



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología – Sub Área: Ciencias Fisiológicas



Julio Pablo Berbejillo Gerschenovich

Título del Proyecto

**Caracterización molecular de la diferenciación
testicular en el esturión siberiano, *Acipenser baerii***



Orientadora: Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces



Instituto de Biología

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la Dra. Denise Vizziano, por darme la oportunidad de realizar esta Maestría, en un momento laboral de mi vida complicado. Afirmo, sin temor a equivocarme, que, gracias a ella, continúo trabajando en Facultad de Ciencias.

En segundo lugar, agradezco a mi co-orientadora, Dra. Gabriela Bedó, que me facilitó todas las herramientas y su conocimiento científico para desarrollar las tareas inherentes a este posgrado.

En tercer lugar, agradezco la generosidad y apoyo de mi jefe y amigo, profesor adjunto Justo Laíz, por haberme liberado de tareas inherentes a la Unidad a la que pertenezco.

En cuarto lugar, quiero agradecer a la Licenciada Anabel Martínez, al Licenciado Andrés Alberro, a la Dra. Maite Letamendía, al Licenciado Agustín Carnikián y al Dr. Walter Norbis por todo el apoyo y compañerismo que me brindaron a la de hora de realizar las tareas de laboratorio y el análisis de datos.

No quiero olvidar a mis compañeros de cursos de posgrado, mis ex estudiantes de Química General y Química Analítica, Santiago Chávez, Nadia Riera, Florencia Tomasina, Rafael Fort, Juan Zanetti, Ricardo Recarey, Rafael Barboza, Florencia González y Andrés Carvajales, que me dieron una gran mano para salvar las materias.

Destaco también que este trabajo se realizó en cooperación con la Empresa Uruguaya "Esturiones del Río Negro", por lo que agradezco a la misma y, en especial, al Ing. Acuicultor Daniel Conijeski por el apoyo dado.

Por último, agradecer a mi familia, por la paciencia y el afecto brindados. Como ya se sabe, es la que paga los "platos rotos" de las actividades de posgrado. También, un recuerdo para mis padres que, lamentablemente, no están presentes hace tiempo, pero no pasa un día en que no los recuerde.

Índice

Agradecimientos	2
Lista de abreviaturas.....	5
Resumen	7
Trabajos publicados durante la realización de la Tesis de Maestría	9
Introducción.....	10
Características generales del modelo elegido	10
Características específicas del modelo elegido	13
Acuicultura de los esturiones en el mundo	18
Determinación sexual en diferentes modelos	20
Elección de los genes marcadores estudiados	26
Antecedentes de los marcadores elegidos	30
Hipótesis de trabajo principal	40
Objetivos y estrategia experimental	40
Materiales y Métodos	41
Animales experimentales y muestreo.....	41
Extracción de ARN y transcripción reversa	44
Caracterización del ADNc y PCR en tiempo real	44
Histología gonadal	48
Análisis filogenéticos	49
Análisis estadísticos	50
Resultados.....	51
Caracterización y clonado de secuencias parciales de ADNc de <i>Acipenser baerii</i>	51
Desarrollo gonadal.....	54
Caracterización filogenética de <i>dmrt1</i> , <i>cyp17a1</i> , <i>star</i> , <i>igf1</i> , <i>ar</i> , <i>lh</i> y <i>sox9</i> gonadales.....	57
Patrones de expresión de peces inmaduros.....	61
Expresión génica en gónadas de peces juveniles	63

Expresión génica gonadal en el período de peridiferenciación de peces de 16 y 18 meses..	65
Discusión	68
Conclusión y perspectivas	75
Bibliografía	76
Anexo	110

Lista de abreviaturas

En esta tesis, los genes fueron escritos con fuente itálica y en minúsculas (ej: *dmrt1*), los ARNm con fuente normal y en minúscula (ej: *dmrt1*) y las proteínas con fuente normal y comenzando con mayúsculas (ej: *Dmrt1*).

Adaptado de *Zebrafish Nomenclature Guidelines*:

<https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

Amh: hormona anti-Mülleriana

Amhy: Gen parálogo de amh ligado al cromosoma Y.

Cyp17a1: Citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1.

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

Dmrt1: Factor de transcripción 1 doble-sexo asociado a Mab-3.

dmrt1bY: Gen con dominio DM ligado al cromosoma Y.

dm-W: Gen parálogo de *dmrt1* ligado al cromosoma W.

E2: Estradiol, 17β-estradiol.

ESD: Determinación sexual ambiental.

FGF 9: Factor de crecimiento fibroblástico 9

Foxl2: Factor de transcripción Forkhead. Forkhead box L2.

GSD: Determinación sexual genética.

Gsdf: Factor de crecimiento gonadal derivado del soma.

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

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

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

Sf1: Factor esteroideogénico 1 o *Steroidogenic factor 1*.

sox9: gen 9 conteniendo al SRY-box.

SRY: Región del cromosoma Y determinante del sexo.

TSD: Determinación sexual por temperatura.

tbx1: Familia de genes asociada al factor de transcripción de la caja T.

wt1: Gen supresor de tumores 1 de Wilms.

Resumen

Los mecanismos moleculares de la diferenciación testicular en los peces primitivos son poco conocidos. En el esturión siberiano, no existían antecedentes (antes de esta tesis) sobre los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación sexual de su gónada. Por ende, se planteó la necesidad de estudiar la expresión diferencial de un grupo de genes en las gónadas de individuos en el período de peri-diferenciación y en las de individuos machos y hembras con diferentes grados de diferenciación. Debe señalarse que este pez presenta un desarrollo lento y ello facilitó el análisis de sus gónadas, obtenidas a partir de individuos de 16 y 18 meses de edad que presentaron un retardo en el crecimiento y en la diferenciación sexual, evaluada microscópicamente. Paralelamente, se exploró la gónada (aún inmadura) de individuos de 3 años. Para realizar la caracterización de la expresión molecular, se seleccionó un grupo de genes, entre los que se encuentran factores de transcripción como *dmrt1* y *sox9*, que son conocidos por controlar la diferenciación testicular en vertebrados y que se expresan en las células de Sértoli; factores relacionados con la diferenciación de la célula de Leydig (*cyp17*, *star*) que afectan la producción de andrógenos, el receptor *ar* involucrado en la receptividad de andrógenos, un factor que controla el desarrollo del crecimiento del testículo (*igf1*) y un gen que codifica para la gonadotropina LH (*lh*). Tres genes se caracterizaron por primera vez (*dmrt1*, *cyp17a1*, *ar*), dos de ellos se clonaron (*dmrt1*, *ar*), mientras que para los otros se emplearon secuencias de bases de datos públicas.

Los peces en el período de peri-diferenciación mostraron siempre una expresión génica gonadal diferencial en función del sexo gonadal, salvo para el *sox9*. Las gónadas de individuos de 16 meses mostraron bajos niveles de expresión general. Se pudo observar diversos niveles de expresión del *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star* y *ar* y de *lh*, que sugieren la sobre-expresión en las gónadas de los futuros machos. Los perfiles de expresión y los estudios filogenéticos sugieren que estos genes son reguladores potenciales del desarrollo de los testículos en el esturión siberiano.

Trabajos publicados derivados de este trabajo de tesis de Maestría

La siguiente es una lista de los artículos originales de investigación publicados y las presentaciones a Congresos, relacionados con esta Tesis:

Artículos originales de investigación:

1) Revista indexada “Fish Physiology and Biochemistry”

2013: Berbejillo, J.; Martínez-Bengochea, A.; Bedo, G. and Vizziano-Cantonnet, D. **Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*).** *Fish Physiol Biochem.* 39: 91 – 94. DOI: 10.1007/s10695-012-9666-5

2) Revista indexada “Molecular Reproduction and Development”

2012: Berbejillo, J.; Martínez-Bengochea, A.; Bedo, G.; Brunet, F.; Volff, J.-N. and Vizziano-Cantonnet, D. **Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*.** *Mol. Reprod. Dev.* 79: 504 – 516. DOI: 10.1002/mrd.22053

Presentaciones a Congresos

1) IV Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos – Latin American and Caribbean Aquaculture 2013 LACQUA2013 – XIX Jornada de Acuicultura y el VI Foro Regional de Acuicultura. Octubre de 2013.

Avances sobre la diferenciación del sexo en esturiones cultivados en Uruguay.
Vizziano-Cantonnet D., Berbejillo J., Martínez-Bengochea A., Di Landro S.

2) 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Thrissur (Cochin), India, Agosto de 2011.

Molecular characterization of testis differentiation in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*.
Berbejillo J., Martinez-Bengochea A., Bedó G., Vizziano-Cantonnet D. 2011. INDIAN J. SCI. TECHNOL. VOL. 4 ISSUE 8 (SUPPL.). PUBLISHED BY INDIAN SOCIETY FOR EDUCATION AND ENVIRONMENT. ISSN: 0974 – 6846. pp 71 – 72.

3) XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Piriápolis, Uruguay. Mayo de 2010.

Identificación de genes marcadores de la diferenciación sexual gonadal de una especie primitiva: el esturión siberiano *Acipenser baerii*.
Berbejillo, J., Bedó, G., Vizziano, D.

Introducción

Características generales del modelo elegido

El esturión siberiano es un pez que forma parte del grupo más grande y diverso de vertebrados, con cerca de 28.000 especies reconocidas hasta el momento (Nelson 2006). Este grupo incluye los peces sin mandíbula (mixinos, lampreas), los cartilaginosos (tiburones, rayas) y los peces óseos (celacanto, peces pulmonados y los peces con aletas radiadas). Estos últimos representan más del 95 % de todas las especies de peces vivos y prácticamente el 50 % del total de vertebrados existentes (Volff 2005).

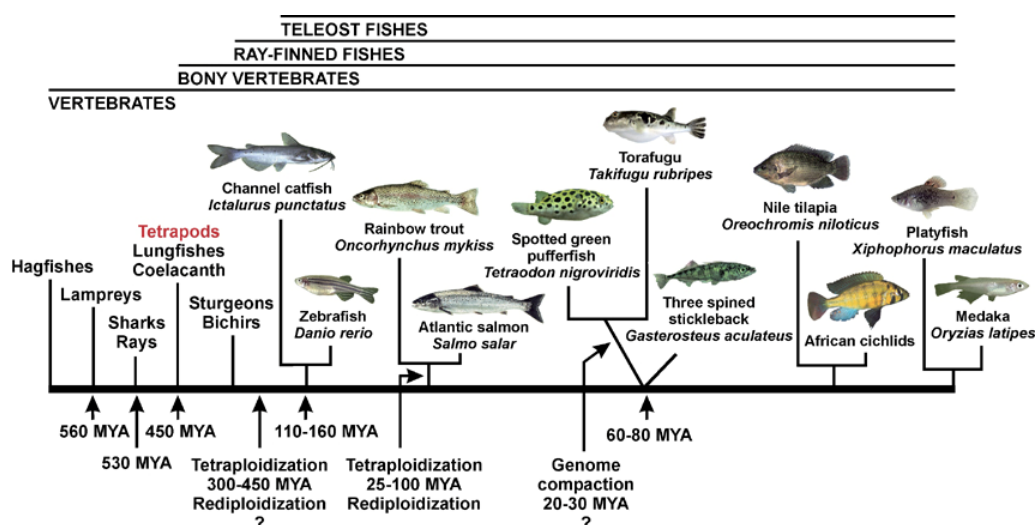


Figura 1.- El linaje de los peces. Tomado de Volff, J. N. 2005.

Adicionalmente, ofrecen una ventaja importante para la definición de la interfaz organismo-medio ambiente y las respuestas a los factores de estrés natural o antropogénico (Cossins y Crawford 2005).

El atractivo principal de este grupo es su extraordinaria diversidad morfológica, ecológica, comportamental y genética, así como otros aspectos de su biología (Devlin y Nagahama 2002). Esta variedad se ve reflejada también en su reproducción, incluyendo gonocorismo, hermafroditismo y unisexualidad (Devlin y Nagahama 2002; Strüssmann y Nakamura 2002; Penman y Piferrer 2008). A diferencia de los mamíferos, poseen una gran plasticidad en su genoma y la determinación genética de su sexo es muy lábil debido a la influencia no sólo de factores hormonales, sino también de factores sociales y ambientales. Su cerebro no posee mecanismos que permitan tornar irreversible su sexo al inicio de su desarrollo (Le Page *et al.* 2010). El fenómeno de plasticidad se visualiza mejor en la gónada adulta de algunos peces que cambian espontáneamente de machos a hembras (peces protándricos, como la Dorada – *Sparus aurata* – y todas las especies de peces payaso – *Amphiprion* *sp.* –) o de hembras a machos (peces protóginos, como el pez Luna – *Thalassoma lunare* –) (Devlin y Nagahama 2002).

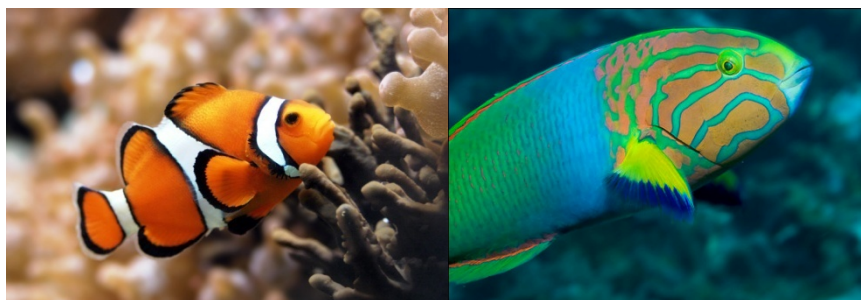


Figura 2.- En la fotografía de la izquierda, *Amphiprion ocellaris* (Pez payaso), un pez protándrico y en la de la derecha, *Thalassoma lunare* (Pez luna), un pez protógino.

Recientemente, se ha constatado la supra-regulación temprana de *Gsdf* en *Halichoeres trimaculatus*, un pez protógino, durante las primeras etapas de

su reversión sexual. Esta expresión se ubica en la periferia de su lamela ovárica, concretamente en las células soporte que rodean a las células germinales goniales y a las células espermatogénicas originadas a partir de éstas (Horiguchi *et al.* 2013).

En todos los casos de hermafroditismo secuencial descritos anteriormente, los individuos que cambian su sexo mantienen su fertilidad, a diferencia de lo que ocurre en los casos anormales de mamíferos (Capel y Tanaka 2013).

Los enfoques moleculares actuales sobre la organización y evolución génicas han arrojado luz sobre muchas cuestiones evolutivas que explican, en parte, esta gran variabilidad. En ese sentido, el análisis de los datos del genoma del pez Fugu (*Fugu rubripes*) sugiere un evento de duplicación temprano de todo el genoma en la evolución de los peces con aletas, probablemente antes del origen de los teleósteos (Christofells *et al.* 2004). Por otro lado, se ha confirmado recientemente que todos los vertebrados experimentaron dos rondas de duplicación global de su genoma (WGD, por su sigla en inglés) al principio de su evolución, pero los peces teleósteos experimentaron una tercera ronda adicional acontecida hace 320 – 400 millones de años en un antepasado común, pero luego de su divergencia de un ancestro común con los actinopterigios no-teleósteos (entre los que se encuentra nuestro modelo de estudio) (Sato y Nishida 2010).

Características específicas del modelo elegido

Los esturiones son considerados por la comunidad científica como verdaderos “fósiles vivientes” ya que pertenecen al antiguo super orden de los *Chondrostei* de la clase *Osteichthyes* (Bemis *et al.* 1997).

Las formas más ancestrales se remontan al Período Jurásico (entre 130 y 195 millones de años atrás) (Figura 3).



Figura 3.- Fósil antiquísimo de esturión (período Jurásico) hallado en la Provincia de Liaoning (China). <http://infinitecreature.hubpages.com/hub/The-Sturgeon-of-the-World>

Las formas actuales son muy similares a las del Período Cretácico Tardío (entre 65 y 100 millones de años atrás) (Figura 4).



Figura 4.- Fósil 3D de esturión (período Cretácico Tardío) hallado en la Provincia de Montana (EEUU) (Grande y Hilton, 2006).

Su genoma tetraploide posee 250 cromosomas (2n) (Fontana 1994) y se ha identificado en varias especies un sistema de determinación sexual del tipo ZZ/ZW (hembras heterogaméticas), como en el caso de *Acipenser transmontanus* (Van Eenennaam *et al.* 1999), *Huso huso* (Omoto *et al.* 2005), *Acipenser brevirostrum* (Flynn *et al.* 2006) y *Acipenser baerii* (Fopp-Bayat 2010).

Clasificación taxonómica: Reino: *Animalia*; Phylum: *Chordata*; Clase: *Actinopterygii*; Orden: *Acipenseriformes*; Familia: *Acipenseridae*; Género: *Acipenser*; Especie: *baerii baerii* Brandt 1869



Figura 5.- Ejemplar de *Acipenser baerii* Brandt, 1869
<http://www.biolib.cz/en/taxon/id100201/>

Estos peces poseen 5 filas de placas en el cuerpo, con una boca de posición ínfera y protruíble con 4 barbas anteriores. No poseen espinas y sí un cartílago central. Son peces muy longevos, pudiendo alcanzar los 4,2 m, con un dorso pardo negruzco, un vientre blanco y una cola heterocercal.

Se trata de especies de agua dulce, aunque dentro de esta familia existen especies marinas anádromas (migran al agua dulce para reproducirse).

Su alimentación es bentófaga (organismos que viven sobre el fondo o enterrados), fundamentalmente crustáceos y moluscos (Rodríguez, M. www.dinara.gub.uy). Todas sus especies son unisexuales, el intersexo es escaso y su gametogénesis es, por lo general, similar. Las hembras presentan un desarrollo grupal sincronizado de sus ovocitos, con distintos agrupamientos de folículos vitelogénicos y pre-vitelogénicos (Hurvitz *et al.* 2005).

El caviar proveniente de los ovarios (que alcanzan, en muchos casos, el 10 % del peso del animal), hace que estos peces posean una gran importancia comercial en el mundo. De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4369>), una cucharada de caviar aporta el requerimiento adulto diaria de vitamina B-12, aunque también es alta en colesterol y sal. 1 cucharada de caviar (16 g) contiene:

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| ✓ Calorías: 42 g | ✓ Proteínas: 3,94 g |
| ✓ Grasas: 2,86 g | ✓ Sodio: 240 mg |
| ✓ Carbohidratos: 0,64 g | ✓ Colesterol: 94 mg |

La composición química de las huevas del esturión blanco de cría (*Acipenser transmontanus*), alimentados con dos dietas experimentales con diferentes fuentes de lípidos dietéticos, mostró que el contenido en ácidos grasos fue prácticamente constante en todos los casos (Caprino *et al.* 2008). Tanto el caviar (Figura 6) como la carne que se extrae de las hembras son muy

apreciados en el mercado internacional (Europa, Estados Unidos), contando con un alto precio de comercialización.



Figura 6.- Caviar de la Empresa "Esturiones del Río Negro" (Uruguay)
<http://tipsfamilia.com/2009/07/13/caviar-de-uruguay/>

A nivel nacional, se elabora una crema antiarrugas con caviar Ossetra uruguayo.



Figura 7.- Crema de caviar <http://www.matiasgonzalez.com>



Figura 8.- Sello y matasello de Correos del Uruguay sobre productos de exportación uruguayos (Empresa Esturiones del Río Negro S.A.) <http://www.correo.com.uy>

Durante su evolución, las múltiples duplicaciones de su genoma podrían explicar su elevada resistencia a las mutaciones perjudiciales, ya que es probable que posean varias copias funcionales de cada gen (Blacklidge y Bidwell 1993). Esto hace que sus características primitivas se hayan mantenido a lo largo de aproximadamente 200 millones de años, a pesar de los grandes cambios que ha tenido el medio ambiente (Baker *et al.* 2005; Asadi *et al.* 2006) y que muchas de sus características bioquímicas y moleculares difieran sustancialmente de la de los teleósteos.

Acuicultura de los esturiones en el mundo

Los esturiones se hallan naturalmente distribuidos a lo largo de las costas de los océanos Atlántico y Pacífico, en el mar Mediterráneo y Negro y en varios ríos, lagos y mares interiores (Dettlaff *et al.* 1993). La disminución alarmante de sus poblaciones en los hábitats naturales, principalmente en el mar Caspio, debida a varios factores tales como la sobrepesca, la caza furtiva, la producción de caviar, la destrucción de sus lugares naturales de desove, la construcción de represas y la polución de las aguas, ha llevado a la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, por su sigla en inglés) a declarar a todas las especies de esturión protegidas ante la explotación excesiva (Anonymous 2002). Por lo anteriormente expuesto, varias especies de este pez han sido introducidas en acuicultura en todo el mundo, especialmente en Europa. El esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) y el esturión siberiano (*Acipenser baerii*) son las

especies que mejor se han adaptado a este tipo de cultivo y, por ende, son las más estudiadas al respecto. Un severo problema que se presenta en el manejo de las hembras de estos peces primitivos es la maduración lenta y asincrónica de sus ovarios. Como ejemplo, se puede citar que la mayoría de los machos del esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) maduran a la edad de 4 años, mientras que las hembras alcanzan su madurez sexual entre los 6 y 12 años de edad y poseen ciclos ováricos bianuales (Doroshov *et al.* 1997).

En el esturión siberiano por su parte, se constató mediante la observación histológica de su desarrollo temprano y de su diferenciación gonadal, que dos tipos de gónadas son distinguibles a los 210 dph (días post eclosión por su sigla en inglés: "days post hatching") (Tian *et al.* 2010). En un artículo reciente, se las logra distinguir a los 115 dph. La actividad meiótica se observó en los ovarios a los 197 dph, mientras que, en los testículos, las primeras divisiones meióticas se observaron mucho más tarde, a los 439 dph y sólo en algunos ejemplares siberianos (Rzepkowska y Ostaszewska 2013).

En Uruguay, el esturión siberiano (*Acipenser baerii*) es la única especie cultivada con éxito. De hecho, Uruguay posee la primera y única marca de caviar del Hemisferio Sur, a la que muchos chefs del mundo le han reconocido su calidad (Suplemento *El Empresario*, diario El País, 19 de Julio de 2013). El mapa que se muestra en la próxima página está construido a partir de datos estadísticos proporcionados por la FAO (Figura 9). Las actividades de acuicultura de esta especie también se dan en otros países, tales como la Federación Rusa, Italia, Alemania, Polonia, España, los Estados Unidos, China, Bélgica y Hungría. Sin embargo, la producción en estos casos está incluida en la

categoría estadística de la FAO denominada “esturión nep”, debido a que los países anteriores no indican exactamente la especie cultivada y porque parte de la producción proviene de híbridos.



Figura 9.- Principales países productores de *Acipenser baerii*. (FAO Fishery Statistics, 2005)

Determinación sexual en diferentes modelos

En primer lugar, debe mencionarse que en nuestro modelo no se conoce el gen determinante del sexo, ni los mecanismos moleculares involucrados en la decisión de tomar una vía de diferenciación masculina o femenina por parte de las gónadas. El conocimiento del gen determinante del sexo, permitiría el sexado genético temprano y la selección de las hembras y la eliminación de los machos en el cultivo.

Paralelamente, los intentos para estudiar su ginogénesis no han tenido éxito hasta el momento en el mundo (Williot 2011). La determinación sexual surge del evento genético o ambiental por el cual se establece el sexo de un

individuo en una decisión binaria simple (Piferrer 2013). Constituye el evento disparador de la diferenciación sexual, eje central del presente trabajo.

Hasta el momento, se han identificado sólo cuatro genes reguladores maestros del proceso (Capel y Tanaka 2013):

- ✓ *Sry* en mamíferos (Gubbay *et al.* 1990; Sinclair *et al.* 1990; Koopman *et al.* 1991). Existen hallazgos muy recientes en este grupo que establecen la existencia de determinantes del sexo no reconocidos por el dogma clásico (Arnold *et al.* 2013). Empleando al ratón como modelo animal, concretamente a sus cuatro genotipos centrales (FCG, por su sigla en inglés), se demostró que el complemento dado por los cromosomas sexuales es independiente del sexo de las gónadas. Los ratones FCG incluyen ratones XX y XY con testículos y ratones XX y XY con ovarios. Los análisis realizados sobre estos modelos revelaron diferencias sexuales en el peso y en la formación de tejido graso. Los ratones adultos gonadectomizados que poseen dos cromosomas X muestran un incremento mayor de estas variables con respecto a aquéllos que poseen un solo cromosoma, más allá de su sexo gonadal. Este efecto se ve reflejado también en diferencias sexuales halladas en diversos tejidos y fenotipos, incluyendo muchas enfermedades muy relevantes, entre las que se encuentran las patologías autoinmunes, los defectos en el cerramiento del tubo neural, la hipertensión y las adicciones (Arnold *et al.* 2013).

- ✓ *Dmrt1* en aves. El modelo de dosaje-Z es el que impera (Smith *et al.* 2004; Smith *et al.* 2009). No obstante ello, los estudios recientes en gallinas ginandrofórmicas laterales (Figura 10), más allá de que no han podido elucidar el mecanismo de determinación sexual aviar, han demostrado que las células somáticas aviares poseen una determinación sexual autónoma y previa al tipo de gónada desarrollada y a las hormonas sexuales secretadas (Zao *et al.* 2010; Barske y Capel 2010). Estos hallazgos desafían la visión clásica (donde el fenotipo es determinado por las secreciones hormonales de las gónadas) y deberían traer aparejado una definición más amplia sobre la determinación sexual en general (Cutting *et al.* 2013).



Figura 10.- Gallina ginandrofórmica (*), donde el lado derecho posee rasgos femeninos y el izquierdo masculino. Extraído de Zao et al. 2010.

* Fenómeno natural pero escaso en donde los individuos nacen con rasgos masculinos en un lado y femeninos en el otro.

✓ *dm-w* en anfibios. Este gen identificado recientemente, a diferencia del resto, determinaría el sexo femenino (Yoshimoto *et al.* 2008, Yoshimoto *et al.* 2010; Yoshimoto *et al.* 2011).

✓ *dmy* en peces teleósteos, concretamente en dos especies muy cercanas de medaka (*Oryzias latipes* y *Oryzias curvinotus*) (Nanda *et al.* 2002; Matsuda *et al.* 2002; Matsuda *et al.* 2003; Kobayashi *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2007; Matsuda *et al.* 2007; Otake *et al.* 2010).

Afortunadamente, en el lapso de un año y medio, se han descubierto varios candidatos potenciales para regular este proceso en peces:

✓ *amhy*, gen parálogo a *amh*, implicado en el desarrollo testicular del pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) (Hattori *et al.* 2012). Este gen codifica para la hormona anti-Mülleriana.

✓ *amh-R-Y*, *amr-R* ligado a Y, descubierto en el Fugu (*Fugu rubripes*) gracias a un polimorfismo de un nucleótido en el receptor de la amh que establece la diferencia entre un amh-R y un amh-R-Y. (Kamiya *et al.* 2012).

✓ *gsdfY*, descubierto en el medaka *Oryzias luzonensis*, codifica para un factor de crecimiento y no para un factor de transcripción ni para una hormona, provocando la pérdida de la expresión de *dmy* (Myosho *et al.* 2012). Se presume que adquirió una nueva funcionalidad y comenzó a

actuar como gen determinante del sexo, quedando ligado al cromosoma Y (Marshall-Graves 2012).

- ✓ *SDY*, descubierto en las truchas y salmones (Yano *et al.* 2012). Se trata de un gen que aparece a partir del truncado de un factor del sistema inmune (IRF9).

Más allá de este panorama promisorio, lamentablemente, los intentos realizados durante más de 10 años para descubrir el/los gen/es determinante/s del sexo en nuestro modelo han sido infructuosos (Wuertz *et al.* 2006; McCormick *et al.* 2010; Keyvanshokook and Gharaei 2010; Yarmohammadi *et al.* 2011). Los autores concluyen que los estudios de genética clásica y molecular han sido infructuosos y que la esperanza de identificar el gen determinante del sexo se encuentra en estudios de transcriptómica aplicados en gónadas embrionarias. De hecho, ésta es la estrategia que se utilizó para identificar el gen determinante del sexo en los salmónidos (Yano *et al.* 2012). Nuestro equipo de trabajo ha comenzado a investigar este tema y va a emplear la transcriptómica aplicada a gónadas embrionarias del esturión siberiano.

