacer menos difícil este camino y a la ciencia por permitirme conocerlos.

A los de todos los días, Bruno, Jose, Rey, Kevin, Gasti, Cofi, pero principalmente al Oveja. Sin dudas que esto no es fácil pero justamente por eso tenemos que seguir adelante. Y para eso estamos nosotros. Te quiero Ove.

A todos ellos gracias por ayudarme a seguir aprendiendo.

Resumen

El esturión siberiano descubierto por Brandt (1869), es una de las 17 especies que en la actualidad representan el género *Acipenser*. Son peces basales que se encuentran en la base de los Actinopterygii y en la mayoría de los casos se encuentran en peligro crítico de extinción. Si bien las poblaciones naturales presentan distribución holártica, el esturión siberiano ha sido utilizado en acuicultura de manera muy exitosa en Uruguay, posicionando a este país entre los mayores productores de caviar del mundo. El esturión siberiano presenta desarrollo lento, en condiciones de cautiverio en Uruguay, los machos llegan a la madurez sexual a los 3 años y las hembras a los 5 años de edad. Por otro lado, discriminar entre hembras y machos no es fácil y hoy es posible a través de ecografía recién a los 2 años. Debido a la importancia que representa el sexado temprano de esta especie en acuicultura y el interés específico por los ovocitos postvitelogénicos producidos por las hembras se han realizado estudios enfocados a comprender tanto los mecanismos de determinación sexual como las vías moleculares de diferenciación que son desencadenadas una vez que el sexo queda determinado. Estudios de ginogénesis han postulado que esta especie presentaría sistema de determinación ZZ/ZW, monofactorial y que el gen determinante estaría asociado al genoma femenino. Más recientemente se ha descubierto una secuencia específica del genoma de las hembras que apoya esta teoría. Por otro lado, los esteroides sexuales se posicionan en el eje central de la diferenciación sexual temprana en hembras de esturión siberiano. En base a esto, en este trabajo se buscó estudiar la expresión de *star* a los 3 y a los 6 meses de edad, abarcando así el período de diferenciación molecular del sexo de esta especie, que precede al período de diferenciación morfológica, la cual se identifica claramente a los 8 meses de edad. La proteína StAR es la encargada de transportar el colesterol hacia el interior de la membrana mitocondrial y así permitir la producción de los esteroides sexuales. La hipótesis planteada está basada en la importancia de los estrógenos en esta etapa del desarrollo de las hembras. Dado que los estrógenos actúan más tempranamente que los andrógenos en la

regulación de los peces en general, postulamos que *star* se expresará muy temprano en las futuras hembras de esturión siberiano. El ARN gonadal utilizado en este proyecto fue extraído previamente por el Lic. André Lasalle. A partir de este material se realizaron las PCR en tiempo real pertinentes, con el objetivo de evaluar la expresión de *star* en cada mes. Previamente se realizó un estudio de bioinformática que permitió seleccionar el gen en cuestión y diseñar los cebadores específicos. A partir de los niveles de expresión relativa obtenidos para *star* a través de este trabajo demostramos que esta proteína se expresa durante el período de diferenciación molecular en esturión siberiano. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la actividad de *star* entre los grupos formados que corresponderían a machos y hembras en diferenciación, lo que estaría indicando que *star* también es necesaria en machos durante este estadio, sugiriendo la posible producción de andrógenos durante la diferenciación molecular. Un estudio con marcadores del sexo a nivel del ADN genómico permitirá confirmar las tendencias observadas.

Índice

1.- Introducción.....	7
1.1.- Modelo de estudio.....	7
1.2.- Determinación sexual.....	10
1.3.- Diferenciación sexual.....	14
1.3.1.- Papel del eje hipotálamo-pituitaria-gónada en el control de la diferenciación sexual.....	16
1.3.2.- Producción de esteroides y su papel en el desarrollo gonadal.....	17
1.4.- Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR).....	22
1.5.- Enfoque del trabajo.....	24
2.- Hipótesis.....	26
3.- Objetivo general.....	26
3.1.- Objetivos específicos.....	26
4.- Materiales y métodos.....	27
4.1.- Animales experimentales y extracción de tejido gonadal.....	27
4.2.- Extracción de ARN y obtención de ADN copia (ADNc).....	28
4.3.- Retrotranscripción.....	29
4.4.- Bioinformática.....	29
4.4.1.- Elección del gen de estudio basado en estudios de bioinformática.....	29
4.4.2.- Diseño de cebadores.....	32
4.5.- PCR en tiempo real.....	34
4.6.- Procesamiento de datos.....	37

4.7.- Análisis estadísticos.....	38
5.- Resultados.....	39
5.1.- Transcriptómica: estudio de expresión diferencial.....	39
5.2.- Patrón global de expresión génica.....	40
5.3.- Relación de la expresión de <i>star</i> entre 3 y 6 meses.....	41
5.4.- Identificaciones de grupos de peces en individuos indiferenciados.....	42
5.4.1.- Expresión génica en gónadas de individuos de 3 meses.....	42
5.4.2.- Expresión génica en gónadas de individuos de 6 meses.....	45
6.- Discusión.....	48
7.- Conclusión.....	55
8.- Bibliografía.....	56

1.- Introducción

1.1.- Modelo de estudio

Los esturiones son un grupo de peces antiguos que tienen importancia productiva. Esto se debe a que sus ovocitos postvitelogénicos, mejor conocidos como caviar, son muy cotizados en todo el mundo. Dentro de este grupo, el esturión siberiano (*Acipenser baerii*), se destaca por ser la especie de esturiones más utilizada en acuicultura. Su gran adaptabilidad a diferentes ambientes permite que sea cultivada en más de 50 países, incluido Uruguay, el cual está ubicado fuera del rango de distribución de este grupo de peces, que se distribuyen en el hemisferio norte (Bronzi et al., 2011, 2019) y se encuentra entre los principales exportadores de caviar en el mundo junto con China, Italia, Francia, Israel, Bulgaria, Estados Unidos, entre otros (Bronzi et al., 2019; Infonegocios, 2020).

El esturión siberiano descubierto por Brandt (1869), es una de las 17 especies que en la actualidad representan el género *Acipenser*, el cual pertenece a los Acipenseriformes, único orden representante de la subclase Chondrostei (Grande y Bemis, 1996). Habitan la Tierra desde el Jurásico tardío, cuando se da la divergencia entre los esturiones verdaderos (*Acipenseridae*) y los peces remo o paleta (*Polyodontidae*). Se cree que la divergencia se da a partir de *Peipiaostidae*, ancestro en común que tienen ambas familias, ya extinto (Grande y Bemis, 1996) y que habitó la Tierra durante el período jurásico (Birstein y DeSalle, 1998).

Comúnmente se les atribuye el término "fósiles vivientes", esto se debe a que prácticamente no han sufrido cambios durante su desarrollo evolutivo. Según el registro fósil existente, conservan muchos de los rasgos que presentaban sus antepasados (Gardiner, 1984). Esto posiblemente está relacionado a la poliploidía y a la presencia de microcromosomas (Birstein y Vasiliev, 1987), lo que podría amortiguar mutaciones manteniendo características ancestrales. Son peces basales que se encuentran en la base de los Actinopterygii y si bien son considerados peces óseos, presentan una serie

de características que llevaron a postular en el S. XIX un mayor emparentamiento con los elasmobranquios. Entre ellas podemos remarcar la presencia de espiráculos, la composición cartilaginosa del endoesqueleto, suspensión mandibular de tipo hiofíllica (refiere a la manera en la que el arco mandibular se sostiene al cráneo) y el palatocuatrato protusible (componente superior de la mandíbula). Son individuos con una notable reducción del grado de osificación si se lo compara con el resto de los peces óseos. Sin embargo, evidencia fósil indica que los antepasados presentaban un esqueleto osificado y que el grado de osificación fue perdiendo relevancia a lo largo del desarrollo evolutivo de esta familia a través de la reducción paedomórfica del esqueleto, es decir, retraso en el desarrollo manteniendo características típicas de etapas tempranas del mismo. Por otro lado, ahora se sabe que el palatocuatrato protusible se deriva independientemente de los condrosteanos (Bemis et al., 1997).

Los hallazgos fósiles realizados hasta la fecha sugieren que los Acipenseriformes presentan distribución holártica (LeBreton et al., 2005), es decir, en todo el hemisferio norte, permitida por su gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Choudhury y Dick, 1998). Sin embargo, no hay una única postura sobre su origen. Según Birstein y De Salle (1998), aparecen por primera vez durante el Período Jurásico en la región de Asia Central, en la cuenca del mar de Tethys debido a la presencia de fósiles de Peipiaostidae en esa zona. Por otro lado, Bemis y Kynard (1996), proponen que el lugar más probable para el surgimiento de este grupo es Europa Occidental durante el Período Triásico. Esto es consistente con la presencia en dicha región del género *Birgeria* y de la familia Chondrosteidae posibles grupos hermanos de los Acipenseriformes (Granade y Bemis, 1996).

Dentro de la familia Acipenseridae se pueden distinguir especies o incluso, poblaciones con determinadas historias de vida que involucran diferentes patrones de migración y que abarcan varios tipos de ambientes (Rochard et al., 1990). El objetivo de las migraciones reside en la búsqueda de alimento, evitar las condiciones adversas y maximizar el éxito reproductivo (Auer, 1996). Algunas migran siempre dentro de

ambientes dulceacuícolas (ríos o lagos) como es el caso del esturión siberiano (Gisbert y Ruban, 2003), a lo que se denomina migración potádroma. Son más comunes las especies de esturiones anádromas, es decir, que pasan la mayor parte de su vida en aguas oceánicas y regresan al agua dulce a reproducirse (desovar). Estas especies utilizan ambientes dulceacuícolas, estuarinos y marinos. Sin embargo, todas se reproducen en agua dulce (Rochard et al., 1990).

La construcción de represas llevada a cabo principalmente durante el siglo XX ha influido seriamente en los patrones migratorios (no solo en esturiones), impidiendo que completen su ciclo de vida. En muchos casos, quedan inaccesibles los hábitats utilizados para el desove, lo que inevitablemente conduce a la extinción de las especies (Rochard et al., 1990). La obstaculización de las rutas migratorias, la pesca excesiva, la destrucción y contaminación de hábitats y la escasez de protocolos que promuevan la conservación son las principales causas de que esta especie se encuentre en peligro de extinción según lo indica la última actualización de la lista roja realizada por la UICN (en inglés, Internacional Union for Conservation of Nature) en 2010 (Ruban y Bin Zhu, 2010).

A excepción de las dos especies del género *Huso* (*Huso dauricus* y *Huso huso*), las cuales son depredadores pelágicos y están más asociadas a la columna de agua que al sustrato, el resto de las especies de esturión están asociados al lecho de los ríos, el cual frecuentan para conseguir alimento ya que su dieta está basada prácticamente en el zoobentos. Es por esto que presentan adaptaciones afines al hábitat que ocupan. Por ejemplo, aletas pectorales comprimidas dorsoventralmente como si fueran alas y área ventral aplanada las cuales permiten una interacción mucho más estable con el sustrato manteniendo profundidad y locomoción constante durante su alimentación, cinco hileras de escudos óseos que posiblemente protegen de la depredación (principalmente a juveniles), boca protusible y en posición inferior a excepción de las especies del género *Huso* que al ser piscívoros presentan boca en posición subterminal

inferior. Esta modificación permitió un aumento del rango dietético, pudiendo cazar tanto pequeños peces como especies bentónicas. Además, todas las especies presentan cuatro barbillas en la superficie ventral del rostro las cuales están tapizadas de órganos quimiorreceptores (Birstein et al., 1997). Otras características típicas de este grupo son su aspecto escualiforme, proyección rostral u hocico aplanado ventralmente el cual puede ser más o menos alargado dependiendo de la especie, ausencia de dientes y cola heterocerca con el lóbulo hipocordal reducido en especies bentónicas para facilitar la movilidad contra el sustrato (Lebreton et al., 2005).

1.2.- Determinación sexual

En especies gonocóricas, la determinación del sexo es una etapa en el desarrollo en donde queda definido el género del individuo y existen dos mecanismos principales que conducen a la misma, la determinación genética (GSD) y la determinación ambiental (ESD) (Penman y Piferrer, 2008). Si bien son considerados mecanismos independientes, algunas especies parecen combinarlos a la hora de determinar su sexo (Lagomarsino y Conover, 1993). Dentro de la determinación genética se han observado sistemas monofactoriales y sistemas polifactoriales (Penman y Piferrer, 2008). En este tipo de determinación, el sexo queda determinado durante la fecundación a través de uno o varios factores genéticos que se heredan de forma diferencial entre sexos. La determinación genética y monofactorial ocurre cuando hay un único gen que determina el sexo, en general asociado a un cromosoma sexual y como resultado en la descendencia se obtiene una proporción de sexos 1:1. Mientras que en las formas poligénicas los determinantes genéticos del sexo se localizan en diversos *loci* y la sumatoria de ellos determina el sexo, por lo que la proporción de sexo de la descendencia difiere de 1:1 (Devlin y Nagahama, 2002; Penman y Piferrer, 2008). Hace unos años este tipo de determinación del sexo era considerado un proceso evolutivamente transitorio expuesto a presiones selectivas que con el tiempo daría lugar a los sistemas de determinación sexual conocidos (Rice, 1986). Sin embargo, ahora se

sabe que evolucionó de forma independiente en diversos taxa como peces, mamíferos, insectos y plantas, lo que hace pensar que es una estrategia estable y no un paso intermedio en la evolución de otros mecanismos (Moore y Roberts, 2013)

En los individuos en los que la determinación es ambiental, su sexo queda definido después de la fecundación. En estos casos la proporción de sexos difiere de 1:1. El ambiente tiene la capacidad de regular la producción de hormonas esteroideas y la expresión de genes a través de la integración de las señales ambientales por el sistema nervioso central (Penman y Piferrer, 2008). En la mayoría de los casos en los que la determinación se da a través de esta vía, la temperatura a la cual se vean expuestos los embriones o larvas aparece como el factor determinante (Penman y Piferrer, 2008). La primera evidencia de la importancia de la temperatura en la determinación del sexo en peces se encontró en el pejerrey del Atlántico (*Menidia menidia*), donde se demostró que altas temperaturas durante el desarrollo temprano induce la diferenciación a machos (Conover y Kynard, 1981). En pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), se vio que, durante el período de diferenciación sexual a temperaturas masculinizantes, los niveles de la hormona cortisol (relacionada con el estrés), 11-cetotestosterona (11-KT) y testosterona (T) (andrógenos importantes en la vía de diferenciación testicular) aumentan con respecto a aquellos individuos expuestos a temperaturas feminizantes. Además, individuos tratados con cortisol mostraron un aumento de 11-KT y T, la activación del gen masculino *amh* que codifica para la hormona anti-Mülleriana y supresión del gen femenino *aromatasa* que codifica para la enzima que transforma T en estradiol-17 β (E2-17 β), siendo la E2-17 β la hormona feminizante universal de los peces (Guiguen et al., 2010). Esto sugiere que la hormona cortisol está involucrada en la diferenciación del pejerrey al actuar como mediador entre la temperatura y la diferenciación sexual (Hattori et al., 2009). Se ha constatado la influencia de la temperatura en más de 60 especies (Penman y Piferrer, 2008).

En especies con determinación monofactorial el gen que determina el sexo del individuo se localiza en lo que se denomina cromosoma sexual configurando así un sistema de determinación en donde un sexo es heterogamético mientras que el otro es homogamético ya que posee dos copias iguales del mismo cromosoma sexual. Cuando el macho es heterogamético hablamos entonces de un sistema XX/XY mientras que cuando la hembra es heterogamética estamos frente al sistema ZZ/ZW (Hule et al., 2014). En peces no existe un sistema de determinación sexual único como ocurre en otros grupos de vertebrados como mamíferos placentados (XX/XY) (Wallis et al., 2008) y aves (ZZ/ZW) (Smith et al., 2007). Incluso dentro el mismo género encontramos especies con diferentes sistemas de determinación sexual como ocurre en *Oreochromis* (Cnaani et al., 2008) o en *Oryzias* (Takehana et al., 2008). A pesar de los descubrimientos anteriormente mencionados, la mayoría de las especies de peces no presentan cromosomas sexuales morfológicamente diferenciados (Devlin y Nagahama, 2002) por lo que es muy difícil realizar nuevos hallazgos basados en estudios de citogenética, es decir, estudiando el cariotipo.

