



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización y estudio de la expresión de la
aromatasa en gónadas durante el desarrollo del
esturión siberiano *Acipenser baerii***

André Eduardo Lasalle Gerla

Orientadora: Dra. Denise Vizziano Cantonnet

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

Tribunal:

Dr. Alí Saadoun

Dra. Laura Quintana

Dra. Denise Vizziano Cantonnet

Julio del 2016

Agradecimientos

Antes que nada quisiera agradecer a la Dra. Denise Vizziano Cantonnet, por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme sobre esta disciplina, sobre investigación, y por estar siempre a disposición y guiarme durante la realización de esta tesina. A Santiago Di Landro mi compañero de laboratorio, viajes al interior y largos muestreos, que me ayudó en la inserción, la adaptación y me enseñó a realizar el trabajo de laboratorio desde el primer momento. Al Dr. Walter Norbis quien me aconsejó sobre la realización de la estadística de este trabajo y a la Dra. Talita Mazzoni por ayudarme a identificar y definir la histología realizada. A la empresa Estuarios del Plata por recibirnos en sus instalaciones y colaborar en el transcurso de esta investigación. A Andrés Ryncowski, veterinario de la planta, así como a Lito Olivera y al resto de los operarios que nos ayudaron en todo momento durante los muestreos. A la ANII por la beca de Iniciación a la Investigación que hizo posible dedicarme a este trabajo de mejor manera.

Quiero agradecer a toda mi familia, en especial a mi madre, a mi hermana, a mi novia que me apoyaron en todo momento, y a mi viejo, mi amigo, a quien extraño cada día y que sin duda es uno de los principales responsables de que hoy haya llegado a este punto en mi carrera.

No puedo olvidarme de los compañeros de la facultad que hicieron que el camino de aquellos difíciles primeros años fuera mucho más llevadero, Ale, Mimi, Gabi, Florcita, Nachito y Mechi. Por último pero no por eso menos importante, gracias a mis hermanos de la vida, los que están siempre, en las buenas y las que no son tanto, con los que comparto todo hace más de 15 años, a Juancho, Sosa, Camilo, Pato, Enano, España, Topo, Gubba, Guillito, Sancho, y Winnia, unos "Capos", a ustedes muchas gracias.

Ahora solo queda perseverar y esperar que este camino, el de la investigación, traiga consigo grandes satisfacciones.....

"El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdadera"

Albert Einstein

¡Vamos por más!

Resumen

En muchos grupos de vertebrados la determinación sexual se produce por mecanismos genéticos (GSD), y por lo tanto queda establecido desde el momento de la fecundación, mientras que en otros la determinación es ambiental (ESD), influenciada por factores externos. La diferenciación sexual por otro lado, es el proceso por el cual una serie de eventos bioquímicos y moleculares finalizan en la formación de una gónada femenina o masculina. Los esturiones son peces filogenéticamente basales, para los cuales ninguno de los dos procesos han sido profundamente estudiados. Los esteroides son considerados los principales inductores del proceso de diferenciación del sexo en vertebrados, y la aromatasa es la enzima fundamental en el proceso de la esteroidogénesis, siendo la responsable de transformar los andrógenos en estrógenos. La hipótesis planteada es que la aromatasa sería clave en el proceso de diferenciación sexual de la vía femenina en esturiones, así como lo es en los peces teleósteos que se han estudiado hasta la fecha. Para verificar la hipótesis se realizó en primer lugar un estudio filogenético de la secuencia obtenida en el transcriptoma gonadal del esturión siberiano, confirmándose que la misma se trata de la aromatasa gonadal (*cyp19a1a*). También se comparó la secuencia de aromatasa cerebral estableciéndose que el esturión siberiano tiene una sola aromatasa expresada tanto en gónada como en cerebro. Luego se caracterizaron los perfiles de expresión del gen que codifica para la aromatasa gonadal (*cyp19a1a*) durante el período de diferenciación sexual del esturión siberiano cubriendo el período entre los 3 y 9 meses de edad, utilizando 20 individuos por mes. La gónada de cada uno de estos individuos fue analizada para definir se trataba de individuos indiferenciados sexualmente, de machos o de hembra. Esto permitió precisar que la diferenciación sexual ocurre entre los 8 y los 9 meses. Previo a la diferenciación sexual, se reportó una expresión máxima de aromatasa en las gónadas de individuos de 4 meses ($p < 0,05$) confirmando que la aromatasa

cumpliría un papel importante en el proceso de diferenciación molecular que precede la diferenciación sexual o morfológica de la gónada. Los 4 meses aparecen como un momento crítico durante el proceso de diferenciación molecular del sexo de los esturiones. Se observó además que los niveles de expresión de hembras fueron en promedio superiores a los de los machos, aunque las diferencias no resultaron significativas como era esperado, posiblemente debido a la alta variabilidad de los resultados y el número bajo de muestras empleado. Los resultados histológicos, mostraron que la mayoría de los individuos se encontraban diferenciados recién a los 9 meses de edad, un poco más tarde que lo observado previamente. La falta de un marcador genético del sexo nos impide concluir si las hembras poseen durante la diferenciación molecular del sexo niveles superiores de expresión respecto de los machos. De todas formas los datos hacen pensar que no hay un 50% de individuos con expresión alta y un 50% con expresión baja como hipotetizamos. Esto abre interrogantes sobre el sistema de determinación sexual del esturión siberiano que actualmente se postula es un sistema monofactorial con hembras heterogaméticas del tipo ZW. No se descarta que existan factores ambientales que influyan sobre el proceso de diferenciación del sexo en la especie.

Índice

1 Introducción y antecedentes

1.1 Determinación sexual

1.2 Diferenciación sexual

1.3 Involucramiento de los esteroides sexuales en la diferenciación del sexo

1.4 Antecedentes y ejemplos en teleósteos y esturiones

1.5 Aromatasa una enzima clave

1.6 Características generales de los esturiones

1.7 Enfoque del trabajo

2 Hipótesis de trabajo y objetivos

Hipótesis

Objetivos generales

Objetivos específicos

3 Materiales y métodos

3.1 Estrategia experimental

3.2 Trabajo de campo

3.2.1 Animales de estudio

3.2.2 Obtención de gónadas

3.3 Trabajo de laboratorio

3.3.1 Trabajo *in silico*

3.3.2 Cebadores de aromatasa

3.3.3 Extracción de ARN

3.3.4 Retrotranscripción

3.3.5 PCR en tiempo real

3.3.6 Análisis de datos de qPCR

3.3.7 Histología

3.3.8 Análisis estadístico

4 Resultados

5 Discusión

6 Bibliografía

Introducción

1.1 Determinación sexual

La determinación sexual refiere a como el sexo de un individuo se define. Entre los vertebrados esto puede producirse de varias maneras. En muchos grupos la determinación sexual se produce por mecanismos genéticos (GSD del inglés genetic sex determination), y por lo tanto queda establecido desde el momento de la fecundación, mientras que en otros la determinación es ambiental (ESD del inglés environmental sex determination), y se produce post fecundación por la influencia de factores externos (Bull 1983). En el caso de los mamíferos (XX/XY) el sexo está determinado de forma genética (GSD), por la presencia o ausencia del gen *SRY* que se localiza en el cromosoma Y de los machos (Sinclair et al. 1990). La presencia de este gen desencadena las cascadas bioquímicas que llevan al desarrollo de los testículos, mientras que su ausencia deriva en el desarrollo de ovarios (Sinclair et al. 1990; Koopman et al. 1991; Goodfellow y Lovell-Badge 1993; Solari 1993). Para el grupo de las aves también se encontró un mecanismo de determinación sexual genético. A diferencia de lo que se observó en mamíferos, en las aves los individuos homogaméticos a nivel de los cromosomas sexuales (ZZ) son machos, mientras que las hembras son las heterogaméticas (ZW). Smith et al. (2009) demostraron que la determinación del sexo está dada por el doble dosaje del gen *DMRT1* en los machos.

Para los reptiles y los peces la determinación sexual se vuelve más compleja, esto es porque además de la GSD, se produce en varios casos una determinación del sexo mediada por el ambiente (ESD), y más específicamente por la temperatura (TSD del inglés temperature sex determination). Cuando existe este tipo de determinación se observa una desviación de la proporción normal de hembras y machos (1:1) que

debería haber en la descendencia de aquellos organismos con determinación genética del sexo (Devlin y Nagahama 2002; Valenzuela et al. 2003). En varias especies de lagartijas y serpientes se han encontrado cromosomas sexuales, indicando que para estos la determinación del sexo ocurriría por vía genética (Beçak et al. 1964; Gorman 1973; Georges et al. 2010). Sin embargo, en otras especies de estos mismos grupos la determinación del sexo está dada por la temperatura (Bull 1980). Además de las serpientes y lagartijas la temperatura afecta también a la mayoría de especies de cocodrilos y de varias de tortugas (Pieau 1975; Bull y Vogt 1979; Yntema y Mrosovsky 1979; Georges et al. 2010). En los peces el sistema de determinación sexual tampoco admite una generalización, y es posiblemente uno de los grupos con más variabilidad a este nivel, lo que hace muy difícil estudiar cómo se determina el sexo. El estudio de los cariotipos para distinguir cromosomas sexuales no es una tarea complicada pero hay que tener especialistas en citogenética que establezcan el cariotipo. Además, el problema fundamental es que en la mayoría de las especies de peces los cromosomas resultan homomórficos (Beçak 1983; Yamazaki 1983; Tave 1986). Esto impide la identificación del sexo por este método y por lo tanto cual es el sexo heterogamético que nos daría una idea del sistema de determinación sexual. Más allá de lo mencionado anteriormente, existen varias especies para las cuales hay presencia de cromosomas sexuales, y sus sistemas también son variables. Las hay tanto XX/XY como es el caso de *Salmo gairdneri* (Thorgaard 1977), ZZ/ZW como sucede para *Parodon hilarii* y *Triportheus guentheri* (Bertollo y Cavallaro 1992; Moreira-Filho et al. 1993), e incluso algunas especies pueden llegar a tener tanto machos como hembras heterogaméticas y con influencia de genes presentes en cromosomas autosomales, lo que sucede en el caso del guppy, *Poecilia reticulata* (Volff y Schartl 2001). Otras especies determinan su sexo genéticamente, pero lo hacen por la influencia de varios cromosomas autosomales a la vez, en estos casos se habla de una determinación

polifactorial, ya que son varios genes distribuidos en varios cromosomas que llevan finalmente a que se establezca un sexo u otro (Kallman 1984). Para complicar aún más el panorama del estudio de la determinación del sexo en peces, se ha visto que no existe un gen determinante común en aquellos peces que son GSD. En las especies para las cuales se ha encontrado el gen determinante siempre ha sido uno distinto (ver Tabla 1) lo que hace muy difícil encontrar el de una especie nueva, ya que no existe un patrón a seguir (Matsuda et al. 2002; Hattori et al. 2012; Kamiya et al. 2012; Myosho et al. 2012; Yano et al. 2012; Takehana et al. 2014).

Tabla 1. Especies de teleósteos y sus respectivos genes determinantes del sexo

Nombre común	Nombre científico	Gen determinante	Función	bibliografía
Medaka	<i>Oryzias latipes</i>	<i>dm-Y</i>	factor de transcripción	(Matsuda et al. 2002)
Medaka	<i>Oryzias luzonensis</i>	<i>gsdf-Y</i>	Derivado de un factor de crecimiento (familia de proteínas TGF- β)	(Myosho et al. 2012)
Medaka	<i>Oryzias dancena</i>	<i>sox3</i>	Factor de transcripción	(Takehana et al. 2014)
Pejerrey	<i>Odontesthes hatcheri</i>	<i>amh-Y</i>	Hormona antimulleriana (familia de proteínas TGF- β)	(Hattori et al. 2012)
Pez globo	<i>Takifugu rubripes</i>	<i>amhR2</i>	Receptor de amh (familia TGF- β)	(Kamiya et al. 2012)
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>sd-Y</i>	Factor relacionado con el sistema inmune	(Yano et al. 2012)

Al igual que los reptiles, varias especies de peces son sensibles a la determinación del sexo por efectos ambientales (ESD). El pH por ejemplo es una condición ambiental que puede afectar la determinación del sexo en peces (Rubin 1985), pero la condición ambiental fundamental cuando hablamos de ESD es la temperatura. Esto ocurre por ejemplo para tilapia y pejerrey, cuando las larvas son

incubadas a ciertos rangos de temperatura ocurren desvíos de la proporción de sexos que debería ocurrir normalmente (1:1) (Conover y Fleisher 1986; Desprez y Mélard 1998; Abucay et al. 1999; Baroiller y D'cotta 2001). En el caso de *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes argentinensis* bajas temperaturas de incubación (17°C) llevan a la producción de poblaciones monosexo hembras mientras que temperaturas más altas (29°C) llevan que la futura población este conformada por 100% de individuos machos, mientras que las temperaturas intermedias (19°C-27°C) generan proporciones sexuales más cercanas a 1:1 (Strüssmann et al. 1996; Strüssmann et al. 1997).

1.2 Diferenciación Sexual

La diferenciación sexual es el proceso por el cual una serie de eventos bioquímicos y moleculares finalizan en la formación de una gónada femenina o masculina. La gónada inicialmente indiferenciada tiene como característica la propiedad de la bipotencialidad, es decir a partir de un esbozo común (una gónada por definición tiene tejido germinal y tejido somático o sea por lo menos dos tejidos) y según los factores moleculares que se expresen durante el período de diferenciación, se formará un ovario o un testículo (Brennan y Capel 2004). Este proceso se produce por la acción conjunta de múltiples genes, es un proceso extremadamente complejo y ocurre en un período temporal acotado (“ventana temporal”), a la que se le llama período de diferenciación molecular. En vertebrados se han identificado varios genes involucrados en las cascadas bioquímicas de diferenciación sexual. Algunos de los genes involucrados en la vía de diferenciación femenina son *FOXL2*, *FST*, *CYP19A1*, *WNT4* y *BMP2* mientras que otros como *SOX9*, *NR5A1 (SF1)*, *NROB1 (DAX1)*, *DMRT1*, *ARX*, *DHH*, *AMH*, *GSDF* son claves para un completo desarrollo testicular (Brennan y

Capel 2004; Yao 2005; Vizziano et al. 2007; Jiang et al. 2016; Xie et al. 2016). En peces, una de las estrategias utilizadas para estudiar cómo funciona la diferenciación sexual es el uso de especies en las que se puedan generar poblaciones monosexo mediante tratamientos hormonales y cruzamientos, o por temperatura. Esto hace que podamos estudiar mediante técnicas de biología molecular los procesos bioquímicos que ocurren en etapas muy tempranas, sabiendo desde un primer momento, incluso previo al comienzo del experimento, cual será a futuro el sexo del individuo utilizado (Piferrer y Guiguen 2008). Distintas especies tienen tiempos distintos de diferenciación sexual, así algunos se diferencian antes de la eclosión como es el caso de *Austrolebias charrua* (Arezo et al. 2007), otras lo hacen pocas horas o días luego de la eclosión, mientras que otras lo hacen en etapa juvenil en animales de varios meses de vida como es el caso del esturión siberiano y otras especies de esturión (Chen et al. 2006; Grandi y Chicca 2008; Rzepkowska y Ostaszewska 2014; Vizziano-Cantonnet et al. 2016). Incluso para ciertas especies la diferenciación del sexo es dependiente del tamaño y no así de la edad de los individuos. En este tipo de diferenciación los individuos que muestran crecimientos más rápidos suelen ser hembras, es el caso que se observa para *Danio rerio* y *Dicentrarchus labrax* (Blázquez et al. 1999; Lawrence et al. 2008).

1.3 Rol de los esteroides sexuales en la diferenciación del sexo

La idea de que los esteroides sexuales son los principales responsables de la diferenciación sexual (Yamamoto 1969) se sigue manteniendo hasta el día de hoy (Baroiller et al. 1999; Nagahama 2000; Devlin y Nagahama 2002; Piferrer y Guiguen 2008; Guiguen et al. 2010). Los esteroides sexuales son hormonas producidas a partir de un sustrato inicial que es el colesterol. Varias enzimas participan de lo que conocemos como la ruta esteroidogénica en la cual se producen los esteroides

sexuales (progestágenos, andrógenos y estrógenos) (Fostier et al. 1983; Nagahama 1994; Nagahama 2000). Estos esteroides son mayormente producidos en las gónadas, los andrógenos se encuentran tanto en los testículos como en los ovarios, siendo en estos últimos precursores de los estrógenos. En los testículos los andrógenos son producidos en células somáticas, más específicamente células de Leydig mientras que los estrógenos son producidos mayormente en ovarios, y se forman en las células de la teca (células somáticas). Es justamente en las células de la teca que se encuentra la maquinaria necesaria para transformar los andrógenos (testosterona) en estrógenos mediante la intervención de la enzima aromatasa (Nagahama 1997). Se ha observado que la administración de estrógenos causa la inversión fenotípica del sexo sobre varios grupos de vertebrados (Baroiller et al. 1999). Esto se ha demostrado mediante experimentos, administrando estrógenos a machos de aves, reptiles, marsupiales, y peces teleósteos donde posteriormente al tratamiento se ha observado la inversión del sexo a fenotípico a hembras (Scheib 1983; Merchant-Larios et al. 1997; Baroiller et al. 1999; Guiguen 2000; Coveney et al. 2001; Piferrer 2001). Exactamente lo contrario sucede al menos en tres de estos grupos (peces, aves y reptiles) al administrar un inhibidor de la enzima aromatasa (IA), en este caso se observa una inversión del sexo femenino al masculino (Wibbels y Crews 1994; Baroiller et al. 1999; Guiguen 2000; Belaid et al. 2001; Hudson et al. 2005). En peces los experimentos con IA fueron exitosos sobre muchísimas especies, por ejemplo en el salmón real, trucha arcoíris, lenguado japonés y en la carpa común entre otros (Piferrer et al. 1994; Guiguen et al. 1999; Kitano et al. 2000; Afonso et al. 2001; Kwon et al. 2002; McAllister y Kime 2003; Fenske y Segner 2004; Tzchori et al. 2004; Uchida et al. 2004; Komatsu et al. 2006; Rashid et al. 2007), demostrando que los estrógenos son esenciales en la formación ovárica. Yendo más lejos aún, Nakamura et al. (2003) demostraron mediante tratamientos con IA que podía llegar a producirse una reversión del sexo, es decir

producir la inversión fenotípica de la gónada en un período posterior a la diferenciación sexual. Este experimento fue exitoso cuando masculinizaron una tilapia adulta en forma parcial pero funcional, lo que hasta ese momento no se creía posible. Esto mismo pudo llevarse a cabo tiempo después con la carpa común (*Cyprinus carpio*). Esto aporta un nuevo papel para los estrógenos demostrando que además de estar íntimamente ligados con la diferenciación ovárica, los mismos son esenciales para la manutención de la gónada femenina durante el resto de la vida del individuo (Guiguen et al. 2010).