Por otra parte, tampoco se cuenta con un conocimiento profundo acerca de su diferenciación gonadal, que, de acuerdo a Bull (1983), describe los diversos mecanismos moleculares, genéticos y fisiológicos que producen un macho o una hembra a partir de un cigoto de genotipo dado y padres en un ambiente dado.

Paralelamente, no se ha logrado obtener de nuestra especie poblaciones monosexo, ni marcadores moleculares sexuales definidos. El control del sexo

para la producción de poblaciones monosexo hembra exige el conocimiento de los mecanismos que controlan la diferenciación gonadal.

Aún no se conoce en qué momento se da la diferenciación molecular de la gónada de esta especie en el Uruguay, ni cuáles son los mecanismos que conducen a la diferenciación hacia el ovario o hacia el testículo.

No obstante ello, se empleó un grupo de animales de 16 y 18 meses con baja tasa de crecimiento y que, paralelamente, comenzaban a mostrar los primeros signos de diferenciación gonadal, a pesar de su edad avanzada (Figura 11).

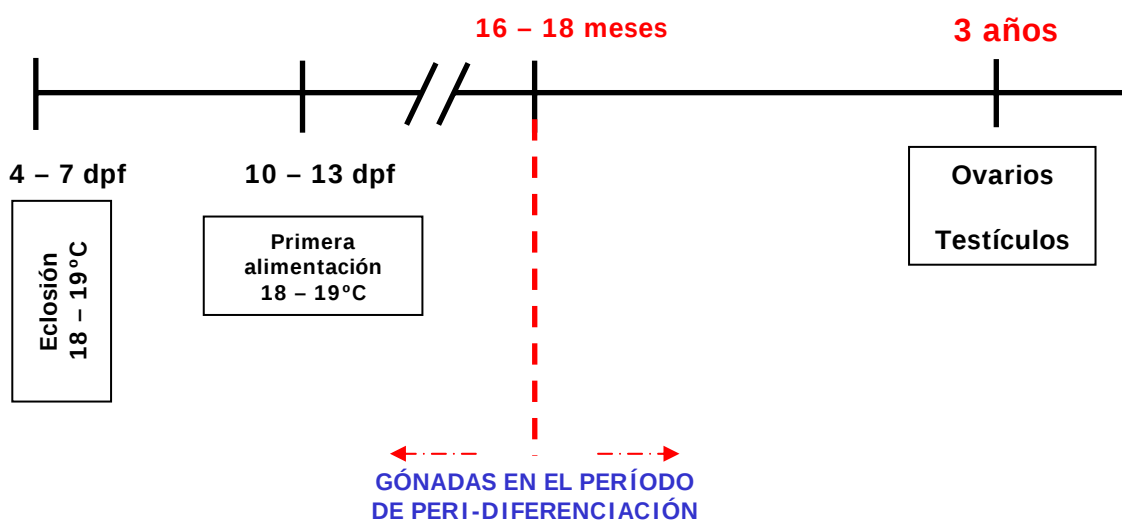


Figura 11.- Período de diferenciación sexual morfológica de los esturiones siberianos analizados en este trabajo.

Su posición evolutiva, en la base de los tetrápodos, sugiere que su proceso de diferenciación sería relativamente ancestral en los vertebrados. Si a esto se le suma el interés económico natural que posee la especie, resulta relevante su estudio a nivel molecular.

Elección de los genes marcadores estudiados

Las vías subyacentes a la determinación sexual se encuentran, en general, altamente conservadas. La similitud estructural de los testículos y ovarios a través de los vertebrados, condujo a la idea de que el tránsito desde el primordio bipotencial al testículo u ovario tendría caminos similares (Piferrer y Guiguen 2008).

Sin embargo, los genes implicados en la diferenciación del testículo y ovario se expresan en un orden diferente en algunas especies (Cutting *et al.* 2013). Por ejemplo, en la vía masculina, el rol clave que posee *sox9* en el desarrollo testicular de mamíferos es la activación de *amh*. Sin embargo, *amh* se expresa más temprano que *sox9* en los embriones de aves, por lo que la activación anterior no se presenta en el sistema aviar, aunque *sox9* podría suprarregularlo (Cutting *et al.* 2013). Asimismo, un gen parálogo de *amh* (*amh-Y*) podría estar implicado en el inicio de la cascada de determinación del sexo en el pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) (Hattori *et al.* 2012).

En la vía femenina, existe una gran diferencia en el requerimiento de estrógenos para la diferenciación del ovario entre las especies. En las especies ponedoras de huevos, *cyp19a1* es clave en el desarrollo de la corteza gonadal exterior de los embriones, con *foxl2* mediando probablemente su activación. Esta vía no se encuentra en los embriones de ratón, un mamífero placentario (Cutting *et al.* 2013).

Los ejemplos anteriores ilustran la plasticidad en la ubicación de los genes en la cascada de diferenciación sexual. Este orden distorsionado de

expresión se encontró también al comparar la expresión de cinco genes de la vía de diferenciación sexual (*wt1*, *sf1*, *dax1*, *sox9* y *cyp19a1*) en el desarrollo embrionario de machos y hembras de nueve vertebrados amniotas, incluyendo especies GSD y ESD (Valenzuela *et al.* 2012).

No obstante todo lo anterior, la mayoría de los genes que integran esta red regulatoria es común a todos los vertebrados; en ese sentido, se ha logrado identificar varios de ellos en la vía de diferenciación gonadal de los mamíferos (Brennan y Capel 2004; Piferrer y Guiguen 2008; Herpin y Scharf 2011).

En peces, el principal factor determinante del sexo es aún desconocido para la mayoría de las especies y no es posible sexarlos en etapas tempranas del desarrollo. Por ello, en algunas especies se ha podido contar con poblaciones monosexo con estudios genómicos y transcriptómicos completos, permitiendo así el estudio de los cambios en la expresión génica gonadal antes de que su género sea expresado a nivel morfológico (Berbejillo *et al.* 2012).

La sobre-expresión de algunos genes antes de la diferenciación morfológica sexual de las gónadas fue descripta también para algunas especies de teleósteos (Guiguen *et al.* 1999; Marchand *et al.* 2000; Guan *et al.* 2000; Yokoi *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2003; Wang *et al.* 2004; Yoshinaga *et al.* 2004; Nagahama 2005; Baron *et al.* 2005; Vizziano *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Ijirii *et al.* 2008; Lareyre *et al.* 2008; Shibata *et al.* 2010; Yano *et al.* 2011). Estos estudios demostraron que la diferenciación testicular era precedida por una clara sobre-expresión de algunos genes que codifican para factores de transcripción de las células de Sertoli, entre los que se encuentra *dmrt1*, *sox9*, *nr0b1* o *dax1*, y *tbx1* (Marchand *et al.* 2000; Guan *et al.* 2000; Yokoi *et al.*

2002; Zhou *et al.* 2003; Vizziano *et al.* 2007; Yano *et al.* 2011), de algunos factores de crecimiento como *amh* y *gsdf* (Yoshinaga *et al.* 2004; Baron *et al.* 2005; Vizziano *et al.* 2007; Lareyre *et al.* 2008; Shibata *et al.* 2010) y de ciertos marcadores de células esteroideogénicas, como es el caso de *Sf1* (Wang *et al.* 2007).

Por otro lado, en algunas especies de peces teleósteos, la diferenciación de las células de Leydig ocurre antes de la diferenciación testicular con una sobre-expresión y/o activación de enzimas y factores que controlan la síntesis de esteroides (Vizziano *et al.* 2007; Blasco *et al.* 2013). Sin embargo, en tilapia, se constató que la capacidad de sintetizar esteroides aparece luego de la diferenciación testicular (Ijirii *et al.* 2008). En peces primitivos como el esturión, el rol de los esteroides en su diferenciación gonadal no es aún conocido.

De todos modos, los esteroides endógenos han sido aceptados como marcadores relevantes de la diferenciación gonadal de vertebrados que no pertenecen a los mamíferos (Hayes 1998; Baroiller *et al.* 1999, Pieau and Dorizzi 2004; Smith y Sinclair 2004). Dentro de este grupo, se ha reportado una cantidad creciente de información sobre la importancia del gen *cyp19a1* que codifica a la enzima aromatasa, responsable de la conversión de andrógenos en estrógenos, en la morfogénesis ovárica de peces teleósteos (Guiguen *et al.* 1999; Guiguen 2000; Govoroun *et al.* 2001; Devlin and Nagahama 2002; Vizziano *et al.* 2007; Karube *et al.* 2007; Piferrer y Guiguen 2008; Guiguen *et al.* 2010).

Por otro lado, se ha reportado que los andrógenos *per se* podrían cumplir un rol en la morfogénesis testicular en peces teleósteos. Desde el trabajo

pionero de Yamamoto (1969), se ha mostrado que la administración de andrógenos promueve la masculinización gonadal en estas especies (Hunter y Donaldson 1983; van den Hurk y van Oordt 1985; Piferrer *et al.* 1993; Guiguen 2000; Govoroun *et al.* 2001; Desprez *et al.* 2003) y en tetrápodos no-mamíferos (Chardard *et al.* 2003). Asimismo, en el pejerrey (*Odonthestes bonariensis*), especie que presenta una determinación sexual por temperatura (TSD), los andrógenos parecen cumplir un rol importante en la determinación y diferenciación testiculares. La 11-keto-testosterona se produce en etapas muy tempranas del desarrollo de los testículos, siendo posiblemente uno de los principales mediadores de la masculinización inducida por el tratamiento de temperatura a nivel de las gónadas (Blasco *et al.* 2013).

Este panorama global ha permitido reunir suficiente información para la elección de los genes reguladores del desarrollo gonadal en nuestro modelo. Debe señalarse que lo ideal hubiera sido analizar y comparar la expresión de todos los marcadores descritos en estos antecedentes. Sin embargo, la mayoría de ellos no estaban disponibles en las bases de datos públicas cuando se iniciaron los estudios para esta tesis. Parte de los mismos fueron caracterizados aquí. Actualmente, los investigadores cuentan con el transcriptoma gonadal de una especie muy relacionada con la del presente trabajo, el esturión del Adriático, *Acipenser naccarii* (Vidotto *et.* 2013).

A continuación, se detalla el grupo de genes estudiado:

- ✓ Factores de diferenciación de células de Sertoli: *dmrt1*, *sox9*
- ✓ Factores de diferenciación de células de Leydig: *cyp17*, *star*
- ✓ Otros: *ar*, *igf1*, *lh*

Su expresión se estudió en el período de peri-diferenciación sexual así como en peces ya diferenciados. Debido a que el momento de la diferenciación sexual no estaba informado en las condiciones de crianza de esta especie en Uruguay, la identificación del desarrollo gonadal se llevó a cabo a través de estudios morfológicos.

Antecedentes de los marcadores elegidos

El primer gen del presente trabajo se conoce como el factor de transcripción Dmrt1 (*Doublesex Maleabnormal-3 Related Transcription factor-1*). A nivel funcional, se ha constatado que es esencial para el mantenimiento de la determinación testicular y el sexo gonadal, luego de la elección fetal entre ratón macho y hembra (Matson *et al.* 2011). Su delección en las células de Sertoli conduce a la feminización, reprogramándolas en células del tipo granulosa (Matson *et al.* 2011). En los testículos de otros grupos taxonómicos, también se ha sido reportado su expresión, por ejemplo, en aves (Smith *et al.* 2009), en reptiles (Torres Maldonado *et al.* 2006), en anfibios (Sakata *et al.* 2006) y en peces teleósteos (Liarte *et al.* 2007; Alam *et al.* 2008; Kobayashi *et al.* 2008; Fernandino *et al.* 2008). En este último grupo, *dmrt1* es un importante factor para la diferenciación testicular, tanto para las células de Sertoli como para las células germinales (Piferrer y Guiguen 2008; Raghuveer y Senthilkumaran 2009; Raghuveer *et al.* 2011). Paralelamente, se ha descrito también que Dmrt1 suprime la vía femenina en las gónadas de tilapia y, posiblemente otros vertebrados, reprimiendo la transcripción del gen *cyp19a1* y la producción de

estrógeno (Wang *et al.* 2010). La disminución de su expresión estaría relacionada con la inversión del sexo en el pez protándrico besugo negro (*Acanthopagrus schlegeli*) (He *et al.* 2003). Con respecto a nuestra especie de interés, la expresión de *dmrt1* ya ha sido estudiada en gónadas de ciertas especies de esturión, habiéndose demostrado que es dimórfica en el esturión de lago, *Acipenser fulvescens* (Hale *et al.* 2010). Sin embargo, no mostró dimorfismo sexual en el esturión nariz de pala, *Scaphirhynchus platyrhynchus* (Amberg *et al.* 2010).

El segundo gen que se pretende estudiar en esta tesis es el factor de transcripción Sox9 (gen 9 conteniendo al SRY-box). A nivel funcional, *sox9* posee un rol crucial en la diferenciación de las células de Sertoli. Luego de la expresión de *Sry*, es uno de los genes que se activa más temprano en las células de pre-Sertoli de mamíferos y, por lo tanto, posee un rol clave en la diferenciación sexual de los mamíferos (Bowles y Koopman 2001; Brennan y Capel 2004). En particular, participa junto a FGF 9 en un mecanismo de retroalimentación positiva para que la formación de los cordones testiculares y la diferenciación de las células de Leydig ocurran sincronizadamente a lo largo de toda la cresta genital, desde la región central a los polos (Figura 12).

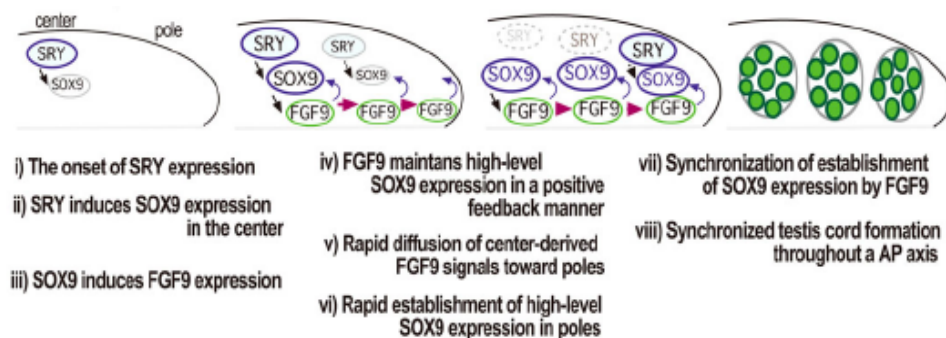


Figura 12.- Mecanismo de retroalimentación positiva entre *sox9* y *FGF 9*.
(Tomado de Harikae *et al.* 2012).

Las señales de FGF 9 son probablemente secretadas desde la región central, rápidamente se difunden hacia los polos y allí, inducen la expresión de *sox 9* en las células de Sertoli (Harikae *et al.* 2012).

No obstante todo lo anterior, algunos autores afirman que *sox9* es dispensable para la diferenciación testicular, luego que ocurre la determinación sexual (Barrionuevo *et al.* 2009).

El trabajo pionero en peces teleósteos fue realizado en la trucha arco iris (Takamatsu *et al.* 1997). Posteriormente, se identificaron dos genes en el pez cebra: *sox9a* y *sox9b* (Chiang *et al.* 2001). Este mismo patrón de duplicación génica se halló en otros peces teleósteos, como el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) (Cresko *et al.* 2003), la anguila de los campos de arroz (*Monopterus albus*) (Zhou *et al.* 2003) y el bagre (*Clarias gariepinus*) (Raghuveer *et al.* 2010). En el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), se detectó su expresión varias semanas antes de una diferenciación morfológica discernible de la gónada (Von Schalburg *et al.* 2011). Sin embargo, no se observó ninguna evidencia de ella en esturiones (Hett *et al.* 2005). En pejerrey (*Odonthestes bonariensis*) y en medaka, *sox9* fue propuesto para estar involucrado en la formación de la estructura testicular, pero no en su diferenciación (Nakamoto *et al.* 2005; Blasco *et al.* 2010). En la trucha, los parálogos de *sox9* (*sox9a1*, *sox9a2*) no expresaron completamente su dimorfismo sexual (Vizziano *et al.* 2007), sugiriendo que no son esenciales para la diferenciación testicular.

Estos resultados ambiguos no son alentadores para conocer la función de *sox9* en peces pero sugieren que su expresión puede sufrir modificaciones en la

diferenciación gonadal de las distintas especies; por ende, ha sido elegido para estudiarlo en este trabajo.

El tercer gen en estudio, *igf1*, codifica para una hormona peptídica que posee una estructura molecular similar a la de la insulina (Le Gac *et al.* 1996). Se la conoce como el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (Igf-1) y juega un rol importante en el crecimiento infantil y posee efectos anabólicos en los seres humanos adultos. Los humanos deficientes en Igf-1 presentan alturas disminuidas. Este síndrome se lo conoce como Síndrome de Laron (Laron *et al.* 1966) y es tratado con Igf-1 recombinante. De hecho, un análogo sintético de Igf-1, la mecasermina, es empleado para el tratamiento de esta afección (Rosenbloom 2007; Keating 2008).

La producción de Igf-1 se da principalmente en el hígado como una hormona endócrina, así como en tejidos blancos de forma parácrina/autócrina y es el mediador principal de los efectos de la hormona de crecimiento (GH). Se une, al menos, a dos receptores de superficie celular: el receptor de Igf-1 (IGF1R) y el receptor de insulina. Actualmente, es ampliamente aceptado que la señalización a través de la vía de los receptores insulina/Igf-1 contribuye significativamente al proceso de envejecimiento biológico en muchos organismos. Esta línea de investigación se desarrolló con el trabajo pionero del laboratorio de Cynthia Kenyon en el nemátodo rhabdítico *Caenorhabditis elegans*, quien demostró que las mutaciones en el gen *daf-2*, que codifica para el receptor unificado insulina/Igf-1 del gusano redondo, podría duplicar su vida útil (Dorman *et al.* 1995). Con posterioridad a los primeros trabajos de Kenyon, las mutaciones que reducen esta vía han demostrado desacelerar el proceso

degenerativo de envejecimiento y extender la vida útil en una amplia gama de organismos, desde *Drosophila melanogaster*, ratones (Bartke 2011) hasta, muy probablemente, los seres humanos (Guevara-Aguirre *et al.* 2011; Pawlikowska *et al.* 2008; Suh *et al.* 2008; Van Heemst *et al.* 2005).

En lo que respecta a peces, se sabe que el sistema Igf-1 posee un rol importante en la vitelogénesis. La transición desde un ovocito previtelogénico hasta un ovocito vitelogénico en crecimiento es una etapa crítica para la foliculogénesis en el esturión y puede, muy a menudo, demorarse varios años. Los hallazgos previos en peces teleósteos mostraron que Igf-1 participa en los procesos de diferenciación de las células del folículo del ovocito y la esteroidogénesis ovárica *in vitro* y, a su vez, permitieron descubrir en el *Acipenser ruthenus linnaeus* un importante papel parácrino en la vitelogénesis temprana, siendo identificado como un factor inductor de la vitelogénesis (VIF) (Wuertz *et al.* 2007).

En peces machos, Igf-1 podría actuar como mediador de GH y GtHs en el testículo. Más aún, se comprobó en las células testiculares de *Oncorhynchus mykiss* que es un potencial regulador parácrino/autócrino dentro del compartimiento espermatogénico y puede actuar directamente sobre las células germinales para estimular su proliferación (Perrot *et al.* 1999). La expresión de *igf1* no se había explorado previamente en gónadas de esturiones.

Los otros genes estudiados en esta tesis están relacionados con la producción de esteroides y su receptividad en peces: *cyp17*, *star* y *ar*.

En lo que respecta a *cyp 17*, se sabe que codifica para una enzima, la 17-hidroxilasa, que cataliza la conversión de los progestágenos en andrógenos,

en particular, la conversión de la 17-hidroxipregnelonona y la 17-hidroxiprogesterona en dehidro-epiandrosterona y adrostenediona, respectivamente (Boron y Boulpaep 2009).

En el modelo de trucha arco iris que permite el empleo de poblaciones monosexo genéticas, la producción de *cyp17* es tardía en los testículos de los machos (47 dpf) pero ocurre con anterioridad a la diferenciación morfológica (Vizziano *et al.* 2007). Sin embargo, su expresión en pez cebra no muestra diferencias significativas temporales entre diferentes etapas del desarrollo, al igual que en la carpita cabezona (Wang *et al.* 2004). En la anguila campo de arroz, *cyp17* muestra un patrón de expresión diferencial en las gónadas. Su expresión predominante en testículo, en detrimento de la que presenta en ovario y ovotestículo, es consistente con el proceso de reversión del sexo natural. Estos hallazgos sugieren que *cyp17* tendría un rol potencial importante en la diferenciación gonadal durante la reversión sexual de esta especie (Yu *et al.* 2003). Debe resaltarse que no existían antecedentes de la expresión de *cyp17* en el esturión, antes del presente trabajo.

El gen *star*, por su parte, codifica para una proteína de transporte de esteroides (Christenson y Strauss 2000).

La producción de las diferentes clases de esteroides depende de la disponibilidad del sustrato inicial, el colesterol. El paso inicial de este proceso de esteroidogénesis, la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol, está catalizado por la enzima P450 scc (cythochrome P450 side-chain cleavage) que está situada en la membrana interna de las mitocondrias. El colesterol, en peces teleósteos, es internalizado desde el citoplasma hacia la membrana

interna de la mitocondria por una proteína transportadora de esteroides (Young *et al.* 2005; Arukwe 2008) (Figura 13).

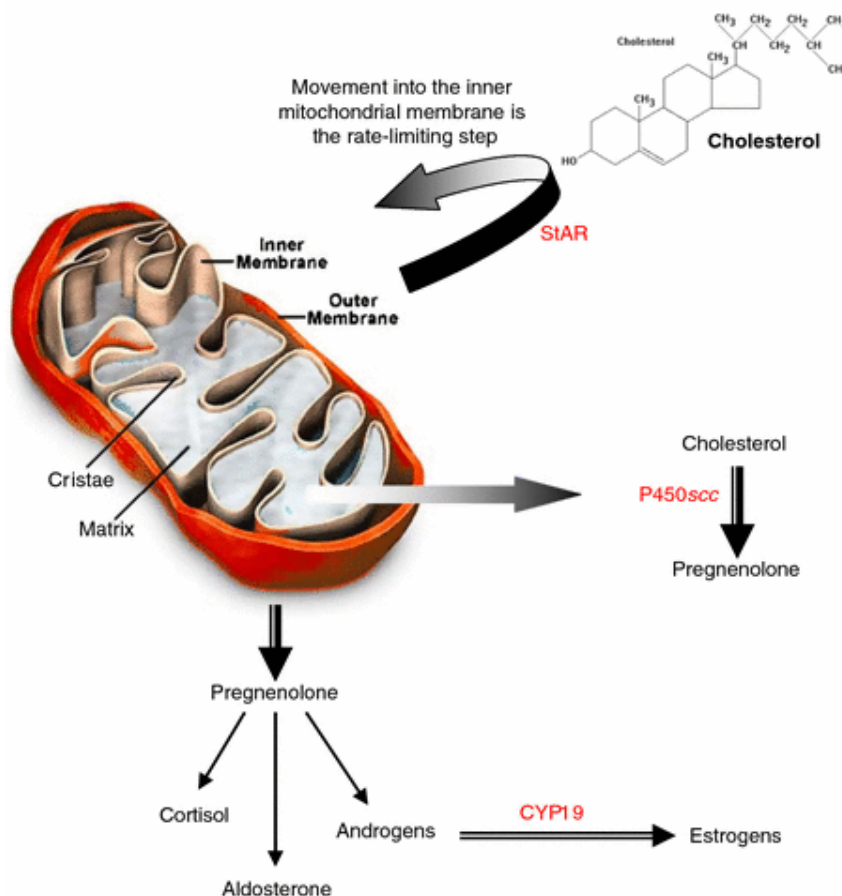


Figura 13.- Mecanismo de acción del gen *star* (Tomado de Arukwe 2008).

En mamíferos, esta proteína fue aislada por primera vez en 1994 por el equipo de investigación de B. J. Clark y se la denominó StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (Clark *et al.* 1994). En trucha arco iris, la expresión relativa de *star* en testículos en desarrollo alcanza un máximo entre los 50 y 55 días post fertilización (dpf). Luego de este período, cae muy levemente, en contraposición a lo que sucede en los ovarios en desarrollo, cuya expresión (menor a la de testículo) cae bruscamente entre los 60 y 65 dpf y alcanza valores muy bajos, por debajo del 5 % (Vizziano *et al.* 2007).

Por otro lado, el gen *ar* codifica para el receptor de andrógenos (AR), un tipo de receptor nuclear que es activado por la unión en el citoplasma de las hormonas androgénicas testosterona o dehidrotestosterona (Lu *et al.* 2006; Roy *et al.* 1999). Los genes regulados por los andrógenos son críticos para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo sexual masculino. Este receptor está íntimamente relacionado con el de progesterona, de hecho, altas dosis de progestina (progesterona sintética) pueden bloquearlo (Bardin *et al.* 1983; Raudrant *et al.* 2003).

Su función principal es la de unirse a sitios blanco que regulan la expresión de genes que codifican diversas proteínas (Mooradian *et al.* 1987). Sin embargo, posee funciones adicionales que son independientes de la unión al ADN (Heinlein *et al.* 2002). En algunos tipos celulares, la testosterona interactúa directamente con él, mientras que, en otros, la testosterona es convertida por la acción de la enzima 5-alfa-reductasa a dehidrotestosterona, un agonista aún más potente para su activación (Davison *et al.* 2006). En humanos, es codificado por el gen *AR* localizado sobre el cromosoma X en el locus Xq 11-12 (Chang *et al.* 1988; Trapman *et al.* 1988). En la enfermedad de Kennedy, la fisiología neuronal estaría siendo afectada por la carencia del mismo (Kennedy *et al.* 1968; Yu *et al.* 2006). El síndrome de insensibilidad a andrógenos, conocido formalmente como la feminización testicular, está causado por una mutación en dicho locus (Brown 1995). Estudios realizados en ratones "knock-out" para *AR* han mostrado que es esencial también para el desarrollo normal de la fertilidad femenina, siendo requerido para el desarrollo

y funcionamiento íntegro de los folículos ováricos y de la ovulación, trabajando a través de mecanismos neuroendócrinos e intra ováricos (Walters *et al.* 2010).

Con respecto a los peces, se sabe que el patrón de duplicación del gen *ar* es consistente con un evento temprano de duplicación genómica global (WGD): se identificó la presencia de dos genes, *ar-a* y *ar-b*, luego de la separación de los Acipenseriformes del linaje que llevó a los peces teleósteos, pero antes de la divergencia de los Osteoglossiformes (Hoegg *et al.* 2004). Tres eventos específicos mostrarían la diversidad actual de los ARs en Actinopterygians: (i) WGD temprana, (ii) pérdida paralela de un duplicado en varios linajes y (iii) neofuncionalización putativa del mismo duplicado en peces percimorfes, ocurrida mucho tiempo después de la WGD (Douard *et al.* 2008).

En otro orden, los disruptores endócrinos químicos pueden afectar los procesos normales que dependen de las hormonas a través de numerosos mecanismos, incluyendo la mimetización del ligando. La 17 β -Trembolona (TB), un esteroide anabólico, es un potente agonista de los receptores androgénicos, empleado ampliamente como promotor del crecimiento en el ganado vacuno en los Estados Unidos. Los estudios llevados a cabo con este disruptor endócrino en el pez mosquito han mostrado que, al igual que la metiltestosterona, induce la masculinización de la aleta anal acompañada de una supra-regulación transitoria de los receptores androgénicos en hembras adultas. También promueve la diferenciación de la aleta anal en un gonopodio en los alevines de ambos sexos, estimula la espermatogénesis precoz en los testículos de los machos y la formación de ovotestis en las hembras (Sone *et al.* 2005). Como corolario de esta parte, debe señalarse que este gen no había sido evaluado

hasta el presente trabajo, en las gónadas de los esturiones durante su desarrollo.