Otro factor que influye en el estudio de la determinación del sexo en especies con determinación monofactorial, reside en la ausencia de un gen determinante del sexo universal altamente conservado como es el caso de *SRY* en la mayoría de los mamíferos placentados (Wallis et al., 2008) o *dmrt1* en la mayoría de las aves (Pan et al., 2018). A pesar de ello, la mayoría de genes determinantes descubiertos hasta el momento en peces, pertenecen a una de las tres familias de proteínas implicadas en la diferenciación de sexo en vertebrados. Estas son: SOX (del inglés, Sry-related HMG box), DMRT (del inglés, Doublesex and mab 3 related transcription factors) y TGF- β (del inglés, transforming growth factors). En base a estos hallazgos, se podría pensar que hay una relación de asociación entre estas tres familias de proteínas y los genes determinantes del sexo. Sin embargo, no parece existir ninguna relación evidente entre los genes determinantes hallados. Es más probable que sean eventos independientes y repetidos a lo largo de la evolución (Pan et al., 2018). En este sentido es necesario

remarcar el gen determinante del sexo *sdyl* hallado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yano et al., 2012), el cual es un factor vinculado con el sistema inmune y no está relacionado a ninguna de estas tres familias proteicas. Los genes determinantes del sexo que se conocen hasta el momento están presentados en la Tabla 1.

La corta existencia de los cromosomas sexuales en teleósteos a la cual se asocia la característica de homomórficos, también parece explicar la alta tasa de recombinación existente, que está ligada a la variabilidad en la determinación del sexo y explica la existencia de varios genes determinantes que a su vez están poco conservados, incluso entre especies de la misma familia (Pan et al., 2018). Estos resultados ponen de manifiesto que el mecanismo de determinación sexual en peces es un proceso especie específico, lo que dificulta aún más la búsqueda de un nuevo gen.

Tabla1. Genes determinantes del sexo descubiertos hasta el momento.

Gen	Especie(s) que se descubrió	Sistema de determinación	Publicación
<i>Dmy</i>	<i>Oryzias latipes</i> ; <i>Oryzias curvinotus</i>	XY	Matsuda et al., 2002; Matsuda et al., 2003
<i>dmrt1</i>	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	ZW	Chen et al., 2014
<i>sox3</i>	<i>Oryzias dancena</i>	XY	Takehana et al., 2014
<i>Amhy</i>	<i>Odontesthes hatcheri</i> ; <i>Oreochromis niloticus</i>	XY	Hattori et al., 2012; Li et al., 2015
<i>Amhby</i>	<i>Esox Lucius</i>	XY	Pan et al., 2019
<i>amhr2y</i>	<i>Takifugu rubripes</i>	XY	Kamiya et al., 2012
<i>Gsdfy</i>	<i>Oryzias luzonensis</i>	XY	Myosho et al., 2012
<i>Sdy</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XY	Yano et al., 2012
<i>hsd17β1</i>	<i>Seriola</i>	ZW	Koyama et al., 2019

En esturiones no está claro el mecanismo de determinación sexual. Los estudios de citogenética no han podido demostrar la presencia de cromosomas sexuales posiblemente debido a las etapas tempranas de evolución en la que se encuentran los cromosomas (Volff, 2005). Por otro lado, los estudios de ginogénesis realizados aportan pruebas indirectas de que el sexo femenino sería heterogamético, o sea ZW (Van Eenennaam et al., 1999; Omoto et al., 2005; Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat 2010; Saber y Hallajian, 2014). Además, Fopp-Bayat (2010) y Van Eenennaam et al., (1999) observaron en *A. baerii* y esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) respectivamente que en el grupo de peces no ginogénéticos correspondientes al control, la proporción del sexo no varía de 1:1, lo que estaría indicando que el mecanismo de determinación sería genético y monofactorial. Sin embargo, no es posible concluir que el sistema de determinación del sexo correspondiese al sistema ZZ/ZW, ya que no se pudo descartar que se tratase de un sistema Z/A (Van Eenennaam et al., 1999). Recientemente, se descubrió un marcador sexual asociado al genoma de las hembras en sterlet (*Acipenser ruthenus*), y según los autores, esto estaría apoyando la teoría de que sterlet presenta un mecanismo de determinación genética, monofactorial y sistema de determinación ZZ/ZW (Kuhl et al., 2020). Sin embargo, estos autores no pudieron identificar el gen determinante del sexo en sterlet, descubrimiento que sería clave para entender el mecanismo de determinación tanto en sterlet como en otras especies de esturiones del género *Acipenser*.

1.3.- Diferenciación sexual

Luego de que el sexo se determina ocurre una cascada de eventos moleculares y bioquímicos que conducen a cambios citológicos y morfológicos. A esa etapa posterior a la determinación se le llama diferenciación sexual y refiere al proceso ontogenético a través del cual, el tejido gonadal que permanecía indiferenciado comienza a manifestar cambios que posteriormente desembocará en la formación testicular u ovárica (Piferrer, 2011). Antes de que el sexo sea determinado, la gónada indiferenciada, denominada

primordio gonadal es biopotencial, es decir, tiene la capacidad de producir dos tipos de células diferentes a partir del mismo grupo celular. La gónada es el único órgano que posee esta característica, por lo que es un modelo interesante a la hora de realizar estudios de organogénesis, los cuales ya han empezado a dilucidar cascadas génicas encargadas de conducir a las células hacia la diferenciación testicular u ovárica (Brennan y Capel, 2004).

Dependiendo del destino de la gónada, se van a expresar determinados genes asociados a la vía masculina o a la femenina. Estos genes se van a expresar en un intervalo de tiempo específico, el cual se denomina período de diferenciación molecular del sexo y precede a la diferenciación morfológica (Vizziano et al., 2007). Este proceso no es un evento aislado, sino que está directamente ligado a factores exógenos como la temperatura o eventos comportamentales y fisiológicos como las hormonas esteroideas que influyen y condicionan el destino del primordio gonadal (Nakamura et al., 1998; Baroiller et al., 1999; Devlin y Nagahama, 2002).

Como ya fue mencionado, los actores principales de la determinación del sexo en peces varían entre las especies. Sin embargo, los factores involucrados en las cascadas bioquímicas que estos desencadenan y que conducen a la diferenciación morfológica están relativamente conservados en vertebrados. Por ejemplo, la proteína “forkhead box protein L2” o foxl2, la enzima aromatasa (cyp19a1a), la folistatina (fst) son esenciales en la vía de diferenciación ovárica de distintos vertebrados, mientras el factor de transcripción SOX-9 (sox9), factor de empalme 1 (sf1), receptor nuclear de la subfamilia 0, grupo B, miembro 1 (nr0b1), amh, y el factor de transcripción “Doublesex and mab-3 related transcription factor 1” (dmrt1) y factor derivado del soma gonadal (gsdf) son factores conservados en la vía de diferenciación testicular (Brennan y Capel, 2004; Nagahama, 2005; Yao, 2005; Vizziano et al., 2007; Ijiri et al., 2008; Piferrer y Guiguen, 2008; Siegfried, 2010; Ribas et al., 2016; Hayman et al., 2021). Por lo que es interesante estudiar la expresión de los genes que los codifican. Igualmente se observan

diferencias en sus secuencias, en la ubicación dentro de las cascadas génicas y en la expresión sexo específica de algunos de ellos.

Sin embargo, en peces, así como en otros vertebrados inferiores, los esteroides sexuales toman relevancia y se posicionan como actores principales en la diferenciación, desarrollo y manutención del sexo. De hecho, Yamamoto (1969) los definió como inductores naturales del sexo en peces. Posteriormente, más de 50 años de estudios han confirmado el papel central y universal de los estrógenos en la regulación de la diferenciación de la gónada femenina de peces (Guiguen et al., 2010), y ha relativizado el papel universal de los andrógenos que no siempre se encuentran sintetizados en el período previo a la diferenciación sexual (Nakamura et al., 1998).

1.3.1.- Papel del eje hipotálamo-pituitaria-gónada en el control de la diferenciación sexual.

Hasta el momento hemos introducido los factores gonadales que controlan la diferenciación sexual en peces. Sin embargo, existen algunos indicios que defienden la idea de que podría haber un papel importante del eje hipotálamo-pituitaria-gónada en la regulación de la diferenciación del sexo en peces.

En este sentido, recordaremos el papel del eje hipotálamo-pituitaria-gónada en la regulación de la reproducción del adulto para luego introducir los datos de interés referentes a la diferenciación sexual. Este eje se encarga de integrar las señales que conducen a la maduración gonadal (Trudeau, 1997). Las hormonas gonadotrópicas (GTHs): hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) son producidas en la glándula pituitaria y transportadas vía sanguínea hasta las gónadas en donde hay receptores específicos a éstas (Devlin y Nagahama, 2002). Además de regular la maduración gonadal en peces adultos, se ha demostrado la expresión de GTHs y sus receptores gonadales antes de la diferenciación morfológica de la gónada, es decir, en el momento en el que se desencadenan las cascadas moleculares que conducen la diferenciación sexual. Lo que ha permitido sugerir, que la hipófisis a través de sus hormonas gonadotropas es importante durante la diferenciación (Baroiller, 1999; Devlin

y Nagahama, 2002; Yan, 2012). La FSH, por ejemplo, es producida antes de la maduración y promueve la síntesis esteroidea y el crecimiento gonadal (Devlin y Nagahama, 2002; Yan, 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de receptores de FSH en hembras genéticas durante la diferenciación ovárica parece estar involucrada en la diferenciación en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Además, se ha demostrado que la transcripción del gen *cyp19a1a*, el cual codifica para la enzima encargada de la producción de estrógenos a partir de andrógenos, es estimulada por las gonadotropinas en peces teleósteos. También se postula que incluso bajas concentraciones de receptores de FSH en machos son suficientes para iniciar y mantener la expresión de *dmrt1* en *O. niloticus* (Yan, 2012). En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), receptores de LH están altamente expresados durante el desarrollo ovárico temprano, coincidiendo con la alta expresión de aromatasa lo que sugiere la participación en la diferenciación ovárica (Baron et al., 2005). La comunicación entre el cerebro y las gónadas en desarrollo es esencial para asegurar niveles de GTHs y el desarrollo gonadal apropiado. Se sabe que las gonadotropinas estimulan la síntesis de esteroides en gónadas de teleósteos y a su vez los esteroides sexuales completan la vía generando un ciclo de retroalimentación positivo con el cerebro que regula la producción de GTHs (Devlin y Nagahama, 2002). Sin embargo, son necesarios más estudios dirigidos a estudiar el rol hipofisario durante la diferenciación sexual en peces.

1.3.2.- Producción de esteroides y su papel en el desarrollo gonadal

El precursor de las hormonas esteroideas es el colesterol, el cual es transportado por la proteína StAR hacia el interior de la mitocondria. Un conjunto de enzimas esteroideogénicas importantes van a actuar sobre el colesterol para desencadenar la producción de andrógenos y estrógenos. En los peces, los andrógenos son producidos por las células de Leydig ubicadas en los intersticios entre los túbulos testiculares que contienen el epitelio germinativo constituido por cistos de células espermatogénicas, mientras que en el ovario tanto los andrógenos como los estrógenos son producidos por

las células foliculares que rodean los ovocitos en desarrollo (Nagahama et al., 1982). En estas células foliculares, precisamente en las células de la granulosa se expresa el gen que codifica para la enzima aromatasa (*cyp19a1a*), la cual va a llevar a cabo la producción de estrógenos a partir de andrógenos que son producidos por las células de la teca (Kagawa et al., 1982). Las principales hormonas esteroideas involucradas en la diferenciación son: E2-17 β , fundamental para el desarrollo ovárico y andrógenos 11-oxygenados fundamentales en el desarrollo testicular de la mayoría de las especies de teleósteos (Piferrer, 2011). Se ha documentado la presencia de células productoras de esteroides (SPCs) durante la diferenciación ovárica de varias especies como en tilapia (*Sharoterodon niloticus*) (Nakamura y Nagahama, 1985), salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*) (Nakamura y Nagahama, 1993) y tilapia del Nilo (Nakamura et al., 2003). En esturión siberiano y en sterlet (*A. ruthenus*), SPCs también fueron detectadas durante la diferenciación tanto en hembras como en machos y la intensificación de la actividad de estas células fue acompañada del aumento en la expresión de E2-17 β y T en hembras y machos respectivamente (Mosyagina y Zelennikov, 2016). Sin embargo, en algunos casos no está tan clara la aparición de las SPCs durante la diferenciación. Por ejemplo, no fue posible detectar presencia de SPCs antes de la diferenciación en medaka (Kanamori et al., 1985).

Para evaluar si, efectivamente, tanto los andrógenos como los estrógenos están presentes durante la diferenciación, Nakamura (1998) estudió la expresión de cuatro enzimas importantes en la cascada esteroidogénica: la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}), la cual actúa al inicio de la cascada cortando la cadena lateral del colesterol para producir pregnenolona; la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), encargada de producir progesterona y 17-hidroprogesterona a partir de pregnenolona y 17-hidroxipregnenolona respectivamente; la 17,20 liasa (C17), cuya función es la producción de dehidro-epiandrosterona y androstenediona a partir de 17-hidroxipregnenolona y 17-hidroxiprogesterona respectivamente; por último la citocromo P450 aromatasa (aromatasa) cuya importancia fue descrita anteriormente. Se demostró

que estas enzimas se expresan en gónadas indiferenciadas en hembras genéticas y la actividad de éstas aumenta a medida que evoluciona el desarrollo ovárico. Debido al rol de la enzima aromatasa de producir estrógenos, estos estudios sugieren la presencia de E2-17 β al inicio y durante la diferenciación. Por otro lado, en machos solo se detectó la expresión de estas enzimas después de la diferenciación testicular con la excepción de la enzima aromatasa, la cual nunca fue detectada. Estos eventos sugieren que en tilapia del Nilo los andrógenos no juegan un papel importante en la diferenciación testicular. Por otro lado, si se documentó la participación de andrógenos 11-oxigenados en pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Blasco et al., 2010; 2013).

Con el objetivo de lograr entender mejor el rol de las hormonas esteroideas sexuales en la diferenciación gonadal y tomando como referencia los resultados obtenidos por Yamamoto (1969) en *O. latipes*, donde logró invertir el sexo genético tanto de hembras como de machos utilizando esteroides sexuales, se han llevado a cabo varios estudios relacionados a la capacidad de invertir el sexo fenotípico al intervenir en la producción de estrógenos y andrógenos. Por ejemplo, la inhibición de la aromatasa durante el período clave de diferenciación sexual resulta en la inversión del sexo, es decir que ejemplares genotípicamente hembras desarrollan un fenotipo masculino (Piferrer et al., 1994; Baroiller et al., 1999; Guiguen et al., 1999; Guiguen et al., 2010). La consistencia de estos resultados confirma el rol clave de los estrógenos en el desarrollo ovárico. Además, la administración de estrógenos en machos, principalmente E2-17 β dio como resultado la inversión del sexo a hembras fenotípicas en varias especies de peces (Baroiller et al., 1999; Guiguen, 2000; Piferrer, 2001). En esturiones también se ha logrado invertir el sexo hacia hembras luego de aplicar tratamientos con estrógenos (Falahatkar et al., 2014). Los fitoestrógenos, en altas concentraciones, también son capaces de provocar la inversión del sexo en esturiones (Fajkowska et al., 2020). Por otro lado, la masculinización de hembras mediante andrógenos también ha sido ampliamente documentada en otros peces (Hunter y Donaldson, 1983; Devlin y Naghama, 2002). La administración de MT, un andrógeno sintético, ha sido efectiva en

más de 25 especies y junto con 11-KT son los más efectivos masculinizantes (Devlin y Naghama, 2002). También se vio que en hembras de goldfish (*Carassius auratus*) adultas la 11-KT puede conducir al desarrollo testicular, lo que estaría indicando que aún en organismos adultos las células germinales siguen manteniendo su bipotencialidad (Kobayashi et al., 1997). Los resultados obtenidos relacionados al rol de los esteroides sexuales durante la diferenciación sexual permiten concluir que son muy importantes en el desarrollo gonadal en peces. En resumen, el E2-17 β es un regulador universal de la diferenciación femenina de peces, pero los andrógenos endógenos solo cumplirían un papel importante en algunas especies.