Así como los estrógenos son importantes inductores de la diferenciación ovárica, algunos andrógenos son inductores de la diferenciación testicular (Strüssmann y Nakamura 2002). La inversión del sexo de hembras genéticas a machos fenotípicos ha sido lograda en medaka, goldfish, tilapia, guppy, zebrafish, trucha arcoíris, salmón atlántico, salmón coho y salmón chinook (Yamazaki 1983). Existen diferentes andrógenos capaces de producir la inversión del sexo, siendo el más eficiente la 11 ketotestoterona aunque también cumplen su cometido la testosterona, androstenediona, y androsterona pero a mayores dosis (Yamazaki 1983; Pandian y Sheela 1995; Baroiller et al. 1999; Guiguen 2000). Se ha observado también que la 17 α -metiltestosterona y la dihidrotestosterona tienen un buen efecto masculinizante por ejemplo sobre la tilapia, la lubina, y la trucha (Blázquez et al. 1995; Golan y Levavi-Sivan 2014), así como también en esta última especie la 11 β -hidroxiandrostenediona que invierte a las hembras genotípicas a machos fenotípicos funcionales con buenos resultados en la práctica (Feist et al. 1995).

1.4 Antecedentes en nuestro modelo de estudio, el *Acipenser baerii*

El laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces, en el cual he desarrollado el trabajo de tesis, es pionero en estudios de expresión de genes

relacionados con la diferenciación y determinación sexual en el esturión siberiano. Uno de los primeros trabajos publicados sobre esta temática se basó en la búsqueda de genes candidatos para la diferenciación sexual y la expresión de los mismos en diferentes tejidos. Se identificaron genes que se relacionan con el desarrollo testicular mediante revisión bibliográfica. Los genes seleccionados fueron *dmrt1*, *sox9* (factores que se estudiaron en las células de Sertoli) *cyp17a1* y *star* (factores estudiados de células de Leydig), y *ar* (receptor de andrógenos), *lh* (hormona luteinizante) e *igf1*. Se ha visto que estos genes están sobre-regulados en las gónadas de trucha durante la diferenciación (Baron et al. 2005b), razón por la cual fueron elegidos para el estudio. Los resultados obtenidos en gónadas de esturión siberiano ya diferenciados mostraron patrones dimórficos con una sobre regulación en la expresión de todos los genes seleccionados en los machos, exceptuando a *sox9*, para el cual no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hembras y machos. Así este primer estudio demostró que hay conjuntos de genes con patrones de expresión masculinos relacionados con la diferenciación testicular (Berbejillo et al. 2012). Otro de los trabajos realizados por Berbejillo et al. (2013) más focalizado sobre la expresión de los genes *dmrt1* y *sox9* demuestra que hay una expresión dimórfica de *dmrt1* durante el período previo a la diferenciación morfológica de la gónada del esturión, pero no pasa lo mismo con *sox9*, sin embargo en un período más tardío (3 años), las gónadas de los individuos analizados muestran una expresión dimórfica de los dos genes, ambos sobre expresados en las gónadas masculinas. Además, se ha caracterizado y estudiado la *amh* tanto durante el período de indiferenciación como de post diferenciación del sexo en el esturión siberiano. El trabajo abarcó la gónada así como otros tejidos y obtuvo resultados que mostraron la expresión importante de este gen en branquia, hígado y cerebro además de en la gónada. La *amh* mostró niveles de expresión muy elevados en las gónadas completamente indiferenciadas de esturiones de 3 y 4 meses

de edad. Lo cual aportó a la identificación del momento de diferenciación sexual de estos peces. Sin embargo, el patrón dimórfico con mayor expresión en machos que se esperaba durante la gametogénesis solo se observó a los 9 y 10 meses de edad, perdiéndose más tarde en el desarrollo (Di Landro 2014, Tesina de grado).-

1.5 La aromatasa

La aromatasa también conocida como CYP19A1, es una enzima codificada por el gen *CYP19A1A*. Este gen se encuentra muy conservado y cumple el rol esencial de convertir andrógenos en estrógenos (Fostier et al. 1983). El gen *CYP19A1A* pertenece a la superfamilia de genes del citocromo P-450. Esta superfamilia se compone de 100 familias, dónde a su vez el P450aromA es el único miembro de la familia 19 y subfamilia A (Simpson et al. 1994; O'donnell et al. 2001; Simpson et al. 2002). La aromatasa tiene una distribución amplia, encontrándose expresada en varios tejidos. En mamíferos, ha sido detectada en gónadas (masculinas y femeninas), cerebro, hígado, tejido adiposo, así como en la placenta y en numerosos tejidos fetales (Simpson et al. 1994). Las aves presentan aromatasa a nivel cerebral, así como en hígado, músculo y en la glándula adrenal (Silverin et al. 2000), y los peces en cerebro, ovarios y testículos, riñón, corazón, músculo, piel y agallas (Piferrer y Blázquez 2005). Más allá de estos grupos la aromatasa a nivel cerebral se ha detectado para todos los vertebrados (Callard et al. 1978).

Además, en los peces teleósteos (después de la 3R) existen dos isoformas de la aromatasa, las cuales están codificadas por genes parálogos. Uno de ellos da lugar a la aromatasa A (*CYP19A1A*) también conocida como aromatasa gonadal ya que es el lugar donde se encuentra con mayor expresión, y su parálogo a la aromatasa B (*CYP19A1B*) o aromatasa cerebral que se expresa mayoritariamente en cerebros. Estas

dos formas de la aromatasa según estudios deben haber surgido debido a una duplicación completa del genoma ocurrida dentro de los Actinopterigios (Jaillon et al. 2004). En este trabajo y utilizando el transcriptoma de la gónada y del cerebro generados en el Laboratorio, se investigó *in silico* si había una o dos formas de aromatasa en esturiones.

En los peces la aromatasa gonadal se expresa mayormente en ovarios y mucho menos en testículos, sin embargo los niveles de expresión de la aromatasa gonadal no dependen únicamente del sexo del individuo sino que también son afectados por la edad y el estado reproductivo del mismo (Piferrer y Blázquez 2005). La aromatasa actúa como una enzima en la ruta esteroidogénica, utilizando como sustrato a la androstenediona o a la testosterona para producir estrona o estradiol (E_2) respectivamente. Como se mencionó anteriormente el E_2 juega un papel crucial para que se produzcan correctamente procesos fisiológicos durante el desarrollo de los vertebrados incluyendo el crecimiento, la reproducción y la diferenciación sexual (Simpson et al. 2002). Este gen es importante para la diferenciación ovárica, se ha observado en varias especies que en las hembras los ovarios presentan una expresión elevada del gen. Esta expresión en algunas especies es completamente dimórfica y muy temprana lo que permite que sea utilizado como un excelente marcador del sexo (Guiguen et al. 1999; D'cotta et al. 2001; Vizziano et al. 2007; Ijiri et al. 2008).

A nivel del cerebro la aromatasa también cumple un importante papel en lo que es la diferenciación sexual de este órgano en particular. Los primeros estudios realizados en aves cantoras por Schlinger y Arnold (1991) mostraron los altos niveles de aromatasa cerebral en machos, tendencia que luego fue verificada en muchísimas otras especies (Forlano et al. 2006). El comportamiento del canto es un rasgo puramente masculino y al tratar hembras jóvenes en un período de 3 semanas post nacimiento con estradiol se observó que estas desarrollaron el comportamiento del

canto de los machos. Los estrógenos cumplen el rol de activar los comportamientos masculinos de los individuos, sin embargo no generan un cambio sobre el órgano a nivel organizacional (Schlinger 1998). Esto fue una clara evidencia de que los altos niveles de expresión de aromatasa cerebral y por consiguiente los estrógenos allí formados juegan el papel de masculinizar el cerebro a nivel de las áreas vinculadas al comportamiento. Así, según los niveles de CYP19A1B que haya en el cerebro, los individuos desarrollaran los comportamientos correspondientes a su sexo. En teleósteos se han encontrado varios ejemplos de expresión dimórfica de la aromatasa cerebral, algunas veces con expresión en hembras y otras en macho (Forlano et al. 2001; Trant et al. 2001; Blázquez y Piferrer 2004; Goto-Kazeto et al. 2004; Vizziano-Cantonnet et al. 2011) lo que no deja determinar realmente que cometido debe cumplir, pero se presume que puede relacionarse directamente con el comportamiento y la diferenciación sexual del cerebro (Trant et al. 2001; Forlano et al. 2006).

La regulación de la aromatasa gonadal está basada en un circuito de regulación positiva (Guiguen et al. 2010) en el cual se involucran íntimamente los estrógenos y el gen *Foxl2*. Este último gen además, está ligado a la vía de diferenciación ovárica tanto de mamíferos (Baron et al. 2005a), como de aves (Govoroun et al. 2004) y peces (Baron et al. 2004; Wang et al. 2007). Trabajos realizados en trucha arcoíris por Baron et al. (2004) muestran que los estrógenos son capaces de sobre regular a *foxl2* y a su vez este último sobre regula a *cyp19a1a* (Wang et al. 2007), así se cerraría el circuito esencial en el inicio de la diferenciación ovárica. Por otro lado se ha demostrado en mamíferos que la expresión de la aromatasa es fuertemente inhibida por la *AMH* durante el período de diferenciación del sexo (Josso et al. 1998), así como también es reprimida cuando se expresa el gen *DAX1*, ambos necesarios para el buen funcionamiento de las vías de desarrollo masculino (Wang et al. 2001). Durante mi

trabajo como becario ANII de grado, participé en estudios de expresión de la aromatasa en gónadas de esturión siberiano que dieron lugar a un artículo del cual soy co-autor (Vizziano-Cantonnet et al. 2016) y a través del cual se pudo identificar el período de diferenciación molecular del sexo de esta especie. A su vez se observó que la aromatasa tuvo dos picos de expresión el primero se produjo a los 3 y 4 meses y luego decayó, y se produjo un nuevo pico durante el período post diferenciado entre los 8 y 14 meses. Los resultados indicaron que la aromatasa parece ser un importante gen en la regulación de la diferenciación ovárica para la especie. Esto nos llevó a investigar en mayor profundidad los perfiles de expresión de la aromatasa durante el período de diferenciación molecular del sexo y los inicios de la diferenciación sexual.

1.6 Esturiones

Los esturiones son peces filogenéticamente basales, están presentes en el planeta desde hace por lo menos 200 millones de años, es decir desde el inicio del período Jurásico (Jin 1995; Bemis et al. 1997). Los cambios sufridos por este grupo a nivel evolutivo desde su aparición fueron mínimos, esto hace que sean llamados comúnmente fósiles vivientes. Pertenecen al orden de los acipenseriformes, hoy en día integrado por 25 especies que son representantes de la familia acipenseridae (verdaderos esturiones) repartidas en 4 géneros (*Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus* y *Pseudoscaphirhynchus*) (Rochard et al. 1990; Bemis et al. 1997).

Los esturiones tienen ciertas características que los distinguen claramente del resto de los peces óseos. Antes se los clasificaba en la subclase chondrostei, y como su nombre lo indicaba, poseen en gran parte un esqueleto cartilaginoso (chondros) y además otra parte ósea (ósteos). Actualmente estudios de genética molecular resultaron en la exclusión del grupo de la subclase chondrostei (Li et al. 2008).

Presentan características primitivas como su cola heterocerca, su piel con escamas ganoides y la presencia de la notocorda que permanece hasta estadíos adultos (Birstein 1993; LeBreton et al. 2005). Otras de las características generales del grupo son que su cuerpo es alargado y sus aletas pectorales son planas al igual que su vientre, lo que les permite posarse sobre los lechos de los ríos que habitan. Tienen *rostrum* ahusado, y poseen placas óseas o escudos distribuidos longitudinalmente a cada lado de su cuerpo. Su mandíbula es protráctil, esta característica se debe a que no está unida directamente al cráneo, no tienen dientes y en casi la totalidad de los individuos de las diferentes especies está ubicada en la parte inferior de su cabeza, facilitando su alimentación que se compone principalmente de organismos del bentos. Algunas pocas especies como el esturión kaluga o el beluga la tienen posicionada hacia al adelante ya que son piscívoros y muy buenos cazadores (Polyaninova et al. 1999). Todas las especies actuales de esturiones poseen barbas con la cuales sensan el fondo para obtener su alimento (Miller 2005).

La distribución natural de los esturiones ocurre únicamente en el hemisferio norte, en el continente asiático, en Europa y en América del Norte (Bemis y Kynard 1997; Billard y Lecointre 2000). La evidencia paleontológica obtenida hasta la fecha actual sugiere que el origen de los esturiones se produjo en Europa occidental durante el período Triásico (Grande y Bemis 1996), las primeras especies en la región del mar de Tetis, y más tarde nuevas especies surgieron en la costa este de América del Norte (Birstein et al. 1997).

Según estudios realizados sobre las historias de vida de los esturiones, las diferentes especies realizan distintos tipos de migraciones, teniendo como objetivo la alimentación, y la reproducción, que se produce siempre en agua dulce (ríos) (Paragamian y Kruse 2001; Heublein et al. 2009). Las migraciones río abajo se producen durante el período de búsqueda de alimento, ya que este es más abundante

en zonas estuarinas, mientras que las migraciones río arriba serían para encontrar las zonas de desove. Las mismas zonas de desove serán utilizadas en cada período de puesta ya que son las elegidas por tener las condiciones fisicoquímicas que les aseguran un mejor éxito reproductivo (Waldman et al. 1996; Wirgin et al. 1997).

Los patrones migratorios son variados entre los grupos de esturiones, los hay diádromos es decir que migran entre zonas de agua dulce y de agua salada (McDowall 1988; McDowall 1992). En una sub-clasificación de los diádromos encontramos a los peces anádromos, que son aquellos que pasan la mayor parte de su vida en el mar e ingresan a zonas de agua dulce como los ríos al momento de la reproducción, (Myers 1949; McDowall 1988; McDowall 1992) como lo hacen las especies de género *Huso* (McEnroe y Cech Jr 1987). Otra sub-clasificación dentro de los diádromos son los anfídromos, cuyas migraciones son desde agua dulce hacia agua salado o a la inversa pero sin tener como objetivo final la reproducción (McDowall 1992). Dentro de los esturiones solo una de las especies es anfídroma, se trata del esturión hociquicorto (*Acipenser brevirostrum*) (Kynard 1997; Billard y Lecointre 2000). El otro grupo que encontramos es el de los peces potádromos, que realizan movimientos únicamente entre cuerpos de agua dulce (Gresswell et al. 1997; Quiros y Vidal 2000). Dentro de los esturiones, aquellos del género *Scaphirhynchus* tienen este tipo de patrón migratorio (Bemis et al. 1997).

Los esturiones son peces de desarrollo lento, que llegan a grandes tamaños y son muy longevos. El esturión siberiano, el cual es nuestro modelo de estudio, tarda alrededor de 18 años en llegar a la madurez sexual en la naturaleza, aunque en condiciones de cautiverio en Uruguay le basta solo con 5 años (Ryncowski no publicado). Esa misma especie llega a vivir aproximadamente unos 60 años, a medir un máximo de 3 metros y pesar hasta 200 kilogramos (Billard y Lecointre 2000).

Los estudios de ginogénesis realizados en distintos esturiones sugieren que poseen un mecanismo de determinación sexual genético de tipo ZZ/ZW (Van Eenennaam et al. 1999; Omoto et al. 2005; Flynn et al. 2006; Fopp-Bayat 2010; Saber y Hallajian 2014) aunque esto no está aún del todo claro. El período de diferenciación sexual suele ser largo también, de varios meses, lo que lo hace un excelente modelo para su estudio. Las primeras señales físicas de diferenciación se pueden comenzar a observar a los 6 meses de edad, pero varían según la especie (Chen et al. 2006; Grandi y Chicca 2008; Zhang et al. 2012; Rzepkowska y Ostaszewska 2014). En el último año un trabajo realizado en nuestro laboratorio (Vizziano-Cantonnet et al. 2016) mostró que el esturión siberiano *A. baerii* cultivado en Uruguay se diferencia sexualmente a los 8 meses, con un período previo de diferenciación molecular que ocurre durante los meses 3 y 4. Además de esto, aún no se conoce ningún marcador genético del sexo para las diferentes especies de esturión por más que se han realizado varios trabajos buscando tener una respuesta a esta pregunta (Keyvanshokoooh y Gharaei 2010).