Finalmente, el gen *lh* codifica para la hormona luteinizante (LH), una glicoproteína que posee dos subunidades, una alfa y una beta y que es producida y secretada en los gonadótropos de la adenohipófisis, bajo control de la hormona hipotalámica GnRH.

Su estructura es similar a la de las otras gonadotropinas, como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG).

Las gonadotropinas controlan los ciclos de reproducción de los vertebrados a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Curiosamente, en los trabajos de transcriptómica gonadal de truchas, se ha descubierto la expresión de *lh* en gónadas en vías de diferenciación y la sobreexpresión específica en ovarios durante la primera meiosis de los ovocitos (Baron *et al.* 2005). Tal resultado fue interpretado en su momento como un posible factor anti-apoptótico.

No obstante ello, al no conocerse qué sucede específicamente con este gen en el esturión siberiano, se estudiará si se puede considerarlo como un marcador masculino, al igual que al resto de los genes considerados en estos antecedentes. A su vez, si bien se han desarrollado estudios de la diferenciación gonadal a nivel morfológico, no existen antecedentes sobre los mecanismos moleculares de la misma en esturiones.

Hipótesis de trabajo principal

Demostrar la presencia de una expresión diferencial de los genes estudiados durante el período de diferenciación sexual de la especie, con una mayor expresión específica durante el desarrollo gonadal masculino.

Objetivos y estrategia experimental

Objetivo general:

Caracterizar molecularmente y estudiar la expresión de los posibles genes marcadores del desarrollo testicular del esturión siberiano, *Acipenser baerii*.

Objetivos específicos:

Clonar y caracterizar las secuencias parciales de algunos de los genes descriptos.

Estudiar la filogenia de todos los genes estudiados.

Estudiar su expresión en diferentes tipos de tejidos: testículo y ovario, cerebro, músculo, riñón, hígado y branquias.

El objetivo a largo plazo de este trabajo se centrará en el estudio completo de los mecanismos moleculares que conducen a la diferenciación gonadal en el *Acipenser baerii* y en la identificación del gen determinante de su sexo, mediante la aplicación de técnicas de secuenciado masivo.

Materiales y Métodos

Animales experimentales y muestreo

La investigación que involucró experimentos con animales, se realizó conforme a los principios para el empleo y cuidado de animales de laboratorio, y estuvo de acuerdo con la Ordenanza sobre Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación Universitarias (Res. No. 11 del CDC de fecha 21/12/1999 - Distr. Nro. 295/99 – Diario Oficial 21/2/00).

Los esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) fueron obtenidos del stock de la empresa privada “Esturiones de Río Negro”, situada en Baygorria (Departamento de Río Negro, República Oriental del Uruguay). Estos ejemplares se mantuvieron a temperatura ambiente en tanques externos con circulación abierta.

Los peces fueron transportados en tanques de agua aireados de 1 m³ al Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República.

El período de aclimatación se basó en la diferencia entre la temperatura del agua del tanque y la temperatura del agua en las instalaciones experimentales, tomando como referencia, una hora por cada grado de diferencia. La manutención de estos ejemplares se llevó a cabo durante 2 meses a temperatura ambiente, alimentándose *ad libitum* con 38% de proteínas, siguiendo la dieta desarrollada por la empresa privada, con una tasa de alimentación de un 3% de su biomasa.

Se emplearon diferentes lotes:

Un primer grupo compuesto por un macho y una hembra de 3 años de edad.

Un segundo grupo de peces de 16 meses de edad con un largo de 70 (± 7) cm y un peso de 1228 (± 165) g ($n = 9$).

Un tercer grupo de peces de 16 meses de edad con un largo de 37 (± 5) cm y un peso de 110 (± 46) g ($n = 7$).

Un cuarto grupo de especímenes de 18 meses de edad con un largo de 40 (± 2) cm y un peso 150 (± 37) g ($n = 5$).

Cada grupo fue mantenido en el mismo tanque. La diferenciación de las gónadas a esta edad (entre 16 y 18 meses), tardía respecto a reportes anteriores (Williot 2011), podría deberse al lento crecimiento observado en los animales empleados. De cualquier manera, esto no afectó la identificación histológica del estado de desarrollo en el que se encontraba cada espécimen seleccionado a la hora de comparar peces diferenciados con peces en el período de peri-diferenciación.

Los peces de 3 años mostraron una gónada bien diferenciada pero inmadura. Para el análisis molecular y el clonado, se colectaron muestras de sus testículos y ovarios. Para validar el patrón de expresión de los genes estudiados, se recolectó también diferentes órganos: gónadas, cerebro, músculo, hígado, riñón y branquias.

Para comparar entre peces ya diferenciados y peces en el período de peri-diferenciación, las gónadas de todos los ejemplares fueron evaluadas a nivel microscópico. Una porción de las gónadas removidas fue fijada en una solución de Bouin para los estudios histológicos y su sección contralateral fue

congelada en nitrógeno líquido y transferida a un freezer a -80°C hasta su procesamiento ulterior.

En los peces de 16 a 18 meses de edad, se halló individuos con gónadas no diferenciadas, otros con gónadas que presentaban los primeros signos de diferenciación morfológica y otros con gónadas ya diferenciadas a testículos u ovarios. Para las PCR cuantitativas, se analizó 7 gónadas de peces de 16 meses en el período de peri-diferenciación y 5 gónadas de peces de 18 meses en el mismo período de desarrollo. Paralelamente, se estudió 5 ovarios y 4 testículos de peces de 16 meses.

Los animales experimentales fueron anestesiados en un baño de agua al cual se le agregó una solución alcohólica de Eugenol al 10 % (v/v) (concentración final: 0,25 mg/L). Este soluto es una mezcla de diferentes tipos de Eugenol (Eugenol fenólico, Isoeugenol y Metileugenol) que, al ser completamente insolubles en agua, se disuelven en etanol al 95% (Harms 2003). Se logra con él tiempos de inducción más rápidos y anestesia consistente, en comparación con otros fármacos de inmersión (Gomulka *et al.* 2008) (Bressler y Ron 2004; Detar y Mattingly, 2004; Sladky *et al.* 2001), pero sus períodos de recuperación son más prolongados (Akbulut *et al.* 2011; Detar y Mattingly 2004; Sladky *et al.* 2001). Otras ventajas de este anestésico incluyen su eficacia en un amplio rango de temperaturas, su amplia disponibilidad, bajo costo y manipulación segura (Bressler y Ron 2004; Detar y Mattingly 2004).

Otros animales se sacrificaron por decapitación siguiendo la guía normalizada de cuidados de laboratorio de la UFAW (*Handbook on the Care and*

Management of Laboratory Animals en <http://www.ufaw.org.uk/pubs>) y regulaciones locales.

Extracción de ARN y transcripción reversa

Se realizó una extracción de ARN total empleando un producto comercial con base a Tiocianato de Guanidina y Fenol, Trizol Reagent (Invitrogen™, Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN obtenida se cuantificó en un Nanodrop ND-1000 3.7.1 Thermo Scientific del Instituto Pasteur de Montevideo y su integridad se analizó en un gel de agarosa al 1 %. El ARN de cada una de las muestras se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

La síntesis de ADNc se realizó con 3 μg de ARN total. El ARN fue desnaturalizado en presencia de hexámeros sintetizados al azar (Random hexamers) (0,5 μg) durante 5 ' y a 70°C , y para luego ser enfriado en hielo.

La transcripción reversa (RT) fue llevada a cabo a 37°C durante 1 h, utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI) o Superscript III RNase H – minus (Invitrogen™, Life Technologies), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Caracterización del ADNc y PCR en Tiempo Real

Como ya se mencionó anteriormente, la mayoría de las secuencias génicas relevantes del desarrollo gonadal de *Acipenser baerii* no estaban

disponibles en las bases de datos públicas. Por lo tanto, fue necesario caracterizar los genes que se expresan durante el desarrollo gonadal temprano.

La posición filogenética del esturión siberiano determina una divergencia genética significativa en comparación con otros peces y hace de la selección de cebadores con homología una tarea difícil (Berbejillo *et al.* 2010). Por ello, los cebadores heterólogos empleados fueron diseñados basándose en regiones ortólogas altamente conservadas de peces y tetrápodos, obtenidas a partir del GenBank de NCBI. Fueron inferidas sobre la base de alineamientos de secuencias utilizando los algoritmos de alineamientos de secuencias múltiples del ClustalW, incluido en el programa BioEdit (Hall 1999). Una vez diseñados, los cebadores se mandaron a sintetizar a "*Integrated DNA Technologies*" (Estados Unidos).

Para amplificar los fragmentos de tamaño esperado, se utilizó el ADNc de testículo de esturión siberiano. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo ciclador *Corbett Research Palm Gradient* y en un volumen final de 20 μ L conteniendo: 1 μ L de ADNc, 2.5 μ L de buffer de reacción 10X, 2 μ L de $MgCl_2$ 50mM, 1 μ L de una mezcla de los 4 dNTP 10 mM, 50 pmol de cada oligonucleótido cebador y 1.25 unidades de Taq polimerasa. El programa del ciclador consistió en 3' a 95 °C, 35 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 40'', la temperatura de annealing (tomando en cuenta el T_m de cada par de cebadores) por 1' y 72 °C por 1' como extensión final.

Luego de realizar la electroforesis de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1%, los fragmentos del tamaño esperado se purificaron empleando

el sistema comercial Concert Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL, Life Technologies), luego de visualizarlos con bromuro de etidio.

Posteriormente, los fragmentos purificados de ADN se enviaron al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (Unidad de Biología Molecular) para ser secuenciados. Una vez conocida la secuencia, se exploró la misma en un programa de alineamiento (blast) para confirmar su identidad.

Las secuencias con identidad confirmada se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. Se transformó luego células competentes High Efficiency JM 109 que fueron crecidas en placas de agar con Ampicilina. Previamente, 100 µL de IPTG 10 mM y 20 µL de XGal 50 mg/mL fueron esparcidos sobre la superficie de estas placas durante 30 minutos a 37 °C, lapso que permitió su absorción en el agar. Las colonias blancas se cultivaron en un medio líquido LB/ampicilina. La conservación de los cultivos se llevó a cabo almacenando a – 80°C 850 µL de cultivo en 150 µL de glicerol. El ADN plasmídico se extrajo utilizando el método de lisis alcalina para posteriormente ser secuenciado. Las secuencias clonadas fueron empleadas posteriormente para la producción de ribosondas. Los cebadores necesarios para realizar las qPCR fueron diseñados en base a la secuencia de los genes aquí caracterizados (*dmrt1*, *cyp17a1*) y en secuencias disponibles en GenBank (Tabla 1).

Nombre	Símbolo	Código de acceso al GenBank	Secuencia forward	Secuencia reverse	Tamaño pb
<i>androgen receptor</i>	<i>ar</i>	DQ388357.1	TGAAGAAGATGAAGGGAGCAGAAGAT	TCTCCCCCAGTTCATTCAAGC	227
<i>lutening hormone</i>	<i>lh</i>	AJ251656.1	CTGCAGAGAAGGAGGAATGT	GCGAAGATCCTTATAGGTGCA	152
<i>cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1</i>	<i>cyp17a1</i>	HQ026486, ADM47436.1	TCACACACTCCAGTATTGGTG	CCATTCTTTTCATCTGATG	141
<i>doublesex and mab-3-related transcription factor 1</i>	<i>dmrt1</i>	HQ110106, ADW80327	GGCCCAGGTAGCACTGAGGA	GTTGTGGCTGGACAAACGGC	390 kb
<i>insulin-like growth factor I</i>	<i>igf1</i>	FJ428828.1	AGCTGAGCTTGTGGACAC	AAGCAGCACTCATTACAGAT	126 kb
<i>SRY-box containing gene 9</i>	<i>sox9</i>	EU241882.1	AGCAGCAAAAACAAGCCTCA	AGCTCCGCGTTGTGAAGAT	113 kb
<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>	<i>star</i>	FJ205610.1	CAGAAGTCAATCAGCATCCT	TCAGCACCTTGCTCCATTG	67 kb
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i>	FJ205611.1	TATCCTGACCCTGAAGTACCC	CTCATCGTACTCCTGCTTGCT	

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los primers empleados en las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real y número de acceso al Gen Bank de todos los genes blanco. Los símbolos y nombres de los genes están de acuerdo a la nomenclatura de genes de zebrafish ([www. zfin.org](http://www.zfin.org)).

La PCR en tiempo real (RT-PCR) fue llevada a cabo en el Laboratorio de Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias empleando un equipo de *Applied Biosystems (ABI 7500)* en muestras de 20 µL con 300 nM de cada primer y 5 µL

de una dilución 1:10 de la reacción RT y el Master Mix de Sybr Green PCR (Kapa Kit), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los pasos de incubación utilizados fueron los siguientes: etapa estacionaria (95 °C 5'), etapa de ciclado (95 °C 15'', 60 °C 1') durante 40 ciclos y etapa de curva de "melting" o desnaturalización (95 °C 15'', 60 °C 1', 95 °C 30'', 60 °C 15'').

La validez de la qPCR fue confirmada a través del análisis de las curvas de melting, analizando los fragmentos amplificados en geles de agarosa y a través de secuenciación. Los valores del cociente de sistematización (SQ) fueron calculados como se describió en Baron *et al.* (2005) a partir de los valores de Ct obtenidos. El gen constitutivo utilizado para normalizar los datos fue el de la *β -actina*. La expresión relativa fue calculada como porcentaje del nivel máximo de expresión encontrado para cada gen.

Histología gonadal

Para los análisis histológicos, las gónadas fueron fijadas durante 24 horas en una solución de Bouin y almacenadas en una solución acuosa de etanol al 70 %. Luego, fueron deshidratadas, sumergidas en parafina, cortadas en láminas de 5 μ m y teñidas con hematoxilina de Regaud, Orange G y azul anilina o hematoxilina y eosina Mayer (Gabe, 1968).

Análisis filogenético

Los homólogos de los genes de interés fueron buscados empleando blastP en la base de datos Ensembl (www.ensembl.org/), uniprot (www.uniprot.org/) y la base de datos no redundante (nr) del ncbi (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Las secuencias homólogas encontradas fueron analizadas semi-automáticamente para descartar secuencias redundantes y, de esa forma, elegir especies representativas en grupos de interés. Las secuencias extremadamente cortas o pobremente anotadas fueron descartadas manualmente de los alineamientos de las secuencias proteicas generados con Muscle v3.8.31 (Edgar 2004) (www.drive5.com/muscle). Los alineamientos de las secuencias proteicas totales, así como también las mayores filogenias están disponibles a demanda en la base de datos de peces (FB). Los análisis filogenéticos fueron generados primero utilizando BIONJ (Gascuel 1997), implementado en Seaview Version 4.2.12 (Gouy *et al.* 2010) (pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html). Los árboles simplificados fueron generados con una selección de secuencias proteicas bien anotadas de especies representativas de grupos taxonómicos clave. Las secuencias de *A. baerii* no siempre cumplían con estos criterios, por lo tanto se empleó en su lugar una secuencia ortóloga de otra especie de esturión. Los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud fueron generados utilizando PhyML (www.atgc-montpellier.fr/phyml/) (Guindon *et al.* 2010) empleando JTT como un modelo de sustitución y con su robustez calculada por 1000 réplicas de bootstrap.

Análisis estadísticos

Se llevó a cabo el análisis comparativo de la expresión de cada gen para machos y hembras. Ambos grupos de datos (machos y hembras) fueron comparados y se comprobó que, para la mayoría de los genes (*dmrt1*, *ar*, *lh*, *cyp17*, *igf1*), las varianzas no eran homogéneas, por lo que los resultados fueron analizados empleando la prueba U de Mann-Whitney (Sokal y Rohlf 1995). Para el gen *star*, las varianzas sí fueron homogéneas y los resultados fueron analizados utilizando el test T de Student para muestras independientes (Sokal y Rohlf 1995).

Resultados

Caracterización y clonado de secuencias parciales de ADNc de *Acipenser baerii*

Se logró caracterizar, por primera vez para *Acipenser baerii*, las secuencias parciales de ADNc que codifican para *dmrt1*, *cyp17a1* y *ar* (Figura 14).

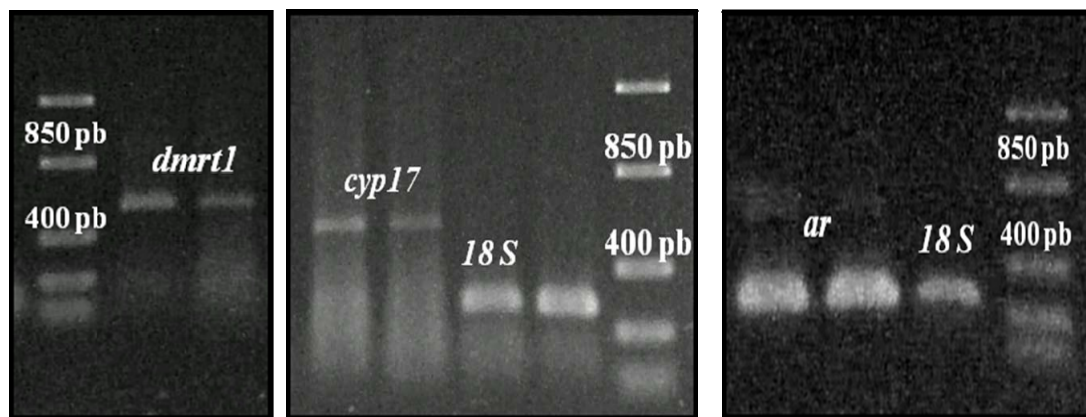


Figura 14.- Corridas electroforéticas de *dmrt1*, *cyp17a1* y *ar*.

En la figura 14, se observa los productos de amplificación de *dmrt1*, *cyp17a1* y *ar* del tamaño esperado en cada caso, obtenidos tras el diseño de varios juegos de cebadores empleando alineamientos de secuencias de las bases de datos. Dichas bandas fueron recortadas, purificadas y enviadas para su secuenciación. Se confirmó así la identidad de los fragmentos.

Dos de ellos (*dmrt1* y *ar*) fueron clonados en plásmidos y utilizados en la transformación de células competentes High Efficiency JM 109.

Luego de la purificación de estos plásmidos, se controló la integridad del ADN plasmídico a través de una corrida electroforética, arrojando el siguiente resultado (Figura 15):



Figura 15.- Corridas electroforéticas del ADN plasmídico de *ar* y *dmrt1*.

La secuencia parcial de *dmrt1* de 536 pb fue depositada en el NCBI Gen Bank con el número de acceso HQ110106 y muestra una elevadísima identidad con las secuencias completas de las formas ST1 y ST2 de *dmrt1* de *Acipenser transmontanus* y una elevada identidad con la secuencia parcial de *dmrt1* de *Scaphirhynchus platyrhynchus* (ver Tabla 2).

Número de acceso	Descripción	Identidad
<u>HQ110106.1</u>	Secuencia parcial del ARNm de <i>dmrt1</i> de <i>A. baerii</i>	100 %
<u>AY057061.1</u>	Secuencia completa del ARNm de la forma ST1 de <i>dmrt1</i> de <i>A. transmontanus</i>	99 %
<u>AY057062.1</u>	Secuencia completa del ARNm de la forma ST2 de <i>dmrt1</i> de <i>A. transmontanus</i>	99 %
<u>GQ403948.1</u>	Secuencia parcial del ARNm de <i>dmrt1</i> de <i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	93 %

Tabla 2. Identidad de secuencias nucleotídicas de diferentes especies de esturión luego de efectuado los alineamientos en el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

La secuencia de *cyp17a1* de 474 pb fue depositada en el NCBI Gen Bank con el número de acceso HQ026486 y no muestra identidad con secuencias

relacionadas de otras especies de esturión. Posee cierta identidad con secuencias relacionadas de aves (ver Tabla 3).

Número de acceso	Descripción	Identidad
<u>HQ026486.1</u>	Secuencia parcial del ARNm de <i>cyp17a1</i> de <i>A. baerii</i>	100 %
<u>NM_001001901.2</u>	Secuencia completa del ARNm de <i>cyp17a1</i> de <i>Gallus gallus</i>	77 %
<u>M21406.1</u>	Secuencia completa del ARNm (ovario específico) de gallina similar al citocromo P450c17 de mamífero	77 %
<u>AB281617.1</u>	Secuencia parcial del ARNm del citocromo P-450c17 de <i>Coturnix japonica</i>	76 %

Tabla 3. Identidad con secuencias nucleotídicas de diferentes especies de aves y del esturión siberiano luego de efectuado los alineamientos en el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

La secuencia de *ar* de 322 pb fue depositada en el NCBI Gen Bank con el número de acceso HQ110107 y muestra una elevada identidad con la secuencia completa de *ar* de *Acipenser ruthenus* x *Huso huso* (ver Tabla 4).

Número de acceso	Descripción	Identidad
<u>HQ110107.1</u>	Secuencia parcial del ARNm de <i>dmrt1</i> de <i>A. baerii</i>	100 %
<u>AB213020.1</u>	Secuencia completa del ARNm de <i>ar</i> de <i>A. ruthenus</i> x <i>Huso huso</i>	96 %

Tabla 4. Identidad de secuencias nucleotídicas de diferentes especies de esturión luego de efectuado los alineamientos en el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Desarrollo Gonadal

En las condiciones de cría establecidas por el IIP, los peces de 3 años de edad (sexualmente diferenciados) continuaban, sin embargo, siendo inmaduros (ovocitos blanquecinos en ovarios de hembras y machos no espermiantes).

Los peces juveniles, de 16 y 18 meses, fueron controlados por microscopía.

El análisis histológico de las gónadas juveniles mostró que un pez poseía una gónada no diferenciada, tanto a nivel morfológico como histológico. Ésta se caracterizó por la falta de elementos que permitieran identificarlas como ovario o testículo. El tejido somático no presentaba ningún ordenamiento en particular que indicara el sexo de la gónada, y solamente contenía gonias.

Siete de ellos, por su parte, mostraban los primeros signos de diferenciación morfológica hacia testículo, con espermatogonias en forma de cordón, tanto a nivel ventral como dorsal (Figura 16).

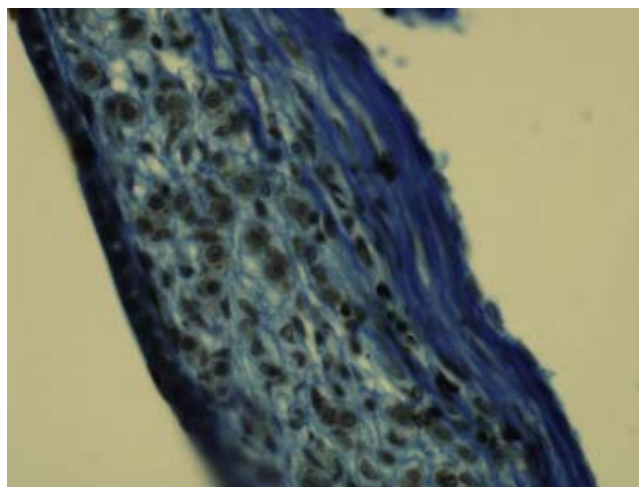


Figura 16.- Gónada con los primeros signos de diferenciación morfológica hacia testículo.

Dos de ellos mostraban los primeros signos de diferenciación morfológica hacia ovario, con ovogonias a lo largo de la región ventral, organizadas en cistos rodeados de células somáticas (Figura 17).

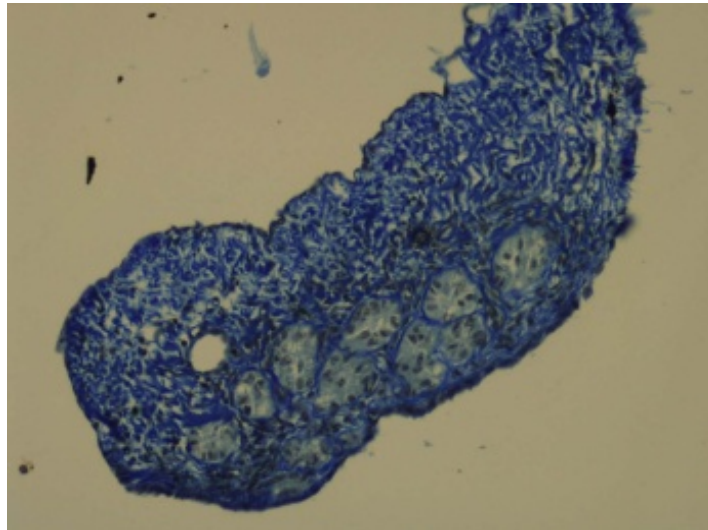


Figura 17.- Gónada con los primeros signos de diferenciación morfológica hacia ovario.

Por otro lado, siete de ellos, ya diferenciados a hembras poseían ovarios que contenían ovocitos pre-vitelogénicos tempranos. Finalmente, cuatro peces, ya diferenciados a machos, contaban con testículos en los que se reconocía los futuros túbulos.

El análisis anterior difiere de los datos reportados para otras especies de esturión en los que la diferenciación se produce a los 9 meses (Grandi y Chicca 2008) y esto puede deberse al retraso en el crecimiento de los animales con los que se trabajó en el presente estudio.

Los ovarios ya diferenciados mostraron futuras lamelas llenas de ovogonias (oo) y unos pocos ovocitos pre-vitelogénicos (Pre-OV) (Figura 18, ovario diferenciado I) u ovarios con una lamela ovárica llena de ovocitos pre-vitelogénicos y grupos de ovogonias (Figura 18, ovario diferenciado II).

Los testículos ya diferenciados mostraron células somáticas (sc) rodeando las espermatogonias (spg) y organizadas para formar los futuros túbulos (Figura 18, testículo diferenciado).

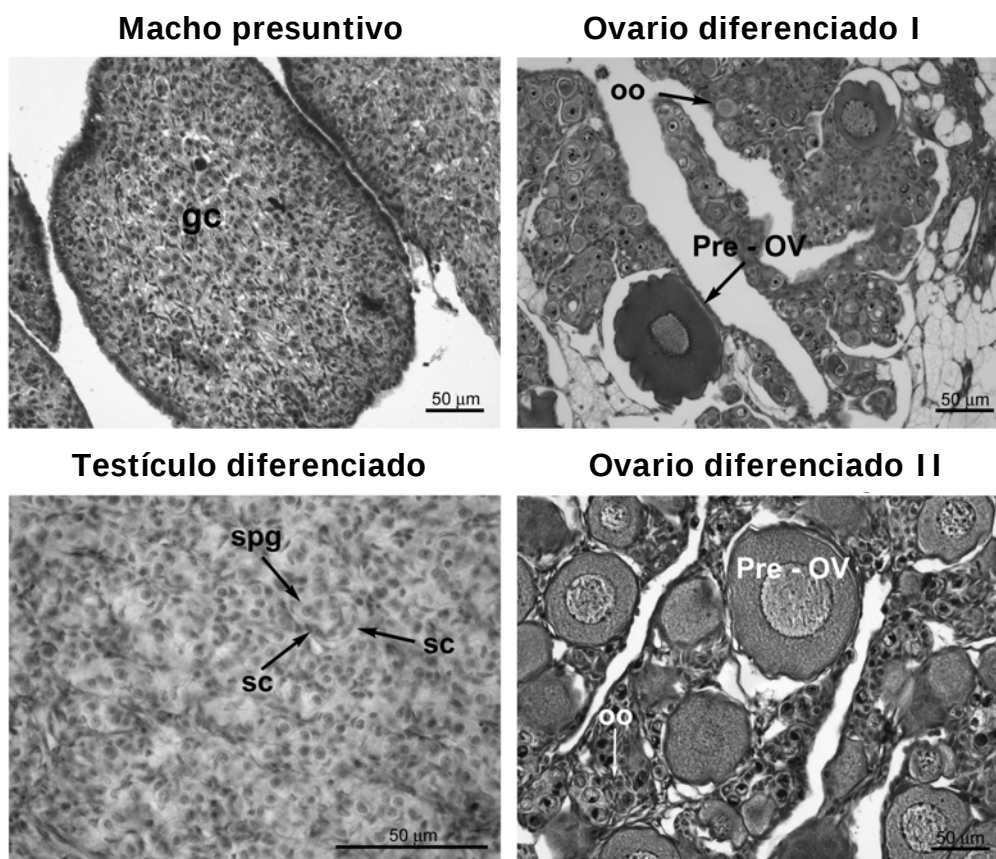


Figura 18.- Análisis histológicos de gónadas de esturiones Siberianos juveniles. Células germinales (gc), ovogonias (oo), ovocitos previtelogénicos (Pre-ov), células somáticas (sc), espermatogonias (spg). Escala: barra = 50 µm.