Los tiempos empleados por cada especie en el proceso de diferenciación son muy variables. Por ejemplo, los primeros signos moleculares de diferenciación en trucha arcoíris fueron observados inmediatamente después de la eclosión y a las 5 semanas se detectaron los primeros signos morfológicos de diferenciación (Vizziano et al., 2007). En tilapia del Nilo la expresión de *aromatasa* y *foxl2* en hembras y *dmrt1* en machos es crítica para el inicio de la diferenciación y se da 6 días después de la eclosión (Yan et al., 2012). Por otro lado, hay especies en las que el desarrollo lleva mucho más tiempo, como es el caso de los esturiones. En condiciones de cautiverio en Uruguay, se ha identificado que en el esturión siberiano el período de diferenciación molecular del sexo ocurre entre el tercer y el sexto meses de vida (Vizziano-Cantonnet et al., 2016, 2018), el cual precede el período de diferenciación morfológica de la gónada y que, según los diferentes autores y criterios morfológicos utilizados, puede comenzar al sexto (Rzepkowska y Ostaszewska, 2014) o al octavo mes de vida (Vizziano-Cantonnet et al., 2018). Mientras que la madurez sexual en cautiverio es alcanzada entre los 3 y 4 años en machos y 7 y 8 años las hembras según datos obtenidos de animales criados en Francia (Billard y Lecointre, 2000) En Uruguay los machos llegan a la madurez sexual a los 3 años y las hembras a los 5 años de edad (Vizziano-Cantonnet et al., 2018).

Como ya se dijo, hace ya varios años, Uruguay se posiciona como uno de los principales productores de caviar en el mundo. El caviar son los ovocitos en post

vitelogenesis producidos por las hembras una vez que cumplen su gametogénesis completa, es decir a los 7 años aproximadamente en Francia y a los 5 a 6 años en Uruguay. Realizar el sexado temprano de los individuos es importante, no solo desde el punto de vista productivo, sino también para comprender los mecanismos que controlan el sexo para poder regularlos artificialmente. El Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces (FREPE) se ha dedicado en los últimos años a comprender los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación del sexo del esturión siberiano, así como en la búsqueda de un marcador sexo específico, que sienten bases para el control del sexo y el sexado de estos peces. El Laboratorio avanzó en la comprensión de los genes que controlan la gónada indiferenciada de 5 y 6 meses, y recién ahora se está dedicando a los estadios más tempranos del desarrollo alrededor de los 3 meses de edad. Es por ello que esta tesis se centró en investigar los potenciales genes femeninos activados tempranamente y compararlos con el momento de plena diferenciación molecular.

Respecto de los marcadores a nivel de ADNg, hasta hace muy poco no se conocía ningún marcador molecular que permitiera discernir entre sexos (Yarmohammadi et al., 2011). Nuestro Laboratorio dedicó un proyecto entero al secuenciado del ADN genómico por RAD sequencing y a la construcción de una base de SNPs de machos y hembras de esturión siberiano. Se compararon la base de SNPs de hembras y machos, se seleccionaron kmeros potencialmente femeninos pero el HRM no confirmó que ninguno de ellos sirviera como marcador. Ese mismo año (2020) se publicó una comparación del genoma masculino y femenino de sterlet (*A. ruthenus*) encontrándose un marcador de las hembras a nivel del ADNg pero aún no se encontró el gen determinante del sexo (Kuhl et al., 2020). Dicho marcador ya fue validado recientemente por nuestro Laboratorio para el esturión siberiano. En este momento nos encontramos realizando el sexado temprano de los esturiones lo cual nos permitirá dar un salto cualitativo en el estudio de la diferenciación sexual de estos peces.

1.4.- Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR)

Ha sido ampliamente demostrado el rol de los estrógenos en la diferenciación de la vía femenina en peces. considerados como los inductores naturales de la diferenciación ovárica (Nagahama, 2005). En un primer análisis de expresión diferencial entre potenciales hembras de 2,5 meses y potenciales machos o no diferenciados de 3 meses, surgieron varios genes activados en las potenciales hembras, entre los cuales se encontró la proteína StAR que nos llamó la atención porque es la que regula el paso clave de conversión de colesterol en esteroides.

En base a ello, en este trabajo nos vamos a centrar en el análisis de StAR, la cual es importante al inicio de la cascada esteroidogénica. Los primeros estudios sobre la funcionalidad de esta enzima fueron realizados en mamíferos. Clark, et al. (1994) lograron, por primera vez, caracterizar StAR en ratón; al identificar una proteína localizada en las mitocondrias, que se sintetizaba como consecuencia de la acción de la LH. Además, demostraron que su expresión era suficiente para inducir la producción de esteroides sin estimulación hormonal. A partir de este descubrimiento se ha caracterizado StAR en varias especies, lo que ha permitido determinar que su estructura y función están altamente conservadas entre diferentes grupos de vertebrados (Bauer et al., 2000; Kusakabe et al., 2002), incluso en peses óseos primitivos como es el caso del esturión; la secuencia aminoacídica de StAR compartida entre el esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) y otros vertebrados es mayor a 60%. Además, si se analiza únicamente la porción C-terminal se observa que es una región altamente conservada (Kusakabe et al., 2002), presentando una homología de secuencia aminoacídica del 70% entre esturión blanco y otros vertebrados (Kusakabe et al., 2009).

La producción de esteroides es un proceso que se lleva a cabo dentro de la mitocondria por lo que, el colesterol debe entrar a esta donde será transformado a pregnenolona por la P450scc (Farkash et al., 1986). Sin embargo, la capa acuosa presente entre las membranas mitocondriales imposibilita la difusión del colesterol hacia el interior de la mitocondria, debido a la composición lipídica de esta molécula (Stocco,

2000); esto, inevitablemente, lleva a que sea necesaria la presencia de una proteína transportadora que se encarga de este proceso. El pasaje de colesterol desde la membrana externa hacia el interior de la mitocondria y la velocidad a la cual es llevado a cabo este proceso es el paso limitante en la producción de esteroides, además de una etapa clave en la regulación por hormonas tróficas (Stocco, 2000).

StAR contiene una región sumamente relevante, la región C-terminal, aquí se encuentra el dominio de transferencia de lípidos relacionado a *star* (START), el cual es esencial en el transporte del colesterol ya que contiene aminoácidos encargados de formar una estructura de túnel hidrofóbica (Tsujiyama y Hurley, 2000); si se prescinde de esta región la producción de esteroides se ve interrumpida. Por otro lado, hacia la porción N-terminal se encuentra la secuencia encargada de transportar a la proteína hacia el interior de la mitocondria. Sin embargo, si esta región se elimina la proteína no puede entrar a la mitocondria, pero no se afecta la actividad potenciadora de la esteroidogénesis de StAR. Esto sugiere que StAR actúa desde la cara externa de la membrana externa mitocondrial y no desde el espacio intermembrana (Arakane, 1996).

La expresión gonadal de *star* en trucha ha sido identificada en células de Leydig en los testículos y en la capa tecal del folículo ovárico (Kusakabe et al., 2002). La esteroidogénesis gonadal es regulada por las gonadotropinas circulantes que se unen a sus respectivos receptores en las células esteroidogénicas. En ovario de pez cebra (*Danio rerio*) se vio que LH puede regular la expresión de *star* ya que esta se ve comprometida en aquellos individuos deficientes de LH (Shang et al., 2019). Kusakabe et al. (2002) demostraron que los cambios en la producción de esteroides están asociados a cambios en los niveles de ARNm de *star*. La transcripción de *star* aumenta en los folículos ováricos durante la maduración final y la ovulación en trucha y disminuye en los folículos post ovulatorios. En el pez sable (*Anoplopoma fimbria*) la transcripción de *star* temprana en la diferenciación permanece baja, seguida de un aumento en su expresión, justo antes de la aparición de los primeros signos de diferenciación morfológica, la cual es significativamente mayor en machos que en hembras. Incluso

consideran a *star* dentro de un grupo de potenciales genes marcadores masculinos debido a su expresión sexo dimórfica. Además, parece haber una expresión más temprana de genes asociados a la señalización de esteroides en machos que en hembras (Hayman et al., 2021); contrario a lo que habitualmente se postula, es decir, que la actividad esteroidea comienza más tempranamente en hembras (Piferrer, 2001; Vizziano et al., 2007; Ijiri et al., 2008; Vizziano-Cattonnet et al., 2016).

Berbejillo et al. (2012), realizaron un estudio de la expresión de esta proteína, junto con otros genes, en el período de peri diferenciación gonadal en el esturión siberiano constatando que su expresión era mayor en machos que en hembras y abriendo la puerta a futuras investigaciones en períodos previos a la diferenciación morfológica del sexo. Estudios realizados durante el periodo de diferenciación molecular en esturión siberiano indican, que los estrógenos juegan un rol importante en la diferenciación hacia la vía femenina. Por otro lado, sugieren que la mayor sensibilidad a los andrógenos se da durante la espermatogénesis temprana y no en etapas previas a la diferenciación morfológica del sexo (Vizziano-Cattonnet et al., 2016). Estos resultados permiten suponer que, debido a la función de potenciador de la esteroidogénesis, la expresión de *star* puede estar más relacionada a la vía femenina durante el período de diferenciación molecular en el esturión siberiano.

1.5.- Enfoque del trabajo:

Este proyecto está enfocado en evaluar la actividad de la proteína StAR durante el período de diferenciación molecular del sexo en esturión siberiano y busca identificar si StAR sigue un patrón de expresión femenina o, por otro lado, no logra ser relevante. En trabajos previos del laboratorio FREP se logró identificar una serie de genes marcadores de la ruta de diferenciación femenina del esturión siberiano entre los 3 y los 6 meses de edad usando el transcriptoma gonadal y su validación por qPCR (Vizziano-Cattonnet et al., 2018; Lasalle, 2019). Sin embargo, el análisis se centró en los individuos de 5 y 6 meses, que fueron en los cuales se pudo inferir el sexo por la

expresión de algunos marcadores femeninos típicos de peces. No se estudiaron en esa ocasión genes implicados muy tempranamente (2,5 y 3 meses) en la vía de diferenciación gonadal femenina.

Para identificar otros genes potenciales femeninos en los 2,5 y 3 meses de edad se comenzó realizando un estudio de bioinformática que implicó hacer un estudio de expresión diferencial del transcriptoma gonadal de individuos potencialmente femeninos (2,5 meses) *versus* individuos potencialmente masculinos o indiferenciados (3 meses). Entre los genes sobre-expresados en los individuos potencialmente femeninos se encontró el gen codificante para la proteína StAR, que como dijimos, está involucrada en la producción de esteroides.

Esta tesis se desarrolló cuando aún no había un marcador del sexo a nivel del ADN_g, validado para el esturión siberiano y es por ello que, para que los resultados obtenidos en este proyecto fueran consistentes y se lograra identificar si efectivamente StAR aporta al programa de diferenciación femenino o no, fue necesario relacionar este trabajo con los estudios realizados por Lasalle (2019), en su tesis de Maestría. En dicha tesis se evaluaron los niveles de expresión de *cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1*, *ix3*, *irx5* y *lhx2* desde los 3 a los 6 meses de edad demostrándose que *cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1* generaban un patrón sexo dimórfico temprano (3 meses de edad) mientras que todos los genes incidieron en la formación de un patrón sexo dimórfico a los 6 meses de edad. Se vincularon los niveles de expresión obtenidos para *star* con los de los genes femeninos identificados por Lasalle (2019).

Se evaluó si la inclusión de *star* entre los genes potencialmente femeninos produce la reorganización espacial de los individuos, generando nuevos grupos, lo que estaría directamente ligado a *star*. La alternativa es que *star* está contribuyendo a fortalecer los grupos formados o simplemente no está influyendo significativamente sobre los mismos.

2.- Hipótesis

Dado que la función de StAR está altamente conservada en los vertebrados y que los estrógenos actúan más tempranamente que los andrógenos en la regulación de los peces en general, postulamos que *star* se expresará muy temprano en las futuras hembras de esturión siberiano. Pensamos que la expresión de *star* se va a correlacionar con la expresión de genes femeninos como *foxl2*, *cyp19a1a* y *hsd17β1* durante etapas tempranas del desarrollo.

3.- Objetivo general:

Entender cómo se comporta *star* durante el período de diferenciación molecular del sexo en esturión siberiano, relacionándolo con la expresión de genes femeninos (*foxl2*, *cyp19a1a*, *hsd17β1*).

3.1- Objetivos específicos:

- 1.- Realizar un análisis bioinformático que logre discriminar cuales son los genes que se sobre expresan en hembras de 2,5 meses de edad y que será utilizado en la elección del gen de estudio.
- 2.-Diseñar cebadores específicos capaces de amplificar *star* que permitan identificar su presencia en gónadas de esturión siberiano.
- 3.-Estudiar la expresión de *star* en gónadas de esturiones juveniles de 3 y 6 meses, meses que cubren una ventana de tiempo clave en el proceso de diferenciación sexual del esturión siberiano.

4.-Relacionar la expresión de *star* con el potencial desarrollo femenino identificado utilizando los marcadores *foxl2*, *cyp19a1a*, *hsd17β1*. Estos últimos fueron obtenidos durante el trabajo de Maestría del Lic. André Lasalle.

4.- Materiales y métodos

4.1.- Animales experimentales y extracción de tejido gonadal

El modelo de estudio utilizado fue el esturión siberiano. Los ejemplares fueron proporcionados por la empresa Estuario del Plata, la cual está ubicada en la localidad de San Gregorio de Polanco, Tacuarembó. Se utilizaron ejemplares de 3 y 6 meses de edad, con la finalidad de abarcar el período previo a la diferenciación morfológica del sexo en el cual está contenido el período de diferenciación molecular.

Los ejemplares utilizados en este proyecto fueron muestreados por un estudiante de posgrado del Laboratorio (Lic. André Lasalle), quien utilizó 30 individuos por mes para su tesis en desarrollo. En esta tesina se utilizará el ADN copia (ADNc) obtenido por ese colega. Sin embargo, con el fin de realizar una formación que incluyera los pasos hasta obtener ADNc, se aprendió a mantener peces en cautividad, realizar muestreo de animales, extracción de ARN, limpieza con DNasas para eliminar remanentes de ADN genómico (ADNg) y retrotranscripción para la obtención de ADNc. Este trabajo fue realizado utilizando peces que permanecían en el acuario del laboratorio.

Para llevar a cabo el muestreo los animales fueron trasladados en baja densidad desde el acuario hasta los laboratorios prácticos con el fin de disminuir el estrés de los ejemplares y evitar cualquier tipo de alteración fisiológica. Una vez en el lugar de muestreo previamente esterilizado con alcohol, se realizó la decervicación de los ejemplares siguiendo el protocolo de la CHEA (Comisión Honoraria Para la Experimentación Animal). Luego se realizó la extracción de las gónadas, utilizando pinzas y bisturíes debidamente esterilizados con alcohol y posteriormente flameados antes de cada disección, además se utilizó una lupa binocular para facilitar el proceso. Cada individuo fue debidamente pesado y medido. Las gónadas fueron introducidas en

criotubos independientes con sus respectivas rotulaciones e inmediatamente conservadas en nitrógeno líquido a $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez finalizada esta etapa las muestras fueron trasladadas a un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este proceso tuvo como objetivo evitar la degradación de la muestra, evitando así, la pérdida de material genético. El material que se obtuvo fue conservado para otras actividades de laboratorio.