Actualmente el estado de conservación de los esturiones es delicado, con la mayoría de sus especies amenazadas según los estándares de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) lo que supone el riesgo de una posible extinción de muchas de ellas (Holčík 1989; Williot et al. 2002; IUCN 2015). La sobrepesca, contaminación de ríos con pesticidas y metales pesados y la construcción de represas que impiden que se produzcan las migraciones reproductivas fueron y aún son algunas de las causas que llevan a que los esturiones estén en esta situación crítica (Bacalbasa-Dobrovici 1991; Zaitsev 1993; Bacalbaşa-Dobrovici 1997; Wei et al. 1997; Krüger y Pudenz 2002). Uruguay se posiciona hoy en día como un país emergente en la producción de caviar con altos estándares de calidad a nivel mundial. Hay varios emprendimientos establecidos y funcionando en los cuales se utilizan 4 especies para la producción, el esturión siberiano (*A. baerii*), el esturión ruso (*Acipenser*

gueldenstaedtti), el sterlet (*Acipenser ruthenus*) y el último de los introducidos para la cría el esturión beluga (*Huso huso*). Uno de los problemas más importantes que se encuentran a nivel de la acuicultura del esturión es el no tener la posibilidad del sexado de los individuos tempranamente. Los esturiones son sexados actualmente luego del primer año de edad mediante ecografía, o mediante canulación, generando a la empresa altos costos y mucha pérdida de capital sobre todo en lo que es la alimentación de individuos machos que serán improductivos ya que no generarán caviar.

1.7 Enfoque del trabajo

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la expresión del gen de la aromatasa a nivel gonadal con el fin de comprender si al igual que en peces modernos como los teleósteos la aromatasa se expresa en altos niveles durante la diferenciación sexual del esturión, que es un pez muy antiguo.

Es por ello que esta tesis se enfocó en entender en primer lugar si había una o dos formas de aromatasa en esturiones, y cuál era la identidad de la aromatasa obtenida en el transcriptoma gonadal y cerebral del esturión siberiano generado en el laboratorio. En segundo lugar y centrándonos en la secuencia obtenida en la gónada se estudió como ocurre la cinética de la expresión de la aromatasa que identificamos previamente como aromatasa gonadal (*cyp19a1a*) durante el período de la diferenciación sexual del esturión siberiano *Acipenser baerii*, y el cometido que esta pueda cumplir durante este período. Este trabajo intenta confirmar si al igual que en peces teleósteos la aromatasa se puede considerar un buen marcador femenino. En base a ello se podrán caracterizar las futuras hembras aún no diferenciadas y establecer así la búsqueda de un marcador genético del sexo. Esto último tendría una

relevancia en aspectos de investigación fundamental y se insertaría también como una solución para el sector productivo.

2 Hipótesis general

La hipótesis de trabajo es que el rol de los estrógenos como actores fundamentales de la diferenciación sexual en las hembras es altamente conservado y que, al igual que en los peces teleósteos, actúan tempranamente en el proceso de diferenciación ovárica del esturión. Se plantean como predicciones para este estudio, que habrían dos tipos de expresión en los individuos indiferenciados: expresión alta en futuras hembras potenciales y expresión baja en futuros machos potenciales.

2.1 Objetivo general

Estudiar los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo del ovario del esturión siberiano.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar *in silico* si existen una o dos aromatasas en peces basales utilizando el transcriptoma gonadal y cerebral generado por nuestro laboratorio.
2. Amplificar el gen de la aromatasa expresada en la gónada a partir de la secuencia homóloga obtenida previamente en el laboratorio.
3. Caracterizar los niveles de expresión de la aromatasa entre los 3 y los 9 meses de edad
4. Validar el período de diferenciación molecular identificado en trabajos previos del laboratorio

3 Materiales y métodos

3.1 Estrategia experimental

En primer lugar se buscó caracterizar las aromatasas encontradas en el transcrito gonadal y cerebral mediante el uso de diversas herramientas informáticas, entre ellas, “blast” sobre bases de datos y un análisis filogenético. En lo que refiere al estudio de expresión, se realizó un muestreo mensual desde los 3 a los 9 meses, donde se utilizó un número de individuos grande ($n=20$). El análisis de histología gonadal nos permitió generar categorías para examinar mediante análisis estadísticos si existen diferencias significativas entre los niveles de expresión de aromatasas de individuos indiferenciados, machos y hembras.

3.2 Trabajo de campo

Durante 7 meses se realizaron muestreos en la empresa Estuario del Plata, localizada en la ciudad de San Gregorio de Polanco en el departamento de Tacuarembó, sobre la orilla del Río Negro (Figura 1). Los animales experimentales fueron comprados a esta empresa a través de proyectos y la misma nos recibió en sus instalaciones para realizar los muestreos. Para desarrollar los mismos de buena manera fue necesario trasladar los equipos del laboratorio al campo en cada una de las salidas (lupa, instrumentos de disección, los diferentes químicos necesarios para conservación de tejidos y fijación, PAF, formol, alcohol, nitrógeno líquido, y el resto del instrumental como balanzas, mecheros, otros). Los muestreos fueron realizados junto a otros integrantes del laboratorio lográndose así una mayor eficiencia, ya que se muestrearon grandes cantidades de individuos en cada una de las salidas y debía efectuarse de forma precisa y lo más rápidamente posible.



Figura 1. Imagen satelital de la ubicación e instalaciones de la planta de esturiones Estuario del Plata a orillas del río Negro en la Ciudad de San Gregorio de Polanco, departamento de Tacuarembó. Sobre el río se logran observar las jaulas en las cuales se encuentran los esturiones que ya fueron clasificados, luego de terminar su proceso de engorde a nivel de planta.

3.2.1 Animales de estudio

Los animales fueron seleccionados al azar dentro de un mismo lote (Lote 9, eclosión: 17 de mayo de 2014), que fue el que se siguió a lo largo de los 7 meses que duró el trabajo (agosto de 2014 a febrero de 2015). En cada una de las salidas al campo se muestrearon entre 30 y 45 animales. Los mismos fueron obtenidos de los tanques que posee la empresa en el sector que permanece en tierra, capturándolos mediante el uso de un calderín sin ocasionarles ningún tipo de daño. Los individuos se llevaron al laboratorio perteneciente a Estuario del Plata, ubicado en el mismo predio, en grupos de 5 y en baja densidad para una mejor organización y para disminuir el estrés de los animales, teniendo en cuenta la posibilidad de que cualquier cambio fisiológico podría verse reflejado en los niveles de expresión de diferentes genes. Los esturiones utilizados para este trabajo abarcaron las edades de 3 a 9 meses cubriendo así los períodos de diferenciación molecular e inicios de la diferenciación sexual hasta ahora postulados para esta especie en concreto (Rzepakowska y Ostaszewska 2014; Vizziano-Cantonnet et al. 2016).

3.2.2 Obtención de gónadas

Previo a la disección de los animales se preparó la zona de trabajo en el laboratorio, esterilizándola con alcohol, al igual que los útiles de trabajo (pinzas, bisturís, tijeras y demás elementos utilizados para la disección), que además fueron autoclavadas previamente a cada salida. Se indujo la muerte de los individuos por decervicación siguiendo los protocolos de la CHEA (Comisión Honoraria para la Experimentación Animal). Posteriormente se llevó a cabo la disección de los animales. De cada uno de ellos se obtuvieron las gónadas, el trabajo se realizó en forma rápida (5 a 10 minutos por animal), para evitar cualquier posible degradación de ARN. Con el mismo propósito, inmediatamente de extraídas, las gónadas fueron conservadas en nitrógeno líquido (-195 °C aproximadamente) asegurando de mantener sus características bioquímicas, hasta el momento de la extracción del ARN. Una lupa binocular fue utilizada para diseccionar a los individuos de 3 y 4 meses debido al pequeño tamaño de las gónadas a esta edad. Los útiles de disección fueron esterilizados mediante alcohol y flameado, utilizando un mechero, entre cada una de las disecciones. Las gónadas de cada individuo fueron almacenadas en criotubos rotulados de forma independiente para ser seguidos a lo largo del proceso experimental. Además de las muestras que se preservaron en nitrógeno líquido y se utilizaron para extraer ARN, se preservó una parte de la gónada en formol al 10% para los estudios de histología. En total se obtuvieron 294 muestras de gónada para el estudio de la cinética del gen aromatasa. No todas las gónadas pudieron ser muestreadas para los tres tipos de estudio mencionados, ya que en algunos casos, al ser las mismas muy pequeñas, se priorizó tomar la muestra para realizar la extracción de ARN, utilizando en estos casos todo el tejido y por lo tanto no se obtuvo muestra para histología.

3.3 Laboratorio

3.3.1 Trabajo *in silico*

La base de datos desarrollada del transcriptoma gonadal y cerebral permitió la búsqueda de la secuencia de la aromatasa usando como interrogante la estructura de la proteína aromatasa de otros peces (*Lepisosteus oculatus*, *Salmo trutta*, *Anguilla japónica*, *Oryzias latipes*, *Latimeria chalumnae*). Se obtuvo mediante blast un contig en la base gonadal y un contig en la base del cerebro que fueron traducidos a proteína utilizando el programa informático Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Una vez obtenida la secuencia proteica y tras analizar que el marco de lectura encontrado fuese el correcto, su identidad fue buscada mediante un blast específico de proteínas (blastp) utilizando la sección “blast” de la web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) observándose que la secuencia obtenida correspondía a la aromatasa. En respuesta a nuestra búsqueda la base de datos del National Center for Biotechnology Information nos brinda una lista de todas aquellas especies presentes en su base de datos que tienen mayor similitud con la proteína que nosotros blasteamos, y la información de que tan similares son las secuencias de las otras especies respecto a la nuestra. Se descargaron de la base del NCBI todas las secuencias proteicas (102) de aromatasa A y aromatasa B de diferentes especies de peces, y agregando aquellas dos secuencias que obtuvimos de nuestra base de datos de esturión se realizó un estudio filogenético utilizando el programa MEGA 7.0, mediante el método de máxima verosimilitud con un bootstrap de 1000, y un sesgo para que los valores de bootstrap aceptados por el estudio fueran aquellos mayores a 50%, esto permite que los grupos generados tengan una validez estadística más fuerte, y así nos aseguramos de tener resultados robustos y confiables en nuestro árbol filogenético. La secuencia nucleotídica de aromatasa del esturión siberiano fue enviada al Gen Bank

(KM258120.1, GI 815729764) y publicada en asociación con el artículo Vizziano-Cantonnet et al. (2016)

3.3.2 Cebadores de aromatasa y del gen constitucional

En base a ese estudio *in silico*, para poder obtener el gen aromatasa se diseñaron cebadores homólogos a la secuencia del gen *cyp19a1a* del *Acipenser baerii*. Para diseñar estos cebadores específicos (Tabla 2) se utilizaron técnicas *in silico* buscando cubrir las propiedades para un buen funcionamiento de los mismos. Estas propiedades fueron verificadas con el programa “Oligoanalyzer 3.1” disponible en la página web de la empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Luego de finalizado el diseño, se encargó la compra de los mismos a IDT, y una vez en el laboratorio fueron validados mediante una electroforesis en gel de agarosa verificando que el producto obtenido fuera el esperado. Los cebadores del gen constitucional 18S - que codifica para una parte del ARN ribosomal, y es utilizado para estandarizar los resultados de expresión, por su característica de gen housekeeping - fueron diseñados y validados por el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces (FREP) previamente a este trabajo (Di Landro 2014, Tesina de grado), y estas mismas secuencias se utilizaron en esta oportunidad para el estudio correspondiente.

Tabla 2 Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para las PCR en tiempo real

Gen	abreviación	Secuencia forward	Secuencia reverse	Producto (pb)
Citocromo P450, familia 19, Subfamilia a, polipéptido 1 ^a	<i>cyp19a1a</i>	5'GTCCAGCTTCAGACAGGATG	5'AGATGGTGTCTGCAATGTT	164
18S gen de RNA ribosomal	18S	5' GAGGTGAAATTCTTGGACCGG	5' GGTGCCCTCCGTC AATTCC	260

3.3.3 Extracción de ARN

La idea detrás de la utilización del ARN en este trabajo es que el ARNm extraído de las muestras, es un reflejo de aquellos genes que se están expresando en el momento en que fue extraído el tejido de interés (en nuestro caso las gónadas), y que serían posteriormente traducidos a proteínas. La extracción de ARN fue realizada mediante la utilización del Kit ilustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) de General Electric (GE) y según el protocolo de extracción indicado por su fabricante. Se extrajo ARN de la totalidad de las gónadas muestreadas en nitrógeno líquido durante los 7 meses de trabajo. La concentración (ng/ μ L) de ARN obtenido de cada muestra fue medida en un espectrofotómetro Nanodrop marca Agilent 2100, el cual nos brindó además los datos de las relaciones de absorbancia 260/280nm y 260/230nm de cada una de las muestras. Las muestras de ARN obtenidas se conservaron en un freezer a -80 °C hasta el momento de su utilización.

3.3.4 Retrotranscripción

Entre la totalidad de los ARN extraídos se eligieron los pertenecientes a 20 individuos diferentes por mes (Tabla 3). Para realizar esta selección se tuvieron en cuenta sus concentraciones y relaciones de absorbancia, ya que con estos indicadores podemos definir cuales extracciones resultaron con una buena o muy buena calidad. Para ello las relaciones de absorbancia deben estar alrededor de 2,0 (i.e. $a_{260}/a_{280} \approx 2,0$; $a_{260}/a_{230} \approx 2,0$); y dentro de aquellas con mejores relaciones se tomaron las muestras con mayores concentraciones de ARN. Estas muestras fueron retrotranscriptas para, de esta manera, obtener el ADN copia (ADNc) que es necesario más tarde para realizar las PCR en tiempo real (qPCR) y medir los niveles de expresión de la aromatasa. La reacción se desarrolla a partir de un volumen de ADN que varía

debido a que debe tener una concentración final de 1000 ng/ μ l en un volumen total de 10 μ l. Para ello se calculó el volumen necesario de ARN requerido según la concentración de la muestra y añadiéndole el volumen de agua necesario para que la concentración de ARN final fuese la buscada. Para aquellas muestras en las que la concentración de ARN era muy baja y no se alcanzaba la concentración final se utilizó el volumen total (10 μ l) de ARN. Luego se agrega a cada muestra 1 μ l de cebadores aleatorios (random primers) [200ng/ μ l] y 1 μ l de dNTP's 10 mM. Los dNTP's constituyen la mezcla de las bases del ADN necesarias para la síntesis de una secuencia en la reacción de PCR y a partir de un molde. A este mix se lo lleva a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se le agrega un segundo mix compuesto por 4 μ l de "first strand buffer", 2 μ l de DTT (es un agente reductor, el cual en este caso actúa eliminando estructuras secundarias del RNA y facilitando la acción de la enzima retrotranscriptasa) y 1 μ l de "RNAsa Out" (inhibe la acción de RNAsas y preserva así la integridad del ARN objetivo para la acción de la retrotranscriptasa), se calienta a 37°C durante 2 minutos, y allí se le agrega a 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa (retrotanscriptasa) M-MLV de la empresa Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción finaliza luego de un ciclo de incubación a 37°C durante 50 minutos y una posterior inactivación por calor a 70°C durante 15 minutos, todo esto siguiendo las indicaciones del protocolo realizado por el fabricante. Se obtiene un volumen final de reacción de 20 μ l de ADN copia. Los diferentes ciclos de calentamiento se realizan mediante un termociclador.

Tabla 3 Muestras seleccionadas de cada mes para retrotranscribir y realizar PCR en tiempo real

Muestras de 3 meses	Muestras de 4 meses	Muestras de 5 meses	Muestras de 6 meses	Muestras de 7 meses	Muestras de 8 meses	Muestras de 9 meses
388	556	635	744	840	875	919
389	557	638	747	841	876	924
390	558	639	748	842	877	925
391	562	642	749	843	882	927
392	568	645	751	844	886	929
393	571	650	752	845	887	931
399	572	652	753	846	889	935
401	573	654	754	847	890	937
402	574	655	755	848	892	939
403	575	656	757	850	894	940
404	576	657	761	857	897	941
406	577	662	763	858	898	942
407	578	664	764	859	899	945
411	579	665	767	861	900	948
414	581	666	769	863	901	949
415	583	667	770	864	902	951
416	585	669	771	865	903	952
417	586	670	772	868	904	953
434	587	671	773	870	905	957
440	588	672	774	874	906	958

3.3.5 PCR en tiempo real

Los ADNc obtenidos de la retrotranscripción fueron separados en 7 categorías correspondiendo cada una a los meses de edad de los individuos, es decir 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 meses. Además, cada una de las muestras se siguió con el rótulo original del número de individuo muestreado. La PCR en tiempo real nos otorga una serie de datos cuantitativos, con los cuales podemos saber cuáles son las muestras que tienen mayor nivel de expresión sobre otras. Para esto la técnica se realiza mediante un termociclador, el cual trabaja con varios ciclos de calentamiento y enfriamiento, y a su vez mide la cantidad de fluorescencia que es emitida por un agente fluorescente agregado a cada una de las muestras. Aquellas muestras con mayor expresión del gen de estudio emitirán mayor fluorescencia en el mismo tiempo que una muestra con menor expresión. En el vocabulario técnico se habla de Ct (threshold cycle), esto refiere a la cantidad de ciclos que tarda una muestra para emitir un nivel de fluorescencia

superior al umbral inferior de detección del termociclador. Por esta razón es que aquellas muestras que presenten un Ct menor serán las que estén más expresadas. Los genes constitutivos tienen Ct muy bajos por sus altos niveles de expresión, por el contrario los blancos, al no tener cDNA tienen Ct muy elevados. Otro dato importante que nos otorga la qPCR son las curvas de melt. La temperatura de melt de una secuencia específica de ADN es única, las curvas nos permiten por lo tanto saber si la secuencia que se está expresando es la que buscamos, siendo esto un nuevo control por si en la electroforesis que se realiza previamente para obtener la verificación del funcionamiento de nuestros cebadores no hayamos podido identificar la presencia de más de un producto.