Caracterización filogenética de *dmrt1*, *cyp17a1*, *star*, *igf1*, *ar*, *lh* y *sox9* gonadales

La caracterización filogenética se llevó a cabo tanto para los genes caracterizados por primera vez aquí (*dmrt1*, *cyp17a1*, *ar*), como para los que provinieron de secuencias de bases de datos públicas (*star*, *igf1*, *lh*, *sox9*).

La caracterización sobre *dmrt1* de esturiones siberianos mostró que es, inequívocamente, ortólogo a todas las proteínas *dmrt1* encontradas en otras especies de cordados (no se incluyen datos). No presenta ramas largas como ocurre en tetrápodos o en especies de teleósteos (Figura 19A).

cyp17a1 también está en una posición filogenética basal respecto a los tetrápodos y peces teleósteos, aunque la rama que conduce a los esturiones presenta un valor de bootstrap muy débil. Nuevamente, la rama de los esturiones es corta, cuando se compara a la de mamíferos (Figura 19B). Esta característica es aún más fuerte para la proteína Star (Figura 19C).

Igf1 se encuentra en todas las especies de cordados y la posición filogenética de este gen en el esturión Siberiano (Figura 19D) está de acuerdo con la clasificación de la especie.

Con una topología similar a *Igf1*, la filogenia del *AR* es consistente con la clasificación de la especie. La longitud de la rama de *AR* en esturiones es similar a la de varios tetrápodos, a la de *AR-A* de peces teleósteos y hasta de tres especies de condriactos (Figura 19E).

Los genes *LH* (ortólogo a la *LH* de mamífero) en *Acipenser*, se ubican en el árbol con las especies de tetrápodos y no con las de peces. Sin embargo, los

valores de bootstrap de la rama común entre tetrápodos y esturiones son débiles, al igual que en la rama que lleva a los actinopterigios. Esto podría ser una consecuencia de una atracción de la rama larga al gen *LH* ampliamente diferenciado que se encuentra en las especies de metaterios utilizadas aquí (Figura 19F).

El gen *sox9* de esturiones se separa en la base de los actinopterigios, aunque el valor de bootstrap de esta rama también es muy débil (Figura 19G).

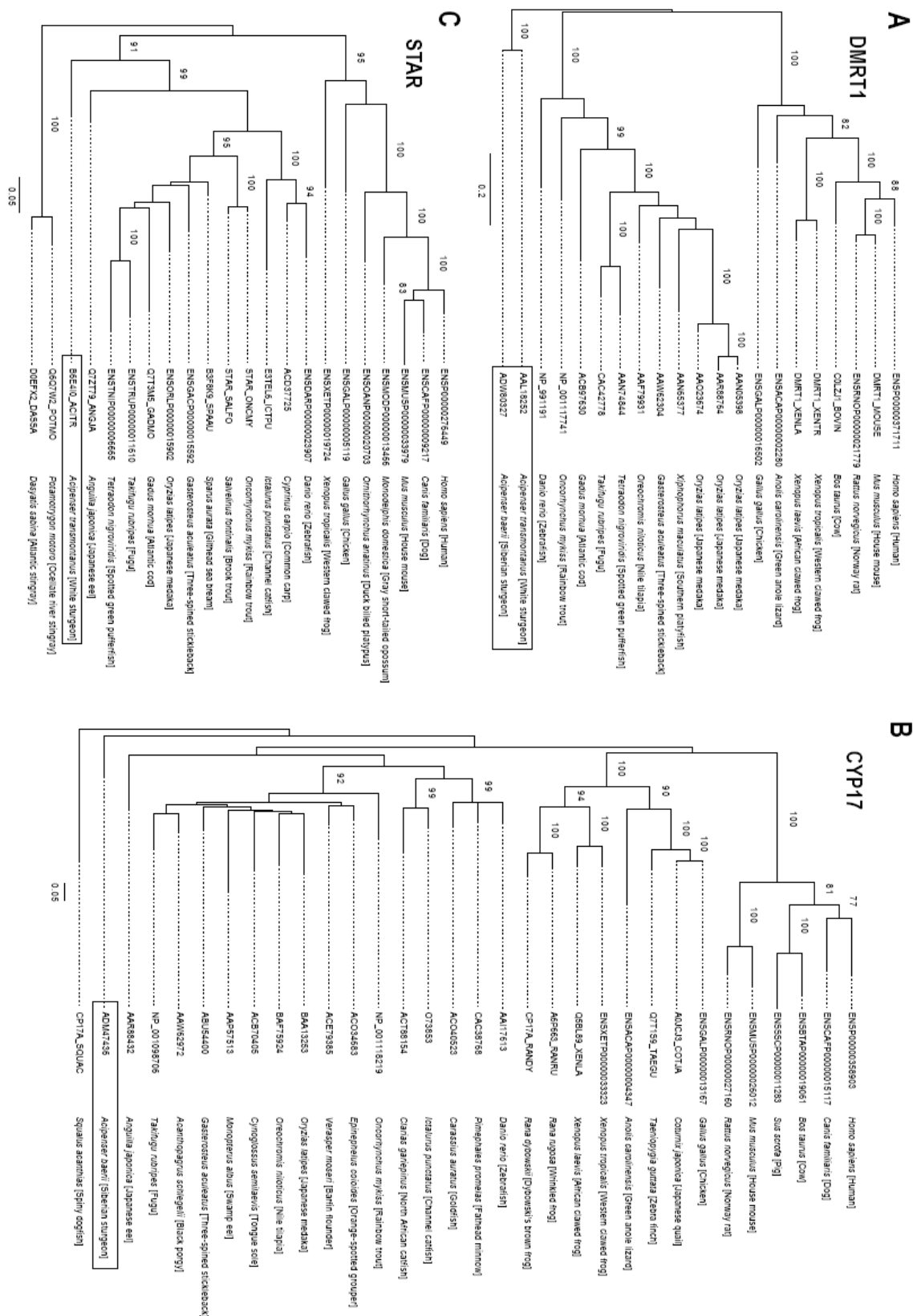
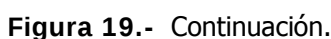


Figura 19.- Análisis filogenéticos, utilizando máxima verosimilitud, de los genes involucrados en la diferenciación testicular; donde: A) dmrt1 B) cyp17a1 C) star D) igf1 E) ar F) gthb2/lh, y G) sox9. Los esturiones están recuadrados. Los números de acceso de las proteínas se brindan con los nombres de las especies. Los valores de Bootstrap de 1000 iteraciones, en porcentaje, fueron generados utilizando PHYML.



Patrones de expresión en tejidos de peces inmaduros de 3 años

El estudio cuantitativo a través de las qPCR en las gónadas de esturiones siberianos inmaduros mostró que *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *igf1* y *lh* tienen una expresión diferencial en ellas, con una mayor expresión en testículos (Figura 20).

En lo que respecta a los tejidos somáticos, *dmrt1* y *cyp17a1* se expresan en el cerebro, músculo, hígado, branquias y riñón, aunque esta expresión es relativamente baja comparada con la que se presenta en gónadas.

Por otro lado, *sox9*, *ar* y *lh* presentan una mayor expresión en los tejidos estudiados, con una expresión particularmente elevada en el músculo y cerebro masculinos en comparación con sus contrapartes femeninos.

El *igf1* presentó una mayor expresión en el hígado de machos y hembras en comparación con los otros tejidos estudiados, mientras que la expresión de *star* resultó ser particularmente alta en riñones.

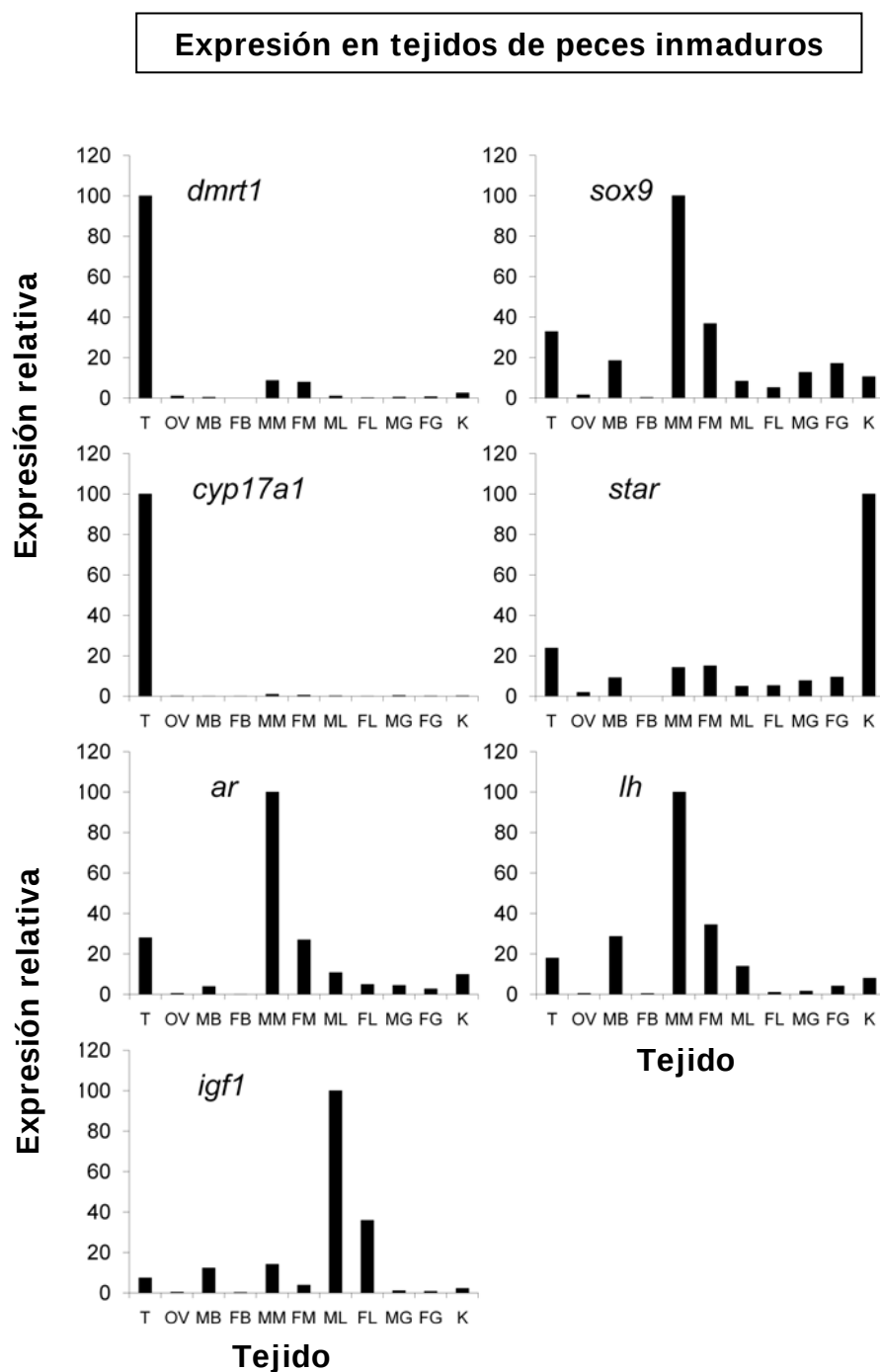


Figura 20.- Expresión de transcritos de *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh* e *igf1* en tejidos de esturiones siberianos inmaduros. Se realizó la qPCR en testículos (T), ovarios (OV), cerebro masculino (MB), cerebro femenino (FB), músculo masculino (MM), músculo femenino (FM), hígado masculino (ML), hígado femenino (FL), branquias masculinas (MG), branquias femeninas (FG) y riñón (K). La cuantificación relativa fue realizada por normalización de los valores relativos respecto a los del gen constitutivo de la β -actina. Se utilizó como 100 % el tejido con mayor expresión.

Expresión génica en gónadas de peces juveniles

Los marcadores de células de Sertoli y Leydig fueron estudiados en gónadas ya diferenciadas de peces juveniles. Entre los marcadores de células de Sertoli, la expresión del ARNm de *dmrt1* mostró un claro dimorfismo sexual, siendo mayor (>200 veces) en machos que en hembras cuando las gónadas estaban recientemente diferenciadas ($p < 0.001$); por el contrario, la expresión de *sox9* mostró no ser diferencial (Figura 21).

Los marcadores de células de Leydig estudiados, *cyp17a1* y *star*, mostraron un claro dimorfismo sexual; se encontró que su expresión era mayor en machos que en hembras en esta etapa ($p < 0.001$) (Figura 21).

El gen que codifica para el receptor de andrógenos (*ar*) también mostró una mayor expresión en machos ($p < 0.001$).

El mismo resultado se observó en otros marcadores como *lh* ($p < 0.001$) e *igf1* ($p < 0.001$), aunque estos genes presentaron un nivel de expresión menor en comparación con el resto de los genes estudiados.

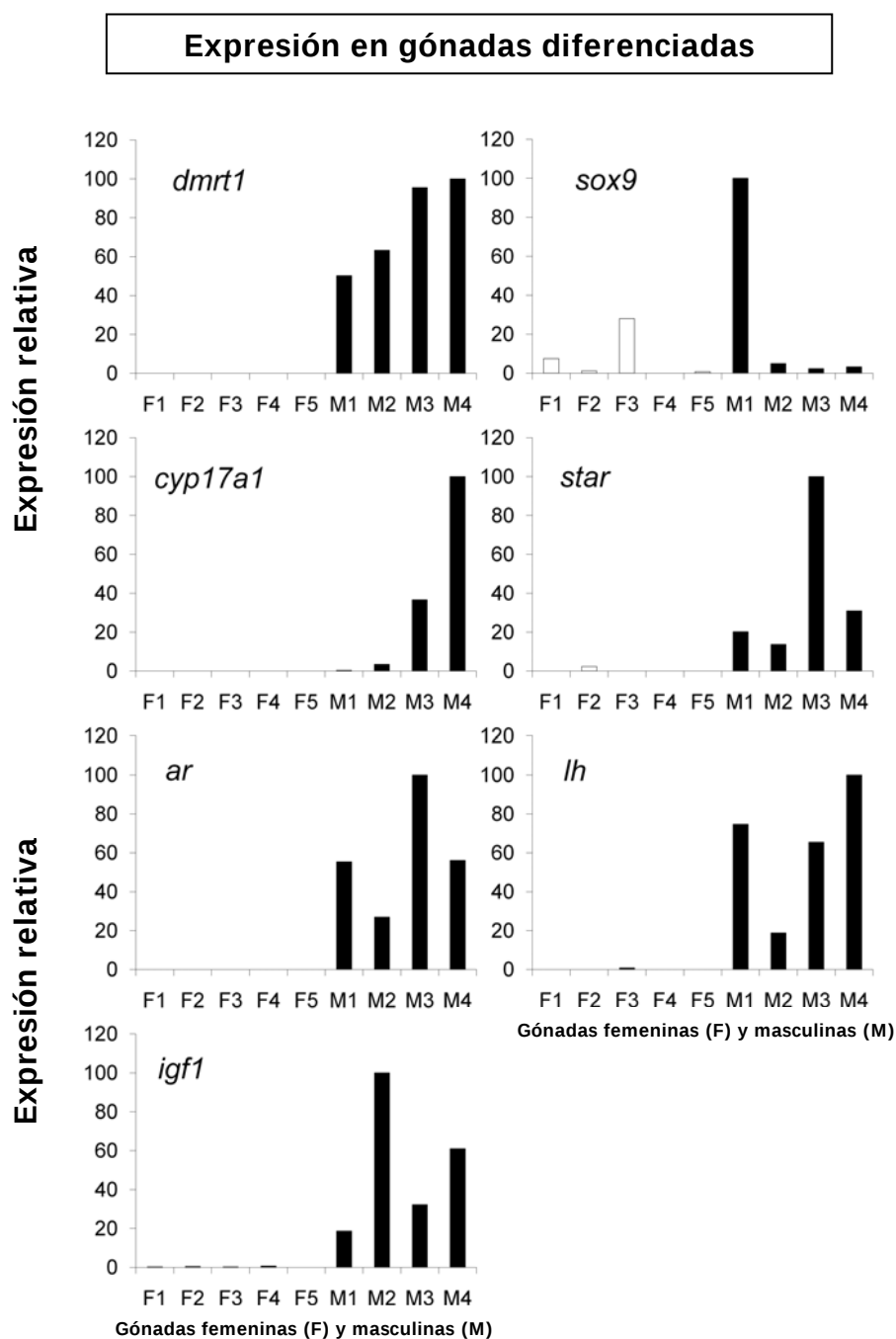


Figura 21.- Los niveles de expresión de los transcritos de *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh* e *igf1* fueron analizados a través de qPCR en muestras de gónadas de hembras ya diferenciadas (F1 a F5) y machos ya diferenciados (M1 a M4) de 16 meses. La cuantificación relativa fue realizada por normalización de los valores relativos respecto a los del gen constitutivo de la β -actina. El nivel de expresión fue significativamente mayor en gónadas masculinas que en las femeninas para *dmrt1* ($p < 0.001$), *cyp17a1* ($p < 0.001$), *star* ($p < 0.001$), *ar* ($p < 0.001$), *lh* ($p < 0.001$) e *igf1* ($p < 0.0001$). No se halló diferencia en la expresión de *sox9* entre gónadas de machos y de hembras.

Expresión génica en gónadas en el período de peri-diferenciación de peces de 16 meses y 18 meses

Dentro de este grupo de peces de 16 meses, debe señalarse que la expresión fue en general muy baja en todos los casos. El pez número 4 (ver Figura 22) tuvo una leve expresión mayor de *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar* y *lh* en sus gónadas, mientras que los otros peces mostraron una expresión casi nula de estos genes (Figura 22, peces 1, 2, 3, 5, 6, y 7).

Igf1 no mostró el mismo comportamiento que los otros genes a los 16 meses (Figura 22).

En un segundo grupo de peces de 18 meses, dos animales mostraron una elevada expresión de *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *lh* y *ar* (Figura 23, peces número 1 y 4), mientras que el resto de los animales presentaron una baja expresión de esos genes (Figura 23, animales 2, 3 y 5).

Los otros genes estudiados (*star* e *igf1*) no mostraron el mismo patrón de expresión.

El análisis histológico de las gónadas de peces de 18 meses mostró que los peces números 1 y 4 eran machos presuntivos, el pez 2 mostró una gónada indiferenciada y los peces 3 y 5 mostraron una gónada con claros signos de diferenciación hacia ovario.

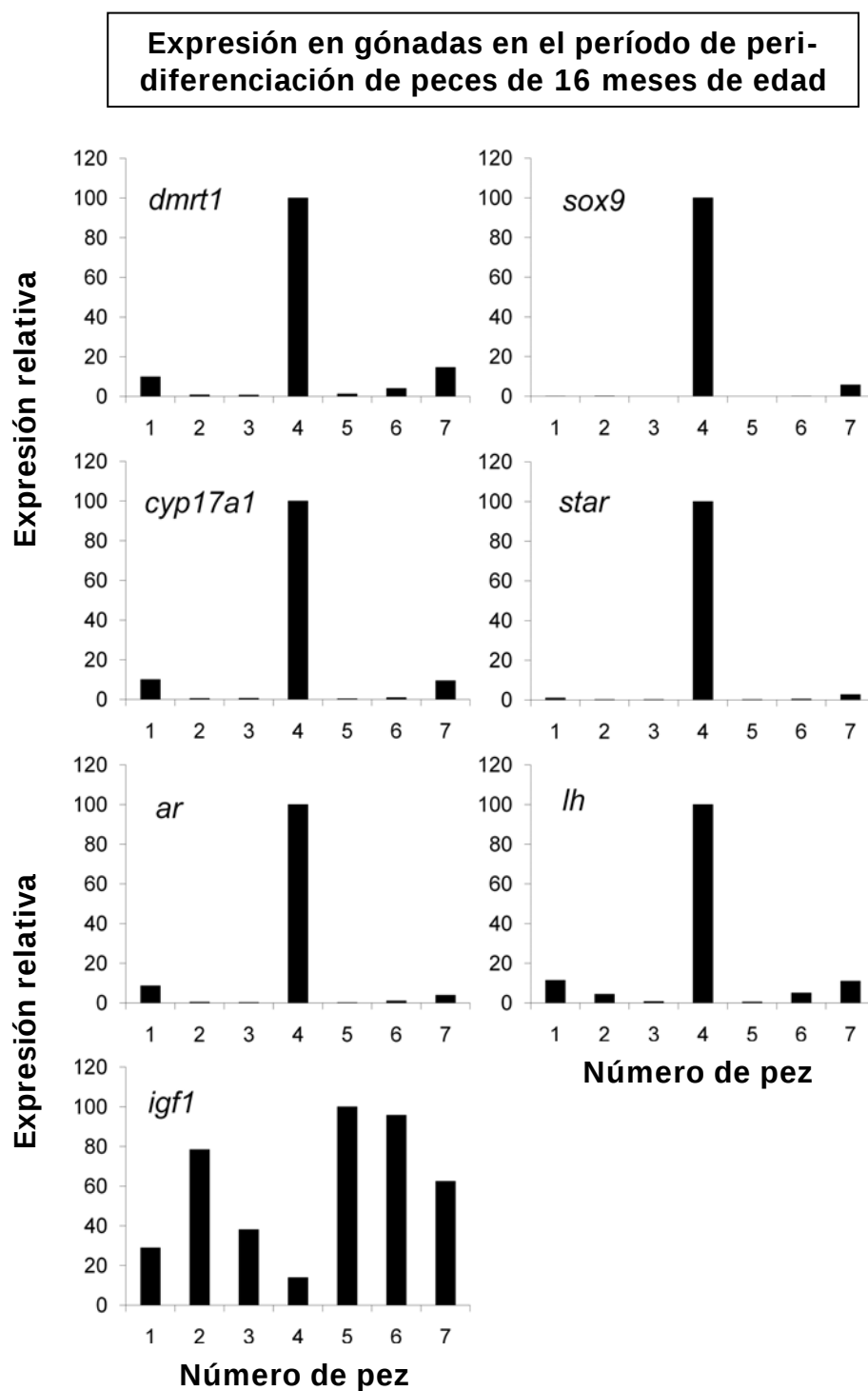


Figura 22.- Los niveles de expresión de los transcritos de *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh* e *igf1* fueron analizados a través de qPCR en muestras de gónadas en el período de peri-diferenciación de peces de 16 meses. Cada número (1 a 7) corresponde a la gónada de un pez individual. La cuantificación relativa fue realizada por normalización de los valores relativos respecto a los del gen constitutivo de la β -actina.

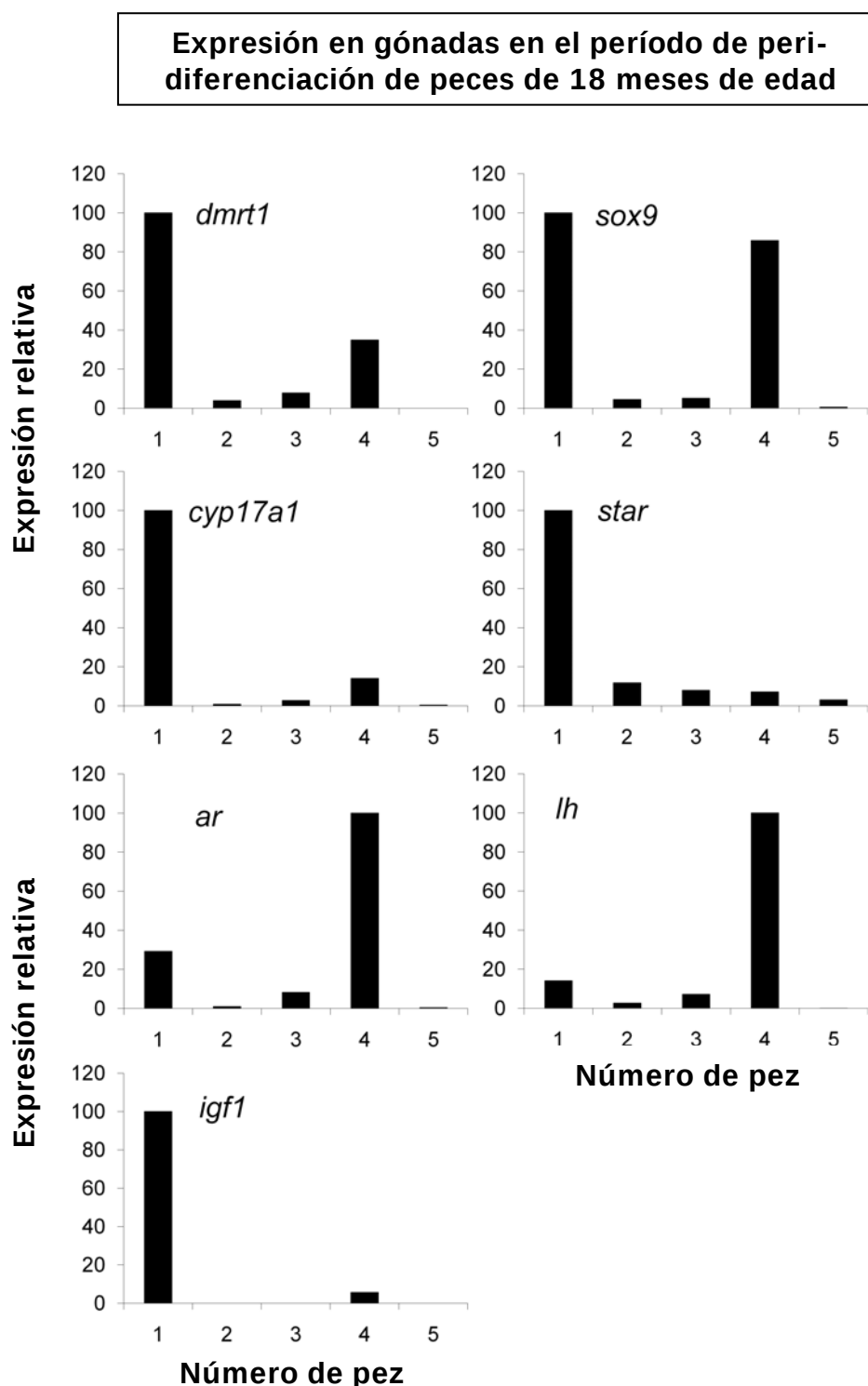


Figura 23.- Los niveles de expresión de los transcritos de *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh* e *igf1* fueron analizados a través de qPCR en muestras de gónadas en el período de peri-diferenciación de peces de 18 meses. Cada número (1 a 5) corresponde a la gónada de un pez individual. La cuantificación relativa fue realizada por normalización de los valores relativos respecto a los del gen constitutivo de la β -actina.

Discusión

Esta es la primera caracterización de los cambios moleculares que ocurren en los esturiones siberianos durante su diferenciación sexual gonadal. Se observó una clara expresión diferencial sexual en los genes seleccionados (*dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *igf1* y *lh*), con una mayor expresión en los testículos en comparación con los ovarios de peces de 3 años. Esta expresión diferencial también se presentó en peces juveniles con gónadas diferenciadas, con la excepción de *sox9*. Antes de la diferenciación sexual morfológica, el patrón de expresión observado en factores de células de Sertoli (*dmrt1*, *sox9*), producción de andrógenos y receptores (*cyp17a1*, *star*, *ar*) y *lh* sugieren una sobre-expresión en aquellos especímenes que probablemente estaban en proceso de diferenciación masculina. La falta de poblaciones formadas exclusivamente por machos o hembras y de marcadores sexuales genéticos impide una conclusión definitiva sobre la participación de los factores estudiados en la diferenciación gonadal. Aunque las tendencias observadas sugieren que estos factores participan en el proceso de diferenciación de los testículos, deben llevarse a cabo más estudios en etapas más tempranas del desarrollo gonadal para confirmar esta hipótesis.