4.2.- Extracción de ARN y obtención de ADN copia (ADNc)

Esto fue un aprendizaje técnico general previo al inicio del trabajo específico de tesis usando algunos peces del acuario. La extracción de ARN se realizó a través de dos métodos: Monarch Total RNA Miniprep Kit (BioLabs) y Trizol Reagent (Life Technologies), siguiendo sus respectivos protocolos. La misma fue llevada a cabo en tandas de a 10 muestras con la finalidad de evitar la degradación del ARN que puede tener lugar si se aumenta el tiempo de las muestras a temperatura ambiente. Luego de cada extracción se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific con el cual se estimó la concentración de ARN de cada muestra y la calidad de las mismas a través de las relaciones de absorbancia $260/280\text{ nm}$ y $260/230\text{ nm}$. Si el índice de pureza $260/280$ se encuentra entre 1,8 y 2,0 indica que la calidad de la muestra es alta y no hay contaminación con proteínas. Si el índice de pureza $260/230$ se encuentra entre 1,8 y 2,2 es aceptada como pura e indica que no hay contaminación con compuestos orgánicos. Posteriormente las muestras fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hay que tener en cuenta que la extracción de ARN puede estar contaminada, sobre todo si se utiliza la técnica basada en la aplicación de Trizol. Entre los contaminantes que pueden estar presentes, se encuentran restos de ADN genómico (ADNg). Si no se elimina el ADNg remanente, interferirá en la cuantificación real de la expresión génica. En ese sentido, siguiendo el protocolo Thermo Scientific DNase I, RNase-free se llevó a cabo la eliminación de la posible contaminación por ADNg presente en las muestras. Luego se estimó la concentración de ARNm nuevamente para corroborar que el procedimiento previamente indicado no haya influido sobre la

concentración total de ARNm. Posteriormente se validó la eliminación de la contaminación con ADNg a través de PCR en tiempo final en gel de agarosa 1% utilizando la muestra de ARN como sustrato. La extracción de ARNm es necesaria, a pesar de que la reacción de PCR utilice una muestra de ADN, porque el objetivo de este estudio es evaluar la expresión de un gen específico y para ello es necesario cuantificar la transcripción de dicho gen, lo que va a aportar una idea de la relevancia de la proteína en el tejido y en la etapa del desarrollo en la que se realice el estudio.

4.3.- Retrotranscripción

A través de esta técnica se consigue realizar la conversión del ARNm extraído de las gónadas en ADNc el cual puede ser utilizado para medir expresión génica mediante una reacción de qPCR. Se utilizó el protocolo perteneciente a la empresa Invitrogen basado en la enzima M-MLV RT. La cantidad de ADNc resultante en cada muestra debe ser la misma ya que es la base que se va a utilizar para cuantificar la expresión. Por eso el volumen inicial de ARNm que se introduce en la reacción va a variar, según su concentración, para asegurarse de que tenemos la misma cantidad de nanogramos totales de ARN en cada reacción. Para llevar a cabo la producción de ADNc se utilizaron cebadores aleatorios. Este tipo de cebadores permiten retrotranscribir todos los genes que lograron expresarse. De esta manera se genera material no solo para estudiar un gen específico sino también para estudiar otros genes que se expresan en una etapa del desarrollo específica. En el presente trabajo se utilizarán los cDNA obtenidos durante la tesis de posgrado del Lic. André Lasalle, que fue obtenido en condiciones similares a las descritas.

4.4.- Bioinformática

4.4.1.- Elección del gen de estudio basado en estudios de bioinformática

Para seleccionar el gen a estudiar se realizó un estudio previo, que luego permitió leer la bibliografía correspondiente al gen seleccionado y emitir una hipótesis.

Para esto se llevó a cabo un estudio *a priori* de búsqueda de potenciales genes femeninos en etapas tempranas del desarrollo a través de estudios de expresión diferencial en la plataforma R. Se realizó una búsqueda dentro del transcriptoma mediante el paquete EdgeR, aquí se compararon el pool de individuos de 2,5 meses con un perfil de expresión potencialmente femenino y dos individuos con un perfil de expresión potencialmente masculino de 3 meses. Cabe aclarar que no contábamos con marcadores del sexo a nivel del ADNg al momento de realizar este proyecto. Esta búsqueda se realizó mediante el Script que se puede visualizar en el Anexo 1. Para realizar el filtrado se fijó que la búsqueda de genes expresados diferencialmente y sobre regulados en hembras potenciales tuviera como parámetros un *fdr* (false discovery rate) $<0,05$ y *FC* (del inglés fold change) >0 . El *FC* permite comparar la expresión génica entre dos conjuntos de muestras, es decir, describe como cambia la expresión de un gen con respecto a la expresión del mismo gen en otra muestra. Es así que el transcriptoma gonadal de individuos de 2,5 meses de edad que tenían activación de la *cyp19a1a*, *foxl2* y la *hsd17b1* fue comparado con el transcriptoma de individuos de 3 meses que presentaron bajos niveles de estos tres marcadores femeninos como ya se hizo mención (Anexo 2). Sobre estos genes sobre expresados se realizó un estudio de Gene Ontology Analysis (*GO*) el cual evidenció la actividad, entre otras, de la vía de biosíntesis de esteroides. Los *GO* obtenidos se presentan en la (Anexo 3).

Dentro de los genes que se relacionan con este *GO* encontramos al gen *SSturg2_contig_68507*, que aparece sobre expresado y para el cual se buscó su identidad. El paso siguiente fue identificar la secuencia correspondiente al contigo en la base de datos del transcriptoma gonadal desarrollada anteriormente por el laboratorio. Para esto se filtró la base mediante la herramienta de blasteo "Biomart" y se obtuvo la secuencia nucleotídica correspondiente al contigo buscado. Posteriormente se utilizó la función *blastn* del sitio NCBI (National Center for Biotechnology Information

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para conocer con qué gen se asocia dicha secuencia. Se obtuvo que la misma se corresponde al gen *star* (Figura 1).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
PREDICTED: <i>Acipenser ruthenus</i> steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial-like (LOC117966138)...	<i>Acipenser ruthenus</i>	4105	4105	98%	0.0	98.56%	2377	XM_034911592.1
<i>Acipenser sinensis</i> steroidogenic acute regulatory protein (STAR) mRNA, partial cds	<i>Acipenser sinensis</i>	3575	3575	88%	0.0	96.97%	2579	MF631002.1
PREDICTED: <i>Polyodon spathula</i> steroidogenic acute regulatory protein (star) mRNA	<i>Polyodon spathula</i>	2392	2392	75%	0.0	89.09%	1854	XM_041233750.1
<i>Acipenser transmontanus</i> steroidogenic acute regulatory protein mRNA, complete cds	<i>Acipenser transmontanus</i>	1995	1995	47%	0.0	98.44%	1182	FJ205610.1
PREDICTED: <i>Acipenser ruthenus</i> steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial (LOC117397793). tra...	<i>Acipenser ruthenus</i>	1989	1989	47%	0.0	98.86%	1466	XM_033996654.2
PREDICTED: <i>Acipenser ruthenus</i> steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial (LOC117397793). tra...	<i>Acipenser ruthenus</i>	1723	1723	40%	0.0	98.78%	1022	XM_033996655.2
PREDICTED: <i>Lepisosteus oculatus</i> steroidogenic acute regulatory protein (star) mRNA	<i>Lepisosteus oculatus</i>	700	700	34%	0.0	78.86%	1606	XM_006625323.2
<i>Anguilla japonica</i> STAR mRNA for steroidogenic acute regulatory protein, complete cds	<i>Anguilla japonica</i>	694	694	33%	0.0	79.06%	1451	AB095110.1
PREDICTED: <i>Anguilla anguilla</i> steroidogenic acute regulatory protein (star) mRNA	<i>Anguilla anguilla</i>	690	690	33%	0.0	78.93%	1135	XM_035380310.1

Figura 1: Lista de principales secuencias nucleotídicas obtenidas al realizar el blasteo de la secuencia correspondiente al contig SSturg2_contig_68507 utilizando la herramienta blastn del sitio web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Una vez identificado el gen, se obtuvo a través de la plataforma ExPASy y su herramienta “ExPASy Translate” (<https://web.expasy.org/translate/>) la traducción de este gen verificándose que codificaba para una proteína. Dicho marco de lectura fue analizado través de la herramienta blastp del sitio NCBI para verificar que el mismo correspondiese a la proteína StAR (Figura 2). Por otro lado, se utilizó la secuencia génica de *A. baerii* para identificar en el transcriptoma gonadal cualquier secuencia similar a *star* que pudiera producir problemas a la hora de realizar los siguientes pasos en el estudio.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial isoform X1 [<i>Acipenser ruthenus</i>]	<i>Acipenser ruthenus</i>	587	587	100%	0.0	100.00%	280	XP_033852545.2
steroidogenic acute regulatory protein [<i>Acipenser transmontanus</i>]	<i>Acipenser transmontanus</i>	585	585	100%	0.0	99.64%	280	ACI23577.1
steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial-like [<i>Acipenser ruthenus</i>]	<i>Acipenser ruthenus</i>	585	585	100%	0.0	99.64%	280	XP_034767483.1
steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial [<i>Polyodon spathula</i>]	<i>Polyodon spathula</i>	570	570	100%	0.0	97.14%	280	XP_041089684.1
steroidogenic acute regulatory protein [<i>Anguilla japonica</i>]	<i>Anguilla japonica</i>	496	496	97%	1e-175	87.91%	285	BAC66210.1
steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial [<i>Anguilla anguilla</i>]	<i>Anguilla anguilla</i>	496	496	97%	1e-175	87.91%	285	XP_035236201.1
hypothetical protein ANANG_G00189450 [<i>Anguilla anguilla</i>]	<i>Anguilla anguilla</i>	496	496	97%	1e-175	87.91%	285	KAG5840498.1
steroidogenic acute regulatory protein [<i>Anguilla australis</i>]	<i>Anguilla australis</i>	495	495	97%	2e-175	87.91%	285	AGC29941.1
steroidogenic acute regulatory protein mitochondrial [<i>Megalops cyprinoides</i>]	<i>Megalops cyprinoides</i>	493	493	98%	7e-174	87.27%	334	XP_036382477.1

Figura 2: Lista de principales secuencias proteicas obtenidas al realizar el blasteo de la secuencia correspondiente al contig SSturg2_contig_68507 utilizando la herramienta blastp del sitio web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.4.2.- Diseño de cebadores

Para llevar a cabo el proyecto comencé realizando un entrenamiento en bioinformática en donde aprendí a diseñar cebadores. Poniendo en práctica dicho entrenamiento, se realizó una serie de procedimientos necesarios para el correcto diseño de cebadores. Primeramente y con la finalidad de que los cebadores se comportasen de manera específica, se realizó la alineación, en el programa informático Multalin (Florence Corpet, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), de las secuencias que presentan mayor similitud con *star*. Esta herramienta permite visualizar las regiones de menor similitud entre *star* y el resto de las secuencias. Luego de identificar dichas secuencias se procedió al diseño de los cebadores. Para ello, se utilizó la aplicación web Oligoanalyzer 3.1 correspondiente a la empresa IDT (<https://www.idtdna.com/calc/alyzer>), a través de la cual, se evaluó si eran óptimas las condiciones de las mismas. Una vez verificado que las condiciones de los cebadores fueran las adecuadas se procedió a comprobar la fidelidad entre los mismos y *star* a través de la herramienta BLAST del NCBI. Posteriormente, se realizó la compra de los mismos a través de IDT y se validaron en el laboratorio verificando que el producto obtenido fuese el esperado a través de un gel de agarosa 2%. En la Tabla 2 se aprecian las secuencias específicas de los cebadores y en la figura 3 se muestra el gel de agarosa que verifica la amplificación del producto deseado. Cabe destacar, que el laboratorio validó un juego de cebadores para el gen *star* usando una zona conservada (Berbejillo et al., 2012) cuando aún no se tenía el transcriptoma gonadal (Vizziano-Cantonnet et al., 2018). En este caso, como se conoce la secuencia del gen para esta especie, los cebadores apuntaron a zonas no conservadas de *star* con el fin de levantar un solo contig evitando así levantar otros contigos no deseados presentes en el transcriptoma y que puedan influir en los resultados esperados.

Tabla 2: Cebadores utilizados para la amplificación de *star*

Gen	Forward	Reverse	Tamaño del producto (pb)
<i>star</i>	GATTGAAGAGAAGCCCTACAGT	TCTAGCTTGAACACCTTGCC	185 pb

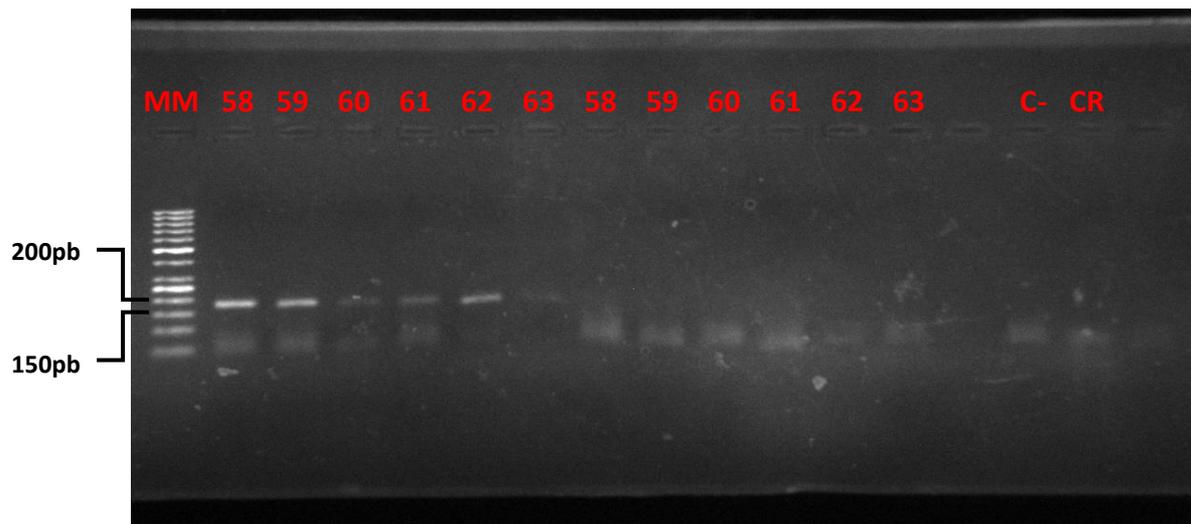


Figura 3. Gel de agarosa al 2% con los resultados de PCR obtenidos mediante un gradiente de temperaturas utilizando los cebadores elegidos para la amplificación de *star*. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular (GeneRuler 50pb DNA Ladder), gradiente de temperatura en °C (58, 59, 60, 61, 62 y 63), para machos y hembras, control negativo y control de reactivos. Se observa un solo producto de 180pb para todas las temperaturas en machos.