Las cajas para realizar las qPCR fueron organizadas de manera tal de que cada muestra tuviese su réplica correspondiente. Dos estadíos fueron realizados en cada caja (por ejemplo 3 y 4 meses en caja 1 (Figura 2), cada uno de ellos con su correspondiente blanco y los cebadores para medir el gen objetivo (aromatasa). Además, se agregó una curva de dilución en cada caja, lo que permitió calcular la eficiencia a la que trabajaron los cebadores en cada corrida realizada. Las diluciones utilizadas para las curvas fueron 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320. Para cada mes se realizó una corrida en la cual las mismas muestras que se corrieron para el gen objetivo, esta vez se corrieron con los cebadores del gen de referencia, un gen constitutivo, en nuestro caso se utilizó el gen 18S. Este gen constitutivo, tiene como fin tener un punto de comparación para los datos obtenidos de nuestro gen objetivo y así poder calcular las cuantificaciones relativas. Es importante entonces que el gen que se utilice como referencia sea uno en el cual su expresión no varíe cuando los tratamientos experimentales son aplicados, es por eso que los genes que generalmente se eligen son genes constitutivos o también llamados housekeeping. El uso del 18S en las gónadas se validó en trabajos previos (Vizziano-Cantonnet et al.

2016). Para obtener las expresiones relativas de los genes debemos saber las eficiencias con las que actuaron los cebadores en las corridas correspondientes como se mencionará más adelante.

Para realizar el estudio de qPCR las muestras fueron preparadas según el protocolo de esta práctica, que indica que cada una de las muestras que se utilicen se preparará utilizando 2 µl de ADNc, 10 µl de “Syber Green” (en nuestro caso utilizamos el de la empresa Kapa Biosystems), 0,4 µl de cebadores forward y reverse correspondientes a la reacción pretendida, y el mismo volumen de Low Rox. Luego las corridas se realizaron en un termociclador de Applied Biosystems (ABI 7500) (Sección Genética, Facultad de Ciencias). El volumen utilizado para cada una de las reacciones fue de 20 µl y el programa de tiempo y temperatura para la reacción se organizó de la siguiente manera: “Holding stage” 5 minutos a 95°C, “cycling stage” 15 segundos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 60°C, luego el “melt curve stage” consta de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 30 segundos a 15°C. En ningún caso se utilizaron pools de gónadas para el análisis, sino que fueron analizadas individualmente incluso para los individuos más jóvenes.

388	388	389	389	390	390	391	391	392	392	393	393
399	399	401	401	402	402	403	403	404	404	406	406
407	407	411	411	414	414	415	415	416	416	417	417
434	434	440	440	bla ARO 3M	bla ARO 3M	556	556	557	557	558	558
562	562	568	568	571	571	572	572	573	573	574	574
575	575	576	576	577	577	578	578	579	579	581	581
583	583	585	585	586	586	587	587	588	588	bla ARO 4M	bla ARO 4M
dil 1/20	dil 1/20	dil 1/40	dil 1/40	dil 1/80	dil 1/80	dil 1/160	dil 1/160	dil 1/320	dil 1/320	dil 1/20	dil 1/20

Figura 2, Diseño de caja para una corrida de qPCR para los meses 3 y 4 con cebadores de aromatasa. Se observan las réplicas de cada muestra, los blancos para cada uno de los meses y la curva de dilución. Para el resto de los meses las cajas se diseñaron de la misma manera tanto para aquellas con cebadores de aromatasa, como para aquellas con cebadores de 18S.

3.3.6 Análisis de datos de qPCR

Los resultados obtenidos de la qPCR en tiempo real fueron estandarizados mediante el método de DELTA DELTA Ct para así obtener la cuantificación relativa, para ello utilizamos la ecuación siguiente:

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}}}{(E_{reference})^{\Delta Ct_{reference}}}$$

Siendo E_{target} la eficiencia que obtuvimos de los cebadores de nuestro gen objetivo en la corrida, y ΔCt_{target} el valor del Ct obtenido para cada una de las muestras en corrida con los cebadores del gen objetivo (aromatasa). De la misma forma el $E_{reference}$ es la eficiencia de los cebadores del gen constitutivo (18S) y $\Delta Ct_{reference}$ el valor de Ct de cada una de las muestras con los cebadores de 18S.

La eficiencia de los cebadores fue calculada en cada una de las corridas a partir de una curva de dilución correspondiente, lo que genera mayor robustez a la hora de comparar y analizar resultados. Para obtener la eficiencia de la reacción el primer paso es generar el gráfico del “Ct vs. log de diluciones”. Una vez obtenida esta curva, de la cual sabremos cual es la pendiente, se puede fácilmente calcular la eficiencia de la reacción mediante la ecuación:

$$E = 10^{\frac{-1}{pendiente}}$$

Los datos, luego de ser estandarizados, y una vez obtenida la expresión relativa, fueron graficados mes a mes individualmente, así como la expresión global de cada mes para todos ellos, lo que nos permite tener diferentes enfoques y llegar a diferentes conclusiones, por un lado a nivel de individuos y por otro lado de la expresión del gen dentro de la población total. Para realizar las gráficas de expresión de los niveles de aromatasa individuales en cada mes, los mismos fueron llevados a porcentaje, siendo el 100% el valor de expresión más alto que refleja un determinado individuo en el mes que en ese momento estudiamos y la expresión del resto de los individuos del mes fue relativa a este. Para algunos de los meses en los cuales se presentaba un outlier o valor atípico (es decir un valor de expresión extremadamente elevado y que resulta muy distante del resto del conjunto de datos), el mismo fue

eliminado únicamente para poder apreciar de mejor manera a nivel gráfico las tendencias de expresión y su modulación. Estos ajustes se realizaron en los 3 meses (se eliminó el individuo 404), 5 meses (se eliminó el individuo 669), 6 meses (se eliminó el individuo 774) y 8 meses (se eliminó el individuo 875) de los datos que se presentan en la Figura 9. Sin embargo al momento de realizar la estadística de este trabajo no fue eliminado ninguno de los datos mencionados anteriormente, sino que todos ellos fueron utilizados en los diferentes análisis realizados. Los resultados expresión de cada uno de los meses fueron sometidos a análisis estadísticos descriptivos para obtener datos generales de los mismo como las medias, medianas, la variación que existe en las muestras (Figura 3).

Univariate statistics							
	A	B	C	D	E	F	G
N	20	20	20	20	20	20	20
Min	0	1,74921E-10	1,69724E-12	1,84E-13	1,2327E-12	1,46548E-12	7,1452E-14
Max	2,09676E-08	2,33632E-06	1,43905E-06	6,3807E-09	5,89561E-07	3,8355E-08	2,77082E-09
Sum	2,504303E-08	4,519327E-06	1,498537E-06	7,535646E-09	9,019215E-07	5,956717E-08	6,09563E-09
Mean	1,252152E-09	2,259663E-07	7,492685E-08	3,767823E-10	4,509607E-08	2,978359E-09	3,047815E-10
Std. error	1,040229E-09	1,400318E-07	7,180588E-08	3,171388E-10	3,079759E-08	1,95831E-09	1,558674E-10
Variance	2,164154E-17	3,92178E-13	1,031217E-13	2,01154E-18	1,896983E-14	7,66996E-17	4,858932E-19
Stand. dev	4,652047E-09	6,262411E-07	3,211257E-07	1,418288E-09	1,37731E-07	8,757831E-09	6,970604E-10
Median	6,389595E-11	1,57981E-08	3,826245E-10	1,646195E-11	1,068294E-10	6,2223E-11	1,643355E-11
25 prcnil	2,31194E-12	2,977932E-09	4,099487E-11	4,673293E-12	4,228037E-11	4,695772E-12	2,391378E-12
75 prcnil	5,329515E-10	4,939757E-08	6,79565E-09	6,323035E-11	4,538687E-09	7,044642E-10	2,019902E-10
Skewness	4,436009	2,99922	4,470085	4,420736	3,70898	3,874825	2,871202
Kurtosis	19,76931	8,154287	19,98709	19,66391	14,31995	15,7694	8,456774
Geom. mean	0	1,377349E-08	4,099994E-10	2,031636E-11	3,293046E-10	7,985086E-11	1,556996E-11
Coeff. var	371,5243	277,1391	428,5856	376,421	305,4168	294,0489	228,7082

Figura 3. Estadística descriptiva realizada sobre los datos de expresión relativa mediante el programa Past3.

Mediante estos datos se determinaron las transformaciones indicadas a realizar a nuestro conjunto de datos para obtener como resultado aquel que sea estadísticamente más robusto sin perder información. Se evaluó la homogeneidad de varianza entre muestras mediante el test de Levene para luego determinar las posibles diferencias significativas de expresión entre los meses. Así mismo se realizó la estadística correspondiente para evaluar diferencias significativas entre niveles de expresión de aromataasa entre hembras y machos (Figura 4). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso del programa informático “Past3” de libre acceso y descarga (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>)

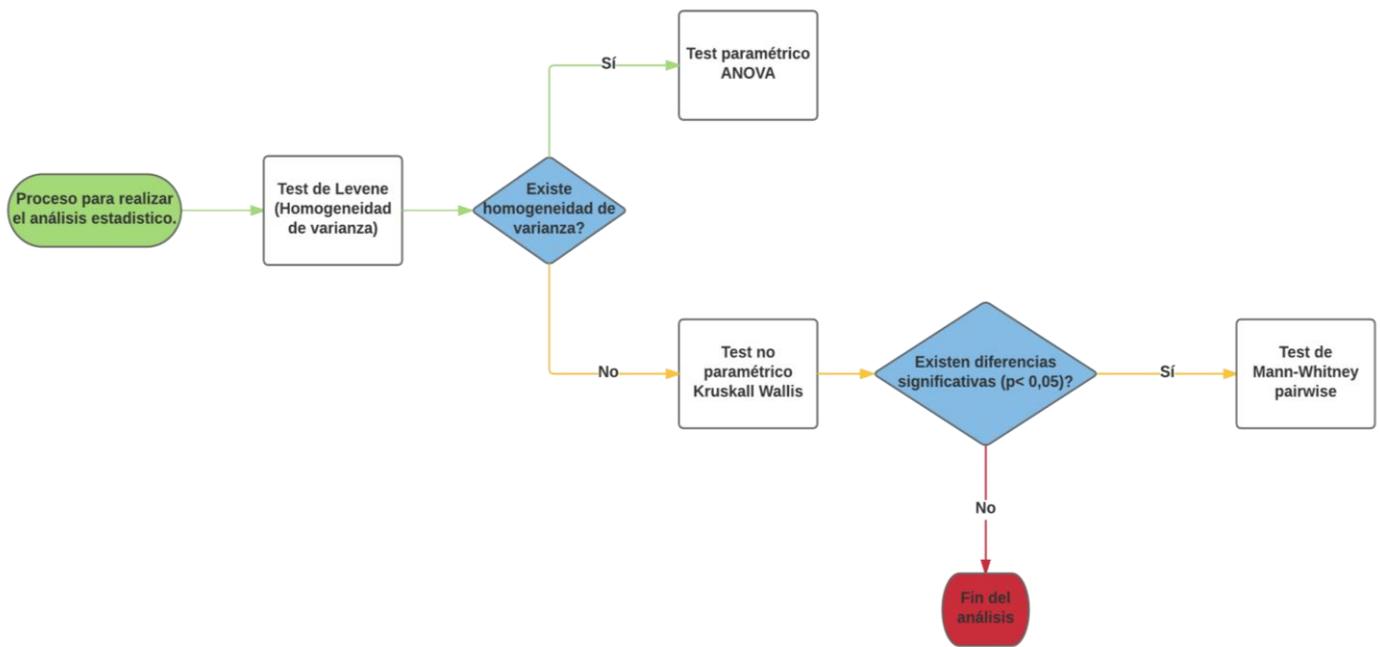


Figura 4. Diagrama que esquematiza el proceso que se lleva a cabo para realizar el análisis estadístico. Se observan los test que deben realizarse según los resultados que se obtengan en cada uno de los pasos realizados a medida que se realiza el análisis.

3.3.7 Histología

Para los estadios de 8 y 9 meses, se realizó la histología de las gónadas pertenecientes a los mismos individuos para los cuales se analizaron los niveles de expresión de aromatasa (Tabla 4). Las gónadas se fijaron en formol al 10%, luego se incluyeron en parafina donde se le realizaron cortes de 5 μm de espesor y se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina y eosina. Los cortes fueron realizados por un laboratorio externo al cual se le pagó el servicio. Las láminas fueron analizadas en el microscopio (Sección Genética, Facultad de Ciencias). El diagnóstico se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios anteriormente realizados en los que se marcan diferencias estructurales entre los tejidos gonadales de hembras y machos (Rzepakowska y Ostaszewska 2014; Vizziano-Cantonnet et al. 2016). Las observaciones se realizaron en aumentos de 4x, 10x, y 20x. La identificación final de

algunas láminas de individuos en diferenciación fue realizada en cooperación con la Dra. Talita Mazzoni (Brasil, Universidad Estatal Paulista (UNESP)).

Tabla 4. Meses y número de muestras para las cuales se realizaron estudios histológicos.

Mes	Número de muestras utilizadas
8	15
9	16

3.3.8 Análisis estadísticos

Para verificar si había diferencias significativas en los niveles de expresión de la aromatasa entre las edades se aplicaron tests estadísticos. Dado que la variabilidad de los datos fue muy elevada entre los diferentes meses se realizó la transformación de los datos de expresión aplicando la ecuación:

$$\ln(X + 1)$$

siendo \ln la función logaritmo neperiano y X el valor de expresión de cada individuo. El resultado es una transformación de los datos (Tabla 5) que reduce la variabilidad y los hace mejores para el análisis estadístico. Luego de realizar la transformación de los datos se realizaron estudios sobre la homogeneidad de varianzas (Levene). El análisis de homogeneidad de varianza mostró que los datos no son homogéneos al obtenerse un valor de $p < 0,05$ para el test de Levene cuya hipótesis nula es que las varianzas son homogéneas. Debido a ello se utilizó un test no paramétrico para determinar si existían diferencias significativas en los niveles de expresión de aromatasa entre edades. El test utilizado fue Kruskal-Wallis para el cual se obtuvo un valor de $p < 0,05$ indicó que existen diferencias significativas en la expresión que se da en los diferentes meses. El test de Mann-Whitney pairwise nos indicará entre qué meses se observan estas diferencias significativas. Así mismo se realizó el estudio estadístico para

observar si existen diferencias significativas entre los niveles de expresión de machos y hembras e indiferenciados en los 8 y 9 meses. Se agruparon los individuos en sus categorías correspondientes siendo estas: indiferenciados, machos putativos, hembras putativas, machos y hembras. Estas 5 categorías mencionadas fueron definidas mediante características morfológicas e histológicas específicas observadas en las gónadas. En el caso de 8 meses las categorías analizadas para los estudios comparativos fueron la de indiferenciados, machos putativos y hembras putativas, ya que las categorías machos y hembras no pudieron ser utilizadas por tener 2 o menos individuos, y no cumplir así con los requerimientos mínimos para el análisis. El test de Levene mostró homogeneidad de varianza entre los tres grupos ($p > 0,05$), por lo que posteriormente se aplicó un ANOVA, este tuvo como resultado un valor de $p > 0,05$ (0,2075) indicando que no hubo diferencias significativas entre grupos.

El análisis entre categorías en los 9 meses fue similar, pero en este caso las categorías utilizadas fueron indiferenciados, machos, y hembras, y se dejaron de lado las categorías machos putativos y hembras putativas por la misma razón que se explicó previamente para la eliminación de categorías en 8 meses. El test de Levene en 9 meses indicó la falta de homogeneidad de varianza entre los datos al obtenerse un p -valor = 0,001072 ($p < 0,05$) por lo tanto aplicamos tests no paramétricos. Utilizamos Kruskal-Wallis y obtuvimos un $p < 0,05$ indicando que existen diferencias significativas entre los grupos, por lo tanto mediante Mann-Whitney pairwise y corrigiendo los p -valores por el criterio de Bonferroni podremos saber entre que grupos se dan estas diferencias.

Por otra parte se graficaron los niveles promedio de todas las categorías para observar la tendencia de expresión de las mismas tanto para 8 meses, como para 9 meses.

Tabla 5 Transformación de los datos de expresión mediante la ecuación $\ln(X+1)$ con el objetivo de reducir la variabilidad general.