Entre los genes estudiados y como ya se mencionó anteriormente, el factor de transcripción *dmrt1* es el único conservado en invertebrados y vertebrados como un factor importante en el desarrollo masculino (Vollf *et al.* 2003; Haag *et al.* 2005). En peces teleósteos, *dmrt1* aparece como un factor importante relacionado a la diferenciación testicular (Piferrer y Guiguen 2008).

Esta asunción está basada en su patrón de expresión durante el desarrollo gonadal temprano en teleósteos (Vizziano *et al.* 2007; Ijirii *et al.* 2008) y en su comportamiento cuando se utilizan tratamientos masculinizantes y feminizantes. *dmrt1* está sobre-expresado durante las fases tempranas de la transdiferenciación gonadal inducida por tratamientos masculinizantes (Raghuveer *et al.* 2005; Vizziano *et al.* 2008) y sub-expresado durante la feminización inducida por estrógenos (Raghuveer *et al.* 2005; Vizziano-Cantonnet *et al.* 2008). En peces primitivos tales como el esturión, *dmrt1* ha sido descrito en dos especies (*Acipenser transmontanus* y *A. baerii*, este trabajo) y surge de manera distintiva y sin ambigüedades respecto a todos los genes *dmrt1* encontrados en otras especies de cordados. *dmrt1* en esturiones presenta una rama muy corta cuando se lo compara con tetrápodos o teleósteos, sugiriendo que este gen conserva su función original. El dimorfismo sexual de *dmrt1* durante las etapas tempranas y avanzadas del desarrollo gonadal en el esturión siberiano (Berbejillo *et al.* 2013) está de acuerdo con las tendencias observadas en teleósteos (Marchand *et al.* 2000; Piferrer y Guiguen 2008) y otros esturiones (Hale *et al.* 2010), y apoya la idea de que es un factor esencial necesario para mantener el sexo gonadal, tal como se describió recientemente para mamíferos (Matson *et al.* 2011). Debe recordarse que *dmrt1* parece no ser dimórfico en todas las especies de esturiones estudiadas (Amberg *et al.* 2010). En peces con sistemas de determinación sexual del tipo XX/XY, *dmrt1* se expresa tanto en gónadas masculinas como femeninas. Aparentemente en este tipo de sistema de determinación de sexo, *dmrt1* no es

un buen candidato para ser el gen maestro involucrado en la determinación testicular.

No obstante ello, se ha propuesto que, en organismos con sistemas de determinación sexual del tipo ZZ/ZW, como las aves, la doble dosis de *dmrt1* en machos ZZ podría ser crítica para la determinación testicular. Recientemente se ha sugerido que los esturiones siberianos tendrían un sistema de determinación sexual de tipo ZZ/ZW (Fop-Bayat 2010). Si la doble dosis de *dmrt1* en esturiones siberianos machos ZZ es crítica para la determinación testicular continúa siendo una incógnita. El análisis filogenético, junto con el patrón de expresión observado para *dmrt1* sugiere que el gen ya adquirió su función como un regulador crítico de la diferenciación testicular en este pez primitivo.

Sox9 fue otro de los factores sertolianos seleccionados como posible candidato involucrado en la diferenciación testicular en esturiones siberianos. Los genes *sox9* pertenecen a la subdivisión *soxE* dentro de otra gran familia multigénica (Schepers *et al.* 2002). Dentro del grupo *soxE*, *sox8* y *sox9* participan de la determinación sexual en mamíferos (Bowles *et al.* 2000; Chaboissier *et al.* 2004; Koopman 2005). Como ya se mencionó anteriormente, *sox9* es un factor crítico a nivel funcional en la diferenciación de las células de Sertoli; es uno de los primeros genes en ser sobre-expresados en células pre-Sertoli, luego de la expresión de *Sry* y tiene un rol esencial en la diferenciación sexual en mamíferos (Bowles y Koopman 2001; Brennan y Capel 2004), pero, sin embargo, sería dispensable para la diferenciación testicular luego de la determinación sexual (Barrionuevo *et al.* 2009). Por lo tanto, su participación en la diferenciación testicular en peces no está clara. En un trabajo previo en

esturiones, no se encontró evidencia que apuntara a una duplicación de *sox9* (Hett *et al.* 2005), como ocurre en peces teleósteos (Zhou *et al.* 2003; Cresko *et al.* 2003), y no se observó diferencias sexo-específicas. El análisis filogenético de la evolución de *sox9* reveló una posición basal del *sox9* en el esturión (*Acipenser sturio*, Hett *et al.* 2005; *Acipenser baerii*, en este trabajo). En otros peces teleósteos, entre los que se encuentra la trucha, el medaka y el pejerrey, las evidencias experimentales sugieren que *sox9* no es esencial para la diferenciación testicular. El patrón de expresión de *sox9* reportado en este trabajo sugiere una potencial participación de *sox9* en la diferenciación testicular tardía en el esturión siberiano. Su rol en eventos tempranos de la diferenciación gonadal aún debe ser estudiado en gónadas no diferenciadas de peces más jóvenes (entre 3 y 6 meses).

cyp17a1, *star*, y *ar* están entre los genes estudiados y están relacionados a la producción y recepción de esteroides. Como ya fue mencionado en la parte introductoria, *cyp17a1* codifica para la 17-hidroxilasa que convierte progestágenos en andrógenos, *star* codifica para una proteína que controla la síntesis de esteroides y *ar* codifica para receptores de andrógenos. Los andrógenos son los principales mediadores de la masculinización en vertebrados luego de la diferenciación testicular (Brennan y Capel 2004; Borg 1994). Sin embargo, respecto a los peces teleósteos, el debate sobre si los andrógenos participan en la diferenciación de los testículos o si comienzan a actuar recién después del comienzo de la espermatogénesis, continúa siendo controversial. En este grupo, los andrógenos más potentes son aquellos que tienen un oxígeno en su carbono once (andrógenos 11-oxigenados) (Borg

1994) y la presencia de estos esteroides está generalmente relacionada con el desarrollo masculino. Sin embargo, hay una alta producción de andrógenos 11-oxigenados en hembras de varias especies de peces teleósteos (Lokman *et al.* 2002) y también en el esturión siberiano, un actinopterio basal (Cuisset *et al.* 1995; Williot 2011). Por lo tanto la enzima involucrada en la 11-oxigenación (11 β -hydroxylasa) no sería una buena elección para el estudio de la vía masculina, por lo menos en el esturión siberiano. En peces en que la síntesis de andrógenos 11-oxigenados se observó solo en gónadas masculinas, hay evidencias de que los andrógenos preceden la diferenciación testicular. Es el caso del pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, en que la producción de andrógenos 11-oxigenados se observó durante etapas tempranas del desarrollo gonadal, antes del momento de diferenciación testicular (Fernandino *et al.* 2008; Blasco *et al.* 2013). Asimismo, en trucha se observó una sobre-expresión temprana del gen que codifica para la 11 β -hydroxylasa (*cyp11b*, polipéptido de la subfamilia b, familia 11 del citocromo P450) en poblaciones compuestas exclusivamente por machos, veinte días antes de la diferenciación testicular (Vizziano *et al.* 2007). Por otro lado, no se encontró evidencias de la expresión de enzimas de la síntesis de esteroides a nivel génico y proteico, antes de la diferenciación testicular en tilapias (Ijiri *et al.* 2008). Esto demuestra que los andrógenos no están universalmente involucrados en la diferenciación testicular en peces.

El contenido de andrógenos (testosterona y 11-ketotestosterona) en esturiones jóvenes permite una discriminación entre sexos bastante acertada una vez que la diferenciación ha ocurrido (etapa II), como es el caso de *A. transmontanus* (Feist *et al.* 2004) y *H. Huso* (Mola *et al.* 2011), siendo *A. gueldenstaedtii* la

única excepción, ya que no mostró ninguna diferencia relacionada al sexo (Barannikova *et al.* 2000). Esto ocurre en una etapa del desarrollo similar a la del esturión siberiano en la que se observa una sobre-expresión de *star* y *cyp17a1*, indicando que, en esturiones recientemente diferenciados, los andrógenos son producidos y detectables. La expresión de *star* y *cyp17a1* en peces en el período de peri-diferenciación gonadal abre la interrogante acerca del rol de los andrógenos antes de la diferenciación gonadal en el esturión siberiano. Además del potencial de producir esteroides, se encontró que la expresión del gen que codifica para el receptor de andrógenos era claramente dimórfica en testículos recientemente diferenciados e inmaduros en comparación a los ovarios de las hembras del esturión siberiano. En esta etapa del desarrollo gonadal, la alta expresión de *ar* en los mismos peces en que sobre-expresan *dmrt1* y *sox9* sugiere que hay una mayor sensibilidad a los andrógenos en las gónadas masculinas antes de su diferenciación morfológica. Los estudios enfocados en las etapas tempranas del desarrollo para identificar la síntesis de esteroides así como también el efecto de los andrógenos en el desarrollo gonadal, ayudarán a comprender si los andrógenos están involucrados en la diferenciación testicular en esturiones. El análisis filogenético de *cyp17a1*, *star* y *ar* indica una probable conservación de la función génica.

Otra característica interesante que se ha podido identificar fue la sobre-expresión masculina de *igf1* en esturiones siberianos recientemente diferenciados. Se ha demostrado que la expresión de *igf1* ocurre en células germinales y somáticas de la trucha arcoiris, tilapia y róbalo (Le Gac *et al.* 1996; Reinecke *et al.* 1997; Berishvili *et al.* 2006; Viñas y Piferrer 2008) lo que

sugiere una función autócrina o parácrina. Respecto al desarrollo gonadal temprano, *igf1* se expresa en células somáticas cuando las gónadas aún están indiferenciadas, lo que indicaría una importancia crucial para el desarrollo y diferenciación gonadal posterior (Reinecke 2010). Un estudio que utiliza knock-downs del receptor de Igf tipo-1 por oligonucleótidos morfolinos en embriones de pez cebra, demostró un alto impacto en el desarrollo de las gónadas, llevando a errores en la migración y apoptosis de las células germinales primordiales (Schlueter *et al.* 2007). El patrón de expresión de *igf1* en gónadas en el período de peri-diferenciación de esturiones siberianos no fue similar al patrón observado para otros marcadores masculinos (*dmrt1*, *sox9*, *ar*, *lh*, *cyp17a1*). Más aún, las tendencias observadas en esta etapa en las gónadas del esturión siberiano no sugirieron una expresión diferencial para *igf1*. Este factor probablemente controla los primeros pasos en el desarrollo testicular luego de la diferenciación, como ha sido demostrado para algunas especies de teleósteos. La filogenia mostró que *igf1* fue encontrado en todas las especies de cordados y sugiere que la función del gen no debería haber cambiado.

Finalmente, se ha comprobado que, en el esturión siberiano, la expresión de *lh* resultó ser mayor en testículos que en ovarios y el patrón observado en peces no diferenciados sugiere que podría ser un marcador masculino.

Integrando todos los resultados, se puede afirmar que la expresión de los genes estudiada en peces no diferenciados sugiere que aquéllos que sobre-expresan *dmrt1*, *sox9*, *cyp17*, *star*, *ar* y *lh* son machos potenciales en un estado de diferenciación molecular avanzado.

Conclusión y perspectivas

Por primera vez para esta especie, se logró identificar y caracterizar tramos significativos de secuencia de tres potenciales marcadores masculinos de su diferenciación gonadal (*dmrt1*, *cyp17a1* y *ar*). Asimismo, dos de ellos (*dmrt1* y *ar*) fueron clonados.

El análisis filogenético y el estudio de la expresión en gónadas y otros tejidos del pez (en diferentes estadios de su desarrollo) permitió concluir que todos los marcadores estudiados (los factores de transcripción de las células de Sertoli – *dmrt1*, *sox9* –, los marcadores funcionales de células de Leydig – *cyp17a1*, *star* –, los receptores de andrógenos, *igf1* y *lh*) parecerían haber conservado una función ancestral en el desarrollo sexual y podrían ser considerados como reguladores potenciales del desarrollo de los testículos en esta especie.

Algunos de ellos estarían involucrados en el proceso de diferenciación testicular (*dmrt1*, *ar*, *lh*, *cyp17a1*, *star* y *sox9*) y otros en las etapas iniciales de la gametogénesis (*igf1*).

Este panorama actual del conocimiento permite sentar las bases para desarrollar, a mediano y largo plazo, el estudio completo de los mecanismos moleculares de la diferenciación gonadal de este pez.

Del mismo modo, con el acceso a las técnicas actuales de secuenciación masiva, se puede aspirar a la identificación del gen determinante de su sexo, lo cual traería grandes beneficios, tanto a nivel académico como productivo.

Bibliografía

Akbulut, B., Çavdar, Y., Çakmak, E., Aksungur, N. 2011, Use of clove oil to anaesthetize larvae of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 618 – 621.

Alam M. A., Kobayashi Y., Horiguchi R., Hirai T., Nakamura M. 2008. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers Dmrt1 and Foxl2 during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *Gen Comp Endocrinol*. 157: 75 – 85.

Amberg J. J., Goforth R., Stefanavage T., Sepúlveda M. S. 2010. Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*). *Fish Physiol Biochem* 36: 923 – 932.

Anonymous 2002: WWF Factsheet: 12th meeting of the conference of the parties to CITES. Santiago, 3 – 15 November 2002 (www.cites.org).

Arnold, A. P., Chen, X., Link, J. C., Itoh, Y., Reue, K. 2013. Cell-autonomous sex determination outside of the gonad. *Developmental Dynamics*. DOI: 10.1002/dvdy.23936

Arukwe, A. 2008. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450_{scc})-regulated steroidogenesis as an organ-specific

molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. *Cell Biol. and Toxicol.* Vol. 24 (6): 527 – 540.

Asadi F., Masoudifard M., Vajhi A., Lee K., Pourkabir M., Khazraeinia P. 2006. Serum biochemical parameters of *Acipenser persicus*. *Fish Physiol Biochem* 32: 43 – 47.

Baker D.W., Wood A.M., Litvak M.K., Kieffer J.D. 2005. Haematology of juvenile *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser brevirostrum* at rest following forced activity. *J Fish Biol.* 66: 208 – 221.

Barannikova, I. A., Bayunova, L. V., Geraskin, P. P., Semenkova, T. B. 2000. Content of sex steroid hormones in blood serum of the Acipenseridae in the marine life period at different gonad states. *J. Ichthyol.* 40: 197 – 202.

Bardin C. W., Brown T., Isomaa V. V., Jänne O. A. 1983. "Progestins can mimic, inhibit and potentiate the actions of androgens". *Pharmacol. Ther.* 23 (3): 443 – 459.

Baroiller, J., Guiguen, Y., Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910 – 931.

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

Barrionuevo, F., Georg, I., Scherthan, H., Lécureuil, Ch., Guillou, F., Wegner, M., Scherer, G. 2009. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev. Biol.* 327: 301 – 312.

Barske, L. A., Capel, B. 2010. An avian sexual revolution. *Nature*. 464: 171 – 172.

Bartke, A. 2011. Single-gene mutations and healthy ageing in mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sc.* 366 (1561): 28 – 34.

Bemis, W.E., Findeis, E.K., Grande, L. 1997. An overview of Acipenseriformes. *Environ. Biol. Fishes.* 48: 25 – 71.

Berbejillo, J., Martínez-Bengochea, A., Bedo, G., Vizziano-Cantonnet, D. 2013. Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Fish Physiol Biochem.* 39: 91 – 94. DOI: 10.1007/s10695-012-9666-5

Berbejillo, J., Martínez-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*. *Mol. Reprod. Dev.* 79: 504 – 516. DOI: 10.1002/mrd.22053

Berbejillo, J., Bedó, G., Brunet, F., Volff, J. N., Vizziano, D. 2010. Identificación de genes marcadores de la diferenciación sexual gonadal de una especie primitiva: el esturión siberiano *Acipenser baerii*. XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Piriápolis, Uruguay.

Berishvili, G., D´Cotta, H., Baroiller, J. F., Segner, H., Reinecke, M. 2006. Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146: 204 – 210.

Blacklidge, K.H., Bidwell, C.A. 1993. Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of North America. *J. Hered.* 84: 427 – 430.

Blasco, M., Somoza, G., Vizziano-Cantonnet, D. 2013. Presence of 11-ketotestosterone in pre-differentiated male gonads of *Odontesthes bonariensis*. *Fish. Physiol. Biochem.* 39:71 – 74 DOI 10.1007/s10695-012-9651-z

Blasco, M., Fernandino, J. I., Guilgur, L. G., Strüssmann, C. A., Somoza, G. Z., Vizziano-Cantonnet, D. 2010. Molecular characterization of cyp11a1 and

cyp11b1 and their gene expression profile in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during early gonadal development. *Comp Biochem and Physiol*, Part A 156: 110 – 118.

Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109 (C): 219 – 245.

Boron F. W., Boulpaep, L. E. 2009. Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach, Ed. SAUNDERS, ISBN: 978-0-8089-2360-2.

Bowles, J., Koopman P. 2001. New clues to the puzzle of mammalian sex determination. *Genome Biol.* 2: 1025.1 – 1025.4.

Bowles, J., Schepers, G., Koopman, P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227: 239 – 255.

Brennan, J., Capel, B. 2004. One tissue, two fates.: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Rev.* 5: 509 – 521.

Bressler K., Ron B. 2004. Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Israeli J. Aquacult.* 56: 5 – 13.

Brown T. R. 1995. Human androgen insensitivity syndrome. *J. Androl.* 16 (4): 299 – 303.

Bull, J. J. 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms.*

Benjamin — Cummings. Menlo Park, CA.

Capel, B., Tanaka, M. 2013. Forward to the special issue of sex determination.

Developmental Dynamics. DOI: 10.1002/dvdy.23937

Caprino, F., Moretti, V. M., Bellagamba, F., Turchini, G. M., Busetto, M. L., Giani, I., Paleari, M. A., Pazzaglia, M. 2008. Fatty acid composition and volatile compounds of caviar from farmed white sturgeon (*Acipenser transmontanus*).

Anal. Chim. Acta. 617: 1 – 2: 139 – 147.

Chaboissier, M. C., A. Kobayashi, V. I. Vidal, S. Lutzkendorf, H. J. van de Kant, M. Wegner, D. G. de Rooij, R. R. Behringer and A. Schedl. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*, 131: 1891 – 1901.

Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A., Flament, S., 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.*, 296 A: 46 – 55.

Chang, C. S., Kokontis, J., Liao, S.T. 1988. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*. 240 (4850): 324 – 326.

Chiang, E. F., C. I. Pai, M. Wyatt, Y. L. Yan, J. Postlethwait and B. Chung. 2001.

Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.*, 231: 149 – 163.

Christenson, L. K., Strauss, J. F. 2000. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochem. And Biophys. Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1529, issues 1 – 3: 175 – 187.

Christofells, A., Koh, E. G. L., Chia, J., Brenner, S., Aparicio, S., Venkatesh, B. 2004. Fugu Genome Analysis Provides Evidence for a Whole-Genome Duplication Early During the Evolution of Ray-Finned Fishes. *Mol. Biol. Evol.* 21 (6): 1146 – 1151. 2004 DOI: 10.1093/molbev/msh114

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). *J Biol Chem*. 269: 28314 – 28322.

Cossins, A. R., Crawford, D. L. 2005. Fish as models for environmental genomics. *Nature Reviews Genetics*. 6: 324 – 333. DOI: 10.1038/nrg1590

Cresko, W. A., Yan, Y. L., Baltrus, D. A., Amores, A., Singer, A., Rodríguez-Mari A., Postlethwait J. H. 2003. Genome duplication, subfunction partitioning and lineage divergence: Sox9 in stickleback zebrafish. *Devl. Dyn.* 228: 480 – 489.

Cuisset, B., Fostier, A., Williot, P., Benneteau-Pelissero, C., Le Menn, F. 1995. Occurrence and in vitro biosynthesis of 11-ketotestosterone in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt maturing females. *Fish Physiol. Biochem.* 14: 312 – 322.

Cutting, A., Chue, J., Smith, C. A. 2013. Just how conserved is vertebrate sex determination? *Developmental Dynamics*. DOI: 10.1002/dvdy.23944

Desprez, D., Géraz, E., Hoareau, M., Mélard, C., Bosc, P., Baroiller, J., 2003. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4) in Florida red tilapia. *Aquaculture* 216: 55 – 65.

Detar JE, Mattingly HT. 2004. Response of southern redbelly dace to clove oil and MS-222: Effects of anesthetic concentration and water temperature. *Proc. Ann. Con. Southeastern. Assoc. Fish Wildl. Agen.* 58: 219 – 227.

Dettlaff, T. A., Ginsburg, A. S., Schmalhausen, O. I. 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Springer Verlag, New York.

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

Dorman J. B., Albinder B., Shroyer T., Kenyon C. 1995. The Age-1 and Daf-2 Genes Function in a Common Pathway to Control the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* 141 (4): 1399 – 1406.

Doroshov, S. I., Moberg, G. P., VanEenennaam, J. P. 1997. Observations on the reproductive cycle of the cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Environ. Biol. Fishes* 48: 265 – 278.

Douard, V., Brunet, F., Boussau, B., Ahrens-Fath, I., Vlaeminck-Guillem, V., Haendler, B., Laudet, V., Guiguen, Y. 2008. The fate of the duplicated androgen receptor in fishes: a late neofunctionalization event? *BMC Evolutionary Biology*. 8: 336.

Edgar R. C. 2004. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*.19, 5: 113.

FAO. © 2005 – 2012. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Acipenser baerii*. Text by Williot, P., Bronzi, P., Benoit, P., Bonpunt, E., Chebanov, M., Domezain, A., Gessner, J., Gulyas, T., Kolman, R., Michaels, J., Sabeau, L & Vizziano, D. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Rome.

Updated 13 Jan 2005. <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Acipenserbaerii/en>

Feist, G., Van Eenennaam, J. P., Doroshov, S. I., Schreck, C. B., Schneider, R. P., Fitzpatrick, M. S. 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. *Aquaculture*. 234: 581 – 590.

Fernandino J. I., Hattori R. S., Shinoda T, Kimura H., Strobl-Mazzulla P. H., Strüssmann C. A., Somoza G. M. 2008. Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev*. 2:316 – 324. DOI: 10.1159/000195681.

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.

Fontana, F. 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome* 37. 888 – 892.

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

Gabe M. 1968. *Techniques histologiques*. Masson, Paris. 1113 pp.

Gascuel O. 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14: 685 – 695.

Gomulka, P., Wlasow, T., Velíšek, J., Svobodová, Z., Chmielinska, E. 2008. Effects of eugenol and ms-222 anaesthesia on siberian sturgeon *Acipenser baerii* brandt. *Acta Vet. Brno.* 77: 447 – 453.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and Phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27: 221 – 224.

Govoroun, M., Mcmeel, O., D'Cotta, H., Ricordel, M., Smith, T., Fostier, A., Guiguen, Y., 2001. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 290: 558 – 566.

Grande, L. y Hilton, E. J. 2006. An exquisitely preserved skeleton representing a primitive sturgeon from the upper cretaceous judith river formation of montana (acipenseriformes: acipenseridae: n. gen. and sp). *Journal of Paleontology* 80 (sp65): 1 – 39.

Grandi, G., Chicca, N. 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic Sturgeon (*Acipenser naccarii*, *Acipenseriformes*, *Chondrostei*). *J. Morphol.* 269: 1238 – 1262.

Guan, G., T. Kobayashi and Y. Nagahama. 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3) – domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 662 – 666.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346: 245-250.

Guevara-Aguirre, J., Guevara-Aguirre J., Balasubramanian P., Guevara-Aguirre M., Wei M., Madia F., Cheng C. W., Hwang D., Martin-Montalvo A., Saavedra J., Ingles S., de Cabo R., Cohen P., Longo V. D. 2011. Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Sci. Transl. Med.* 3 (70): 70ra13.

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. *Gen Comp Endocrinol* 165: 352 – 366.

Guiguen, Y., 2000. Implications of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion. *Curr. Top. Steroid Res.* 3: 127 – 143.

Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki K., McMeel O. M., Martin S. A., 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*). *Mol. Reprod. Dev.* 54: 154 – 162.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology.* 59: 307 – 321.

Haag, E. S., Doty, A, V. 2005. Sex determination across evolution: Connecting the dots. *PLoS Biol* 3: e21.

Hale M. C., Jackson J. R., De Woody J. A. 2010. Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica.* 138: 745 – 756.

Harikae, K., Miura, K., Kanai, Y. 2012. Early gonadogenesis in mammals: significance of long and narrow gonadal structure. *Developmental Dynamics.* DOI: 10.1002/dvdy.23872

Harms C. A. 2003. Fish. In: Fowler ME, Miller RE, eds. Zoo and Wild Animal Medicine, 5th ed. St. Louis: Saunders. 2 – 20.

Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., Strüsmann C. A. 2012. A Y-linked anti Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *PNAS*. 109 (8): 2955 – 2959.

Hayes, T., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J. Exp. Zool.* 281: 373 – 399.

He, C. L., J. L. Du, G. C. Wu, Y. H. Lee, L. T. Sun and C. F. Chang. 2003. Differential Dmrt1 transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Cytogenet. Genome Res.*, 101: 309 – 313.

Heinlein, C. A., Chang, C. 2002. "The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions". *Mol. Endocrinol.* 16 (10): 2181 – 2187.

Herpin, A., Scharl, M. 2011. Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS Journal* 278: 1010 – 1019.

Hett, A. K., Pitra, C., Jenneckens, I., Ludwig, A. 2005. Characterization of Sox9 in European Atlantic Sturgeon (*Acipenser sturio*). *J. Heredity*. 96 (2): 150 – 154.

Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J. S., Meyer, A. 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* 59: 190 – 203.

Horiguchi, R., Nozu, R., Hirai, T., Kobayashi, Y., Nagahama, Y., Nakamura, M. 2013. Characterization of gonadal soma-derived factor expression during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Developmental Dynamics*. DOI: 10.1002/dvdy.23929

Hunter, G. A., Donaldson, E. M., 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. *Fish Physiol.* 9A: 223 – 303.

Hurvitz, A., Degani, G., Goldberg, D., Yom Din, S., Jackson, K., Levavi-Sivan, B. 2005. Cloning of FSH β , LH β and glycoprotein α subunits from the Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), β -subunit mRNA expression, gonad development and steroids levels in immature fish. *Gen. and Comp. Endocrinol.* 140: 61 – 73.

Ijirii S., Kaneko H., Kobayashi T., Wang D. S., Sakai F., Paul-Prasanth B., Nakamura M., Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in

gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction* 78: 333 – 341.

Just, W., Rau W., Vogel W., Akhverdian M., Fredga K., Graves J. A., Lyapunova E. 1995. Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nat. Genet.*, 11: 117 – 118.

Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., Kikuchi K. 2012. A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genet.* 8 (7): e1002798. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002798

Karube, M., J. I. Fernandino, P. H. Strobl-Mazzulla, C. A. Strüssmann, G. Yoshizaki, G. M. Somoza and R. Patiño. 2007. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome p-450 aromatase (*cyp19A1*) gene during the thermolabile sex determination period in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, 307: 625 – 636.

Keating G. M. 2008. Mecasermin. *BioDrugs* 22 (3): 177 – 188.

Kennedy, W. R., Alter, M., Sung, J. H. 1968. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset: a sex-linked recessive trait. *Neurology*, 18: 671 – 680.

Keyvanshokook, S., Gharaei A. 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture Research*. 41: e1 – e7.

Kitano, T., Takamune K., Kobayashi T., Nagahama Y. and Abe S. I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.*, 23: 167 – 176.

Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., Nagahama, Y. 2008. Sexual Dimorphic Expression of *DMRT1* and *Sox9a* During Gonadal Differentiation and Hormone-Induced Sex Reversal in the Teleost Fish Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Developmental Dynamics* 237: 297 – 306.