4.5.- PCR en tiempo real

Para cuantificar la expresión de *star* en dos estadios englobados dentro del período de diferenciación molecular del sexo en esturión siberiano se realizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) sobre el ADNc obtenido previamente en el laboratorio. La qPCR es una técnica rápida ya que no es necesario realizar una electroforesis para revelar los resultados como en la PCR en tiempo final, los datos son brindados al investigador a medida que va transcurriendo la amplificación. Por otro lado, es muy sensible en la cuantificación de ácidos nucleicos, permitiendo la obtención de resultados precisos. Pero la principal característica de la qPCR es que tiene la capacidad de hacer dos cosas al mismo tiempo: amplificar un producto determinado y cuantificar dicha amplificación a medida que va transcurriendo la reacción. Esto es posible porque en la reacción se incluye un fluoróforo el cual va a ser medido por un fluorómetro. Las muestras con mayor expresión emitirán mayor fluorescencia, lo que va a permitir relacionar los datos de fluorescencia con los niveles de expresión en cada muestra. Esta técnica utiliza un termociclador que va a generar los ciclos y las temperaturas adecuadas para que transcurra la reacción. También es necesario un detector de señales fluorescentes y, por último, las herramientas necesarias para procesar la información generada. Para detectar si un gen determinado se está expresando o no, se utiliza lo que se denomina valor de Ct (cycle threshold). El Ct es el número de ciclos necesario para alcanzar un umbral al cual se comienza a detectar la señal de fluorescencia. El valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN que hay en la muestra. Mientras más cantidad de ADN inicial menor el número de Ct necesarios para alcanzar el umbral. Por lo que, dependiendo del nivel de expresión de *star*, es decir, de la cantidad inicial de ADNc específico de *star* presente en la muestra, se observan diferentes valores de Ct. Si la concentración inicial de *star* es alta, la amplificación de dicho gen se relacionará con valores bajos de Ct. Mientras que si la concentración inicial de *star* es muy baja le va a llevar más tiempo alcanzar niveles de amplificación detectables y el

valor de Ct va a ser mayor, es decir, se necesitaran más ciclos para que la amplificación del gen de estudio logre alcanzar el valor de umbral asignado. Por otra parte, esta técnica también permite conocer la temperatura de fusión mediante lo que se denomina curvas de fusión (curva de melting). Esto es importante ya que cada secuencia tiene su propia temperatura de fusión y esto permite identificar si se está amplificando correctamente la secuencia correspondiente al gen seleccionado (Figura 4).

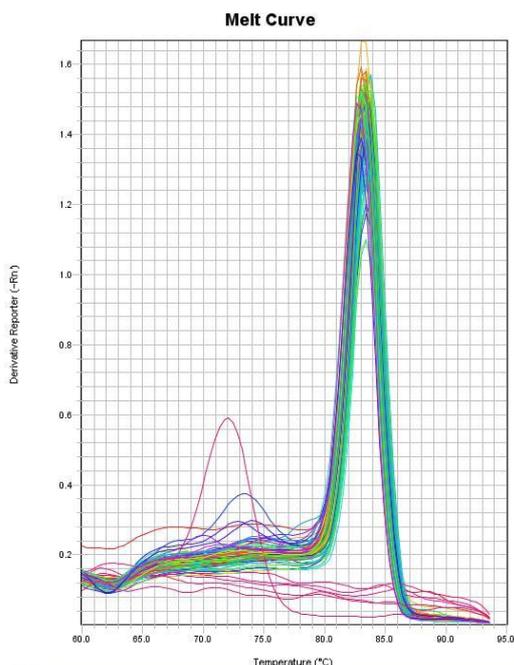


Figura 4. Curva de fusión correspondiente a la amplificación de *star* utilizando los cebadores ya descritos. Se puede observar un solo pico indicando la amplificación de un solo producto.

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real, las muestras fueron agrupadas por mes, por lo que en cada caja de qPCR utilizada se asignaron pocillos para 30 muestras y sus respectivas replicas, si estas son similares entre si aseguran que la reacción se dio correctamente. Además, se introdujo un blanco y un control de reactivos que verifican ausencia o presencia de contaminación durante la manipulación del ADNc o en cualquiera de los reactivos utilizados en la preparación de la caja. Por último, la curva de dilución, la cual permite evaluar la eficiencia de los cebadores utilizados (Figura 5) en cada una de las corridas y así poder comparar corridas distintas.

390	390	392	392	394	394	397	397	398	398	399	399
402	402	403	403	404	404	405	405	406	406	407	407
409	409	410	410	411	411	413	413	414	414	416	416
428	428	429	429	430	430	431	431	432	432	434	434
436	436	437	437	438	438	439	439	440	440	441	441
dil1/10	dil1/10	dil1/20	dil1/20	dil1/40	dil1/40	dil1/80	dil1/80	dil1/160	dil1/160	dil1/320	dil1/320
Bla	Bla	reac	Reac								

Figura 5. Representación de la disposición de las muestras en una caja para realización de qPCR. En la imagen se observan las muestras de *A. baerii* a los 3 meses de edad, la curva de dilución, el control negativo y el control reactivo.

Las especificaciones del Mix de reacción utilizado para la técnica de qPCR se muestran en la Tabla 3 y el ciclado utilizado se muestra en la Tabla 4.

Además del gen de estudio, también se cuantifico la expresión del gen constitutivo *18S* para cada muestra utilizando cebadores específicos previamente validados por el laboratorio (Vizziano-Cantonnet et al., 2016). El propósito de esto reside en la necesidad de estandarizar los datos obtenidos para la expresión de *star*, por lo que es necesario comparar con un gen de referencia como *18S* y luego realizar los estudios correspondientes con los datos de expresión relativa obtenidos para *star*. Se utilizó este gen en particular debido su condición de gen constitutivo, es decir, que se expresa en todo momento y de manera constante.

Tabla 3. Mix de reacción preparado para llevar a cabo la qPCR

Reactivo	Volumen para una muestra de 12µl
SYBR Green (applied biosystems)	6µl
Cebador Foreward	0,48µl
Cebador Reverse	0,48µl
H ₂ O	3,04µl
ADNc	2µl
Volumen total	12µl

Tabla 4. Ciclado utilizado para llevar a cabo la reacción de qPCR.

Activación Polimerasa (hold)		PCR (40 ciclos)		Curva de Melting		
		Desnaturalización	Unión cebador y Extensión			
50,0 °C	95,0 °C	95,0 °C	60,0 °C	95,0 °C	60,0 °C	95,0 °C
2 min	2 min	15 seg	1 min	15 seg	1min	15seg

4.6.- Procesamiento de datos

Una vez finalizada la PCR en tiempo real y habiendo obtenido la totalidad de los datos brutos de *star* es necesario realizar la estandarización de los mismos. Para la realización de la estandarización de los datos en primer lugar hay que calcular la eficiencia específica de la reacción en una corrida en particular. La eficiencia se calcula graficando los valores de Ct vs logaritmo (en base 10) de las diluciones seriadas y obteniendo la pendiente de esta gráfica. Luego se calcula la eficiencia de la reacción a partir de la ecuación siguiente: $E = 10^{-1/pendiente}$. La eficiencia de la reacción se calcula para cada qPCR que se realiza porque es necesario conocer el rendimiento de los cebadores y así obtener una cuantificación confiable para poder comparar resultados de diferentes corridas. Por otro lado, se utilizó la expresión obtenida para el gen constitutivo *18S* para obtener la expresión relativa a partir de la cual se realizan los análisis estadísticos. La cuantificación relativa mide los cambios en la expresión de un gen (en este caso *star*) relativizándolos contra la expresión de un gen constitutivo.

La estandarización se realizó mediante la división entre el SQ (del inglés Standard Quantitation) del gen problema y el SQ del gen constitutivo, mientras que el SQ se obtiene a través de la siguiente ecuación:

$$SQ = [(Ct)/pendiente]^{-1}.$$

Como los datos de expresión relativa de *star* tuvieron órdenes de magnitud muy pequeños fueron multiplicados por 10^8 para poder realizar estudios estadísticos adecuados.

Posteriormente, se procedió a realizar los análisis estadísticos junto a la expresión de *cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1*, *ix3*, *irx5* y *lhx2* para poder visualizar y comparar la expresión de *star* con respecto a la de otros genes que también se expresan durante los estadios estudiados. La expresión de estos genes fue analizada por el Lic. André Lasalle en su tesis de Maestría durante 3 y 6 meses de edad en esturión siberiano.

4.7.- Análisis estadísticos

Se comenzó analizando cada mes por separado. Se buscó observar si *star* presenta expresión diferencial entre diferentes individuos generando así, un grupo de individuos con mayor expresión y otro con menor expresión de *star*. Para esto se empleó el análisis nm-MDS (del inglés, non-metric multidimensional scaling), el cual permite realizar una representación espacial de las distancias existentes entre un conjunto de elementos y que va a depender de la similitud que existe entre ellos. En este caso, el nm-MDS agrupa a aquellos individuos con mayor similitud en los niveles de expresión de los genes previamente mencionados. Por otro lado, es necesario evaluar si es legítima o no la aplicación del escalamiento multidimensional no métrico a nuestros datos. Para ello se emplea el diagrama de Shepard. Este detecta anomalías en el ajuste entre similitudes y distancias. A partir de este gráfico se desprende el valor de stress, el cual va a indicar el grado de ajuste de los datos. Si el valor de stress es menor a 0,2 se considera que el análisis es válido y aplicable. Posteriormente se realizó un análisis de Cluster que permite agrupar los individuos según su similitud. La obtención de dichos clusters va a depender del criterio considerado. Tanto en el nm-MDS como en el análisis de Cluster se aplicó el índice de Horn, que estima el porcentaje de similaridad y permite así, medir la probabilidad de que los individuos estudiados pertenezcan a un mismo taxón. Una vez establecidos los grupos, se estudió la homogeneidad de varianza para cada grupo a través del test de Levene. Cuando los datos presentan homogeneidad de varianza entre los grupos formados (tanto en 3 como en 6 meses), se procede a utilizar test paramétricos para analizar si existen diferencias significativas entre los posibles grupos formados, de no ser así (datos no homogéneos) deberían realizarse test no paramétricos. El test paramétrico a utilizar depende de cuantos grupos se forman. Si son dos grupos se aplica un test de Student, mientras que si son tres grupos o más se aplica un test ANOVA. Por otro lado, se utilizó un análisis discriminante, este método permite reconocer patrones de expresión y generar así grupos de individuos que presenten mayor similitud entre sí. En este caso, se aplicó en función de los patrones

de expresión génica para cada individuo, teniendo en cuenta la expresión de los genes ya mencionados entre los individuos muestreados a los 3 y a los 6 meses de edad. Del análisis se desprende una matriz de confusión que determina si todos los individuos asignados a un grupo presentan las características intrínsecas de ese grupo o se asocian más al otro grupo asignado. Además, se obtiene una clasificación de cuáles son los genes que más contribuyen a la separación de grupos. Sobre estos datos se aplicó el análisis MANOVA del cual se desprenden los test Wilks Lambda o Pillai trace. En base al resultado de estos, se evalúa si existen diferencias significativas entre grupos. Es necesario aclarar en este punto, la necesidad de logaritmizar los datos para reducir la variabilidad de los mismos. Por último, para evaluar si la expresión de *star* presentaba diferencias significativas entre 3 y 6 meses, se evaluó la homogeneidad de varianza para cada mes. Debido a que los datos no presentaban homogeneidad de varianza se procede a utilizar test no paramétricos. En este caso como el estudio se realiza sobre dos grupos se aplicó Mann-Whitney-U.

5.- Resultados

5.1.-Transcriptómica: estudio de expresión diferencial

La comparación de individuos identificados como potencialmente femeninos (pool de 2,5 meses) con aquellos identificados como indiferenciados o futuros machos (3 meses), evidenció la sobre expresión de 1451 contigos en aquellos organismos considerados como futuras hembras bajo las condiciones dadas de $fdr < 0,05$, $FC > 0$. Estos contigos se muestran en la Anexo 2. El estudio de Gene Ontology Analysis (GO) en los genes sobre-expresados femeninos (Anexo 3) evidenció, entre otras, la actividad de la vía de biosíntesis de esteroides. De allí se seleccionó el gen *star* (SSturg2_contig_68507) como gen candidato para realizar un estudio de expresión génica en dos momentos del período de diferenciación sexual del esturión siberiano.

5.2.- Patrón global de expresión génica

A través del análisis discriminante, llevado a cabo utilizando los genes: *cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1*, *ix3*, *irx5* y *lhx2* y *star*, se observa que hay diferencias globales en los niveles de expresión entre individuos de 3 y 6 meses. Esto se puede apreciar gráficamente a través de la Figura 6a, en donde no se observa ningún solapamiento entre cada mes. Además, se aprecia en la matriz de confusión de la Figura 6b, que todos los individuos pertenecientes al grupo de 3 meses de edad siguen un patrón de expresión génica acorde a ese estadio del desarrollo, mientras que dentro del grupo de individuos de 6 meses de edad se observa que el individuo 761 no acompaña el patrón de expresión del resto de los individuos de esa edad, asemejándose más a los niveles de expresión en 3 meses.

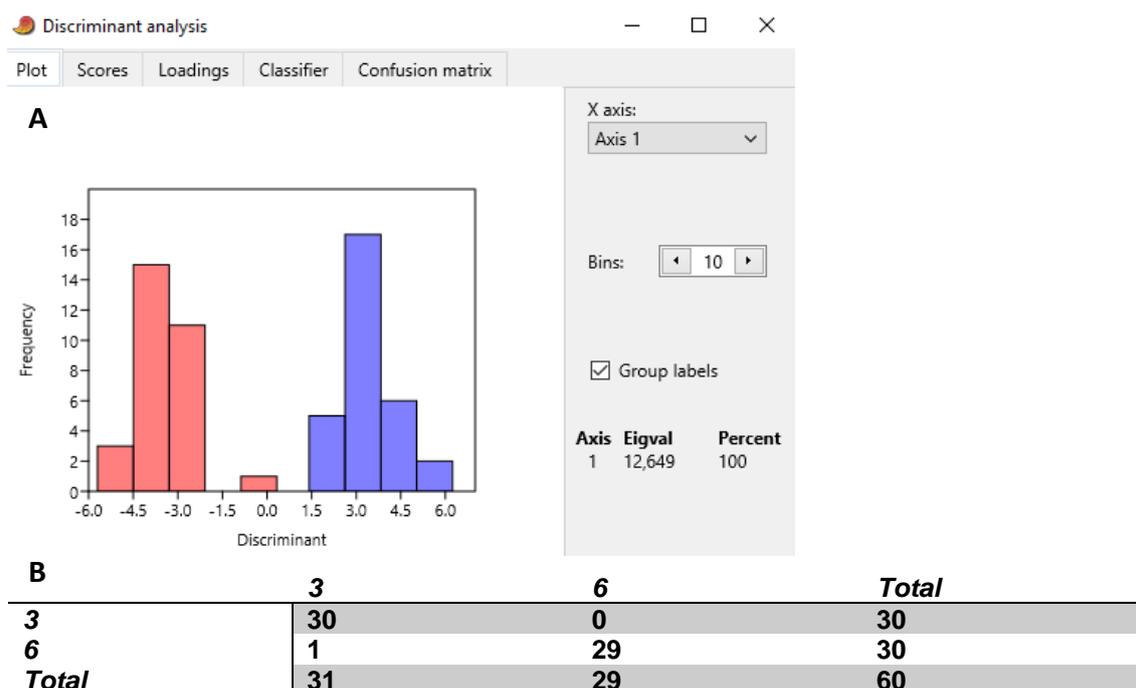


Figura 6. Representación gráfica del análisis discriminante. En rojo el grupo de 6 meses, en azul el grupo de 3 meses (A). Matriz de confusión generada por el análisis. 98,3% de las muestras están correctamente clasificados (B).

Por otro lado, los resultados obtenidos a través del análisis MANOVA muestran que hay diferencias significativas entre los patrones de expresión descritos para 3 y 6 meses. Esto se demuestra a través del test de Wilks Lambda y de Pillai trace. Para

ambos test se obtuvo un p-valor $< 0,05$ (Tabla 5). Los genes que más contribuyeron a discriminar los grupos fueron *irx5* (0,86028) hacia 3 meses y *irx3* (-0,74357) junto con *star* (-0,2008) y *foxl2* (-0,13018), también contribuyen a diferenciar entre grupos, pero hacia 6 meses, al presentar valores negativos. Mientras que, en menor medida, contribuyen *aromatasa* (-0,058468), *hsd17 β 1* (0,055982) y *lhx2* (-0,065564).