Mes 3	Mes 4	Mes5	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9
1,44195691	5,18859902	0,33679063	4,17141361	0,34825712	5,95207361	0,02325346
0,42528421	6,26890577	0,01682995	0,28340623	0,36563335	2,03719226	0,21247261
0	5,38225004	0,20720242	1,8404268	3,8484372	0,51151398	0,00180489
1,95014456	9,75468716	4,73160542	0,06098699	1,58327633	0,93830482	2,74636607
0	3,99566527	1,06911953	0,02827078	0,37161154	0,12091848	0,27665669
0	5,03529669	1,90801269	0,17176952	2,00883272	3,24195064	0,02476813
0,55841155	7,53152732	5,26655154	0,335338	0,10606072	0,45529977	0,1495546
0,41091663	5,67467082	0,08593443	0,31618176	0,50727851	0,17709009	0,00071426
0,09918568	3,80842023	0,06332367	0,01645681	7,71441751	0,0280949	0,7207388
0	6,26921972	0,38893267	0,09800103	0,76561184	1,60499283	0,15473949
5,35032156	5,981935	4,34312863	0,50826924	0,05290034	3,95917447	0,00141997
2,57093298	10,0589597	2,67761203	0,0521818	0,01225168	0,02040739	3,35718425
1,03161665	3,03091646	2,81830506	0,0238073	3,80194944	4,74495129	0,00412293
0,68831478	5,10119065	2,23458475	1,06481826	8,68213333	0,01454848	0,09318035
0	1,78793859	0,52233523	0,04349502	0,68626216	0,02154193	0,07363224
0,65401975	1,01131259	3,80626968	0,00183831	6,23913018	0,0325007	2,46125028
0,15833183	3,88673849	9,57439643	0,11072756	0,09032149	0,59784885	1,22519938
0,08844814	4,36168498	0,44136049	0,13263666	0,39440347	2,10044902	0,03985193
2,02901421	3,25858487	0,36357105	0,43306791	0,77467482	0,08500922	1,20633458
2,07159275	2,08287534	4,80781422	0,81809879	5,58989052	0,14629955	0,68570251

4 Resultados

4.1 Comparación de las secuencias de aromatasa gonadal y cerebral del esturión siberiano

Las secuencias de aromatasa obtenidas de la base de datos del transcriptoma gonadal y cerebral del esturión siberiano fueron estudiadas en una primera instancia realizando un BLAST en NCBI. Las dos secuencias resultaron ser homólogas a la proteína aromatasa dados los datos de cobertura, de probabilidad (e-value) y de identidad que se muestran en las Tablas 6 y 7. La Tabla 6 se muestra las 10 primeras secuencias con mayor homología con la secuencia proteica de la aromatasa de esturión siberiano amplificada a partir de gónada, mientras que la Tabla 7 muestra los datos obtenidos cuando se analizó la secuencia proteica de la aromatasa amplificada a partir del cerebro. El e-value es un indicador de probabilidad y cuanto más bajo es, existe una mayor probabilidad de que las secuencias sean homólogas. El e-value fue de cero para una gran cantidad de aromatasas de distintas especies. En las Tablas 6 y 7 se muestran solo los 10 primeros resultados. Otro dato importante es la cobertura de la secuencias estudiada y ésta muy fue alta como se observa en las Tablas 6 y 7. La identidad también fue la esperada. De hecho cualquiera de las dos proteínas tuvieron una alta similaridad con otras dos especies de esturión (*Acipenser ruthenus* y *Acipenser schrenckii*). A su vez por fuera del grupo de los acipenseriformes, la mayor similaridad fue con la aromatasa de *Lepisosteus oculatus* otra especie basal del grupo de los holósteos.

Tabla 6. Resultados del blasteo de la secuencia proteica de la aromatasa del esturión siberiano, obtenida de la base de datos de la secuenciación gonadal. A la izquierda se observa la secuencia aminoacídica obtenida, a la derecha la devolución de la base de datos de NCBI

Secuencia proteica de la aromatasa obtenida en la gónada	Coincidencias del Blast proteico en NCBI						
	Descripción	Max score	Total score	cobertura de secuencia	E value	Ident	Acceso
MKQVLLLEERISKMLVPVHHNITDIVPECMSGTTAI	cytochrome P450 [<i>Acipenser ruthenus</i>]	859	859	83%	0.0	97%	AIQ80966.1
LSELLCLFMLVWNCKAKASIPGPIFCMGIGALLSY	cytochrome P450 aromatase [<i>Acipenser schrenckii</i>]	827	827	80%	0.0	98%	AGN52746.1
GRFLWTGIGNASNYNEKYGDMVRVWIGGKETL	aromatase isoform X1 [<i>Lepisosteus oculatus</i>]	716	716	99%	0.0	68%	XP_015198515.1
ILSRSSAVHHVLKHGKYATRFGNKHGLQCLGMN	aromatase isoform X2 [<i>Lepisosteus oculatus</i>]	710	710	97%	0.0	68%	XP_015198516.1
DGVIFNCNVTLWKKLRSYFAKALTGPVLQKAVAA	gonadal P450 aromatase [<i>Sparus aurata</i>]	644	644	99%	0.0	60%	AAL27699.1
CTDSTTLYLNKLPEMTNHHAQVDVLMFLRLITVD	aromatase cyp19a [<i>Rhabdosargus sarba</i>]	643	643	99%	0.0	60%	ABC70869.1
VSNRFLNVPMDKEVSVKIQQYFDTWQALLKP	testicular P450 aromatase [<i>Squalus acanthias</i>]	639	639	100%	0.0	60%	ABB53418.1
DIFFMFKWMYQRHEAAAQELPKAIDNLEKRRK	aromatase-like [<i>Clupea harengus</i>]	638	638	99%	0.0	60%	XP_012670226.1
ALLEAEKDDYIDFTSELIFAQSHGELSADNVKQCV	ovarian cytochrome P-450 aromatase [<i>Salmo trutta</i>]	635	635	99%	0.0	61%	AAR04775.1
LEMLIAAPDTMSVTLFYMLMLIAQHPEVERKLEE	aromatase-like [<i>Salmo salar</i>]	633	633	99%	0.0	61%	XP_014030724.1
IDTVIGENEIQKRDQLQNLKVLENFINESLRFHPVVE							
FSMRRAIEDDVIEGYTVRKGNTNIIINMGWMHKG							
DFFLKPNEFSLDNFHKTVPSRFFQPFSGPRSCIG							
KHAALVMMKVILVTLKRYTVQLQTGC SLKNMET							
SNDSLQHPRETQNMLDMFFIPRQKTE							

Tabla 7. Resultados del blasteo de la secuencia proteica de la aromatasa del esturión siberiano, obtenida de la base de datos de la secuenciación del cerebro. A la izquierda se observa la secuencia aminoacídica obtenida, a la derecha la devolución de la base de datos de NCBI.

Secuencia proteica de la aromatasa obtenida en el cerebro	Coincidencias del Blast proteico en NCBI						
	Descripción	Max score	Total score	cobertura de secuencia	E value	Ident	Acceso
MKQVLLLEERISKMLVPVHHNITDIVPECMSGTTAI	cytochrome P450 [<i>Acipenser ruthenus</i>]	863	863	83%	0.0	98%	AIQ80966.1
LSLLLCLFMLVWNCKAKASIPGPIFCMGIGALLSYG	cytochrome P450 aromatase [<i>Acipenser schrenckii</i>]	831	831	80%	0.0	99%	AGN52746.1
RFLWTGIGNASNYNEKYGDMVRVWIGGKETLIL	aromatase isoform X1 [<i>Lepisosteus oculatus</i>]	720	720	99%	0.0	68%	XP_015198515.1
SRSSAVHHVLKHGKYATRFGNKHGLQCLGMNDG	aromatase isoform X2 [<i>Lepisosteus oculatus</i>]	713	713	97%	0.0	68%	XP_015198516.1
VIFNCNVTLWKKLRSYFAKALTGPVLQKAVAACD	P450 aromatase cyp19a [<i>Rhabdosargus sarba</i>]	645	645	99%	0.0	60%	ABC70869.1
EKLDDYIDFTSELIFAQSHGELSADNVKQCVLEMLI	gonadal P450 aromatase [<i>Sparus aurata</i>]	645	645	99%	0.0	60%	AAL27699.1
AAPDTMSVTLFYMLMLIAQHPEVERKLEEIDTVI	aromatase-like [<i>Clupea harengus</i>]	639	639	99%	0.0	60%	XP_012670226.1
GENEIQKRDQLNKKVLENFINESLRFHPVVEFSMR	ovarian cytochrome P-450 aromatase [<i>Salmo trutta</i>]	638	638	99%	0.0	61%	AAR04775.1
RAIEDDVIEGYTVRKGNTIILNMGWMHKGDFFLK	testicular P450 aromatase [<i>Squalus acanthias</i>]	637	637	100%	0.0	60%	ABB53418.1
PNEFSLDNFHKTVPSRFQPFQSGPRSCIGKHAAL	aromatase-like [<i>Salmo salar</i>]	636	636	99%	0.0	62%	XP_014030724.1
VMMKVILVTLKRYTVQLQTGCSLKTMETSNCLS							
QHPRETQNMLDMFFIPRQKTE							

Estos datos confirmaron que las secuencias obtenidas en gónada y cerebro eran las de aromatasa. Sin embargo para poder establecer si había una o dos aromatasas en el esturión siberiano se hicieron estudios de filogenia usando las aromatasas gonadales o aromatasas A (*cyp19a1a*) y las aromatasas cerebrales o aromatasas B (*cyp19a1b*) tomadas de Gen Bank y se las comparó con las aromatasas de la gónada y del cerebro del esturión. Como grupo externo se usó la secuencia

proteica del citocromo P450 2G1. La filogenia mostró una separación en dos grandes grupos, por un lado las aromatasas cerebrales (aromatasa b) y por otro lado las gonadales (aromatasa a). Como se observa en la Figura 5, las dos secuencias proteicas de aromatasa del siberiano (una encontrada en cerebro y la otra en gónada) resultaron estar más emparentadas con el grupo de las aromatasas gonadales, siendo las más cercanas a ellas las aromatasas A de otras especies basales como los esturiones (*Acipenser schrenkii* y *Acipenser ruthenus*), el holósteo *Lepisosteus oculatus*, *Latimeria chalumnae* y *Callorhinchus milii*, así como con *Anguilla japonica* una especie de teleósteo basal, con las cuales forma un grupo monofilético (Figura 5).

4.2 Morfología gonadal

Estudios previos desarrollados en el laboratorio mostraron que en las condiciones de cultivo de Uruguay la diferenciación sexual ocurre alrededor de los 8 meses de edad (Vizziano-Cantonnet et al 2016). En base a esta información decidimos corroborar el estadio de desarrollo de 8 y 9 meses de esta cinética de diferenciación. La histología mostró que a los 8 meses (n= 15) solamente algunos individuos se habían diferenciado. De 15 individuos explorados, 3 estaban diferenciados y los 12 restantes indiferenciados. De los diferenciados, 2 fueron machos y 1 resultó hembra mostrando en ese momento todos los rasgos característicos de su sexo.

Los machos se distinguieron por presentar cordones de células germinales y se observa la formación del ducto espermático. El testículo presenta además un borde liso y parejo (Figura 6 A). Las hembras se caracterizan por presentar la superficie gonadal con grandes indentaciones y células germinales se organizan en grupos o clusters (Figura 6 B). Por otra parte, se observaron individuos completamente indiferenciados cuyo sexo es imposible de reconocer (Figura 6 D), e individuos cuyo sexo es sugerido por algunos signos que hacen suponer una futura diferenciación hacia machos o hacia hembras. En la Figura 5 E, se observa la gónada de una posible hembra si se tienen en cuenta las descripciones realizadas previamente en la especie de estudio y en otros esturiones (Chen et al. 2006; Grandi y Chicca 2008; Rzepkowska y Ostaszewska 2014) que consideran que los bordes gonadales con indentaciones son característicos de las hembras. Sin embargo, no se reconocen células germinales. En la Figura 6 F, se muestra un posible macho caracterizado por tener los bordes gonadales lisos y las células germinales organizadas en cordones y no en clusters como se ve en las hembras.

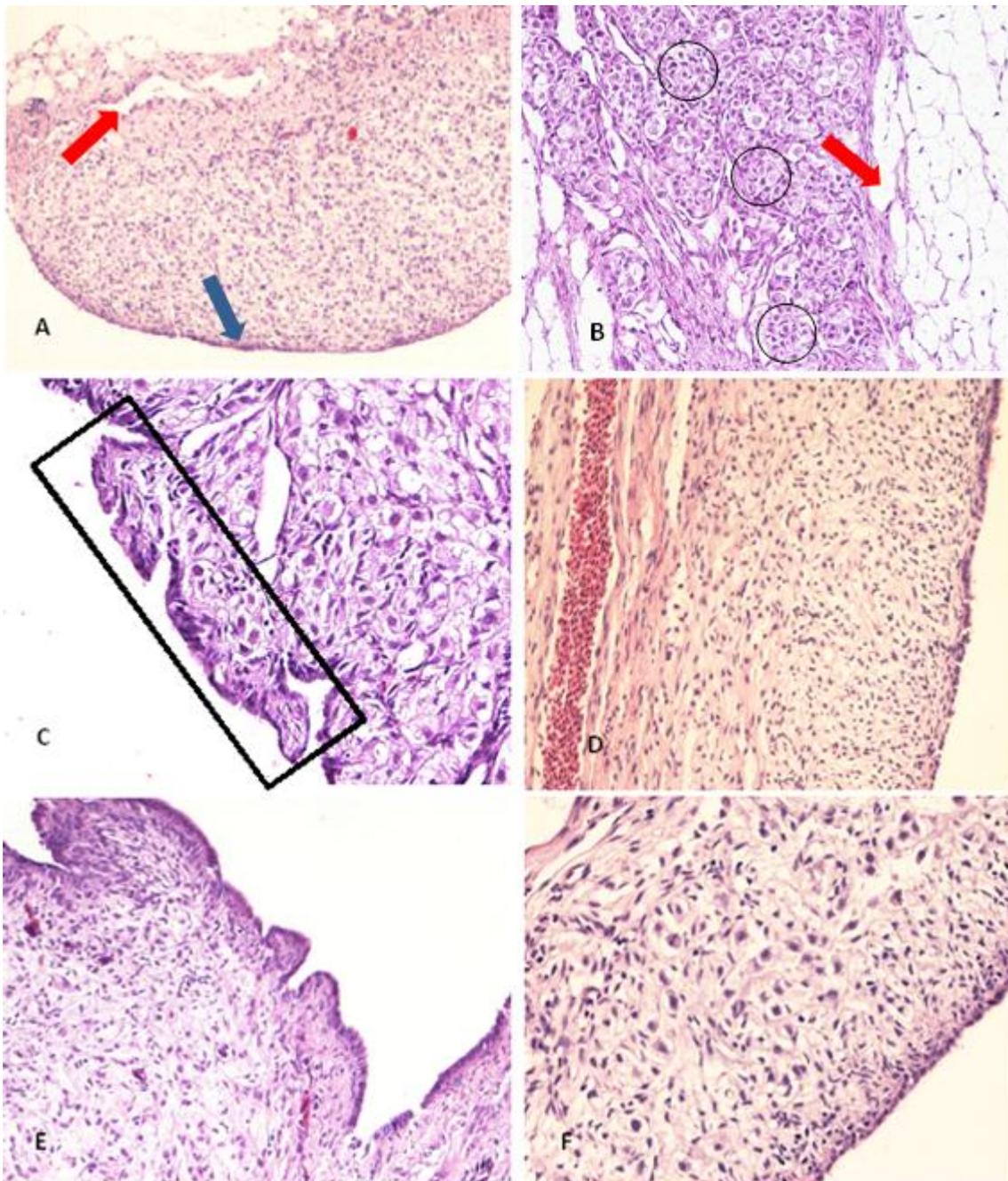


Figura 6. Plancha de fotos de histología con diferentes estadios representados. A = Testículo se observa la formación de un ducto espermático (flecha roja) y el borde liso y parejo (flecha azul), 4X. B = Imagen de una hembra ya diferenciada, en ella se marcan con círculos zonas donde se formaron clusters de células germinales, la flecha roja indica la zona de la gónada con tejido adiposo, 20X. C = Hembra putativa dadas las indentaciones que se forman en los bordes del tejido y se observan células germinales, 20X. D = Estadío indiferenciado con distribución de las células germinales homogénea como se ve en los futuros machos, 10X. E= Hembra putativa Aunque no se observan células germinales los bordes indentados marcan que será una futura hembra, 10X. F= Macho putativo, las células germinales se distinguen poco pero parecen organizarse en cordones, y los bordes son lisos, 10X.

En base a estos criterios se realizó un diagnóstico mostrado en las Tablas 8 y 9.

A los 9 meses hubo un mayor número de individuos diferenciados. Entre los individuos a los que se les realizó la histología (n=16), 9 de ellos estaban claramente diferenciados y se clasificaron 5 como hembras y 4 como machos mostrando en los cortes

observados señales claras y características de los sexos correspondientes. Además 2 individuos fueron identificados como posibles machos y otro como una posible hembra, mientras que los 4 restantes se clasificaron como indiferenciados (Tabla 9).

Tabla 8. Resultados de la histología realizada con los individuos de 8 meses. Se presenta el estado de diferenciación para cada uno de los individuos, y las observaciones correspondientes para cada uno de ellos.

Individuo	Estado de diferenciación	Observaciones
876	Macho putativo	Gónada con bordes lisos. Distribución de células germinales en cordones
882	Macho putativo	Los cordones están empezando a formarse en ciertas regiones. Parece observarse un ducto. Las células germinales están separadas por tejido intersticial característica propia del macho en esturión
886	Indiferenciado (macho putativo)	El borde liso de la gónada es una característica mayormente masculina.
887	Macho putativo	Se observa el borde liso, y un ducto. Las células germinales están difusas
889	Macho putativo	Las células germinales aparecen dispersas. Hay un ducto en formación con un intersticio en desarrollo
890	Indiferenciado	Células germinales poco distinguibles
897	Hembra putativa	Invaginaciones en los bordes (futuras lamelas ovígeras) y disposición del intersticio (tejido conjuntivo) similar a hembras
899	Hembra putativa	Bordes con indentaciones y presencia de algunos clusters de células germinales
900	Macho putativo	Borde liso con células germinales visibles. No se observan clusters ni meiosis.
901	Macho	Los cordones de células germinales se reorganizan en clusters dando lugar a los primeros signos de formación de túbulos seminíferos
902	Macho	Células germinales organizadas en cordones.
903	Hembra	Borde con grandes indentaciones, células germinales organizadas en clusters en regiones específicas da gónada
904	Indiferenciado (macho putativo)	Borde liso y células germinales aisladas. No hay aún cordones formados.
905	Hembra putativa	Bordes discontinuos con indentaciones signos del desarrollo femenino en estadios tempranos: No se logran observar clusters formados
906	Indiferenciado (macho putativo)	Bordes lisos, las células germinales no son claramente distinguibles

Tabla 9. Resultados de la histología realizada con los individuos de 9 meses. Se presenta el estado de diferenciación para cada uno de los individuos, y las observaciones correspondientes para cada uno de ellos.