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

Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117 – 121.

Koopman, P. 2005. Sex determination: a tale of two Sox genes. *Trends in Genetics*. 21: 367 – 370.

Lareyre J.J., Ricordel M.J., Mahe S., Goupil A.S., Vizziano D., Bobe J., Guiguen, Y., Le Gac F. 2008. Two new TGF beta members are restricted to the gonad and differentially expressed during sex differentiation and gametogenesis in trout. *Cybium* 32 (suppl): 202.

Laron Z., Pertzalan A., Mannheimer S. 1966. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? *Isr. J. Med. Sci.* 2 (2): 152 – 155.

Le Gac F., Loir M., Le Bail P.Y., Ollitrault M. 1996. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 44: 23 – 35.

Le Page, Y., Diotel, N., Vaillant, C., Pellegrini, E., Anglade, I., Mérot, Y., Kah, O. 2010. Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. *European Journal of Neuroscience*. 32: 2105 – 2115. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07519.x

Liarte S., Chaves Pozo E., García Alcazar A., Mulero V., Meseguer J., García Ayala A. 2007. Testicular involution prior to sex change in gilthead seabream is characterized by a decrease in DMRT1 gene expression and by massive leukocyte infiltration. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4: 5 – 20.

Lokman, P. M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D. E., Schulz, R. W., Adachi, S., Young, G. 2002. 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance and life history implications. *Gen. Comp. Endocrinol.* 129: 1 – 12.

Lu N. Z., Wardell S. E., Burnstein K. L., Defranco D., Fuller P. J., Giguere V., Hochberg R. B., McKay L., Renoir J. M., Weigel N. L., Wilson E. M., McDonnell D. P., Cidlowski J. A. 2006. "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors". *Pharmacol. Rev.* 58 (4): 782 – 797.

Marchand, O., M. Govoroun, H. D'Cotta, O. McMeel, J. Lareyre, A. Bernot, V. Laudet and Y. Guiguen. 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1493: 180 – 187.

Marshall-Graves, J. A. 2012. How to Evolve New Vertebrate Sex Determining Genes. DOI: 10.1002/dvdy.23887

Mateos, J., Mañanos E., Carrillo, M., Zanuy S. 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 132 (1): 75 – 86.

Matson, C. K., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., Zarkower, D. 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476: 101 – 105.

Matsuda M., Shinomiya A., Kinoshita M., Suzuki A., Kobayashi T., Paul-Prasanth B. 2007. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3865 – 3870.

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*. *Zoolog Sci*. 20: 159 – 161.

Matsuda, M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C. E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S., Sakaizumi M.. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417: 559 – 563.

Mola, A. E., Hovannisyan, H. G., Nazari, R. M., Ovissipour, M. 2011. Early sex identification in cultured beluga (*Huso huso*) using plasma steroid hormones. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 1959 – 1965. ISSN 1684 – 5315.

Mooradian A. D., Morley J. E., Korenman S. G. 1987. "Biological actions of androgens". *Endocr. Rev.* 8 (1): 1 – 28.

Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. 2012. Tracing the emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias Luzonensis*. *Genetics* 191: 163 – 170.

Nagahama Y. 2005. Molecular of sex determination and gonadal sex determination in fish. *Fish Physiol Biochem* 31: 105 – 109.

Nakamoto, M., Suzuki, A., Matsuda, M., Nagahama, Y., Shibata, N. 2005. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333: 729 – 736.

Nanda, I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., Shan Z., Haaf T., Shimizu N., Shima A., Schmid M., Scharl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 99: 11778 – 11783.

Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*. Hoboken: Wiley.

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: 39 – 47.

Otake H., Masuyama H., Mashima Y., Shinomiya A., Myosho T., Nagahama Y, Matsuda M., Hamaguchi S. Sakaizumi M. 2010. Heritable artificial sex chromosomes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Heredity*. 105: 247 – 256.

Pawlikowska, L., Hu D., Huntsman S., Sung A., Chu C., Chen J., Joyner A. H., Schork N. J., Hsueh W. C., Reiner A. P., Psaty B. M., Atzmon G., Barzilai N., Cummings S. R., Browner W. S., Kwok P. Y., Ziv E. Study of Osteoporotic Fractures. 2008. Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Sci. Transl. Med.* 8 (4): 460 – 472.

Penman, D. J., Piferrer, F. 2008. Fish gonadogenesis. Part I. Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev. Fish Sci.*, 16 (S1): 14 – 32.

Perrot V., Funkestein B. 1999. Cellular distribution of insulin-like growth factor II (IGF-II) mRNA and hormonal regulation of IGF-I and IGF-II mRNA expression in rainbow trout testis (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 20 (3): 219 – 229.

Pieau, C., Dorizzi, M., 2004. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J. Endocrinol.* 181: 367 – 377.

Piferrer, F. 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Develop. Dynam.* DOI: 10.1002/dvdy.23924

Piferrer, F., Guiguen, Y., 2008. Fish gonadogenesis part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev. Fish. Sci.* 16: 35 – 55.

Piferrer, F., Baker, I., Donaldson, E., 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 59 – 65.

Raghuveer, K., Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C. C., Sridevi, P., Rajakumar, A., Singh, R., Murugananthkumar, 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*. *Sex Dev* 5: 213 – 223.

Raghuveer, K., Senthilkumaran, B. 2010. Isolation of sox9 duplicates in catfish: localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of sox9 in testicular slices. *Reproduction* 140: 477 – 487.

Raghuveer, K., Senthilkumaran, B. 2009. Identification of multiple dmrt1 s in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment. *J. Mol. Endocrinol.* 42: 437 – 448.

Raghuveer, K., Garhwal, R., Wang, D. S., Bogerd, J., Kirubaragan, R., Rasheeda, M. K., Sreenivasulu, G., Tharangini, N. S., Nagahama, Y., Senthilkumaran, B. 2005. Effect of methyl testosterone and ethynyl estradiol induced sex differentiation on catfish, *Clarias gariepinus*: Expression profiles of DMRT1, cytochrome P450aromatases and 3 betha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Fish Physiol. Biochem.* 31: 143 – 147.

Raudrant D., Rabe T. 2003. "Progestogens with antiandrogenic properties". *Drugs* 63 (5): 463 – 492.

Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffing-Cueni, D. 1997. Insulin-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression and cellular localization. *Endocrinology.* 138: 3613 – 3619.

Reinecke, M. 2010. Insulin-like growth factors and fish reproduction. *Biol. Reprod.* 82: 656 – 661.

Rodríguez, M. www.dinara.gub.uy

Rosenbloom A. L. 2007. The role of recombinant insulin-like growth factor I in the treatment of the short child. *Curr. Opin. Pediatr.* 19 (4): 458 – 464.

Roy A. K., Lavrovsky Y., Song C. S., Chen S., Jung M. H., Velu N. K., Bi B. Y., Chatterjee B. 1999. "Regulation of androgen action". *Vitam. Horm.* 55: 309 – 352.

Rzepkowska, M., Ostaszewska, T. 2013. Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*. doi: 10.1111/raq.12027

Sakata N., Miyazaki K., Wakahara, M. 2006. Up-regulation of P450 arom and down-regulation of Dmrt-1 genes in the temperature-dependent sex reversal from genetic males to phenotypic females in a salamander. *Dev Genes Evol* 216: 224 – 228.

Sato, Y., Nishida, M. 2010. Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution. *Environ. Biol. Fish.* 88 (2): 169 – 188. DOI: 10.007/s10641-010-9628-7.

Schepers, G. E., Teasdale, R. D., Koopman, P. 2002. Twenty pairs of sox: extent, homology and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell.* 3: 167 – 170.

Schlueter, P. J., Sang, X., Duan, C., Wood, A. W. 2007. Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Dev. Biol.* 305: 377 – 387.

Shibata Y., Paul-Prasanth B., Suzuki A., Usami T., Nakamoto M., Matsuda M., Nagahama Y. 2010. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expression Patterns* 10: 283 – 289.

Sinclair, A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J., Foster J. W., Frischauf A. M., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240 – 244.

Sladky K. K., Swanson C. R., Stoskopf M. K., Loomis M. R., Lewbart G. A. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am. J. Vet. Res.* 62: 337 – 342.

Smith C. A., Roeszler K. N., Ohnesorg T., Cummins D. M., Farlie P. G., Doran T. J., Sinclair A. H. 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461: 267 – 271.

Smith, C., Sinclair, A. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays* 26: 120 – 132.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1995. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. *Hardcover*. Tercera edición.

Sone K., Hinago M., Itamoto M., Katsu Y., Watanabe H., Urushitani H., Tooi O., Guillete Jr. J. L., Iguchi T. 2005. Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *Gen. Comp. Endocr.*, 143 (2), 151 – 160.

Strüssmann, C., Nakamura, M. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish physiol. and biochem.* 26 (1): 13 – 29.

Suh, Y., Suh Y., Atzmon G., Cho M. O., Hwang D., Liu B., Leahy D. J., Barzilai N., Cohen P. 2008. Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Aging Cell* 105 (9): 3438 – 3442.

Takamatsu, N., H. Kanda, M. Ito, A. Yamashita, S. Yamashita and T. Shiba. 1997. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene*, 202: 167 – 170.

Tanaka K., Takehana Y., Naruse K., Hamaguchi S., Sakaizumi M. 2007. Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related Oryzias fishes: Substitution of the master sex-determining gene. *Genetics* 177: 2075 – 2081.

Tian M., Zhuang, P., Zhang, T., Yan S., Zhang, L. Liu, T. 2010. Histological observation on early development and differentiation of gonads in Siberian sturgeon. *Journal of Fish. Sci. of China* 17: 496 – 506.

Torres Maldonado L. C., Merchant Larios, H. 2006. Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas. *Ciencia Ergo Sum* 13 (2): 176 – 182.

Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G. G., van der Korput, J. A., Faber, P. W., van Rooij, H. C., Geurts van Kessel, A., Voorhorst, M. M., Mulder, E., Brinkmann, A. O. 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 153 (1): 241 –248.

Valenzuela, N., Neuwald, J. L., Literman, R. 2012. Transcriptional Evolution underlying vertebrate sexual development. *Developmental Dynamics*. DOI: 10.1002/dvdy.23897

Van den Hurk, R., Van Oordt, P., 1985. Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57: 216 – 222.

Van Eenennaam, A. L., Van Eenennaam, J. P., Medrano, J. F., Doroshov, S. I. 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination of White sturgeon. *J. Hered.* 90: 231 – 233.

Van Heemst, D., Beekman M., Mooijaart S. P., Heijmans B. T., Brandt B. W., Zwaan B. J., Slagboom P. E., Westendorp R. G. 2005. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* 4 (2): 79 – 85.

Vidotto, M., Grapputo, A., Boscari, E., Barbisan, F., Coppe, A., Grandi, G., Kumar, A., Congiu, L. 2013. Transcriptome sequencing and de novo annotation of the critically endangered Adriatic sturgeon. *BMC Genomics*, 14: 407.

Vizziano-Cantonnet, D., Baron, D., Mahè, S., Cauty, Ch., Fostier, A., Guiguen, Y. 2008. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 41: 277 – 288.

Vizziano, D., Baron, D., Randuineau, G., Mahè, S., Cauty, Ch., Guiguen, Y. 2008. Rainbow Trout Gonadal Masculinization Induced by Inhibition of Estrogen Synthesis Is More Physiological Than Masculinization Induced by Androgen Supplementation. *Biology of reproduction*. 78: 939 – 946. DOI 10.1095/biolreprod.107.065961

Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., Guiguen, Y. 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics* 236: 2198 – 2206.

Volff, J. N. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94: 280 – 294. DOI:10.1038/sj.hdy.6800635

Volff, J. N., Zarkower, D., Bardwell, V., Schartl, M. 2003. Evolutionary Dynamics of the DM Domain Gene Family in Metazoans. *J. Mol. Evol.* 57: S241 – S249.

Von Schalburg, K. R., Yasuike, M., Yazawa, R., de Boer, J. G., Reid, L., So, S. Robb, A., Rondeau, E. B., Phillips, R. B., Davidson, W. S., Koop, B. F. 2011. Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 12: 31.

Walters K. A., Simanainen U., Handelsman D. J. 2010. "Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models". *Hum. Reprod. Update* 16 (5): 543 – 558.

Wang, D. S., Zhou L. Y., Kobayashi T., Matsuda M., Shibata Y., Sakai F., Nagahama Y. 2010. Doublesex- and Mab-3-Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a Possible Mechanism Favoring the Male Pathway in Tilapia. *Endocrinology* 151 (3): 1331 – 1340.

Wang, X. G. and L. Orban. 2007. Anti-Mullerian hormone and 11 beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. *Dev. Dyn.*, 236: 1329 – 1338.

Wang Y., Ge W. Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues. 2004. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135 (2): 241 – 249.

Williot, P. 2011. Sex determination and staging of gonads. In: Biology and Conservation of the European sturgeon, *Acipenser sturio* L. 1758. The reunion of the European and Atlantic sturgeons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p 369 – 382.

Wuertz, S., Nitsche, A., Jastroch, M., Gessner, J., Klingenspor, M., Kirschbaum, F., Kloas, W. 2007. The role of the IGF-I system for vitellogenesis in maturing female sterlet, *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758. *Gen. Comp. Endocr.* 150 (1), 140 – 150.

Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L., Grillasca, J. P. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*. 258 (1 – 4): 685 – 688.

Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. *Fish Physiol*. 9A: 117 – 372.

Yano, A. Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., Guiguen, Y. 2012. An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*. 22: 1423 – 1428. DOI 10.1016/j.cub.2012.05.045

Yano A., Nicol B., Guerin A., Guiguen Y. 2011. The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-Box transcription factors 1, *tbx1a* and *tbx1b*, are up-regulated during testicular development. *Mol Reprod Dev* 78: 172 – 180.

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. *J. Appl. Ichthyol*. 27: 510 – 513.

Yokoi, H., T. Kobayashi, M. Tanaka, Y. Nagahama, Y. Wakamatsu, H. Takeda, K. Araki, K. Morohashi and K. Ozato. 2002. Sox9 in a teleost fish, medaka

(*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol. Reprod. Dev*, 63: 5 – 16.

Yoshimoto S. and Ito M. 2011. A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS Journal* 278. 1020 – 1026.

Yoshimoto S., Ikeda N., Izutsu Y., Shiba T., Takamatsu N., Ito M. 2010. Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of the ZZ/ ZW-type sex determining system. *Development* 137, 2519 – 2526.

Yoshimoto S., Okada E., Umemoto H., Tamura K., Uno Y., Nishikida-Umehara C., Matsuda Y., Takamatsu N., Shiba T., Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2469 – 2474.

Yoshinaga, N., E. Shiraishi, T. Yamamoto, T. Iguchi, S. Abe and T. Kitano. 2004. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322: 508 – 513.

Young, G., Kusakabe, M., Nakamura I., Lokman, P. M., Goetz, F. W., *Hormones and their receptors in fish reproduction*. Molecular aspects of fish and marine

biology vol. 4. 2005. Editors Philippa Melamed and Nancy Sherwood. (6) 155 – 174.

Yu H., Cheng H., Guo Y., Xia L., Zhou R. Alternative splicing and differential expression of P450c17 (CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel. 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307 (1): 165 – 171.

Yu, Z., Dadgar, N., Albertelli, M., Gruis, K., Jordan, C., Robins, D. M., Andrew, P., Lieberman, A. P. 2006. Androgen-dependent pathology demonstrates myopathic contribution to the Kennedy disease phenotype in a mouse knock-in model. *J. Clin. Invest.*, 116 (10): 2663 – 2672. doi: 10.1172/JCI28773.

Zao, D., Mc Bridel, D., Nandil, S., Mc Queen, H. A., Mc Grew, M. J., Hocking, P. M., Lewis, P. D., Sang, H. M., Clinton, M. 2010. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature*. 464: 237 – 243.

Zhou, R., L. Liu, Y. Guo, H. Yu, H. Cheng, X. Huang, T. R. Tiersch and P. Berta. 2003. Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol. Reprod. Dev.*, 66: 211 – 217.

ANEXO

Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)

Julio Berbejillo · Anabel Martinez-Bengochea ·
Gabriela Bedó · Denise Vizziano-Cantonnet

Received: 20 December 2011 / Accepted: 25 May 2012 / Published online: 12 June 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract The sex differentiation period of the Siberian sturgeon was investigated through expression profiling of two testicular markers (*dmrt1* and *sox9*). At the molecular level, a clear sexual dimorphism of *dmrt1* and *sox9* was observed in 3-year-old fish with immature gonads, in which males showed higher expression of these genes. Among 16-month-old sturgeons cultured in Uruguay, gonad morphology analyses showed one group of fish with undifferentiated gonads and a second group which had started their histological differentiation into ovaries or testes. *dmrt1* showed a significantly higher expression in testes of recently differentiated fish, but this was not the case for *sox9*. In undifferentiated fish, we observed two clearly different groups in terms of expression: one group of fish over-expressing male markers (*dmrt1*, *sox9*) and another group of fish showing very low expression of these genes. This suggests that fish undergoing male differentiation can be identified by

their profiles of gene expression before they undergo morphological differentiation.

Keywords Sturgeons · Sex differentiation · Gonad morphology · Gene expression

Abbreviations

<i>dmrt1</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor
<i>sox9</i>	SRY-box containing gene 9
<i>amh</i>	Anti-Müllerian Hormone
<i>nr5a1</i>	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
<i>nrOb1</i>	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
<i>RT-qPCR</i>	Real-Time quantitative polymerase chain reaction
<i>SQ</i>	Systemizing Quotient

J. Berbejillo · A. Martinez-Bengochea ·
D. Vizziano-Cantonnet (✉)
Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología
de Peces, Facultad de Ciencias, Universidad
de la República Oriental del Uruguay, Iguá 4225,
11400 Montevideo, Uruguay
e-mail: vizziano@gmail.com

G. Bedó
Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología,
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay

Introduction

The sex of fish and the molecular factors involved in sex differentiation are difficult to assess before morphological differentiation of gonads in most species. The sex determining gene was identified in a species of medaka, *Oryzias latipes* (Matsuda et al. 2002), and a species of pejerrey (Hattori et al. 2012), allowing to study the sex differentiation cascade for these species. However, the major determinant gene is unknown in

all other fish species. Contrasting with the absence of information on sex determination, we now have some ideas on the molecular factors involved in the period preceding gonad differentiation in some fish. The information comes from species for which genomes or transcriptomes are available, and in which monosex populations can be obtained. These factors were recently reviewed by Piferrer and Guiguen (2008), and some of the most widely studied genes involved in the masculine differentiation pathway were *sox9* (SRY-box containing gene 9), *dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor), *amh* (Anti-Müllerian Hormone), *nr5a1* (Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1), and *nrOb1* (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1). However, the molecular mechanisms underlying gonad differentiation in basal actinopterygian fish such as sturgeons remain poorly understood. In this model, no monosex populations are available, no genetic markers for sex have been defined, and there is no genetic resource bank. Since the time of sex differentiation was not reported for the species in rearing conditions in Uruguay, we identified undifferentiated and differentiated fish by gonad morphology. For the molecular characterization of gonadal differentiation, two genes previously known as testis differentiation markers in other species were selected (*dmrt1* and *sox9*) (Baron et al. 2005; Vizziano et al. 2007).

Materials and methods

Siberian sturgeons were obtained from Esturiones del Río Negro (Uruguay); the group of fish that was given

to us by the producers showed a low growth rate. One gonad was fixed for histology, and the contralateral gonad was frozen in liquid nitrogen and transferred to -80°C until RNA extraction. For gene characterization, primers were designed using conserved sequence regions from fish data bases and used to amplify cDNA of post-differentiated testes. The fragments amplified were sequenced and analyzed through a Blast search in order to confirm their identity. The partial cDNA sequences encoding for *dmrt1* (HQ110106) were characterized. Primers for RT-qPCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction) were designed based on the gene sequences characterized here (*dmrt1*) and on sequences previously submitted to GenBank for *sox9* (EU241882.1). We validated the expression of the genes selected in different tissues of 3-year-old fish by RT-qPCR (testis, ovary, muscle, liver, gills, and kidney). For gonad quantitative expression, we studied 12 undifferentiated gonads, 10 recently differentiated ovaries, 4 recently differentiated testes (16 months old), and 4 ovaries from females at 3 years old, using β -actin (FJ205611.1) for normalization. The validity of qPCR was confirmed through analysis of melting curves, checking amplified fragments in agarose gel and through sequencing. The SQ values were calculated as described in Baron et al. (2005).

Results

The histological analysis of 16-month-old fish rendered 12 fish with undifferentiated gonads at the morphological and histological levels; 5 fish with

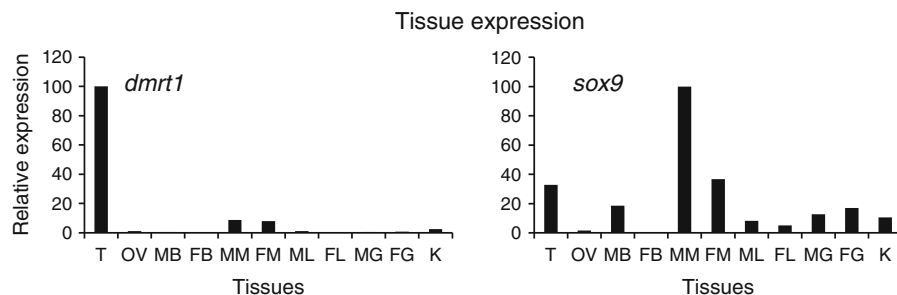


Fig. 1 Tissue expression of Siberian sturgeon *dmrt1* and *sox9* transcripts for 3-year-old fish. qPCR was made on testis (T), ovaries (OV), male brain (MB), female brain (FB), male muscle (MM), female muscle (FM), male liver (ML), female liver (FL),

male gills (MG), female gills (FG), and kidney (K). The relative expression was calculated as the percentage of the highest expression level recorded for each gene

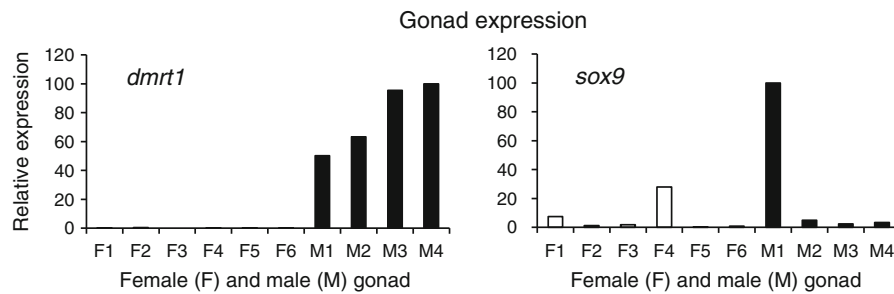


Fig. 2 Expression level of *dmrt1* and *sox9* in gonads. qPCR was made in gonads of recently differentiated (16-month-old) females (F1 to F6) and males (M1 to M4). The expression level was significantly higher in males than in female gonads for

dmrt1 ($p < 0.001$). *sox9* expression was not different between male and female gonads. The relative expression was calculated as the percentage of the highest expression level recorded for each gene

recently differentiated ovaries containing early pre-vitellogenic oocytes; and 4 sampled fish with already differentiated testes (data not shown).

dmrt1 expression in immature testes was clearly higher than in immature ovaries (3 year old fish) and showed very low levels of expression in the other tested tissues. *sox9* expression was also higher in testes when compared with ovaries, but showed high expression in other tissues as well (Fig. 1).

When gonads were recently differentiated, *dmrt1* mRNA expression exhibited a clear sexual dimorphism being higher (>200-fold) in male gonads than in female ($p < 0.001$), while *sox9* expression did not result dimorphic (Fig. 2).

Among undifferentiated fish, some of them had a high *dmrt1* and *sox9* expression in gonads, while the rest displayed low expression of these genes (data not shown).

Discussion

This is the first characterization of the molecular changes during gonad sex differentiation in sturgeons. The most interesting result was the evidence of a clear sexual dimorphism in the expression of *dmrt1* and *sox9* in gonads of immature fish (3 years old) with an over-expression in male gonads with respect to female gonads. When the expression was studied in less developed gonads (recently differentiated testes of 16-month-old fish), the *dmrt1* was higher in testes with respect to ovaries. Surprisingly, *sox9* expression showed no difference between male and female gonads in recently differentiated gonads (16-month-

old fish). We have no explanation for the absence of *sox9* sexual dimorphism in recently differentiated fish. *dmrt1* and *sox9* expression share a similar pattern in gonads prior to morphological sex differentiation, suggesting an over-expression in those probably undergoing male differentiation.

In teleost fish, *dmrt1* appears as an important factor related to testes differentiation, both Sertoli cells as in germ cells (Piferrer and Guiguen 2008; Raghuv eer and Senthilkumaran 2009; Raghuv eer et al. 2011). The sexual dimorphism of *dmrt1* expression during early and advanced stages of gonad development in sturgeons agrees with trends observed in teleosts (Marchand et al. 2000; Piferrer and Guiguen 2008) and supports the idea that it is an essential factor necessary to maintain the gonad sex as it was described in mammals (Matson et al. 2011). Recently, it was proposed that in organisms with a ZZ/ZW sex determination system, the double dosage of *Dmrt1* in males could be critical for testes determination (Smith et al. 2009). Since it has recently been proposed that Siberian sturgeons have a ZZ/ZW sex determination system (Fop-Bayat 2010), the question is open as to the role *dmrt1* plays in the sex determination of sturgeon males.

The other factor selected as a possible candidate involved in testes differentiation of Siberian sturgeons was *sox9*. In many fish species, two isoforms of *sox9* (form a, and form b) were reported (Zhou et al. 2003; Cresko et al. 2003). In a previous work on sturgeons, no evidence was observed for *sox9* duplication (Hett et al. 2005) and no sex specific differences were observed. In the present study, we studied the expression of a *sox9* orthologous to the *sox9* described by

Hett et al. (2005) in *Acipenser sturio*. The pattern of *sox9* expression reported in the present work suggests a potential involvement of *sox9* in late testes differentiation of the Siberian sturgeon. However, the lack of sexual dimorphism in some periods of gonad development suggests that *sox9* is not a key factor during the whole process of testes development (embryonic and adult life) of this sturgeon species.

In conclusion, we have started to identify the molecular factors involved in gonad sex differentiation in the Siberian sturgeon. *dmrt1* appears as a key factor involved in the masculine gonad differentiation and testicular development.

Acknowledgments This work was financed by the Programa de Desarrollo Tecnológico, Uruguay (Grant PDT-71-13). Many thanks are due to the team of Dr. Walter Norbis (Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Uruguay) for their help in statistics. We also thank “Esturiones del Río Negro” (Uruguay) for kindly providing biological samples.