Tabla 5. Análisis de MANOVA realizado sobre los grupos previamente utilizados en el análisis discriminante. Se desprenden los test de Wilks Lambda y de Pillai trace a través de los cuales se obtuvo p-valor $< 0,05$. Hay diferencias significativas entre los grupos analizados.

Wilks' lambda	0,07327	Pillai trace	0,9267
df1:	7	df1:	7
df2:	52	df2:	52
F:	93,96	F:	93,96
P(same):	3,122E-27	P(same):	3,122E-27

5.3.- Relación de la expresión de *star* entre 3 y 6 meses

Analizar la expresión de *star* de manera aislada permitió observar que el gen que codifica la proteína StAR se expresa tanto a los 3 meses como a los 6. Sin embargo, la expresión de *star* varía entre estadios. Se observan diferencias de expresión significativas (p-valor $< 0,05$) entre la etapa inicial del período de diferenciación molecular (3 meses) y la etapa final (6 meses). *star* presenta mayor expresión relativa en los individuos de 6 meses de edad (Figura 7).

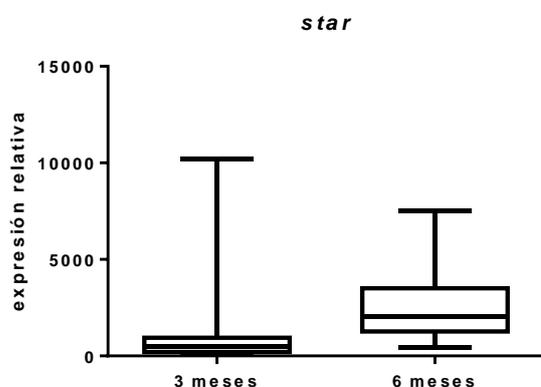


Figura 7. Expresión relativa de *star* en individuos de *A. baerii* de 3 y 6 meses de edad.

5.4.- Identificaciones de grupos de peces en individuos indiferenciados

5.4.1.- Expresión génica en gónadas de individuos de 3 meses

A través de la técnica de qPCR se pudo determinar que todos los individuos expresan *star* durante este estadio del desarrollo gonadal (Figura 8). Basados en estos resultados, se realizó un análisis nm-MDS incluyendo los datos de expresión obtenidos por Lasalle, 2019 (Tesis de Maestría, no publicado) para los genes *cyp19a1a*, *foxl2*, *hsd17b1*, *irx3*, *irx5* y *lhx2* (Figura 9a). A través de este estudio, fue posible determinar la distribución espacial, que se establece en base al patrón de expresión génica de cada individuo, la cual es válida ya que el valor de stress fue menor a 0,2 (Figura 9b). Posteriormente mediante el análisis de Clusters se definió la organización de los individuos en dos grupos (Figura 10), un grupo formado por 11 individuos y otro por 18 individuos (Tabla 6). Los grupos formados coinciden con los establecidos por Lasalle, 2019. Además, no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de *star* para los grupos asignados según el patrón de expresión del conjunto de genes (Figura 11), ya que el resultado del Student's t-test fue mayor p-valor > 0,05.

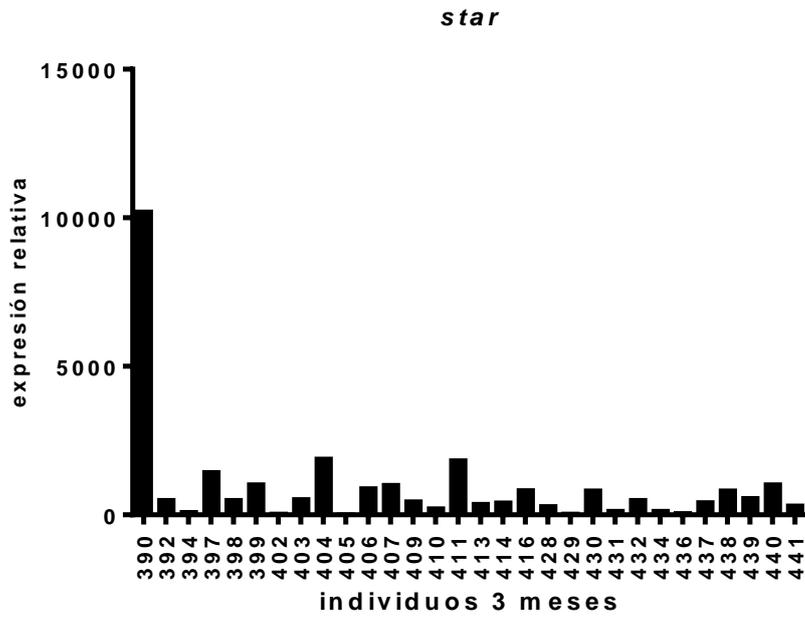


Figura 8. expresión relativa del gen *star* en 30 individuos de *A. baerii* a los tres 3 de edad.

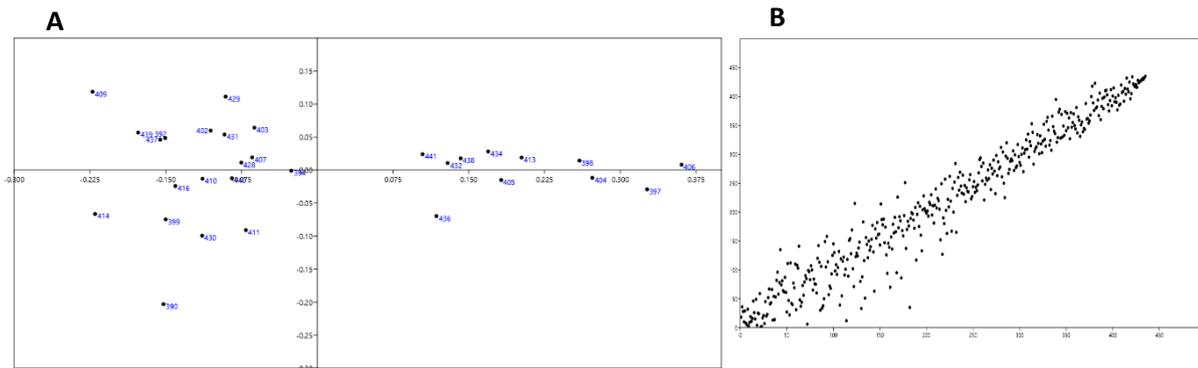


Figura 9. nm-MDS aplicado en individuos de 3 meses de edad de *A. baerii* utilizando el índice de Horn (A). Shepard plot con valor de stress valido = 0,1137 (B)

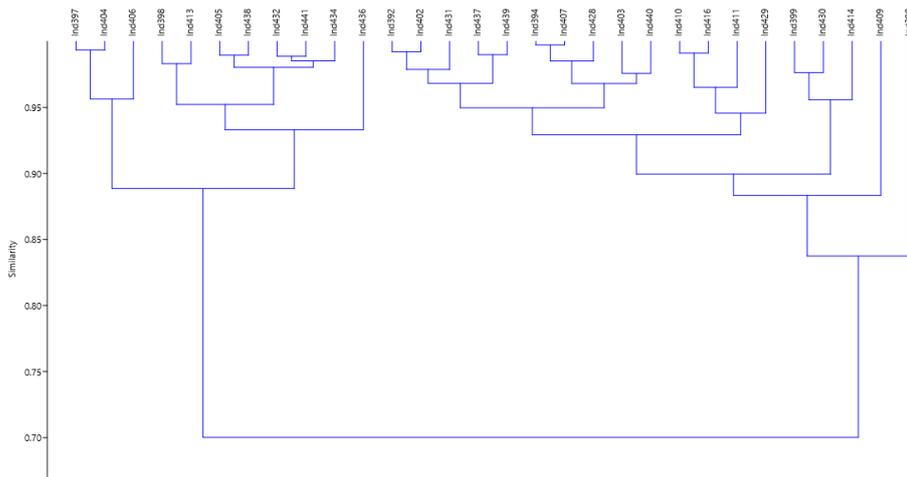


Figura 10. Análisis de Cluster realizado sobre las muestras de *A. baerii* a los 3 meses de edad utilizando el índice de similaridad de Horn. Se forman dos grupos de peces.

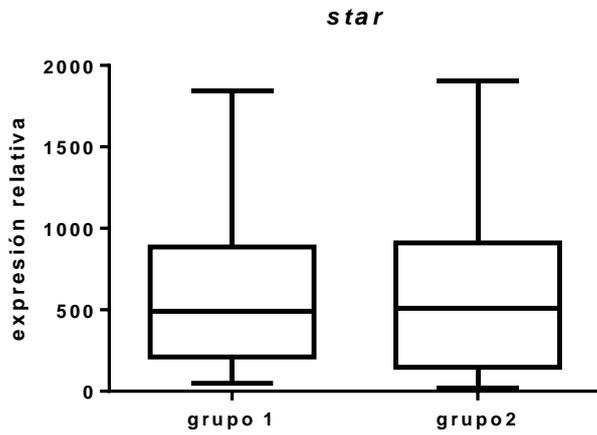


Figura 11. Boxplot realizado sobre los grupos formados a partir de los individuos de *A. baerii* a los 3 meses de edad. No hay diferencias significativas entre grupos.

Tabla 6. Individuos agrupados según el patrón de expresión génica a los 3 meses de edad.

Grupo 1	Grupo 2
392	397
394	398
399	404
402	405
403	406
407	413
409	432
410	434
411	436
414	438
416	441
428	
429	
430	
431	
390	
437	
439	
440	

5.4.2 Expresión génica en gónadas de individuos de 6 meses

Al igual que a los 3 meses, *star* se expresa en todos los individuos. Sin embargo, la expresión relativa a los 6 meses fue mayor (Figura 12). El análisis nm-MDS logra generar una correcta segregación de individuos espacialmente (Figura 13a), presentando buena bondad de ajuste (stress < 0,2) (Figura 13b.), la que posibilita dar como válido el resultado del análisis. Posteriormente, a través del análisis de Clusters se determinó la formación de dos grupos (Figura 14). El grupo más numeroso contiene 21 individuos mientras que el otro grupo 9 individuos (Tabla 7). Este resultado difiere del resultado obtenido por Lasalle, 2019 para 6 meses. Sin embargo, tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la expresión relativa de *star* para los grupos asignados (Figura 15) ya que el Student's t-test fue p-valor > 0,05.

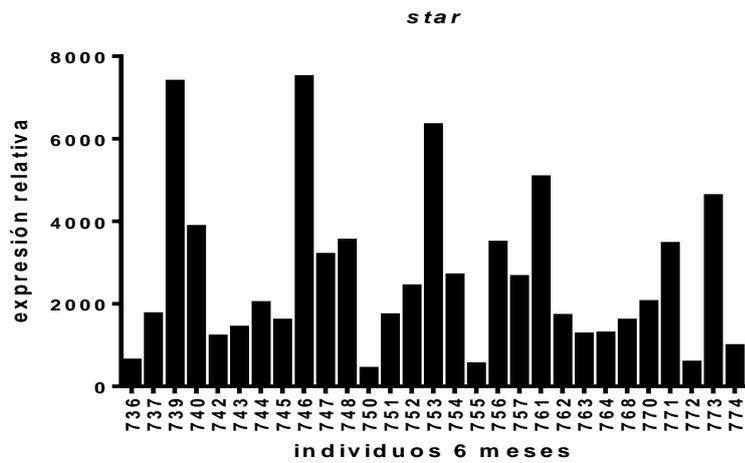


Figura 12. Expresión relativa del gen *star* en 29 individuos de *A. baerii* a los 6 meses de edad.

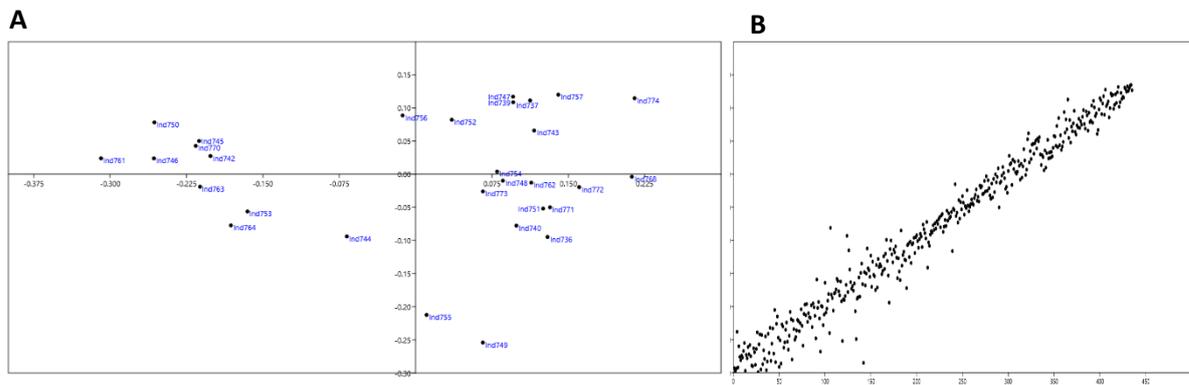


Figura 13. nm-MDS aplicado en individuos de 6 meses de edad de *A. baerii* utilizando el índice de Horn (A). Shepard plot resultante con valor de stress valido = 0,08209 (B)

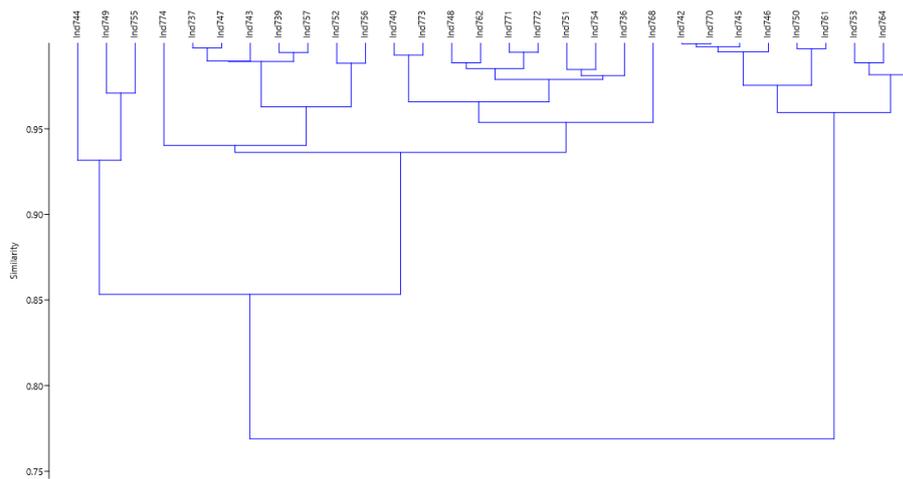


Figura 14. Análisis de Cluster realizado sobre las muestras de *A. baerii* a los 6 meses de edad utilizando el índice de similaridad de Horn. Se forman dos grupos de peces.

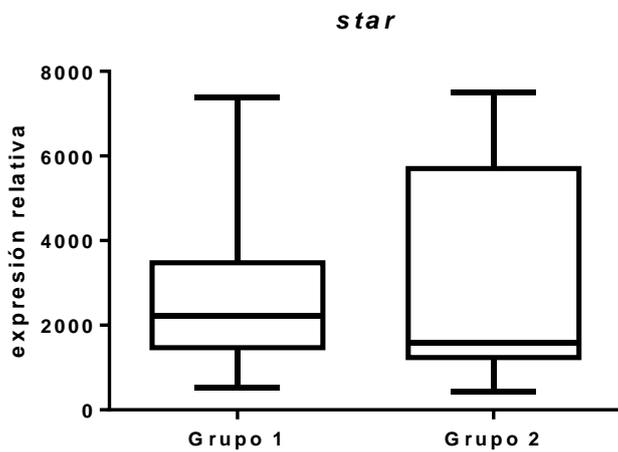


Figura 15. Boxplot realizado sobre los grupos formados a partir de los individuos de *A. baerii* a los 3 meses de edad. No hay diferencias significativas entre grupos.