Individuo	Estado de diferenciación	Observaciones
919	Indiferenciado (hembra putativa)	Borde con indentaciones y presencia de células germinales similares a las de una futura hembra.
924	Hembra	Borde con varias indentaciones. Zonas con clusters y células que parecen estar en mitosis.
925	Macho	Borde liso, células germinales organizadas en cordones.
927	Hembra	Bordes indentados, se observan las células germinales aunque mal fijadas.
931	Indiferenciado (hembra putativa)	Bordes indentados. Tejido gonadal aun en formación. Se observan células mesenquimáticas que darán origen al estroma (tejido intersticial/tejido conjuntivo).
935	Hembra	Se observan células germinales en clusters y en meiosis.
937	Macho	Células germinales en cordones.
939	Macho	Borde liso con células germinales con distribución homogénea.
940	Hembra putativa	Borde irregular y algunos clusters. La preservación de muestra no es buena.
941	Indiferenciado (hembra putativa)	Se observa una diferencia entre tejidos de dos regiones de la gónada, que es característico de hembras que van a tener clusters solo en una región de la gónada, en etapas tempranas. En esta región se observan algunas células germinales, mientras en la otra región predomina el tejido conjuntivo.
942	Macho putativo	Borde liso, las células germinales no se distinguen claramente. Parece ser un estadio temprano. El tejido gonadal todavía no aumentó en el ancho de la gónada.
948	Indiferenciado	No se observan células germinales
949	Macho putativo	El borde es liso y el aspecto general homogéneo.
951	Hembra	Borde con cortes e indentaciones. Se observan clusters y células germinales en mitosis.
952	Hembra	Se observan clusters mitóticos o meióticos.
953	Macho	Borde liso. Se pueden observar células germinales mitóticas en cordones

4.3 Expresión de aromatasa en gónadas

El estudio global de los niveles de expresión de la aromatasa mostró que este gen se expresó en todos los estadios estudiados que cubrieron el período indiferenciado (3 a 7 meses) y el período donde se inició la diferenciación (8 y 9 meses) (Figura 7).

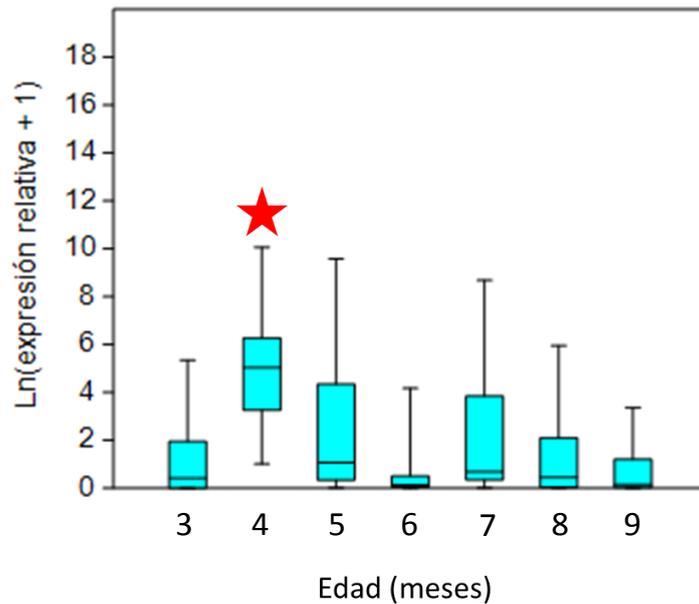


Figura 7. Boxplot realizado a partir de la transformación de los datos de expresión obtenidos para cada uno de los meses del estudio. Los niveles de expresión para el mes 4 son significativamente diferentes del resto de los meses ($p < 0,05$) y se indica con una estrella.

En el cuarto mes la expresión se hace significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el resto de los meses evaluados. El descenso en la expresión observado en el 6to mes no es significativamente diferente del resto de los meses salvo del 4to mes (Figura 8).

	One-way ANOVA	Residuals	Tukey's pairwise	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise		
Bonferroni corrected p values							
	A	B	C	D	E	F	G
A		3,703E-05	1	1	1	1	1
B	3,703E-05		0,01306	7,173E-06	0,0213	0,0003359	9,532E-06
C	1	0,01306		0,04917	1	1	0,1377
D	1	7,173E-06	0,04917		0,2055	1	1
E	1	0,0213	1	0,2055		1	0,3016
F	1	0,0003359	1	1	1		1
G	1	9,532E-06	0,1377	1	0,3016	1	

Figura 8. Test de Mann-Whitney pairwise con p valores corregidos por Bonferroni. Se observan en rosado los meses entre los que existen diferencias significativas. A = 3 meses; B = 4 meses; C = 5 meses; D = 6 meses; E = 7 meses; F = 8 meses; G = 9 meses. B tiene diferencias significativas con el resto de los meses, y C tiene diferencias con D.

Con el fin de observar mejor la distribución de los niveles de expresión a nivel individual y mensual se realizó un gráfico de puntos que muestra claramente que en todos los meses hay diferentes grupos de individuos: un grupo de mayor expresión > 12% y un grupo de baja expresión <12% por debajo de la línea (Figura 9). Esta es una división arbitraria ya que al no tener un marcador genético del sexo no podemos realizar estadística para comparar los niveles de expresión de los machos y de las hembras.

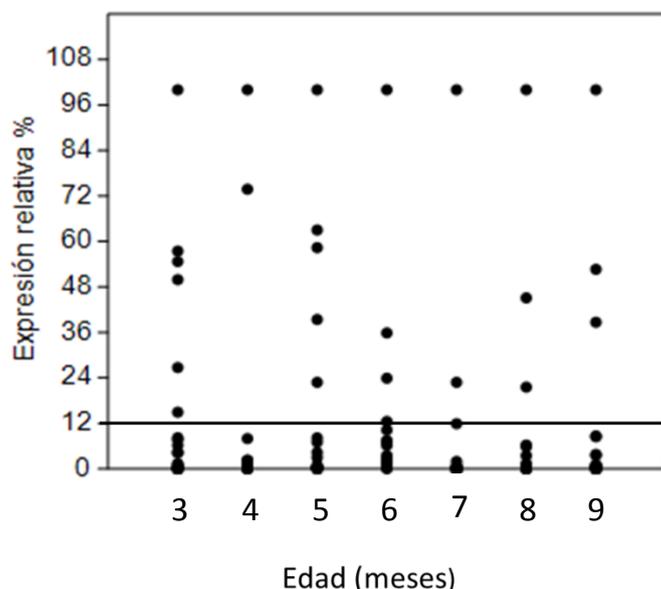


Figura 9. Se observa la expresión relativa de cada uno de los individuos en cada uno de los meses estudiados. Los niveles de expresión son relativos a aquel individuo que mostró la expresión de aromatasa más alta en el mes correspondiente, este representa el 100% en cada mes. Por arriba de la línea se observan los grupos de individuos con mayor expresión, por debajo de la línea los grupos de individuos con menor expresión.

En los meses 8 y 9 ya se inició la diferenciación sexual, y es por ello que se graficaron los valores de expresión de aromatasa para comparar los indiferenciados de los diferenciados (Figura 10).

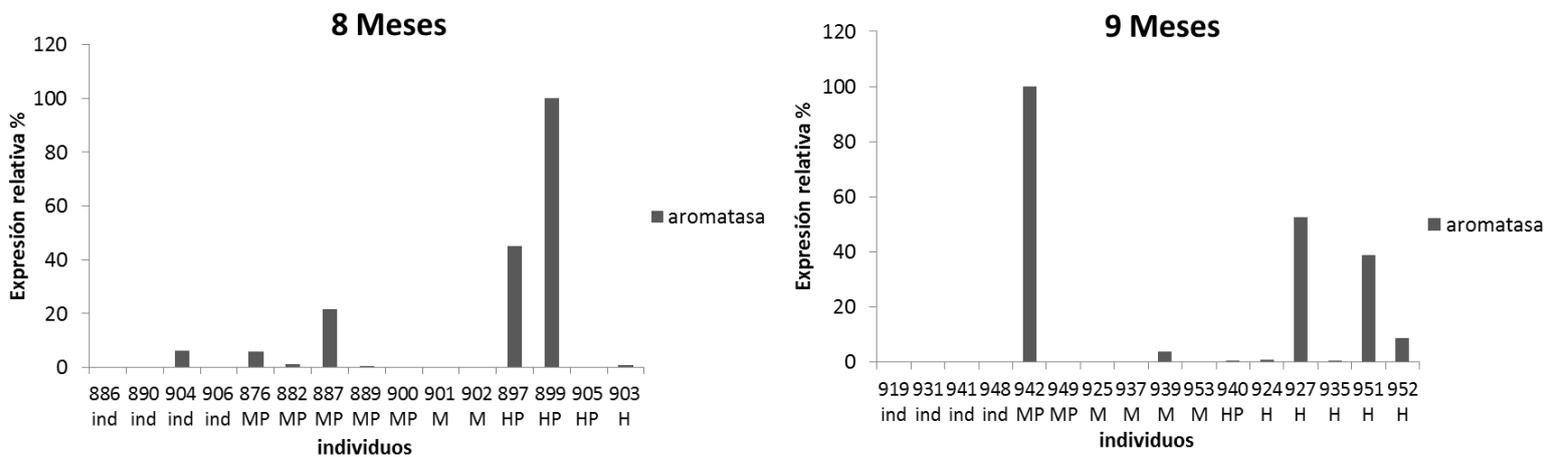


Figura 10. Se observa la expresión relativa en % para cada uno de los individuos estudiados en el meses 8 y 9. Para cada individuo se observan además los diagnósticos realizados a partir de la histología, siendo: ind = indiferenciados; MP = machos putativos; HP = hembra putativa; M = machos; H = hembra

Los resultados del ANOVA realizado para los 8 meses indican que no existen diferencias significativas entre los niveles de expresión de aromatasa de los grupos hembras putativas (HP), machos putativos (MP) e indiferenciados (ind) (p-valor = 0,2075).

Los promedios de expresión para los 8 meses por otro lado muestran una tendencia donde se aprecia que las hembras en diferenciación o hembras putativas (Figura 11 HP panel izquierdo) tienen niveles de expresión superiores al de los futuros machos (machos putativos Figura 11 MP panel izquierdo) o de los Indiferenciados (Figura 11 ind panel izquierdo). La variabilidad de los datos es muy grande como se muestra la Figura 11 (panel derecho) y la muestra muy pequeña para poder concluir en este trabajo sobre la aromatasa como posible marcador femenino a los 8 meses de edad.

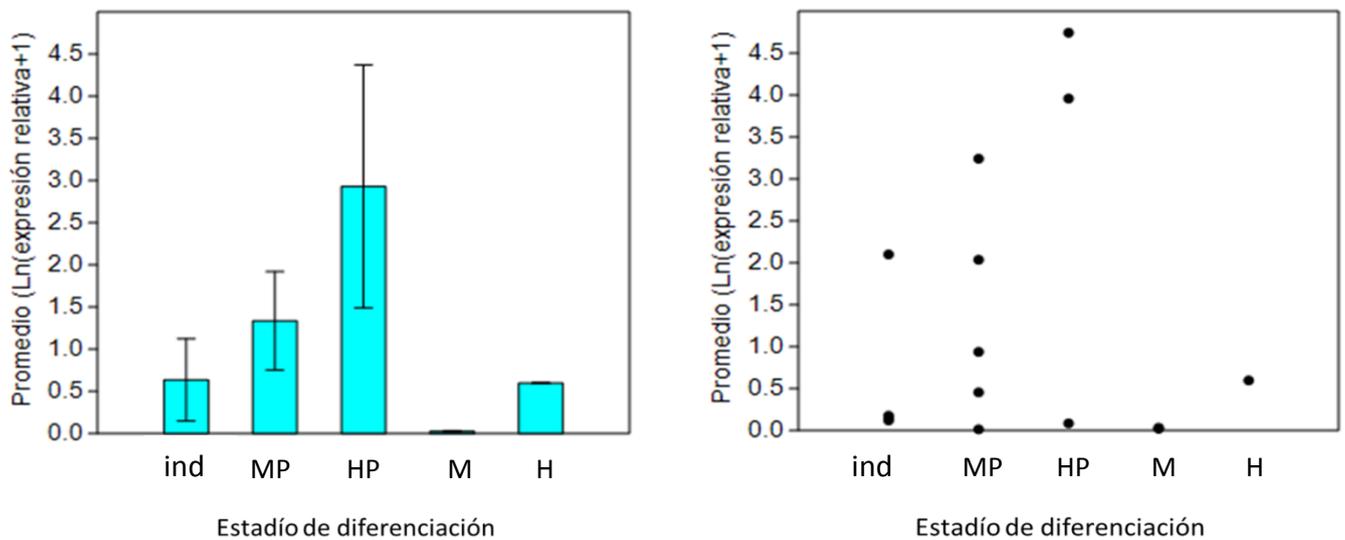


Figura 11. Expresión promedio de aromatasa a los 8 meses de edad de cada uno de los grupos formados según su estado de desarrollo por histología (panel izquierdo), siendo ind=indiferenciados; MP= machos putativos; HP=hembras putativas; M= machos y H= hembras. Valores de todas las muestras de cada grupo utilizadas para formar los promedios (Panel derecho). Cada punto equivale al valor de expresión de aromatasa de un individuo del grupo correspondiente, siendo los grupos los mismos que los mencionados para el grafico de barras.

Para los 9 meses el test de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los machos, hembras e indiferenciados ($p < 0,05$). Sin embargo, al aplicar el test de Mann-Whitney pairwise con corrección de los p-valores por Bonferroni las diferencias no fueron significativas. Esto indica que los valores entre los grupos se encuentran justo en este límite (ser o no ser significativa) y dependen mucho de la potencia de los test utilizados para indicarnos si la diferencia es significativa.

En la Figura 12 se muestran los promedios y sus desvíos (panel de la izquierda) así como la distribución de datos (panel de la derecha). El número de individuos es muy bajo como para sacar conclusiones. Sin embargo, cabe destacar que hubo un macho putativo con niveles muy elevados de aromatasa.

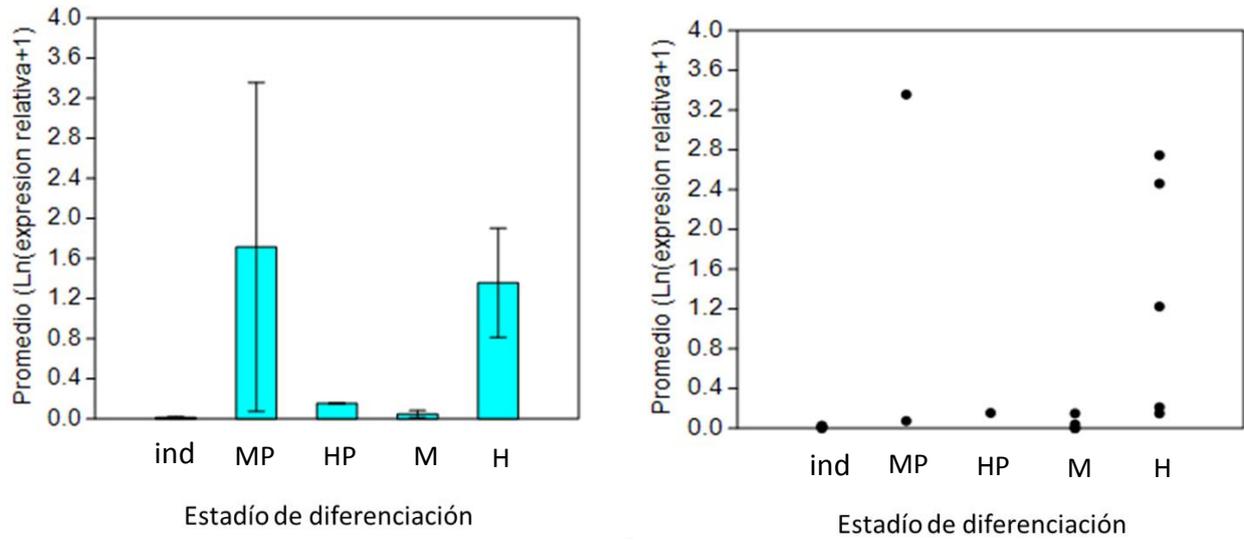


Figura 12. Expresión promedio de aromatasa a los 9 meses de edad para cada uno de los grupos formados según su estado de desarrollo por histología (panel izquierdo), siendo ind=indiferenciados; MP= machos putativos; HP= hembras putativas; M= machos y H= hembras. Valores de todas las muestras de cada grupo utilizadas para formar los promedios (panel derecho). Cada punto equivale al valor de expresión de aromatasa de un individuo del grupo correspondiente, siendo los grupos los mismos que los mencionados para el gráfico de barras.