References

- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen A (2005) Large scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 73:959–966
- Cresko WA, Yan YL, Baltrus DA, Amores A, Singer A, Rodriguez-Mari A, Postlethwait JH (2003) Genome duplication, subfunction partitioning, and lineage divergence: *sox9* in stickleback and zebrafish. *Dev Dyn* 228: 480–489
- Fop-Bayat D (2010) Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 305:174–177
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(8):2955–2959
- Hett AK, Pitra C, Jenneckens I, Ludwig A (2005) Characterization of *sox9* in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *J Heredity* 96(2):150–154
- Marchand O, Govoroun M, D’Cotta H, McMeel O, Lareyre JJ, Bernot A, Laudet V, Guiguen Y (2000) DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta* 1493:180–187
- Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D (2011) DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476:101–105
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563
- Piferrer F, Guiguen Y (2008) Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev Fish Sci* 16(S1):35–55
- Raghuveer K, Senthilkumaran B (2009) Identification of multiple *dmrt1* s in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyl-testosterone treatment. *J Mol Endocrinol* 42:437–448
- Raghuveer K, Senthilkumaran B, Sudhakumari CC, Sridevi P, Rajakumar A, Singh R, Muruganathkumar R, Majumdar KC (2011) Dimorphic expression of various transcription factor and steroidogenic enzyme genes during gonadal ontogeny in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Sex Dev* 5:213–223
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461:261–271
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty Ch, Guiguen Y (2007) Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn* 236:2198–2206
- Zhou R, Liu L, Guo Y, Yu H, Cheng H, Huang X, Tiersch TR, Berta P (2003) Similar gene structure of two *sox9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleostfish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol Reprod Dev* 66:211–217

Expression and Phylogeny of Candidate Genes For Sex Differentiation in a Primitive Fish Species, the Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*

JULIO BERBEJILLO,¹ ANABEL MARTINEZ-BENGOCHEA,¹ GABRIELA BEDO,² FRÉDÉRIC BRUNET,³ JEAN-NICOLAS VOLFF,³ AND DENISE VIZZIANO-CANTONNET^{1*}

¹ Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay

² Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay

³ Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, UMR5242 CNRS/INRA/Université Claude Bernard Lyon1/ENS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon Cedex 07, France

SUMMARY

The molecular mechanisms underlying testis differentiation in basal actinopterygian fish remains poorly understood. The sex differentiation period was investigated in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, by expression profiling of Sertoli cell transcription factors (*dmrt1*, *sox9*) that control testis differentiation in vertebrates; Leydig cell factors (*cyp17a1*, *star*) affecting androgen production; the androgen receptor (*ar*); a growth factor controlling testis development (*igf1*); and a gene coding for a gonadotropin hormone (*lh*). Two genes were characterised for the first time in the Siberian sturgeon (*dmrt1*, *cyp17a1*), while the others came from public databases. Sturgeon gonad development is very slow, with a late sexual differentiation time during their juvenile stage, and are still immature at 3 years of age. Immature fish showed a sex-dimorphic pattern; all the genes studied displayed a higher expression level in male gonads. We took advantage of the presence of juvenile fish with pre- and post-differentiated gonads (16 and 18 months old) to characterise them at the molecular level. The post-differentiated fish displayed a sex dimorphism of gene expression in their gonads for all genes studied, with the exception of *sox9*. The trends in undifferentiated fish lead us to propose that sturgeons undergoing male differentiation express high levels of Sertoli cell factors (*dmrt1*, *sox9*) and of genes involved in the production and receptivity of androgens (*cyp17a1*, *star* and *ar*) together with *lh*. Expression profiles and phylogenetic studies suggest that these genes are potential regulators of testis development in the Siberian sturgeon.



* Corresponding author:
Facultad de Ciencias
Laboratorio de Fisiología de la
Reproducción y Ecología de Peces
Instituto de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República Oriental
del Uruguay, Igua 4225
Montevideo 11400, Uruguay.
E-mail: vizziano@gmail.com

Grant sponsor: Programa de Desarrollo
Tecnológico del Uruguay; Grant
number: 71-13

Mol. Reprod. Dev. 79: 504–516, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 22 May 2012 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/mrd.22053

Received 26 December 2011; Accepted 11 May 2012

INTRODUCTION

The morphological differentiation of vertebrate gonads is preceded by molecular changes that are not completely understood in different taxa. A master gene that determines

Abbreviations: *Amh*, anti-Müllerian hormone; *Ar*, androgen receptor; *Cyp17a1*, cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1; *Dmrt1*, doublesex and Mab-3 related transcription factor 1; *Igf1*, insulin like growth factor I; *Lh*, luteinising hormone; *Sox9*, SRY-box containing gene 9; *Sry*, sex-determining region of chromosome Y; *Star*, steroidogenic acute regulatory protein.

gender has been already identified in some vertebrates. Generally, this master gene encodes a transcription factor, and it is lineage- or even species-specific: SRY (sex-determining region of the Y chromosome) in placental mammals (Sinclair et al., 1990; Koopman et al., 1991), *DMY/dmrt1bY* (*Y-specific DM-domain gene required for male development*) in medaka (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002), *Dmrt1* (*doublesex and Mab-3 related transcription factor 1*) in chicken (Smith et al., 2009), and *Dm-W* (*W-linked paralogue of dmrt1*) in the African clawed frog (Yoshimoto et al., 2008). Recently, it has been shown that a Y-linked duplicated copy of the anti-Müllerian hormone (*amhy*) plays a critical role in the sex determination of the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) (Hattori et al., 2012). On the other hand, many unsuccessful efforts have been undertaken to discover the gender-determining gene in sturgeons (Wuertz et al., 2006; McCormick et al., 2008; Keyvanshokook and Gharaei, 2010). Studies involving different vertebrates revealed that even if the sex-determining gene seems not to be conserved, the downstream sex differentiation cascade includes common genes that interact to induce gonad differentiation (Brennan and Capel, 2004; Piferrer and Guiguen, 2008; Herpin and Scharf, 2011). *Sox9* (*SRY-box containing gene 9*), *Dmrt1*, *Amh* (*anti-Müllerian hormone*), *Nr5a1* (*nuclear receptor subfamily5, group a, member 1*), *Nr0b1* (*nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1*) and *Wt1* (*Wilm's tumour suppressor-1 gene*) have been described as conserved genes involved in the masculine pathway (Bowles and Koopman, 2001; Brennan and Capel, 2004; Piferrer and Guiguen, 2008).

Since the major sex-determining factor is still unknown for most fish, it is not possible to sex the fish at early stages of development, before the period of morphological gender differentiation. To circumvent this problem, genetically all-male and all-female populations were obtained for some species, allowing the study of the changes in gonadal gene expression before their gender was expressed at a morphological level. The information on factors involved in testis differentiation came from species in which monosex populations and genetic resources are available. The over-expression of certain genes before morphological gonad sex differentiation was described in some teleost species (Guiguen et al., 1999; Marchand et al., 2000; Wang et al., 2004; Baron et al., 2005; Nagahama, 2005; Vizziano et al., 2007; Ijiri et al., 2008; Lareyre et al., 2008; Shibata et al., 2010; Yano et al., 2011). These studies showed that testis differentiation was preceded by a clear over-expression of Sertoli cell transcription factors (i.e. *dmrt1*, *sox9*, *nr0b1* or *dax1*, and *tbx1* (or *T-box transcription factor gene family*)) (Marchand et al., 2000; Vizziano et al., 2007; Yano et al., 2011), and transforming growth factors such as *amh* and *gsdf* (*gonadal soma-derived growth factor*) (Baron et al., 2005; Vizziano et al., 2007; Lareyre et al., 2008; Shibata et al., 2010). *dmrt1* expression was previously studied in sturgeon gonads, and shown to be sex dimorphic in Lake sturgeon (Hale et al., 2010) but not in the Shovel-nose sturgeon (Amberg et al., 2010). Leydig cell differentiation occurs for some species before testis differentiation,

with an over-expression and/or activation of enzymes and factors controlling steroid synthesis (Vizziano et al., 2007; Blasco et al., 2012). In contrast, the steroid synthesis capacity appears after testis differentiation in tilapia (Ijiri et al., 2008). The role of steroids in gonad differentiation is unknown in primitive fish like sturgeons. Finally, another interesting candidate involved in gonadal development is the *igf1* (*insulin-like growth factor I*) (Le Gac et al., 1996), which is up-regulated during late testis differentiation in trouts (Baron et al., 2005).

Contrasting with information in teleost fish, the molecular mechanisms underlying testis differentiation in basal actinopterygian fish such as sturgeons remains poorly understood (McCormick et al., 2008; Amberg et al., 2010; Keyvanshokook and Gharaei, 2010). No monosex populations are available for this class of fish, sex-linked genetic markers are not known (Wuertz et al., 2006), and neither their complete genome sequences nor gonad transcriptomes are publicly available to study their sexual development. In order to explore the possible regulators involved in testis differentiation in *Acipenser baerii*, we selected two Sertoli cell factors (*dmrt1*, *sox9*); two Leydig cell factors, *cyp17a1* (*cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1*) and *star* (*steroidogenic acute regulatory protein*); and another three markers, *ar* (*androgen receptor*), *lh* (*luteinising hormone*), and *igf1*, which have been reported to be over-expressed in the differentiating gonads of trouts (Baron et al., 2005). Here, we compare recently differentiated gonads to gonads in the period preceding their morphological differentiation. A phylogenetic analysis of the selected genes was made in order to confirm their relationship with already characterised vertebrate sexual regulators.

RESULTS

Gonad Development

In the rearing conditions used, the fish were sexually differentiated but still immature at 3 years old. Juvenile fish of 16 and 18 months were analysed by microscopy. The histological analysis of juvenile gonads showed 12 fish with undifferentiated gonads at both the morphological and histological levels; 5 fish already differentiated into females, with ovaries containing early pre-vitellogenic oocytes; and 4 fish already differentiated into males, with testes in which the future tubules are recognisable. The undifferentiated gonads were characterised by an absence of features identifying them as testes or ovaries; the somatic tissue had no special arrangement indicating the sex of the gonad, and contained only gonias (gc) (Fig. 1, 'Undifferentiated'). The differentiated ovaries showed future lamellae with plenty of oogonia (oo) and a few pre-vitellogenic oocytes (Prev-OV) (Fig. 1, 'Differentiated ovary I') or contained an ovarian lamellae filled with pre-vitellogenic oocytes and groups of oogonia (oo) (Fig. 1, 'Differentiated ovary II'). The differentiated testes showed the somatic cells (sc) surrounding the spermatogonia (spg) and organised to form the future tubules (Fig. 1, 'Differentiated testis').

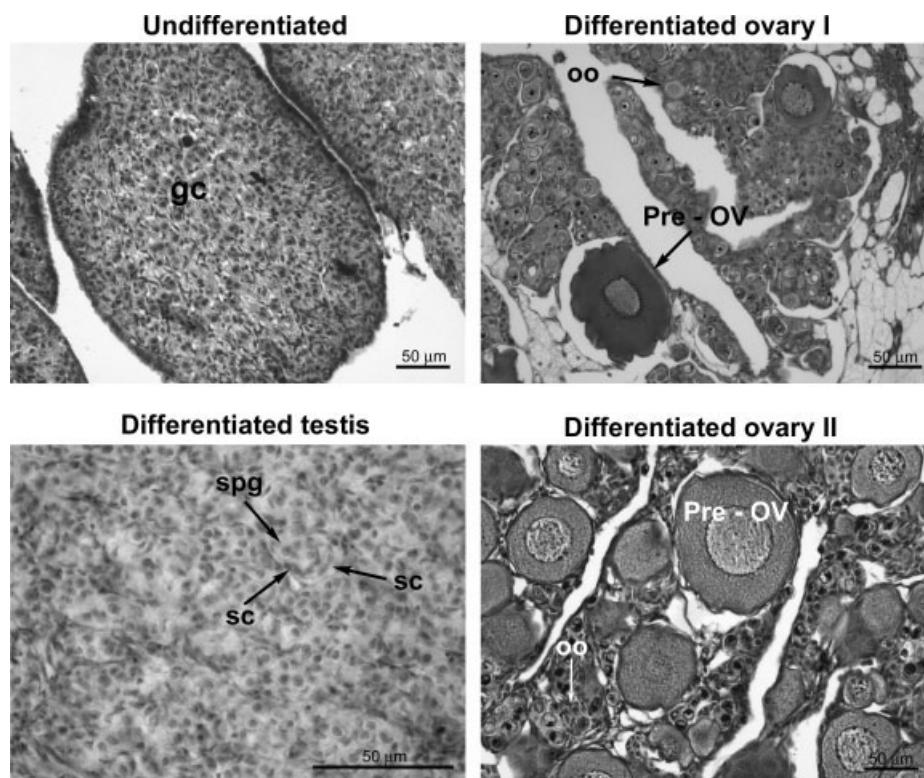


Figure 1. Histological analyses of Siberian sturgeon juvenile gonads. Germ cells (gc), oogonias (oo), pre-vitellogenic oocytes (Pre-ov), somatic cells (sc), spermatogonia (spg). Scale bar = 50 µm.

Phylogenetic Characterisation of Gonadal *Dmrt1*, *Cyp17a1*, *Star*, *Igf1*, *ar*, *lh*, and *Sox9*

Phylogenetic studies of Siberian sturgeon *Dmrt1* showed that it is unambiguously orthologous to all the *Dmrt1* proteins found in other chordate species (data not shown). It does not harbour any long branches, as in tetrapods or teleost species (Fig. 2A). *Cyp17a1* is also in a basal phylogenetic position from tetrapods and teleost fish, although the branch leading to sturgeons is supported by a very weak bootstrap value. Again, the branch of sturgeons is short compared to that of mammals (Fig. 2B). This feature is even stronger for the *Star* protein (Fig. 2C). *Igf1* is found in all chordate species, and the phylogenetic position of this gene for the Siberian sturgeon follows the species classification (Fig. 2D). Similarly, the phylogeny of the *Ar* follows the species classification. The branch length of the *Ar* in sturgeons is similar to that of the *Ar* in other tetrapods, the *Ar*-a of teleost fish, and even three chondrichthyan species (Fig. 2E). The acipenser *Lh* orthologs cluster with the tetrapod species instead of the fish species, although the bootstrap values are weak in the common branch of sturgeons and tetrapods and in the branch leading to the actinopterygians. This could be a consequence of a long-branch attraction to the very differentiated *Lh* homologs found in the metatherian species

used here (Fig. 2F). The sturgeon *Sox9* branches at the base of the actinopterygians, although its bootstrap value is also weak (Fig. 2G).

Expression Patterns in Tissues From Immature Fish

A quantitative expression study through qPCR in immature gonads of Siberian sturgeons showed that *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *igf1*, and *lh* are sex-dimorphic in gonads, with higher expression in testes (Fig. 3). *dmrt1* and *cyp17a1* are slightly expressed in brain, muscle, liver, gills and kidney. In contrast, *sox9*, *ar*, and *lh* have a higher expression in the tissues studied, with a particularly high expression in male muscle and brain when compared to females. *igf1* showed higher expression in the liver of males and females when compared to the other tissues studied, while the expression of *star* was particularly high in kidneys.

Gene Expression in Gonads of Juvenile Fish

Sertoli and Leydig cell markers were studied in already-differentiated gonads of juvenile fish. Among the Sertoli cell markers, *dmrt1* mRNA expression exhibited a clear sexual dimorphism, being higher (>200-fold) in males than in females when gonads were just-differentiated

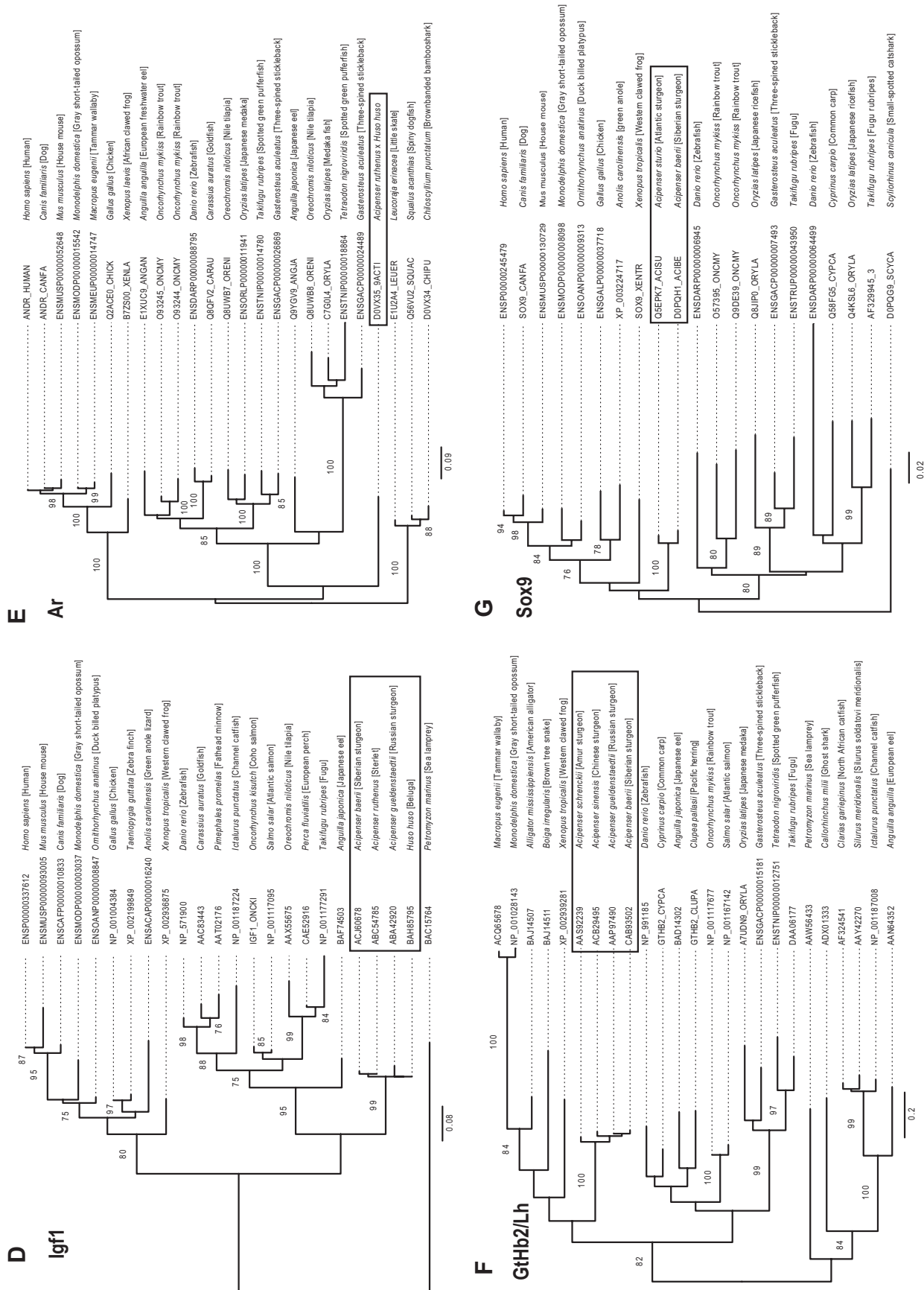


Figure 2. (Continued)

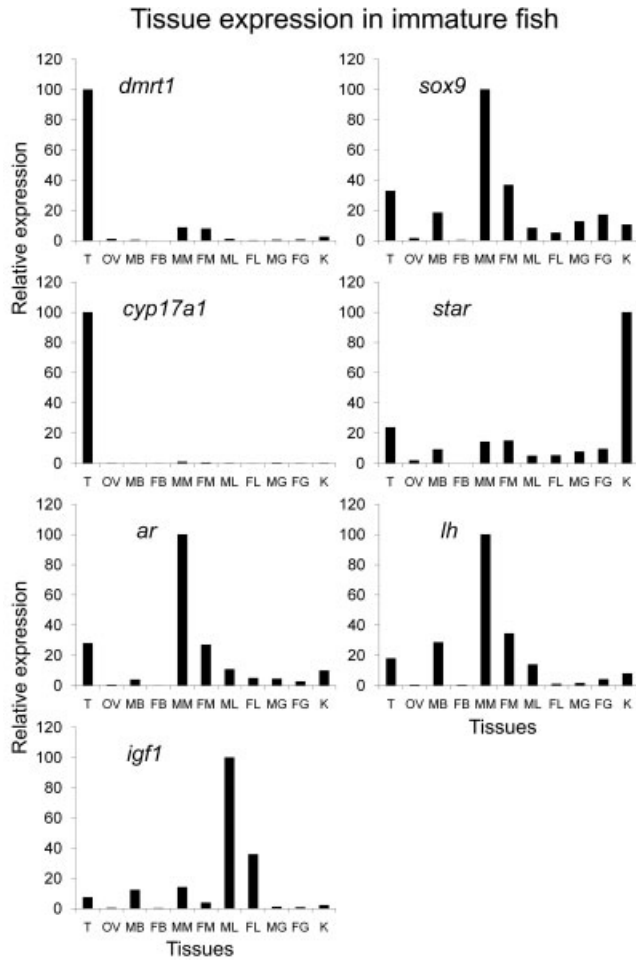


Figure 3. Tissue expression of *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh*, and *igf1* transcripts in immature Siberian sturgeons. qPCR was performed on testes (T), ovaries (OV), male brain (MB), female brain (FB), male muscle (MM), female muscle (FM), male liver (ML), female liver (FL), male gills (MG), female gills (FG), and kidney (K). Relative quantification was carried out by normalisation of the values relative to those of the housekeeping gene β -actin.

($P < 0.001$); in contrast, *sox9* was not dimorphic (Fig. 4). The Leydig cell markers assayed, *cyp17a1* and *star*, showed a clear sexual dimorphism, being higher in males than in females at this stage ($P < 0.001$) (Fig. 4). *ar* was also up-regulated in males ($P < 0.001$); the same trend was observed for *lh* ($P < 0.001$) and *igf1* ($P < 0.0001$), although these two genes were poorly expressed at this stage.

Gene Expression in Gonads of Undifferentiated Fish

Interestingly, within the group of undifferentiated, 16-month-old fish, individual number 4 (see Fig. 5) over-expressed *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, and *lh* in its gonads compared to a much lower expression of these genes in other fish from the same group (Fig. 5, fish number 1, 2, 3, 5, 6 and 7). *igf1* did not share the same behaviour as

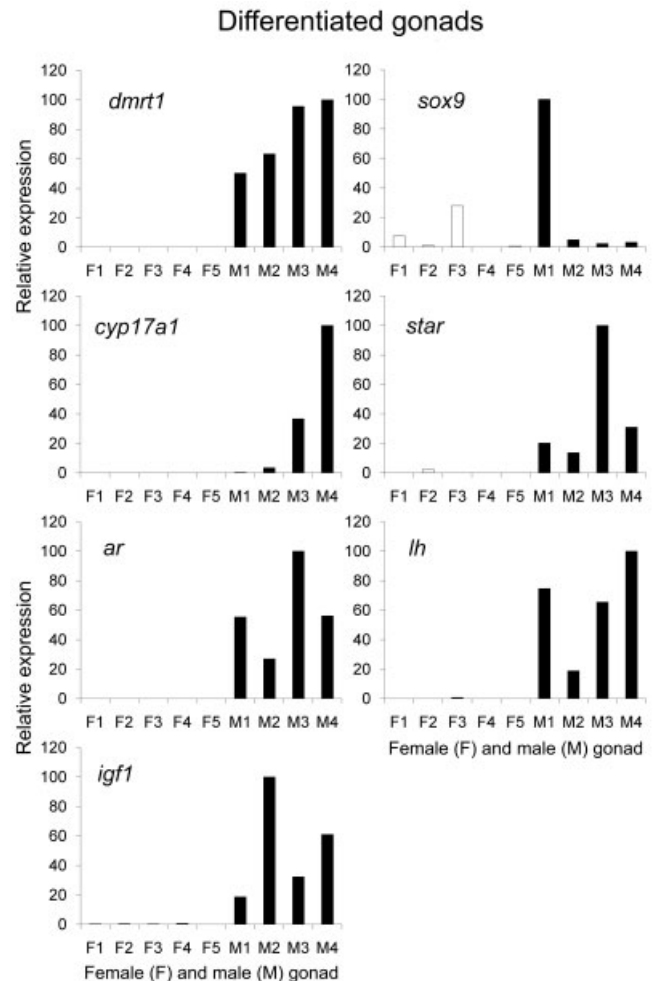


Figure 4. Expression levels of *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh*, and *igf1* transcripts was analysed through qPCR on gonad samples from already-differentiated female (F1 to F6) and already-differentiated male (M1 to M4), 16-month-old fish. Relative quantification was carried out by normalisation of the values relative to those of the housekeeping gene β -actin. The expression level was significantly higher in male than in female gonads for *dmrt1* ($P < 0.001$), *cyp17a1* ($P < 0.001$), *star* ($P < 0.001$), *ar* ($P < 0.001$), *lh* ($P < 0.001$), and *igf1* ($P < 0.0001$). We found no difference in *sox9* expression between male and female gonads.

the other dimorphic genes at 16 months (Fig. 5). In a second group of undifferentiated fish at 18 months, two individuals showed an over-expression of *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1* and *ar* (Fig. 6, fish number 1 and 4), while the others had low expression levels of these genes (Fig. 6, animals 2, 3 and 5). The other genes that were tested (*star*, *lh* and *igf1*) did not show the same expression pattern.

DISCUSSION

This is the first characterisation of the molecular changes that occur in sturgeons during the gonad gender

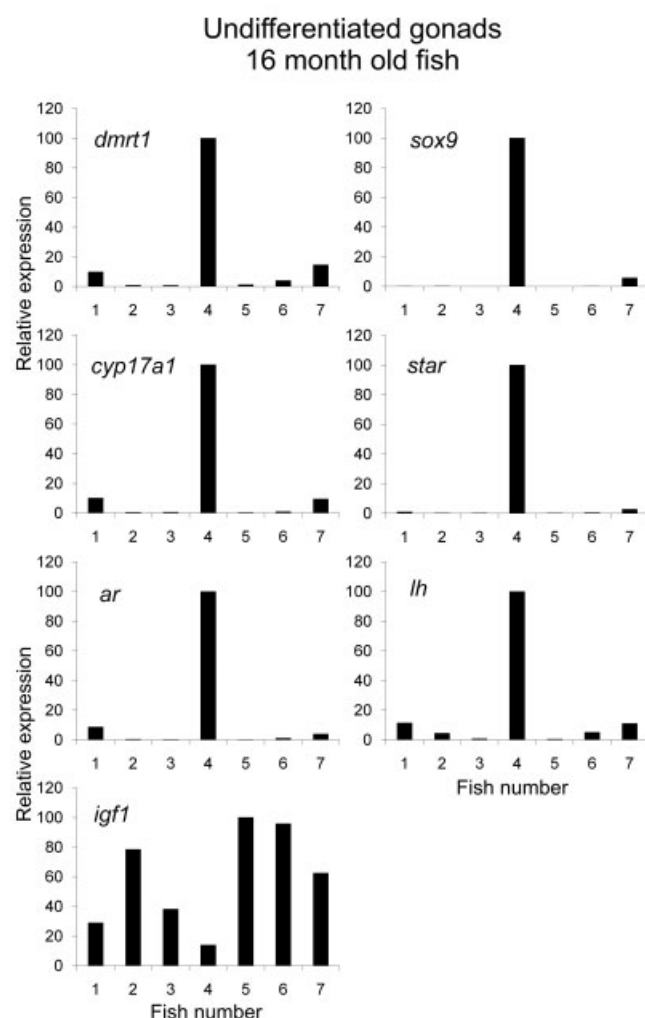


Figure 5. Expression level of *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh*, and *igf1* transcripts was analysed through qPCR on gonad samples from undifferentiated, 16-month-old fish. Each number (1–7) corresponds to the gonad of an individual fish. Relative quantification was carried out by normalisation of the values relative to those of the housekeeping gene β -actin.

differentiation. We observed a clear sexual dimorphism in the genes selected (*dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *igf1* and *lh*), with their over-expression in testes when compared to ovaries of immature fish (3 years old). The dimorphism was also present in the juvenile fish with differentiated gonads, except for *sox9*. Prior to the morphological sex differentiation, the pattern of expression observed in Sertoli cell factors (*dmrt1*, *sox9*), androgen production and receptivity factors (*cyp17a1*, *star*, *ar*), and *lh* suggests that these individuals were probably undergoing male differentiation. The lack of genetic all-male and all-female populations or sex genetic markers prevents a definitive conclusion about the involvement of the factors studied during gonad differentiation. Even though the trends observed suggest they

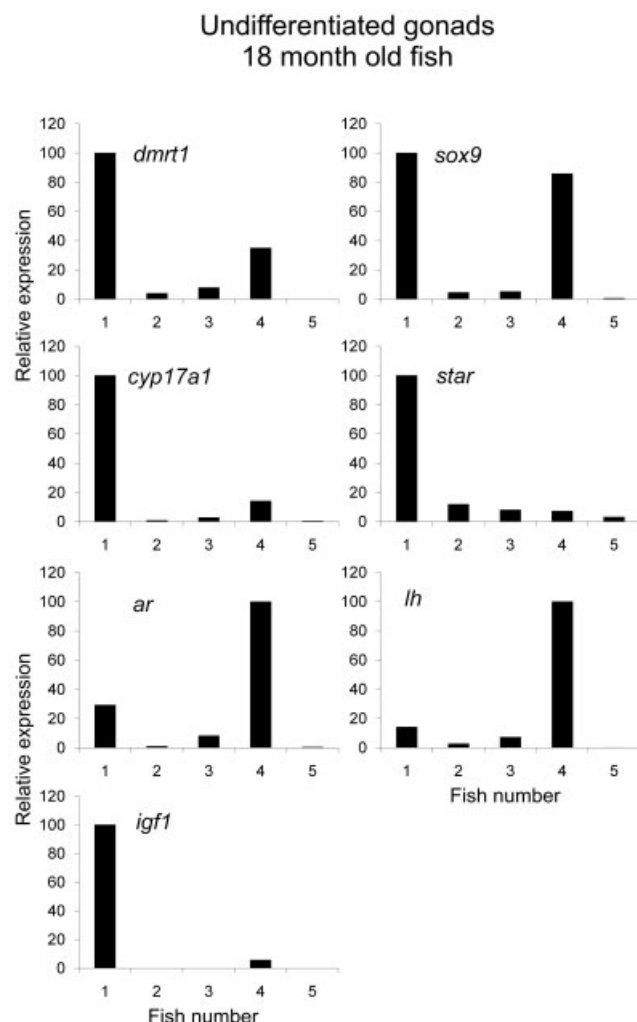


Figure 6. Expression level of *dmrt1*, *sox9*, *cyp17a1*, *star*, *ar*, *lh*, and *igf1* transcripts was analysed through qPCR on gonad samples of undifferentiated, 18-month-old fish. Each number (1–5) corresponds to the gonad of an individual fish. Relative quantification was carried out by normalisation of the values relative to those of the housekeeping gene β -actin.

take part in the process of testes differentiation, more studies must be carried out in earlier stages of gonad development to validate the observed trends.