Tabla 7. Individuos agrupados según el patrón de expresión génica a los 6 meses de edad.

Grupo 1	Grupo 2
744	742
749	770
755	745
774	746
737	750
747	761
743	753
739	764
757	763
752	
756	
740	
773	
748	
762	
771	
772	
751	
754	
736	
769	

6.- Discusión

La participación de los esteroides sexuales durante el período de diferenciación del sexo ha sido ampliamente documentada en peces. Son esenciales para llevar a cabo el correcto desarrollo tanto en hembras como en machos (Piferrer et al., 1993, 1994; Baroiller et al., 1999; Guiguen et al., 1999, 2010; Nagahama, 2005). En esturión siberiano, ha sido comprobada la participación de la aromatasa, en períodos previos a la diferenciación del sexo. Se da un pico de expresión de *foxl2* y *aromatasa*, marcadores femeninos universales, al comienzo del período de diferenciación molecular del sexo (Vizziano-Cantonnet et al., 2016).

La producción de hormonas esteroideas va a depender de la acción de una serie de enzimas que participan en la ruta esteroidogénica. La primera proteína en actuar es StAR, la cual es esencial para que la esteroidogénesis gonadal se produzca correctamente. Su función es transportar el colesterol hacia el interior de la mitocondria,

proporcionando así el sustrato necesario a partir del cual se van a producir hormonas esteroideas (Stocco y Sodeman, 1991; Clark et al., 1994; Lin et al., 1995).

Debido a que se ha documentado en varias especies que la diferenciación ovárica precede a la diferenciación testicular (Nakamura et al., 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002) y a la importancia clara de la enzima aromatasa durante el período de diferenciación molecular del sexo en esturión siberiano (Vizziano-Cantonnet et al., 2016), postulamos en este trabajo que *star*, en este período, estaría activada particularmente en las futuras hembras. Además, los datos obtenidos en la comparación del transcriptoma gonadal del pool de individuos de 2,5 meses con patrones de expresión génica femeninos *versus* dos individuos con un perfil de expresión masculino de 3 meses que tenían reprimidos los genes femeninos nos orientaron a pensar que *star* podía actuar como gen femenino en forma muy temprana. Sin embargo, los resultados de los análisis estadísticos analizados en conjunto con otros marcadores femeninos no permiten concluir esto. Según los grupos generados teniendo en cuenta la expresión del conjunto de genes, la expresión de *star* no fue significativamente diferente para ninguno de los estadios, indicando que *star* no juega un rol central en la segregación de los individuos.

A los 3 meses la actividad de *star* no parece estar influyendo ni en la distribución espacial de los individuos observada a través del análisis nm-MDS ni en la formación de los grupos por parte del análisis de Clusters. Esto último, se ve reflejado al comparar la expresión de *star* entre los grupos formados, observándose que los niveles de *star* son prácticamente idénticos. Sin embargo, a los 6 meses la presencia de *star* genera cambios en la organización espacial de los individuos lo que implica nuevas relaciones de similitud entre estos. Además, el análisis de Clusters demuestra la reagrupación de 3 individuos: 742 (el cual no había sido asignado a ningún grupo, fue incluido en el grupo de posibles machos), 744 y 755 (habían sido considerados como futuros machos, pasaron a formar parte del grupo de futuras hembras). Esto sugiere que la influencia de *star* es más relevante a los 6 meses.

Recientemente se publicó un marcador del sexo en esturiones, que también sirve como marcador del sexo en el esturión siberiano y podrá ser utilizado a nivel del ADN genómico. Por lo que, se realizarán nuevas experimentales con el objetivo de sexar a través de ADN*g* individuos indiferenciados y de esta manera, poder comparar los niveles de expresión de *star* obtenidos a través de PCR en tiempo real para ambos sexos en diferentes etapas del desarrollo. Es por ello, que el laboratorio ha validado los cebadores diseñados para *star* y se concentra en obtener nuevas muestras del período de diferenciación sexual que permitan validar los estudios de identificación del sexo.

Por otra parte, los resultados obtenidos, evidencian la expresión de *star* en los dos sexos. Lo que sugiere la presencia de una actividad esteroidogénica temprana. Esto sería coherente con una producción temprana de esteroides en el desarrollo gonadal del esturión siberiano, tanto en machos como en hembras. Este resultado era esperable si tenemos en cuenta la importancia de los esteroides sexuales para un correcto desarrollo en peces. Por ejemplo, la inhibición de la aromatasa durante el período clave de diferenciación sexual resulta en la inversión del sexo, es decir que ejemplares genóticamente hembras desarrollan un fenotipo masculino (Piferrer et al., 1994; Baroiller et al., 1999; Guiguen et al., 1999; Guiguen et al., 2010). Además, la administración de estrógenos en machos, principalmente E2-17 β dio como resultado la inversión del sexo a hembras fenotípicas en varias especies de peces (Baroiller et al., 1999; Guiguen, 2000; Piferrer, 2001). En esturión siberiano, se ha demostrado la sensibilidad temprana de la gónada a los estrógenos, a través de la estimulación de *foxl2* (Lasalle 2019, Tesis de Maestría). En este mismo estudio se consolida la idea de *foxl2*, *aromatasa* y *hsd17b1*, enzimas claves en la producción de estrógenos, como marcadores tempranos del desarrollo sexual femenino, evidenciando la producción estrogénica temprana. En esturiones también se ha logrado invertir el sexo hacia hembras luego de aplicar tratamientos con estrógenos (Falahatkar et al., 2014).

Por otro lado, si bien se ha demostrado la importancia de los andrógenos en la diferenciación, se ha relativizado el papel universal de estos, que no siempre se encuentran sintetizados en el período previo a la diferenciación sexual (Nakamura et al., 1998). En machos de tilapia del Nilo solo se detecta producción de enzimas esenciales en la cascada esteroidogénica después de la diferenciación testicular, lo que conduce a pensar que los andrógenos no cumplen un rol importante en la diferenciación de esta especie (Ijiri et al., 2008). En este trabajo ponemos en evidencia que podría haber una producción temprana de esteroides sexuales en machos, lo cual completa el panorama observado usando transcriptómica en el cual las enzimas de la ruta esteroidogénica se activan muy tempranamente, por lo que no se puede descartar la participación de andrógenos durante el período de diferenciación sexual en esturiones. Son necesarios mayores esfuerzos de investigación dirigidos a entender el rol de los andrógenos durante la diferenciación sexual de esta especie, la cual ha sido poco estudiada en este sentido.

El aumento de la expresión de *star* al final del período de diferenciación molecular con respecto al inicio del mismo es un factor relevante que contribuye a diferenciar el patrón global de expresión génica que caracteriza ambos estadios estudiados. Este aumento de la expresión global de *star* a los 6 meses respecto de los 3 meses estaría indicando una mayor potencialidad de producción global de esteroides al final del período de diferenciación molecular y previo a la diferenciación morfológica. La diferenciación morfológica en el esturión siberiano se puede identificar claramente a los 8 meses de edad basados en la identificación de grupos o clusters de ovocitos que iniciaron su primera profase meiótica (Vizziano-Cantonnet et al 2016). Otros autores sostienen que se puede identificar el sexo más tempranamente, aproximadamente a los 4 meses de edad, simplemente teniendo en cuenta la superficie gonadal y sin tomar en cuenta ninguna diferenciación en la disposición de las células germinales somáticas (Rzepakowska y Ostaszewska, 2013), pero esto último requiere de una validación usando el sexado genético que está disponible desde hace muy poco tiempo. Esto permite

suponer que son necesarias mayores concentraciones de hormonas esteroideas sexuales a medida que el período de diferenciación avanza y se va aproximando al inicio de la gametogénesis en hembras que ocurre hacia los 8 meses de edad en los esturiones siberianos y mucho más tardíamente en los machos.

En otros peces es frecuente que la diferenciación ovárica preceda la diferenciación testicular (Nakamura et al., 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002), por lo cual la producción de andrógenos específicos se esperaría en etapas más avanzadas. Sería interesante evaluar la expresión de *star* al comienzo del período de diferenciación morfológica para entender mejor cual es la influencia de esta proteína en una especie en donde la cascada molecular que desencadena la formación testicular y ovárica necesita de mayor investigación (Vizziano-Cantonnet et al., 2018).

La expresión de *star* en peces durante el período previo a la diferenciación morfológica, se comporta distinto según la especie. Se ha reportado, en pez sable (*Anoplopoma fimbria*), que la expresión de *star* durante esta etapa es significativamente mayor en machos que en hembras y esto coincide con la participación de los andrógenos endógenos durante la diferenciación sexual (Hayman et al., 2021). En pez gato (*Clarias gariepinus*), tanto la *aromatasa* como *foxl2* presentaron gran actividad durante esta etapa, lo que sugiere que los estrógenos, principalmente E2-17 β , serían muy importantes en la diferenciación de esta especie. Sin embargo, la actividad de *star* apenas fue detectada en gónadas indiferenciados (Raghuveer et al., 2011), abriendo el interrogante sobre la producción real de estrógenos en esas etapas tempranas. A su vez la *cyp11c* (enzima importante en la síntesis de andrógenos 11-oxigenados) se expresa en etapas posteriores indicando que este tipo de andrógenos no juegan un papel esencial en la diferenciación testicular (Raghuveer et al., 2011). En el medaka (*Oryzias latipes*), los esteroides sexuales no están involucrados en la diferenciación sexual (Kanamori et al., 1985; Kawahara y Yamashita, 2000; Suzuki et al., 2004), la cual se da al momento de la eclosión. Sin embargo, es interesante resaltar que la expresión

de *star* en hembras se da a los 25 días después de la eclosión (Nakamoto et al., 2012), posterior al inicio de la expresión de *aromatasa* la cual se da entre 5 y 10 días después de la eclosión. Por otro lado, en tilapia del Nilo se constató la expresión sexo específica de *aromatasa* y *foxl2* a los 5 días después de la eclosión (durante el período de diferenciación sexual de esta especie), así como también, la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con la producción de E2-17 β (Ijiri et al., 2008), sugiriendo que son esenciales en la correcta diferenciación ovárica. Además, Yan et al (2012) sugieren que el receptor de FSH, *fshra* parece estar involucrado en la diferenciación ovárica en tilapia del Nilo debido a la expresión diferencial de este receptor en gónadas femeninas entre los 5 y los 25 días después de la eclosión, que probablemente induce la expresión de *aromatasa*. Sin embargo, no se detecta la sobre expresión de *star* durante el período de diferenciación gonadal en tilapia del Nilo.

En trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) la expresión de *star* se inicia bien tempranamente en el mismo momento en que se sobre expresa la *aromatasa* en cohortes monosexo hembras, y días antes de la sobre expresión de la *cyp11c* (que convierte andrógenos aromatizables en andrógenos 11-oxigenados) (Vizziano et al 2007). En ese trabajo se muestra claramente la expresión de *star* desde las primeras etapas del desarrollo femenino, junto a la *aromatasa*, el *foxl2* y las enzimas que controlan la esteroidogénesis (*cyp11a1*, *hsd3b*, *cyp17a1*, *sf1*) indicando el potencial de producción temprana de estrógenos en truchas. A su vez *star* está bien expresada cuando la *cyp11c* se ve activada en el desarrollo masculino sugiriendo que en este modelo los andrógenos pueden mediar la diferenciación sexual (Vizziano et al 2007). Además, existe un aumento en la expresión de *star* a medida que avanza el período de diferenciación del sexo de las truchas, mostrando que esta proteína está expresada desde el inicio de la diferenciación molecular del sexo y se incrementa en la fase previa a la diferenciación morfológica del sexo.

Teniendo en cuenta que *star* es necesaria para la síntesis de estrógenos, no queda del todo claro cómo, en algunas especies, es posible que esta proteína se

expresarse posteriormente a otras enzimas que se suponen posteriores en la cascada esteroidogénica.

Con el objetivo de entender por qué en algunas especies la expresión de *star* no se da al momento esperado, Yu et al (2014) demostraron, a través de su investigación en tilapia del Nilo, que existen dos parálogos del gen *star* que codifican para dos isoformas de StAR: StAR1 (filogenéticamente más relacionada con StAR de teleósteos y tetrápodos) y StAR2 (parálogo de StAR1 únicamente documentada en teleósteos, *Xenopus* y pollo). Además, observaron que no se detecta expresión de StAR1 durante el desarrollo ovárico, mientras que StAR2 fue regulada positivamente en gónadas indiferenciadas a los 5 días después de la eclosión, durante el período crítico de diferenciación de la vía femenina, coincidiendo con el inicio de la expresión de enzimas esteroidogénicas como *cyp11a1*, *hsd3b*, *cyp17a1*, *aromatasa* y factores de transcripción como *foxl2* y *sf1*, esenciales en la producción de E2-17 β (Ijiri et al., 2008), al igual que fuese descrito previamente en truchas (Vizziano et al 2007). Sugiriendo que es StAR2 y no StAR1 la que participa en la síntesis de estrógenos durante la diferenciación sexual en teleósteos (Yu et al., 2014).

Los datos obtenidos para el esturión siberiano a través de este estudio son similares a los obtenidos en truchas (Vizziano et al 2007), ya que no sólo la *star* se expresa tempranamente, sino que también aumenta en la fase previa a la diferenciación morfológica del sexo. Al igual que en truchas, no se trata de un gen de expresión sexo dimórfica pero estaría indicando la capacidad temprana de producir esteroides de los individuos indiferenciados.

Respecto de los genes parálogos de *star* (*star1* y *star2*) posiblemente hayan surgido en la tercera ronda de duplicación completa del genoma que ocurrió en la base de los peces teleósteos (3R) y que habría dado lugar a la gran diversidad de especies que componen este grupo (Meyer y Schartl, 1999). Los esturiones, son peces basales que se desarrollaron luego de la 2R, pero no presentan una duplicación completa del genoma en su base. Sin embargo, algunas especies como es el caso del esturión

siberiano sufrieron rondas de duplicación completa del genoma, independientes de la 3R. En el transcriptoma gonadal producido en el laboratorio (Vizziano-Cantonnet et al 2018, Klopp et al., 2020) solo se encontró un contig de *star*. De modo que es muy posible que los parálogos de *star* se restrinjan a los peces teleósteos y que de aparecer en los peces basales habría surgido de un evento de duplicación independiente al de los teleósteos.

Debido a que en el genoma de sterlet se observan dos variantes de *star*, se realizarán investigaciones a posteriori buscando entender cuál es la relación entre las diferentes variantes descritas hasta el momento y la variante presente en el transcriptoma de esturión siberiano.

En resumen, la expresión de *star* durante el período de diferenciación sexual no es igual en todas las especies, presentando niveles muy variables. En algunas como en pez sable, en donde los andrógenos son importantes para la diferenciación, se vio que *star* sobre expresa en machos. En otras especies como pez gato y medaka no se detectó su expresión durante este período, pero se detectó un parálogo de *star* en tilapia del Nilo que sobre expresa en hembras durante esta etapa y posiblemente sea la explicación de por qué en pez gato y medaka no se ha constatado la expresión de esta proteína. Por último, en esturión siberiano (a través de este estudio) y en trucha arcoíris se observa la expresión de *star* en ambos sexos. Por lo que, en un futuro cercano se realizarán estudios utilizando gónadas de peces colectados entre los 2,5 y los 6 meses de edad previamente sexados, con el nuevo marcador del sexo.

7.- Conclusión

A partir de los niveles de expresión relativa obtenidos para *star* a través de este trabajo demostramos que esta proteína se expresa durante el período de diferenciación molecular en esturión siberiano. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la actividad de *star* entre los grupos formados que corresponderían a machos y

hembras en diferenciación, lo que estaría indicando que *star* también es necesaria en machos durante este estadio, sugiriendo la posible producción de andrógenos durante la diferenciación molecular. Un estudio con marcadores del sexo a nivel del ADNg permitirá confirmar las tendencias observadas.