5 Discusión

Nuestros resultados muestran que en el esturión siberiano hay una sola aromatasa que se expresa en gónada y cerebro y que es homóloga de la denominada aromatasa A (*cyp19a1a*). Esto evidencia que en esta especie basal y a diferencia de los teleósteos existe una sola aromatasa expresada en cerebro y gónada. En los peces teleósteos se han descrito dos genes parálogos de la aromatasa llamados aromatasa A (*cyp19a1a*) y aromatasa B (*cyp19a1b*). La primera (*cyp19a1a*) se expresa fundamentalmente en los ovarios en diferenciación y ya diferenciados de peces mientras que la segunda (*cyp19a1b*) se expresa fundamentalmente en el cerebro de peces, aunque recientemente se ha demostrado su expresión en los testículos de peces (Delalande et al 2015).

Los conocimientos que se tienen hasta el momento sobre este tema indican que hubo tres rondas de duplicación completa del genoma (WGD), la generación de nueva información a nivel genético que se produjo durante esta duplicación permitió la radiación de especies y evidencia que las WGD resultaron esenciales para la evolución (Ohno et al. 1968; Meyer y Schartl 1999). Las dos primeras rondas de duplicación se produjeron en un período relativamente pequeño de tiempo, sobre los deuterostomados ancestrales y previamente a la aparición de los vertebrados (Meyer y Schartl 1999; Robinson-Rechavi et al. 2004). Luego de la radiación que se produjo en los vertebrados mandibulados y dio lugar a los actinopterigios y sarcopterigios, se produjo entonces en los teleósteos la tercer ronda de duplicación del genoma (Meyer y Schartl 1999; Taylor et al. 2003; Venkatesh 2003; Jaillon et al. 2004). En esta duplicación del genoma surgen nuevos genes que se mantendrán estables en todos los teleósteos, entre ellos la *cyp19a1b* que es un parálogo de la *cyp19a1a* (aromatasa gonadal) (Callard y Tchoudakova 1997). El hecho de que en el esturión esté presente una única forma de la aromatasa (*cyp19a1a*) en gónada como en cerebro indica que

este no formó parte de la tercera ronda de duplicación del genoma, lo que es coherente con la idea que plantea tanto Venkatesh (2003) como Jaillon et al. (2004) y con la posición filogenética que le otorga Li et al. (2008) siendo este un actinopterigio basal no óseo, es decir que el grupo en el cual se encuentran los esturiones está por fuera de los teleósteos.

El *cyp19a1a* codifica para una enzima capaz de convertir andrógenos en estrógenos, que se propone están implicados tanto en la diferenciación sexual de las gónadas (Baroiller et al 1999, Piferrer y Guiguen 2008, Guiguen et al 2010) como en la diferenciación sexual del cerebro (Forlano et al. 2006). En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la expresión del gen de la aromatasa a nivel gonadal con el fin de comprender si al igual que en los peces modernos como los teleósteos, la aromatasa se expresa en altos niveles durante la diferenciación sexual del esturión que es un pez muy antiguo.

La diferencia principal entre los vertebrados superiores y los peces es que los primeros son independientes de los estrógenos durante la diferenciación sexual y los segundos usan los estrógenos como principales mediadores de la diferenciación sexual gonadal. La idea impuesta sobre diferentes especies de vertebrados, marsupiales (Coveney et al. 2001), aves (Scheib 1983), reptiles (Smith et al. 1995; Merchant-Larios et al. 1997) y fuertemente validada sobre teleósteos (Kitano et al. 2000; Kobayashi et al. 2003; Iwamatsu et al. 2006), sugiere a la aromatasa como uno de los principales factores de la diferenciación ovárica (Guiguen et al. 2010). En realidad una enzima no es un factor que pueda regular la diferenciación gonadal pero si puede hacerlo su principal producto de catálisis que son los estrógenos, que se ha demostrado tienen un fuerte efecto feminizante cuando se los aplica en etapas tempranas del desarrollo (Baroiller et al 1999). Al inhibir la aromatasa en hembras durante el período de diferenciación, en muchas especies se observa una reversión fenotípica del sexo

(Piferrer et al. 1994; Kitano et al. 2000; Afonso et al. 2001). Incluso se demostró a través de los primeros trabajos realizados por Nakamura et al. (2003); Bhandari et al. (2006) sobre peces ya diferenciados, que la aromatasa y por lo tanto los estrógenos resultan imprescindibles no solo para la diferenciación ovárica sino también para la manutención de la gónada femenina del pez durante el resto de su vida, y a su vez nos habla de gran plasticidad que muestra el grupo de los teleósteos.

Los estudios de expresión realizados en este trabajo completan los previamente obtenidos en el laboratorio (Vizziano-Cantonnet et al 2016) y demuestran que a los 4 meses existe un pico significativo de expresión de la aromatasa que sugiere que en ese mes ocurren eventos moleculares de importancia muy probablemente relacionados con la diferenciación de una gónada bipotencial hacia ovario. Otro aporte de este trabajo es la confirmación de la presencia de grupos de individuos con baja expresión de aromatasa y grupos con expresión alta. Esto se demuestra en forma mensual durante todo el período de diferenciación sexual (desde los 3 a los 7 meses) y se mantiene en el período en donde se inicia la diferenciación sexual (8 y 9 meses). Si bien la falta de un marcador genético del sexo impide separar los futuros machos de las futuras hembras individualmente en el período de 3 a 7 meses, es evidente que hay un grupo de individuos cuya expresión es $< 12\%$ y otros grupo tiene una expresión $> 12\%$. Estamos pensando que los individuos de expresión baja serían futuros machos y los de expresión alta futuras hembras. Dado que en el período de diferenciación que ocurre entre los 8 y 9 meses no hubo una cantidad suficiente de individuos diferenciados y que en un caso un macho putativo tuvo niveles muy elevados de aromatasa, no podemos concluir en este trabajo que la aromatasa sea un claro marcador de desarrollo ovárico. Los resultados tampoco la descartan ya que las tendencias observadas en las hembras putativas de 8 meses y en las hembras

diferenciadas de 9 meses respecto de los machos muestran una tendencia general al aumento.

Dado que el esturión tendría un sistema de determinación del sexo genético y monofactorial del tipo ZZ/ZW (Van Eenennaam et al. 1999; Omoto et al. 2005; Flynn et al. 2006; Fopp-Bayat 2010; Saber y Hallajian 2014) se espera una progenie con una relación de sexos 1:1, y por lo tanto presencia de un 50% de individuos con expresión de aromatasa alta. Sorprendentemente, el porcentaje de individuos con aromatasa >12% fue mucho menor al 50%. Estos resultados abren varios interrogantes. Uno de ellos es saber si realmente la aromatasa es un buen marcador femenino en esturiones y si el estradiol actúa como mediador temprano de la diferenciación ovárica. Los resultados observados en individuos ya diferenciados mostraron que los niveles de aromatasa no son significativamente diferentes entre hembras y machos putativos. Creemos que una de las formas de dilucidar este problema es realizar una deleción por mutagénesis y observar si realmente las gónadas se masculinizan. Otra interpretación es que el tipo de determinación sexual no sea monofactorial. Un ejemplo es el sistema poligénico de determinación del sexo que ha mostrado una gran diversidad de resultados en lo que refiere a la proporción de sexos en la progenie, y depende de la interacción de factores que se encuentran en cromosomas autosomales o que pueden aparecer también en cromosomas sexuales y desviando la proporción sexual hacia cualquiera de los dos sexos (Kosswig 1964; Bulmer y Bull 1982; Moore y Roberts 2013). En el zebrafish una de las especies para la cual se observó que tiene un sistema de determinación sexual poligénico se ha visto que las proporciones de los sexos llegan a variar en un rango que va desde el 4,8% hasta el 97,3% de machos (Liew et al. 2012). Este tipo de determinación del sexo puede darse en peces con sistemas tanto XX/XY como ZZ/ZW, por ejemplo es el caso de *Xiphophorus spp* o *Danio rerio* y parecería que podría resultar más común de lo que actualmente se piensa (Liew et al. 2012; Moore y

Roberts 2013), por lo que no se descarta que esto suceda en esturiones. Podemos pensar en otras causas que puedan llevar a relaciones dispares entre machos y hembras como pueden ser diferentes elementos ambientales que influyeran en la diferenciación del sexo (Baroiller y D'cotta 2001). Ya se ha demostrado en tilapia por ejemplo que puede haber interacción entre los sistemas de determinación genética y factores ambientales, el más común es la temperatura (Baroiller et al. 1995; Baroiller y D'cotta 2001). Habría que tener en cuenta este punto debido a que las temperaturas de Uruguay son muy diferentes a aquellas que se producen en la región de origen de esta especie pudiendo afectar a los individuos y su diferenciación sexual. Además de la temperatura hay un factor ambiental que también resulta muy interesante para proseguir el análisis de nuestro estudio y este es el de la densidad, la cual parece que también puede afectar la diferenciación del sexo en peces para algunas especies (Francis 1983; Roncarati et al. 1997; Krueger y Oliveira 1999; Baroiller y D'cotta 2001). Esto se ha confirmado por ejemplo en el caso de la anguila europea y la anguila americana donde mediante estudios se comprobó que a mayores densidades de individuos, hay una mayor proporción que se diferencian a machos (Roncarati et al. 1997; Krueger y Oliveira 1999). Las condiciones de cría de que se dan en la planta de piscicultura son muy diferentes a las que se producen en la naturaleza, y dado que la primera etapa de cría, la cual incluye el período de diferenciación molecular (4-5 meses) se produce en tanques donde hay una gran densidad de animales, podríamos pensar que algún tipo de procesos similar a este podría estar sucediendo.

Vale aclarar, como se mencionó en la sección anterior, que en los nueve meses el test de Mann-Whitney señala que hay diferencias significativas entre machos y hembras hasta el momento que corregimos los p-valores por criterio de Bonferroni buscando un resultado más robusto. Esto nos lleva a pensar que si realizáramos un estudio con mayor cantidad de individuos entre estas categorías (machos, hembras e

indiferenciados) los resultados podrían llegar a ser diferencialmente significativos entre macho, hembras e indiferenciados. También se observó que a los 9 meses los machos putativos presentan el mayor promedio de expresión de aromatasa, esto es debido a que uno de los machos putativos tiene una elevadísima expresión de aromatasa (Figura 12). La expresión de aromatasa no resulta totalmente dimórfica, sin embargo el hecho de que la diferencia de expresión entre machos, hembras e indiferenciados haya sido significativa previo a la corrección por Bonferroni, nos permite hipotetizar que aumentando el número de individuos del estudio, disminuiría el peso relativo que otorgan los outliers, y así se encontrarían diferencias significativas; y también que los altos niveles de aromatasa se asocian directamente al sexo femenino.

Se ha demostrado para muchas especies de mamíferos que a pesar de que la aromatasa es una enzima con una acción principalmente femenina, y con una alta expresión en hembras, los machos también la expresan en menor nivel pero con implicancias muy importantes en lo que refiere a su acción biológica sobre el sistema reproductivo (Carreau et al. 1999; Luconi et al. 2002). La aromatasa se encuentra tanto en células de Leydig y Sertoli tanto como en células germinales, y está fuertemente relacionada con el buen desarrollo de la espermatogénesis, y con la motilidad del espermatozoide (Carreau 2001; Carreau et al. 2002). Machos a los que se les ha reprimido la aromatasa mediante tratamientos hormonales, o que tienen niveles muy bajos, han resultado estériles, demostrando su papel fundamental también en las vías de desarrollo sexual masculino (Eddy et al. 1996; O'Donnell et al. 2001). Este aspecto es escasamente conocido en peces ya que no existe prácticamente ningún estudio en respecto a este punto en ellos, sin embargo Miura et al. (1999) demostró que para la anguila japónica bajos niveles de E_2 en machos están relacionados directamente con el buen funcionamiento de la espermatogénesis. Esta misma razón puede ser una buena

hipótesis para explicar los bajos niveles de aromatasa que se observan en los resultados para los individuos que presumimos serían posiblemente machos.

En un trabajo reciente realizado por Delalande et al. (2015) en truchas macho, se observó que en la gónada se expresa tanto la aromatasa A como la aromatasa B (aparecida en teleósteos), y que aunque los niveles de expresión registrados son mucho menores a los que se encuentran en ovarios, se deduce que en los testículos la aromatasa estaría jugando un papel importante a nivel biológico. Delalande et al. (2015) mostraron además que cada aromatasa tiene una modulación propia de los niveles de expresión. La aromatasa A muestra mayores niveles durante los estadios tempranos del desarrollo gonadal, y decrece rápidamente en el transcurso de la maduración gonadal y la espermatogénesis, sin embargo en ese mismo período en el cual la aromatasa A decrece, se da un incremento en la expresión de la aromatasa B. Según los resultados que obtuvieron ellos sugieren que la aromatasa A sería la que generaría el E_2 intratesticular suficiente para proliferación de espermatogonias, pero luego la aromatasa B se encargaría de esta tarea, generando el estradiol que permite la maduración del espermatozoide. En el esturión existe una única aromatasa, la aromatasa A, y podría estar actuando en el desarrollo temprano del testículo, esto sería una posible razón de los niveles que observamos en los machos de nuestro estudio que están comenzando su etapa de diferenciación.

La histología nos demostró que en el mes 8 la mayoría de los individuos aún están indiferenciados o aparecen como machos putativos o hembras putativas. Diferente es lo que sucede en el noveno mes de desarrollo donde la mayoría de los individuos muestreados para histología ya aparecían totalmente diferenciado en machos o hembras (9 individuos de 16 totales), siendo el resto putativos (3) o indiferenciados (4). La diferenciación del sexo se produce entonces entre estos dos meses, donde aparecen las primeras características propias del desarrollo gonadal de

cada sexo, como lo son la disposición de células germinales en cordones en el caso de los macho, o el agrupamiento en clusters de células germinales femeninas, e indentaciones del borde del tejido, en hembras. Podemos concluir aquí que la diferenciación sexual a nivel morfológico comienza durante el octavo y noveno mes de edad dando una mayor precisión a resultados previos obtenidos en el laboratorio (Vizziano-Cantonnet et al. 2016).

Los altos niveles de aromatasa expresados en el 4to mes nos hacen pensar que este es un punto crítico de lo que se conoce como el período de diferenciación molecular siendo muy posiblemente la aromatasa uno de los tantos genes involucrados directamente en las vías de diferenciación del sexo. Podríamos incluso hablar más específicamente de la vía de diferenciación femenina si relacionamos este resultado con la expresión que se da mayormente en hembras y que analizamos anteriormente. Además el comportamiento general de la aromatasa durante los primeros meses de desarrollo también sigue el patrón que se observó en el trabajo realizado por Vizziano-Cantonnet et al. (2016) sin embargo, en este caso existe un corrimiento en el tiempo que tarda en llegar a mismo comportamiento que se muestra en el trabajo anteriormente mencionado. Mientras que Vizziano-Cantonnet et al. (2016) identificó que el pico de mayor expresión de los genes se producía durante el mes 3 con un posterior descenso, aquí la cinética muestra el mismo comportamiento con un atraso de un mes, y lo mismo sucede con el periodo de diferenciación sexual el cual anteriormente fue identificado en 8 meses mientras que en este trabajo se acerca más a los 9 meses. Cabe preguntarse entonces cual es la causa de esto, quizás diferentes características ambientales como la temperatura del agua o pH hayan variado durante los años y pueden estar influyendo sobre los organismos, causando que en la expresión de los genes que estudiamos se retrase, produciéndose entonces este desfasaje en el tiempo, que se refleja al comparar los resultados con aquellos

obtenidos anteriormente (Vizziano-Cantonnet et al. 2016). Luego de los 5 meses se produce un descenso abrupto de la expresión de aromatasa en el mes 6 para la cual no tenemos una explicación formal.

Conclusiones

Los niveles de expresión de aromatasa durante el período de diferenciación molecular (gónadas indiferenciadas morfológicamente) son compatibles con una producción temprana de estrógenos y por lo tanto con la intervención de estrógenos como mediadores de la diferenciación sexual en esturiones.

Si bien se observaron dos tipos de expresión de aromatasa durante el período indiferenciado, uno alto que podría considerarse como individuos en vías de diferenciación femenina y uno bajo correspondiente a la vía de diferenciación masculina, la ausencia de un dimorfismo sexual en la expresión de aromatasa esperado entre los machos y las hembras impide concluir sobre un posible papel feminizante de los estrógenos en el esturión siberiano.

Se concluye que existe una sola forma de aromatasa en el esturión siberiano que se expresa tanto en gónadas como en cerebros y que tiene implicancias evolutivas mostrando que este gen no se duplicó previo a la 3er ronda de duplicación del genoma ocurrida en la base de los teleósteos.

Perspectivas

Dado que no se pudo confirmar que la aromatasa sea un gen involucrado en la vía de diferenciación femenina como está clásicamente demostrado en peces teleósteos, se comenzó a investigar otros posibles genes involucrados tempranamente en la regulación de la diferenciación sexual de los futuros ovarios. De hecho utilizando los datos obtenidos en el transcriptoma gonadal del esturión siberiano se han

realizado estudios de expresión diferencial de los cuales surgieron una serie de genes candidatos que podrían estar involucrados en el control de la diferenciación ovárica. Con esta idea se postuló y ganó un proyecto PAIE en curso del cual estoy encargado. Los genes seleccionados fueron *irx3*, *mafa*, *lhx2*, *foxl2* y en este momento se están validando los cebadores para qPCR. Es de destacar que estos no son los genes clásicamente conocidos como femeninos en los peces.