Among the studied genes, transcription factor *dmrt1* is the only one conserved in invertebrates and vertebrates as a major factor involved in male fate (Voff et al., 2003; Haag and Doty, 2005). *Dmrt1* belongs to the *dmrt/mab3* multigenic family, and has several paralogs (Hong et al., 2007). At the functional level, it has been shown that *Dmrt1* is essential for maintaining mammalian testes determination and gonad sex after foetal choice between male and female in mouse (Matson et al., 2011). The deletion of *Dmrt1* in Sertoli cells induces feminisation, and reprograms differentiated Sertoli cells into granulosa-type cells in mouse (Matson et al.,

2011). *Dmrt1* has also been proposed as the gene required for male development in birds, as two doses of Z-linked *dmrt1* in ZZ males are needed for gonad masculinisation (Smith et al., 2009). The knockdown of *Dmrt1* using RNA interference resulted in partial sex reversal of males and gonad feminisation (Smith et al., 2009). In amphibians, a *dmrt1* gene linked to the W chromosome is crucial for primary ovary formation in *Xenopus laevis*, which uses a ZZ–ZW sex determination system (Yoshimoto et al., 2008). The results observed in birds and *X. laevis* suggest that there are two alternative forms of sex determination in ZZ/ZW animals: the dosage of a Z-linked gene or the expression of a female sex-determining gene in the W chromosome.

In teleost fish, *dmrt1* appears as an important factor related to testis differentiation (Piferrer and Guiguen, 2008). This assumption is based on its pattern of expression during the very early gonad development in teleosts (Vizziano et al., 2007; Ijiri et al., 2008) and on its behaviour when masculinising and feminising treatments are used. *dmrt1* is up-regulated during the early phases of gonad transdifferentiation induced by masculinising treatments (Raghuveer et al., 2005; Vizziano et al., 2008), and down-regulated during the feminisation induced by estrogens (Raghuveer et al., 2005; Vizziano et al., 2008). In primitive fish such as sturgeons, *dmrt1* has been described in two species (*Acipenser transmontanus* and *A. baerii*, present work) and roots distinctively and unambiguously with respect to all the *Dmrt1* genes found in other chordate species. *dmrt1* in sturgeons harbours a very short branch when compared to tetrapods or teleost fish, suggesting that this gene retains its original function. The sexual dimorphism of *dmrt1* during early and advanced stages of gonad development in the Siberian sturgeon agrees with trends observed in teleosts (Marchand et al., 2000; Piferrer and Guiguen, 2008) and other sturgeons (Hale et al., 2010), and sustains the idea that it is an essential factor needed to maintain the gonad sex, as was described recently in mammals (Matson et al., 2011). It must be reported that *dmrt1* seems not to be sex dimorphic in all the sturgeon species studied (Amberg et al., 2010). In fish with XX/XY sex determination, *dmrt1* is expressed in both male and female gonads. It seems that for this kind of sex determinism, *dmrt1* is not a good candidate to be the master gene involved in testis determination. Yet, a double dosage of *Dmrt1* in ZZ males could be critical for testis determination in organisms with ZZ/ZW, such as birds and more recently, the Siberian sturgeon (Fopp-Bayat, 2010). Whether the double dosage of *dmrt1* in male ZZ Siberian sturgeons is critical for testis determination remains to be elucidated. The phylogenetic analysis together with the expression pattern observed for *dmrt1* suggests that the gene already acquired its function as a critical regulator of testis differentiation in this primitive fish.

Sox9 was another Sertolian factor selected as a possible candidate involved in testis differentiation in Siberian sturgeons. The Sox9 genes belong to the SoxE subdivision among another large, multigenic family (Schepers et al., 2002). Within the SoxE group, Sox8 and Sox9 are involved

in male sex determination in mammals (Bowles et al., 2000; Chaboissier et al., 2004; Koopman, 2005). At a functional level, Sox9 has a crucial role in Sertoli-cell differentiation; it is one of the earliest genes to be up-regulated in pre-Sertoli cells following the expression of Sry, and it has a key role in sex differentiation in mammals (Bowles and Koopman, 2001; Brennan and Capel, 2004). Yet, Sox9 is dispensable for testis differentiation after sex determination (Barriónuevo et al., 2009), leaving its involvement in fish testis differentiation unclear. In a previous work on sturgeons, no evidence was observed for sox9 duplication (Hett et al., 2005), as is the case in teleost fish (Cresko et al., 2003; Zhou et al., 2003), and no sex-specific differences were observed. The phylogenetic analyses of Sox9 evolution revealed a basal position for sturgeon sox9 (*Acipenser sturio*, Hett et al., 2005, *A. baerii* present work). In medaka and pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), sox9 has been proposed as being involved in the formation of testis structures, but not in testis differentiation (Nakamoto et al., 2005; Blasco et al., 2010). In trout, sox9 paralogs (*sox9a1*, *sox9a2*) showed an incomplete sexually dimorphic expression (Vizziano et al., 2007), suggesting that they are not essential for testis differentiation. The pattern of sox9 expression reported in the present work suggests a potential involvement of sox9 in late testis differentiation in the Siberian sturgeon. Its role in early events of gonad differentiation remains to be studied in undifferentiated gonads of younger fish (i.e. 3- to 6-months old).

cyp17a1, *star*, and *ar* are related to steroid production and receptivity. *cyp17a1* encodes for the 17-hydroxylase that converts progestins into androgens; *star* encodes for a protein that controls steroid synthesis, and *ar* encodes for androgen receptors. Androgens are the main mediators of vertebrate masculinisation after the testes are differentiated (Borg, 1994; Brennan and Capel, 2004). In teleost fish, however, it is controversial whether androgens participate in the gender differentiation of testes or start acting only after the onset of spermatogenesis. In this group, the more potent androgens are those that have an oxygen at carbon eleven (11-oxygenated androgens) (Borg, 1994), and the presence of these steroids is usually related to masculine development. Yet, females of several teleost fish species also produce high levels of 11-oxygenated androgens (Lokman et al., 2002), as does the basal actinopterygian Siberian sturgeon (Cuisset et al., 1995; Williot, 2011). Thus, the enzyme involved in 11-oxygenation (11 β -hydroxylase) seems not to be a good choice to study the masculine pathway, at least in the Siberian sturgeon. In fish in which the production of 11-oxygenated androgen synthesis was observed only in male gonads, there is some evidence that androgens precede testis differentiation. This is the case of the pejerrey, *O. bonariensis*, in which a production of 11-oxygenated androgens was observed during the early phases of gonad development prior to testis differentiation (Hattori et al., 2009; Blasco et al., 2012). Moreover, an early over expression of the gene encoding for the 11 β -hydroxylase (*cyp11b*, cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide) was observed in all male genetic trout populations 20 days before testis differentiation (Vizziano et al.,

2007). In contrast, there was no expression at the gene and protein levels for steroid synthesis enzymes before testis differentiation in tilapias (Ijiri et al., 2008). This shows that androgens are not universally involved in testis differentiation in fish.

The androgen content (testosterone and 11-ketotestosterone) in young sturgeons discriminates between genders fairly well as soon as differentiation has occurred—that is, stage II, as is the case for *A. transmontanus* (Feist et al., 2004) and *Huso huso* (Mola et al., 2011), but not *Acipenser gueldenstaedtii*, which did not exhibit any sex-related differences (Barannikova et al., 2000). This occurs at a similar stage as the stage in Siberian sturgeon development, during which we observed an over-expression of *star* and *cyp17a1*, indicating that, in recently differentiated sturgeons, androgens are produced and detectable. The expression of *star* and *cyp17a1* in undifferentiated fish opens the question about the role of androgens prior to gonad differentiation in Siberian sturgeons. Besides the potential to produce steroids, we found that the expression of the *ar* gene was clearly dimorphic in recently differentiated and immature testes when compared to ovaries in the Siberian sturgeon. The over-expression of *ar* in the same undifferentiated fish that show high expression of *dmrt1* and *sox9* suggests there is a higher sensitivity for androgens in male gonads before their morphological differentiation. Studies focused on early developmental stages in order to identify steroid synthesis as well as the androgen effect on gonad development will help understand if androgens are involved in testis differentiation in sturgeons. The phylogenetic analysis of *cyp17a1*, *star*, and *ar* indicates a probable conservation of gene function.

Another interesting feature we found was the male over-expression of *igf1* in recently differentiated Siberian sturgeons. The expression of *igf1* has been shown to occur in germ and somatic cells of rainbow trout, tilapia and seabass (Le Gac et al., 1996; Reinecke et al., 1997; Berishvili et al., 2006; Viñas and Piferrer, 2008), suggesting an autocrine or paracrine function. *igf1* is also expressed in somatic cells when gonads are still undifferentiated, suggesting a crucial importance to further gonad development and differentiation (Reinecke, 2010). A study using knockdown of the type-1 Igf receptor by morpholino oligonucleotides in zebrafish embryos demonstrated a high impact on gonad development, leading to mismigration and apoptosis of primordial germ cells (Schlueter et al., 2007). The pattern of *igf1* expression in undifferentiated gonads of Siberian sturgeons was not similar to the pattern observed for the other male markers (*dmrt1*, *sox9*, *ar*, *lh*, *cyp17a1*). Moreover, the trends observed prior to gonad differentiation in the Siberian sturgeon did not suggest any dimorphic expression for *igf1*. This factor probably controls the first steps of testis development after differentiation, as it has been shown for some teleost species. The phylogenetics showed that *igf1* was found in all chordate species, and suggests that the gene's function should not have changed.

lh has been found to be expressed in trout and is over-expressed specifically in ovaries during the first oocyte meiosis (Baron et al., 2005). Such a result was interpreted

as a possible anti-apoptotic factor at that time. In the Siberian sturgeon, *lh* expression was higher in testes than in ovaries, and the pattern observed in undifferentiated fish suggests that it could be a masculine marker.

In conclusion, Sertoli cell transcription factors (*dmrt1* and *sox9*), Leydig cell functional markers as (*cyp17a1*, *star*), as well as *ar*, *igf1*, and *lh*, seem to have retained an ancestral function in sexual development, specifically testis differentiation. Some of these genes seem to be involved in the process of testis differentiation (*dmrt1*, *ar*, *lh*, *cyp17a1*, *star*, *sox9*) while others are active at initial stages of gametogenesis (*igf1*). Along these lines, individual Siberian sturgeons over-expressing *dmrt1*, *sox9*, *cyp17*, *star*, *ar*, and *lh* are potential males in advanced molecular differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Sampling

Research involving animal experimentation conformed to the principles for the use and care of laboratory animals, and was in compliance with Uruguayan regulations on animal welfare (Comisión Honoraria de Experimentación Animal).

Siberian sturgeon juveniles (*A. baerii*) of different ages were obtained from a fish farm, (Esturiones del Río Negro), where they were reared at environment temperature. Fish were transported in aerated water tanks of 1 m³. The acclimatisation time depended on the difference between the temperature of the water in the tank and the water in the experimental facilities, taking 1 hr for each degree of difference. Fish were maintained for 2 months in the Instituto de Investigaciones Pesqueras (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Uruguay) at environment temperature before sampling. They were fed ad libitum with 38% protein, following the diet developed by the enterprise Esturiones del Río Negro, with a feeding rate of 3% of their biomass. Different batches were used. A first group of 16-month-old fish measured 37 ± 5 cm and weighed 110 ± 46 g. A second group of 16-month-old fish measured 70 ± 7 cm in length and weighed 1,228 ± 165 g. A third group of 18-month-old specimens measured 40 ± 2 cm and weighed 150 ± 37 g. Each group of fish was maintained in the same tank. The late differentiation of the gonads at 16 and 18 months with respect to previous reports (Williot, 2011) can be explained by the slow growth observed in the fish used. This difference did not affect the histological identification of the developmental stage of each specimen selected to compare undifferentiated to differentiated fish.

Three-year-old fish showed a well differentiated but immature gonad. For molecular analysis and cloning, the testes and ovaries of 3-year-old fish were sampled. To validate the pattern of expression of genes studied, gonads, brain, muscle, liver and gills were collected.

For the comparison between already differentiated and undifferentiated fish, the gonads of all the fish in the different groups were evaluated at a microscopic level. One gonad was fixed in Bouin for histology and the contralateral one

was frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for RNA extraction. Among the fish, we found individuals with undifferentiated gonads and other with gonads that were already differentiated into testes or ovaries. For qPCR, we studied seven undifferentiated gonads from 16-month-old fish, and five undifferentiated gonads from 18-month-old fish. In addition, five ovaries and four testes of 16-month-old fish were studied.

RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer instructions, and quality was assessed by gel electrophoresis. cDNA synthesis was carried out on 3 μg of total RNA. RNA was denatured in the presence of random hexamers (0.5 μg) for 5 min at 70°C , and then chilled on ice. Reverse transcription (RT) was performed at 37°C for 1 hr using M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) as described by the manufacturer.

cDNA Characterisation and Real-Time PCR

No sequences of genes relevant to *A. baerii* gonadal development are available in public databases. Hence, there is a need to start characterising those genes that are expressed during early gonad development. Phylogenetic position determines significant genetic divergence compared to other fish, and makes the selection of primers with homology quite difficult (Berbejillo et al., 2010). The primers we used were designed based on highly conserved regions from fish and tetrapod orthologues, inferred from sequence alignments using the ClustalW multiple sequence alignment algorithms provided in the BioEdit software (Hall, 1999). The gene list and primer selection is shown in Table 1.

The partial cDNA sequences encoding for *dmrt1* (HQ110106), *ar* (HQ110107), and *cyp17a1* (HQ026486) were characterised and sent to GenBank. Primers for qPCR were designed based on the gene sequences characterised here (*dmrt1*, *cyp17a1*) and on sequences available in GenBank (Table 1).

Real-time RT-PCR was carried out using an Applied Biosystems instrument (ABI 7500). Reactions were performed in 20- μl volumes with 300 nM of each primer, 5 μl of a 1:10 dilution of the RT reaction, and the Kapa Sybr qPCR master mix, according to the manufacturer's instructions. The incubation steps used were: Holding stage (95°C for 5 min), Cycling stage (95°C for 15 sec, 60°C 1 min), and Melt Curve Stage (95°C 15 sec, 60°C 1 min, 95°C 30 sec, 60°C , 15 sec) followed by 40 PCR cycles.

The validity of the qPCR was confirmed through the analysis of the melting curves, checking amplified fragments in an agarose gel, and through sequencing. The Systemizing Quotient (SQ) values were calculated as described in Baron et al. (2005). The housekeeping gene used for data normalisation was β -actin. The relative expression was calculated as a percentage of the highest expression level recorded for each gene.

TABLE 1. Nucleotide Sequence of Real-Time PCR Primers and GenBank Accession Number for All Target Genes

Gene	Symbol gene name	GenBank accession number	Forward sequence	Reverse sequence	Size (bp)
androgen receptor	<i>ar</i>	DQ388357.1	TGAAGAAGATGAAGGAGCAGAAGAT	TCTCCCCAGTTTCATTCAAGC	227
	<i>lh</i>	AJ251656.1	CTGCAGAGAAGGAGGAATGT	GCGAAGATCCTTATAGGTGCA	152
cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	<i>cyp17a1</i>	HQ026486, ADM47436.1	TCACACACTCCAGTATTGGTG	CCATTCTTTTCATCTGATG	141
doublesex and mab-3-related transcription factor 1	<i>dmrt1</i>	HQ110106, ADW80327	GGCCCAGGTAGCACTGAGGA	GTTGTGGCTGGACAAACGGC	390 kb
insulin-like growth factor I	<i>igf1</i>	FJ428828.1	AGCTGAGCTTGTGGACAC	AAGCAGCACTCATTCACGAT	126 kb
sry-box containing gene 9	<i>sox9</i>	EU241882.1	AGCAGCAAAAACAAGCCT CA	AGTCCGCGTTGTGAAGAT	113 kb
steroidogenic acute regulatory protein	<i>star</i>	FJ205610.1	CAGAAGTCAATCAGCATCCT	TCAGCACCTTGTCTCCATTG	67 kb
β -actin	β -actin	FJ205611.1	TATCTGACCCTGAAGTACCC	CTCATCGTACTCCTGCTTGT	

Gene symbols and gene names are depicted according to the gene zebrafish nomenclature (www.zfin.org).

Histology

For histological analyses, the gonads were fixed for 24 hr in Bouin's fixative, and stored in 70% ethanol. They were then dehydrated, embedded in paraffin, cut to 5- μ m thick sections, and stained with Regaud hematoxiline, orange G, and aniline blue or Mayer haematoxylin and eosin (Gabe, 1968).

Database Search and Alignments

Homologous genes of interest were searched for using BlastP in the Ensembl database (www.ensembl.org/), UniProt (www.uniprot.org/), and the non-redundant (nr) database at NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Retrieved homologous sequences were screened semi-automatically to remove redundant sequences and to select representative species in groups of interest. Too-short or poorly annotated sequences were discarded manually from protein sequence alignments generated with Muscle v3.8.31 (Edgar, 2004) (www.drive5.com/muscle). Total protein sequence alignments as well as large phylogenies are available upon request. Phylogenetic analyses were first generated using BIONJ (Gascuel, 1997), implemented in Seaview Version 4.2.12 (Gouy et al., 2010) (pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html). Simplified trees were generated with a selection of well-annotated protein sequences of representative species from key taxonomic groups. In this sense, *A. baerii* sequences did not always meet these criteria, so we used an orthologous sequence for another sturgeon species instead. Maximum Likelihood phylogenetic trees were generated using PhyML (www.atgc-montpellier.fr/phyml/) (Guindon et al., 2010) using JTT as a substitution model and with robustness calculated by 1,000 bootstrap replicates.

Statistical Analysis

We carried out the comparative expression analysis of each gene for males and females. Both groups of data (male and female) were compared to find that the variances for most genes (*dmrt1*, *ar*, *lh*, *cyp17*, *igf1*) were not equal, and thus the results were analysed using the Mann–Whitney test. For *star*, the variances were equal and the results were analysed using the Student's *t*-test.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Walter Norbis (Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Uruguay) for his help in statistics; Dr. Daniel Carnevia, Dr. Alejandro Perreta and Dr. Maite Letamendía (Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Uruguay) for their help in the maintenance and sampling of fish, and Lic. Andrés Alberro for technical assistance. We also thank 'Esturiones del Río Negro' (Uruguay) for kindly providing the biological samples used in this work.

REFERENCES

- Amberg JJ, Goforth R, Stefanavage T, Sepúlveda MS. 2010. Sexually dimorphic gene expression in the gonad and liver of shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*). *Fish Physiol Biochem* 36:923–932.
- Barannikova IA, Bayunova LV, Geraskin PP, Semenkova TB. 2000. Content of sex steroid hormones in blood serum of the Acipenseridae in the marine life period at different gonad states. *J Ichthyol* 40:197–202.
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y. 2005. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 73:959–966.
- Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lécureuil Ch, Guillou F, Wegner M, Scherer G. 2009. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol* 327: 301–312.
- Berbejillo J, Bedó G, Brunet F, Volff JN, Vizziano D. 2010. Identificación de genes marcadores de la diferenciación sexual gonadal de una especie primitiva: El esturión siberiano *Acipenser baerii*. XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB), Piriápolis, Uruguay.
- Berishvili G, D'Cotta H, Baroiller JF, Segner H, Reinecke M. 2006. Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 146: 204–210.
- Blasco M, Fernandino JI, Guilgur LG, Strüssmann CA, Somoza GM, Vizziano-Cantonnet D. 2010. Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b* and their gene expression profile in pejerrey during early gonadal development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156:110–118.
- Blasco M, Somoza GM, Vizziano-Cantonnet D. 2012. Presence of 11-ketotestosterone in pre-differentiated male gonads of *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem*. DOI: 10.1007/s10695-012-9651-z [<http://www.springerlink.com/content/0920-1742/?k=blasco>]
- Borg B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol* 109:219–245.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227:239–255.
- Bowles J, Koopman P. 2001. New clues to the puzzle of mammalian sex determination. *Genome Biol* 2:1025.1–1025.4.
- Brennan J, Capel B. 2004. One tissue two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev* 5:509–521.
- Cresko WA, Yan YL, Baltrus DA, Amores A, Singer A, Rodriguez-Mari A, Postlethwait JH. 2003. Genome duplication, subfunction partitioning, and lineage divergence: Sox9 in stickleback and zebrafish. *Dev Dyn* 228:480–489.

- Cuisset B, Fostier A, Williot P, Benneteau-Pelissero C, Le Menn F. 1995. Occurrence and *in vitro* biosynthesis of 11-ketotestosterone in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt maturing females. *Fish Physiol Biochem* 14:312–322.
- Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VIP, Lützkendorf S, van de Kant HJG, Wegners M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891–1901.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797.
- Feist G, Van Eenennaam JP, Doroshov SI, Schreck CB, Schneider RP, Fitzpatrick MS. 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. *Aquaculture* 232:581–590.
- Fopp-Bayat D. 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homoga-metic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 305:174–177.
- Gabe M. 1968. Techniques histologiques. Paris: Masson. 1113 pp.
- Gascuel O. 1997. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685–6695.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224.
- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, Mcmeel OM, Martin SA, 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*). *Mol Reprod Dev* 54:154–162.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321.
- Haag ES, Doty AV. 2005. Sex determination across evolution: Connecting the dots. *PLoS Biol* 3:e21.
- Hale MC, Jackson JR, DeWoody JA. 2010. Discovery and evaluation of candidate sex493 determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser 494 fulvescens*). *Genetica* 138:745–756.
- Hall TA. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci* 109(8):2955–2959.
- Hattori RS, Fernandino JI, Kishii A, Kimura H, Kinno T, Oura M, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA, 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:e6548.
- Herpin A, Scharf M. 2011. Dmrt1 genes at the crossroads: A widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS J* 278:1010–1019.
- Hett AK, Pitra C, Jenneckens I, Ludwig A. 2005. Characterization of Sox9 in European Atlantic Sturgeon (*Acipenser sturio*). *J Hered* 96:150–154.
- Hong CS, Park BY, Saint-Jeannet JP. 2007. The function of Dmrt genes in vertebrate development: It is not just about sex. *Dev Biol* 310:1–9.
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 78:333–341.
- Keyvanshokook S, Gharaei A. 2010. A review of sex determination and searches for se-specific markers in sturgeon. *Aquacult Res* 41:e1–e7.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117–121.
- Koopman P. 2005. Sex determination: A tale of two Sox genes. *Trends Genet* 21:367–370.
- Lareyre JJ, Ricordel MJ, Mahe S, Goupil AS, Vizziano D, Bobe J, Guiguen Y, Le Gac F. 2008. Two new TGF beta members are restricted to the gonad and differentially expressed during sex differentiation and gametogenesis in trout. *Cybiurn* 32:202.
- Le Gac F, Loir M, Le Bail PY, Ollitrault M. 1996. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 44:23–235.
- Lokman PM, Harris B, Kusakabe M, Kime DE, Schulz RW, Adachi S, Young G. 2002. 11-Oxygenated androgens in female teleosts: Prevalence, abundance, and life history implications. *Gen Comp Endocrinol* 129:1–12.
- Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476:101–105.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male 1376 development in the medaka fish. *Nature* 417:559–563.
- Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel O, Lareyre JJ, Bernot A, Laudet V, Guiguen Y. 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta* 1493:180–187.
- McCormick CR, Bos DH, DeWoody JA. 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *J Appl Ichthyol* 24:643–645.
- Mola AE, Hovannisyan HG, Nazari RM, Ovissipour M. 2011. Early sex identification in cultured beluga (*Huso huso*) using plasma

- steroid hormones. *Afr J Biotechnol* 10:1959–1965. ISSN 1684–5315.
- Nagahama Y. 2005. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31:105–109.
- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. 2005. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:729–736.
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Scharl M. 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11778–11783.
- Piferrer F, Guiguen Y. 2008. Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev Fish Sci* 16:35–55.
- Raghuveer K, Garhwal R, Wang DS, Bogerd J, Kirubakaran R, Rasheeda MK, Sreenivasulu G, Tharangini NS, Nagahama Y, Senthikumar B. 2005. Effect of methyl testosterone- and ethynyl estradiol-induced sex differentiation on catfish, *Clarias gariepinus*: Expression profiles of DMRT1, cytochrome P450aromatases, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Fish Physiol Biochem* 31:143–147.
- Reinecke M, Schmid A, Ermatinger R, Löffing-Cueni D. 1997. Insulin-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: Gene sequence, tissue expression, and cellular localization. *Endocrinology* 138:3613–3619.
- Reinecke M. 2010. Insulin-like growth factors and fish reproduction. *Biol Reprod* 82:656–661.
- Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. 2002. Twenty pairs of sox: Extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 3:167–170.
- Schlueter PJ, Sang X, Duan C, Wood AW. 2007. Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Dev Biol* 305:377–387.
- Shibata Y, Paul-Prasanth B, Suzuki A, Usami T, Nakamoto M, Matsuda M, Nagahama Y. 2010. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr Patterns* 10:283–289.
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461:261–271.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
- Viñas J, Piferrer F. 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biol Reprod* 79:738–747.
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty Ch, Guiguen Y. 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn* 236:2198–2206.
- Vizziano D, Baron D, Randuineau G, Mahé S, Cauty C, Guiguen Y. 2008. Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biol Reprod* 78:939–946.
- Vollf JN, Zarkower D, Bardwell V, Scharl M. 2003. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol* 57:S241–S249.
- Wang DS, Kobayashi T, Zhou LY, Nagahama Y. 2004. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 320:83–89.
- Williot P. 2011. Sex determination and staging of gonads. In: *Biology and conservation of the European sturgeon, Acipenser sturio* L. 1758. The reunion of the European and Atlantic sturgeons. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. pp 369–382.
- Wuertz S, Gaillard S, Barbisan F, Carle S, Congiu L, Forlani A, Aubert J, Kirschbaum K, Tosi E, Zane L, Grillasca JP. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* 258:685–688.
- Zhou R, Liu L, Guo Y, Yu H, Cheng H, Huang X, Tiersch TR, Berta P. 2003. Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol Reprod Dev* 66:211–217.
- Yano A, Nicol B, Guerin A, Guiguen Y. 2011. The duplicated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) T-Box transcription factors 1, tbx1a and tbx1b, are up-regulated during testicular development. *Mol Reprod Dev* 78:172–180.
- Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2469–2474.