Bibliografía

Arakane, F., Sugawara, T., Nishino, H., Liu, Z., Holt, J. A., Pain, D., & Strauss, J. F. (1996). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13731-13736.

Auer, N. A. (1996). Importance of habitat and migration to sturgeons with emphasis on lake sturgeon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(S1), 152-160.

Baron, D., Houlgatte, R., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2005). Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biology of reproduction*, 73(5), 959-966.

Baroiller, J. F., Guiguen, Y., & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(6-7), 910-931.

Bauer, M. P., Bridgham, J. T., Langenau, D. M., Johnson, A. L., & Goetz, F. W. (2000). Conservation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein structure and expression in vertebrates. *Molecular and cellular endocrinology*, 168(1-2), 119-125.

Bemis, W. E., Findeis, E. K., & Grande, L. (1997). An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of fishes*, 48(1), 25-71.

Bemis, W. E., & Kynard, B. (1996). Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1-4), 167-183.

Berbejillo, J., Martinez-Bengochea, A., Bedo, G., Brunet, F., Volff, J. N., & Vizziano-Cantonnet, D. (2012). Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular reproduction and development*, 79(8), 504-516.

Billard, R., & Lecointre, G. (2000). Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4), 355-392.

Birstein, V. J., & Vasiliev, V. P. (1987). Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces) karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species. *Genetica*, 72(1), 3-12.

Birstein, V. J., Hanner, R., & DeSalle, R. (1997). Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In *Sturgeon biodiversity and conservation* (pp. 127-155). Springer, Dordrecht.

Birstein, V. J., & DeSalle, R. (1998). Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(1), 141-155.

Blasco, M., Fernandino, J. I., Guilgur, L. G., Strüssmann, C. A., Somoza, G. M., & Vizziano-Cantonnet, D. (2010). Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b1* and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(1), 110-118.

Blasco, M., Somoza, G. M., & Vizziano-Cantonnet, D. (2013). Presence of 11-ketotestosterone in pre-differentiated male gonads of *Odontesthes bonariensis*. *Fish physiology and biochemistry*, 39(1), 71-74.

Brennan, J., & Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 509-521.

Bronzi, P., Rosenthal, H., & Gessner, J. (2011). Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 169-175.

Bronzi, P., Chebanov, M., Michaels, J. T., Wei, Q., Rosenthal, H., & Gessner, J. (2019). Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. *Journal of Applied Ichthyology*, 35(1), 257-266.

Chen, S., Zhang, G., Shao, C., Huang, Q., Liu, G., Zhang, P., & Wang, J. (2014). Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature genetics*, 46(3), 253-260.

Choudhury, A., & Dick, T. A. (1998). The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. *Journal of Biogeography*, 25(4), 623-640.

Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., & Stocco, D. M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28314-28322.

Cnaani, A., Lee, B. Y., Zilberman, N., Ozouf-Costaz, C., Hulata, G., Ron, M., & Kocher, T. D. (2008). Genetics of sex determination in tilapiine species. *Sexual development*, 2(1), 43-54.

Conover, D. O., & Kynard, B. E. (1981). Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science*, 213(4507), 577-579.

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364.

Di Landro Francis, S. (2014). Estudio de la expresión de amh durante el período de diferenciación del sexo en el esturión siberiano: *Acipenser baerii*.

Fajkowska, M., Adamek-Urbańska, D., Ostaszewska, T., Szczepkowski, M. Ł., & Rzepkowska, M. Ł. (2021). Effect of genistein, daidzein and coumestrol on sex-related genes expression in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Aquaculture*, 530, 735872.

Falahatkar, B., Poursaeid, S., Meknatkhah, B., Khara, H., & Efatpanah, I. (2014). Long-term effects of intraperitoneal injection of estradiol-17 β on the growth and physiology of juvenile stellate sturgeon *Acipenser stellatus*. *Fish physiology and biochemistry*, 40(2), 365-373.

Farkash, Y., Timberg, R., & Orly, J. (1986). Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology*, 118(4), 1353-1365.

Flynn, S. R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D. J., & Benfey, T. J. (2006). Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*, 253(1-4), 721-727.

Fopp-Bayat, D. (2010). Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*, 305(1-4), 174-177.

Gardiner, B. G. (1984). Sturgeons as living fossils. In *Living fossils* (pp. 148-152). Springer, New York, NY.

Gisbert, E., & Ruban, G. I. (2003). Ontogenetic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*: a synthesis between laboratory tests and field data. *Environmental Biology of Fishes*, 67(3), 311-319.

Grande, L., & Bemis, W. E. (1996). Interrelationships of Acipenseriformes, with comments on Chondrostei. In *Interrelationships of Fishes*, Edited by: Stiassny, MLJ, Parenti, LR and Johnson, GD, 85-115.

Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki, K., McMeel, O. M., Martin, S. A. M., & Fostier, A. (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 54(2), 154-162.

Guiguen, Y. (2000). Implication of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion. *Current Topics in Steroid Research*, 3, 127-143.

Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 352-366.

Hattori, R. S., Fernandino, J. I., Kishii, A. I., Kimura, H., Kinno, T., Oura, M., & Watanabe, S. (2009). Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination?. *PLOS one*, 4(8), e6548.

Hattori, R. S., Strüssmann, C. A., Fernandino, J. I., & Somoza, G. M. (2012). Genotypic sex determination in teleosts: insights from the testis-determining amhy gene. *General and comparative endocrinology*, 192, 55-59.

Hayman, E. S., Fairgrieve, W. T., & Luckenbach, J. A. (2021). Molecular and morphological sex differentiation in sablefish (*Anoplopoma fimbria*), a marine teleost with XX/XY sex determination. *Gene*, 764, 145093.

Heule, C., Salzburger, W., & Böhne, A. (2014). Genetics of sexual development: an evolutionary playground for fish. *Genetics*, 196(3), 579-591.

Hunter, G. A., & Donaldson, E. M. (1983). 5 Hormonal Sex Control and its Application to Fish Culture. *Fish physiology*, 9, 223-303.

Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., & Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of reproduction*, 78(2), 333-341.

Infonegocios. (6 de octubre de 2020). Polanco, cuna del mejor caviar uruguayo que se consolida en el mundo. <https://infonegocios.biz/nota-principal/polanco-cuna-del-mejor-caviar-uruguayo-que-se-consolida-en-el-mundo>

Kagawa, H., Young, G., Adachi, S., & Nagahama, Y. (1982). Estradiol-17 β production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *General and comparative endocrinology*, 47(4), 440-448.

Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., & Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genet*, 8(7), e1002798.

Kanamori, A., Nagahama, Y., & Egami, N. (1985). Development of the tissue architecture in the gonads of the medaka *Oryzias latipes*. *Zoological science*, 2(5), p695-706.

Kawahara, T., & Yamashita, I. (2000). Estrogen-independent ovary formation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Zoological science*, 17(1), 65-68.

Kobayashi, M., Furukawa, K., Kim, M. H., & Aida, K. (1997). Induction of male-type gonadotropin secretion by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. *General and comparative endocrinology*, 108(3), 434-445.

Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., & Ieda, R. (2019). A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes. *Current Biology*, 29(11), 1901-1909.

Kuhl, H., Guiguen, Y., Hoehne, C., Keuz, E., Klopp, C., Du, K., & Holostenco, D. (2020). A 180 My-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest

known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. bioRxiv.

Kusakabe, M., Todo, T., McQuillan, H. J., Goetz, F. W., & Young, G. (2002). Characterization and expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNAs in trout. *Endocrinology*, 143(6), 2062-2070.

Kusakabe, M., Zuccarelli, M. D., Nakamura, I., & Young, G. (2009). Steroidogenic acute regulatory protein in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): cDNA cloning, sites of expression and transcript abundance in corticosteroidogenic tissue after an acute stressor. *General and comparative endocrinology*, 162(2), 233-240.

Lasalle, A. Estudio del programa de diferenciación sexual femenino y búsqueda de marcadores sexo específicos para el esturión siberiano *Acipenser baerii* (No publicado) Pasaje Maestría-Doctorado tesis, UdelaR, (2019).

Lagomarsino, I. V., & Conover, D. O. (1993). Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evolution*, 47(2), 487-494.

LeBreton, G. T., Beamish, F. W. H., & McKinley, S. R. (Eds.). (2005). *Sturgeons and paddlefish of North America* (Vol. 27). Springer Science & Business Media.

Li, M., Sun, Y., Zhao, J., Shi, H., Zeng, S., Ye, K., & Wang, D. (2015). A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS genetics*, 11(11), e1005678.

Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J. F., Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., & Miller, W. L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267(5205), 1828-1831.

Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., & Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559-563.

Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias latipes* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zoological science*, 20(2), 159-161.

Meyer, A., & Schartl, M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current opinion in cell biology*, 11(6), 699-704.

Mosyagina, M. V., & Zelennikov, O. V. (2016). State of steroid secretory cells and concentration of gonadal steroid hormones in the blood plasma of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* and sterlet *A. ruthenus* (Acipenseridae) during sex differentiation. *Journal of ichthyology*, 56(1), 141-146.

Moore, E. C., & Roberts, R. B. (2013). Polygenic sex determination. *Current Biology*, 23(12), R510-R512.

Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., & Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics*, 191(1), 163-170.

Nagahama, Y., Kagawa, H., & Young, G. (1982). Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1), 56-64.

Nagahama, Y. (2005). Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. *Fish physiology and biochemistry*, 31(2-3), 105.

Nakamoto, M., Fukasawa, M., Tanaka, S., Shimamori, K., Suzuki, A., Matsuda, M., & Shibata, N. (2012). Expression of β 3-hydroxysteroid dehydrogenase (*hsd3b*), *star* and *ad4bp/sf-1* during gonadal development in medaka (*Oryzias latipes*). *General and comparative endocrinology*, 176(2), 222-230.

Nakamura, M., & Nagahama, Y. (1985). Steroid Producing Cells during Ovarian Differentiation of the Tilapia, *Sarotherodon niloticus*: (ovarian

differentiation/female germ cell/steroid producing cell/ultrastructure/tilapia). *Development, growth & differentiation*, 27(6), 701-708.

Nakamura, M., & Nagahama, Y. (1993). Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture*, 112(2-3), 237-251.

Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., & Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362-372.

Nakamura, M., Bhandari, R. K., & Higa, M. (2003). The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 113-117.

Omoto, N., Maebayashi, M., Mitsunashi, E., Yoshitomi, K., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2002). Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries science*, 68(5), 1047-1054.

Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., & Yamauchi, K. (2005). Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female x *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture*, 245(1-4), 39-47.

Pan, Q., Guiguen, Y., & Herpin, A. (2018). Evolution of sex determining genes in Fish.

Pan, Q., Feron, R., Yano, A., Guyomard, R., Jouanno, E., Vigouroux, E., & Guiguen, Y. (2019). Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation. *PLoS genetics*, 15(8), e1008013.

Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. part I: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(SUPPL.1), 14–32.

Piferrer, F., Baker, I. J., & Donaldson, E. M. (1993). Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and comparative endocrinology*, 91(1), 59-65.

Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I. I., Devlin, R. H., & Donaldson, E. M. (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *Journal of experimental zoology*, 270(3), 255-262.

Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. In *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* (pp. 229-281). Elsevier.

Piferrer, F., & Guiguen, Y. (2008). Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 16(sup1), 35-55.

Piferrer, F. (2011). HORMONAL CONTROL OF REPRODUCTION AND GROWTH | endocrine control of sex differentiation in fish. En *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 1490–1499). Elsevier.

Raghuveer, K., Senthikumar, B., Sudhakumari, C. C., Sridevi, P., Rajakumar, A., Singh, R., & Majumdar, K. C. (2011). Dimorphic expression of various transcription factor and steroidogenic enzyme genes during gonadal ontogeny in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Sexual Development*, 5(4), 213-223.

Ribas, L., Robledo, D., Gómez-Tato, A., Viñas, A., Martínez, P., & Piferrer, F. (2016). Comprehensive transcriptomic analysis of the process of gonadal sex differentiation in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Molecular and cellular endocrinology*, 422, 132-149.

Rice, W. R. (1986). On the instability of polygenic sex determination: The effect of sex-specific selection. *Evolution*, 40(3), 633-639.

- Rochard, E., Castelnaud, G., & Lepage, M. (1990). Sturgeons (Pisces: Acipenseridae); threats and prospects. *Journal of Fish Biology*, 37, 123–132.
- Ruban, G. & Bin Zhu. (2010). *Acipenser baerii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T244A13046607. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-1.RLTS.T244A13046607.en>
- Rzepakowska, M., & Ostaszewska, T. (2014). Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*, 6(2), 75-88.
- Saber, M. H., & Hallajian, A. (2014). Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquaculture international*, 22(1), 273-279.
- Shang, G., Peng, X., Ji, C., Zhai, G., Ruan, Y., Lou, Q., & Yin, Z. (2019). Steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone are required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation in zebrafish. *Biology of reproduction*, 101(4), 760-770.
- Siegfried, K. R. (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *Journal of Fish Biology*, 76(8), 1879-1902.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Hudson, Q. J., & Sinclair, A. H. (2007). Avian sex determination: what, when and where?. *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1-4), 165-173.
- Stocco, D. M., & Sodeman, T. C. (1991). The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 266(29), 19731-19738.
- Stocco, D. M. (2000). The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology*, 164(3), 247-253.
- Strüssmann, C. A., & Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish physiology and biochemistry*, 26(1), 13-29.
- Suzuki, A., Tanaka, M., & Shibata, N. (2004). Expression of aromatase mRNA and effects of aromatase inhibitor during ovarian development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(3), 266-273.
- Takehana, Y., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2008). Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. latipes*. *Chromosome Research*, 16(5), 801-811.
- Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M. L., Kawakami, K., Shin, T., & Naruse, K. (2014). Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias latipes*. *Nature communications*, 5(1), 1-10.
- Trudeau, V. L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of reproduction*, 2, 55-68.
- Tsujishita, Y., & Hurley, J. H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature structural biology*, 7(5), 408-414.
- Van Eenennaam, A. L., Van Eenennaam, J. P., Medrano, J. F., & Doroshov, S. I. (1999). Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity*, 90(1), 231-233.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., & Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(8), 2198-2206.
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzoni, T. S., & Quagio-Grassiotto, I. (2016). Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular Reproduction and Development*, 83(1), 19–36.
- Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C., & Genthon, C.

- (2018). De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and Comparative Endocrinology*, 268, 96–109.
- Vizziano-Cantonnet, D. (2018). Gonadal Steroids: Synthesis, Plasmatic Levels and Biological Activities in Sturgeons. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology* (pp. 327-350). Springer, Cham.
- Volff, J. N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94(3), 280-294.
- Wallis, M. C., Waters, P. D., & Graves, J. A. M. (2008). Sex determination in mammals—before and after the evolution of SRY. *Cellular and molecular life sciences*, 65(20), 3182-3195.
- Yamamoto, T. O. (1969). 3 Sex Differentiation. In *Fish physiology* (Vol. 3, pp. 117-175). Academic Press.
- Yan, H., Ijiri, S., Wu, Q., Kobayashi, T., Li, S., Nakaseko, T., & Nagahama, Y. (2012). Expression patterns of gonadotropin hormones and their receptors during early sexual differentiation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of reproduction*, 87(5), 116-1.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., & Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423-1428.
- Yao, H. H. C. (2005). The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Molecular and cellular endocrinology*, 230(1-2), 87-93.
- Yarmohammadi, M., Pourkazemi, M., Chakmehdouz, F., & Kazemi, R. (2011). Comparative study of male and female gonads in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) employing DNA-AFLP and CDNA-AFLP analysis. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 510-513.
- Yu, X., Wu, L., Xie, L., Yang, S., Charkraborty, T., Shi, H., & Zhou, L. (2014). Characterization of two paralogous StAR genes in a teleost, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular and cellular endocrinology*, 392(1-2), 152-162.