Con el fin de profundizar en la funcionalidad de los posibles genes femeninos se comenzarán estudios de inhibición génica y para ello se ha obtenido la financiación para la estadía de un investigador de Argentina quien vendrá a nuestro laboratorio en el segundo semestre de 2016 y con quien se inicia una nueva cooperación.

Otro modo de realizar estudios sobre posibles genes femeninos y masculinos es realizar una inversión hormonal del sexo y ver cómo se comportan los genes durante los procesos de feminización y masculinización. Esto formará parte de mi futura tesis de Doctorado.

Dado que una de las mayores limitantes actuales para poder estudiar la diferenciación sexual de los esturiones es la falta de un marcador genético del sexo, es nuestro interés aplicar las técnicas nuevas llamadas RADseq que son una forma rápida de comparar el genoma masculino y el femenino sin necesidad de ensamblar todo el genoma del macho y de la hembra. Para ello el grupo de investigación presentó un proyecto a la CSIC en el último llamado de 2016.

A largo plazo el laboratorio sigue interesado en los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación sexual en peces y en particular de una especie emergente en Uruguay como especie de cultivo y producción de caviar. Las bases biológicas que estamos sentando en esta especie podrán servir con fines tecnológico-

productivos sobre todo en la obtención de un sexado temprano o en la conformación de planteles monosexo hembras.

Bibliografía

- Abucay JS, Mair GC, Skibinski DO, Beardmore JA. 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 173(1):219-234.
- Afonso LOB, Wassermann GJ, Terezinha de Oliveira R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology* 290(2):177-181.
- Arezo M, D'Alessandro S, Papa N, De Sà R, Berois N. 2007. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell* 39(2):89-98.
- Bacalbasa-Dobrovici N. Statut des differentes especes d 'esturgeons dans le Danube Roumain: Problemes lies a leur maintenance [Status of different sturgeon species in the Romanian Danube: Problems associated with their protection]; 1991. p 185-192.
- Bacalbaşa-Dobrovici N. 1997. Endangered migratory sturgeons of the lower Danube River and its delta. *Environmental Biology of Fishes* 48(1-4):201-207.
- Baroiller J-F, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55(6-7):910-931.
- Baroiller J, D'cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4):399-409.
- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology* 273(3):216-223.
- Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Cribeu E, De Baeree E, Guiguen Y, Jaubert F, Pailhoux E. 2005a. Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction Nutrition Development* 45(3):377-382.
- Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y, Veitia RA. 2004. An evolutionary and functional analysis of FoxL2 in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of molecular endocrinology* 33(3):705-715.
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y. 2005b. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biology of reproduction* 73(5):959-966.
- Beçak W. 1983. Evolution and Differentiation of Sex Chromosomes in Lower Vertebrates. *Mechanisms of Gonadal Differentiation in Vertebrates: Springer Berlin Heidelberg*. p 3-12.
- Beçak W, Beçak ML, Nazareth H, Ohno S. 1964. Close karyological kinship between the reptilian suborder Serpentes and the class Aves. *Chromosoma* 15(5):606-617.
- Belaid B, Richard-Mercier N, Pieau C, Dorizzi M. 2001. Sex reversal and aromatase in the European pond turtle: treatment with letrozole after the thermosensitive period for sex determination. *Journal of Experimental Zoology* 290(5):490-497.
- Bemis WE, Findeis EK, Grande L. 1997. An overview of Acipenseriformes. *Sturgeon biodiversity and conservation: Springer*. p 25-71.
- Bemis WE, Kynard B. 1997. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes* 48(1-4):167-183.
- Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedó G, Vizziano-Cantonnet D. 2013. Expression of dmrt1 and sox9 during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish physiology and biochemistry* 39(1):91-94.

- Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedo G, Brunet F, Volff JN, Vizziano-Cantonnet D. 2012. Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Molecular reproduction and development* 79(8):504-516.
- Bertollo L, Cavallaro Z. 1992. A highly differentiated ZZ/ZW sex chromosome system in a Characidae fish, *Triplotheus guentheri*. *Cytogenetic and genome research* 60(1):60-63.
- Bhandari R, Nakamura M, Nagahama Y. Estrogen is essential for the maintenance of female sex in fish; 2006. WILEY-LISS DIV JOHN WILEY & SONS INC, 111 RIVER ST, HOBOKEN, NJ 07030 USA. p 111-111.
- Billard R, Lecointre G. 2000. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10(4):355-392.
- Birstein VJ. 1993. Sturgeons and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology* 7(4):773-787.
- Birstein VJ, Hanner R, DeSalle R. 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *sturgeon biodiversity and conservation*: Springer. p 127-155.
- Blázquez M, Carrillo M, Zanuy S, Piferrer F. 1999. Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. *Journal of fish biology* 55(5):916-930.
- Blázquez M, Piferrer F. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and cellular endocrinology* 219(1):83-94.
- Blázquez M, Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Donaldson EM. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* 135(4):329-342.
- Brennan J, Capel B. 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics* 5(7):509-521.
- Bulmer M, Bull J. 1982. Models of polygenic sex determination and sex ratio control. *Evolution; international journal of organic evolution*:13-26.
- Bull J. 1980. Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology*:3-21.
- Bull J, Vogt R. 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science* 206(4423):1186-1188.
- Bull JJ. 1983. *Evolution of sex determining mechanisms*: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. 1978. Phylogenetic Distribution of Aromatase and Other Androgen-Converting Enzymes in the Central Nervous System*. *Endocrinology* 103(6):2283-2290.
- Callard GV, Tchoudakova A. 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 61(3):387-392.
- Carreau S. 2001. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Molecular and cellular endocrinology* 178(1-2):65-72.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J. 2002. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and cellular endocrinology* 193(1-2):137-143.
- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 22(4):211-223.
- Conover DO, Fleisher MH. 1986. Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 43(3):514-520.
- Coveney D, Shaw G, Renfree MB. 2001. Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tamar wallaby. *Biology of reproduction* 65(2):613-621.
- Chen X, Wei Q, Yang D, Zhu Y. 2006. Observations on the formation and development of the primary germinal tissue of cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Journal of Applied Ichthyology* 22:358.

- D'cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller J-F. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular reproduction and development* 59(3):265-276.
- Delalande C, Goupil AS, Lareyre JJ, Le Gac F. 2015. Differential expression patterns of three aromatase genes and of four estrogen receptors genes in the testes of trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular reproduction and development* 82(9):694-708.
- Desprez D, Mélard C. 1998. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 162(1):79-84.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208(3):191-364.
- Di Landro S. 2014. Estudio de la expresión de *amh* durante el período de diferenciación del sexo en el esturión siberiano, *Acipenser baerii*. Facultad de Ciencias: Universidad de la República. 89 p.
- Eddy E, Washburn TF, Bunch D, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137(11):4796-4805.
- Feist G, Yeoh C-G, Fitzpatrick MS, Schreck CB. 1995. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture* 131(1):145-152.
- Fenske M, Segner H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology* 67(2):105-126.
- Flynn S, Matsuoka M, Reith M, Martin-Robichaud D, Benfey T. 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture* 253(1):721-727.
- Fopp-Bayat D. 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 305(1):174-177.
- Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *The Journal of Neuroscience* 21(22):8943-8955.
- Forlano PM, Schlinger BA, Bass AH. 2006. Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems. *Front Neuroendocrinol* 27(3):247-274.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. 1983. 7 The Gonadal Steroids. *Fish physiology* 9:277-372.
- Francis RC. 1983. Experiential effects on agonistic behavior in the paradise fish, *Macropodus opercularis*. *Behaviour* 85(3):292-313.
- Georges A, Ezaz T, Quinn A, Sarre S. 2010. Are reptiles predisposed to temperature-dependent sex determination? *Sexual Development* 4(1-2):7-15.
- Golan M, Levavi-Sivan B. 2014. Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *General and comparative endocrinology* 207:50-55.
- Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1993. SRY and sex determination in mammals. *Annual review of genetics* 27(1):71-92.
- Gorman GC. 1973. The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*:349-424.
- Goto-Kazeto R, Kight KE, Zohar Y, Place AR, Trant JM. 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *General and comparative endocrinology* 139(1):72-84.
- Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F, Cotinot C. 2004. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Developmental Dynamics* 231(4):859-870.
- Grande L, Bemis WE. 1996. Interrelationships of Acipenseriformes, with comments on Chondrostei" In *Interrelationships of Fishes*, Edited by: Stiassny, MLJ, Parenti, LR and Johnson, GD:85-115.
- Grandi G, Chicca M. 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei). *Journal of morphology* 269(10):1238-1262.

- Gresswell RE, Kershner J, Dunham JB, Gresswell RE. 1997. Ecology and Management of Potamodromous Salmonids: Introduction to Ecology and Management of Potamodromous Salmonids. *North American Journal of Fisheries Management* 17(4):1027-1028.
- Guiguen Y. 2000. Implication of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion. *Current Topics in Steroid Research* 3:127-143.
- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, McMeel O, Martin S, Fostier A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular reproduction and development* 54(2):154-162.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang C-F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and comparative endocrinology* 165(3):352-366.
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M, Strussmann CA. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(8):2955-2959.
- Heublein J, Kelly J, Crocker C, Klimley AP, Lindley S. 2009. Migration of green sturgeon, *Acipenser medirostris*, in the Sacramento River. *Environmental Biology of Fishes* 84(3):245-258.
- Holčík J. 1989. *General Introduction to Fishes: Acipenseriformes*: Balogh Scientific Books.
- Hudson QJ, Smith CA, Sinclair AH. 2005. Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Developmental dynamics* 233(3):1052-1055.
- 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*. *Biology of reproduction* 78(2):333-341.
- IUCN. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. www.iucnredlist.org Downloaded on 03 December 2015.
- Iwamatsu T, Kobayashi H, Yamashita M. 2006. Sex reversal in medaka treated in vitro with 17 α -methyl-dihydrotestosterone during oocyte maturation. *Development, growth & differentiation* 48(1):59-64.
- Jaillon O, Aury J-M, Brunet F, Petit J-L, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431(7011):946-957.
- Jiang D-N, Yang H-H, Li M-H, Shi H-J, Zhang X-B, Wang D-S. 2016. *gsdf* is a downstream gene of *dmrt1* that functions in the male sex determination pathway of the Nile tilapia. *Molecular reproduction and development*:n/a-n/a.
- Jin F. An early fossil sturgeon (*Acipenseriformes*, *Peipiaosteidae*) from Fengning of Hebei, China; 1995. p 51-52.
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. 1998. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and cellular endocrinology* 145(1):3-7.
- Kallman K. 1984. A New Look at Sex Determination in Poeciliid Fishes. In: Turner B, editor. *Evolutionary Genetics of Fishes*: Springer US. p 95-171.
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S. 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.
- Keyvanshokoo S, Gharaei A. 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. *Aquaculture research* 41(9):e1-e7.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe S-I. 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular reproduction and development* 56(1):1-5.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 2003. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenetic and genome research* 101(3-4):289-294.

- Komatsu T, Nakamura S, Nakamura M. 2006. Masculinization of female golden rabbitfish *Siganus guttatus* using an aromatase inhibitor treatment during sex differentiation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(4):402-409.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351(6322):117-121.
- Kosswig C. 1964. Polygenic sex determination. *Cellular and Molecular Life Sciences* 20(4):190-199.
- Krueger WH, Oliveira K. 1999. Evidence for environmental sex determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Environmental Biology of Fishes* 55(4):381-389.
- Krüger A, Pudenz S. 2002. Chlorinated Hydrocarbon Pollution in Caviar Samples. *International Review of Hydrobiology* 87(5-6):637-644.
- Kwon JY, McAndrew B, Penman D. 2002. Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *Journal of fish biology* 60(3):625-636.
- Kynard B. 1997. Life history, latitudinal patterns, and status of the shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*. *Environmental Biology of Fishes* 48(1-4):319-334.
- Lawrence C, Ebersole JP, Kesseli RV. 2008. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fishes* 81(2):239-246.
- LeBreton GT, Beamish FWH, McKinley SR. 2005. *Sturgeons and paddlefish of North America*. Springer Science & Business Media, New York.: Kluwer Academic Publishers. p 323.
- Li C, Lu G, Orti G. 2008. Optimal data partitioning and a test case for ray-finned fishes (Actinopterygii) based on ten nuclear loci. *Systematic biology* 57(4):519-539.
- Liew WC, Bartfai R, Lim Z, Sreenivasan R, Siegfried KR, Orban L. 2012. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PloS one* 7(4):e34397.
- Luconi M, Forti G, Baldi E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 80(4-5):369-381.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417(6888):559-563.
- McAllister BG, Kime DE. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology* 65(3):309-316.
- McDowall R. 1992. Diadromy: origins and definitions of terminology. *Copeia*:248-251.
- McDowall RM. 1988. *Diadromy in fishes: migrations between freshwater and marine environments*: Croom Helm.
- McEnroe M, Cech Jr JJ. *Osmoregulation in white sturgeon: life history aspects*; 1987. p 191-196.
- Merchant-Larios H, Ruiz-Ramirez S, Moreno-Mendoza N, Marmolejo-Valencia A. 1997. Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and comparative endocrinology* 107(3):373-385.
- Meyer A, Scharl M. 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current opinion in cell biology* 11(6):699-704.
- Miller MJ. 2005. The ecology and functional morphology of feeding of North American sturgeon and paddlefish. *Sturgeons and paddlefish of North America*: Springer. p 87-102.
- Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and biophysical research communications* 264(1):230-234.
- Moore EC, Roberts RB. 2013. Polygenic sex determination. *Current Biology* 23(12):R510-R512.
- Moreira-Filho O, Bertollo LA, Galetti Jr PM. 1993. Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46(2-3):115-125.

- Myers GS. 1949. Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia*:89-97.
- 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(1):163-170.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology* 38:217-217.
- Nagahama Y. 1997. 17 α , 20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62(1):190-196.
- Nagahama Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish; 2000.
- Nakamura M, Bhandari RK, Higa M. 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish physiology and biochemistry* 28(1-4):113-117.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine reviews* 22(3):289-318.
- O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and Spermatogenesis 1. *Endocrine reviews* 22(3):289-318.
- Ohno S, Wolf U, Atkin NB. 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* 59(1):169-187.
- 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 \times *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture* 245(1):39-47.
- Pandian T, Sheela S. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138(1):1-22.
- Paragamian VL, Kruse G. 2001. Kootenai River white sturgeon spawning migration behavior and a predictive model. *North American Journal of Fisheries Management* 21(1):10-21.
- Pieau C. 1975. Temperature and Sex Differentiation in Embryos of Two Chelonians, *Emys orbicularis* L and *Testudo graeca* L. In: Reinboth R, editor. *Intersexuality in the Animal Kingdom*: Springer Berlin Heidelberg. p 332-339.
- Piferrer F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197(1):229-281.
- Piferrer F, Blázquez M. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish physiology and biochemistry* 31(2-3):215-226.
- Piferrer F, Guiguen Y. 2008. Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science* 16(S1):35-55.
- Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar II, Devlin RH, Donaldson EM. 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *Journal of experimental zoology* 270(3):255-262.
- Polyaninova A, Kashentseva L, Malinovskaya L, Molodtsova A, Smirnova L. 1999. Feeding conditions for sturgeons (*Acipenseridae*) in the Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology* 15(4-5):293-294.
- Quiros R, Vidal J. 2000. Cyclic behaviour of potamodromous fish in large rivers. *Management and Ecology of River Fisheries*:71-86.
- Rashid H, Kitano H, Lee KH, Nii S, Shigematsu T, Kadomura K, Yamaguchi A, Matsuyama M. 2007. Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 1(5):311-322.
- Robinson-Rechavi M, Boussau B, Laudet V. 2004. Phylogenetic dating and characterization of gene duplications in vertebrates: the cartilaginous fish reference. *Molecular biology and evolution* 21(3):580-586.
- Rochard E, Castelnau G, Lepage M. 1990. Sturgeons (*Pisces: Acipenseridae*); threats and prospects. *Journal of fish biology* 37:123-132.
- Roncarati A, Melotti P, Mordenti O, Gennari L. 1997. Influence of stocking density of European eel (*Anguilla anguilla*, L.) elvers on sex differentiation and zootechnical performances. *Journal of Applied Ichthyology* 13(3):131-136.
- Rubin DA. 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (*Teleostei*). *Copeia*:233-235.

- Rzepkowska M, Ostaszewska T. 2014. Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture* 6(2):75-88.
- Saber MH, Hallajian A. 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquaculture international* 22(1):273-279.
- Scheib D. 1983. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Mechanisms of Gonadal Differentiation in Vertebrates*: Springer. p 87-92.
- Schlinger BA. 1998. Sexual differentiation of avian brain and behavior: current views on gonadal hormone-dependent and independent mechanisms. *Annual review of physiology* 60(1):407-429.
- Schlinger BA, Arnold AP. 1991. Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(10):4191-4194.
- Silverin B, Baillien M, Foidart A, Balthazart J. 2000. Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species. *General and comparative endocrinology* 117(1):34-53.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. 2002. Aromatase-a brief overview. *Annual review of physiology* 64(1):93-127.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarnah B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, Bulun SE. 1994. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocrine reviews* 15(3):342-355.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf A-M, 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(6281):240-244.
- Smith CA, Elf PK, Lang JW, Joss JM. 1995. Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation* 58(4):281-290.
- 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(7261):267-271.
- Solari AJ. 1993. *Sex chromosomes and sex determination in vertebrates*: CRC Press.
- Strüssmann CA, Cota JCC, Phonlor G, Higuchi H, Takashima F. 1996. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environmental biology of fishes* 47(2):143-154.
- Strüssmann CA, Nakamura M. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish physiology and biochemistry* 26(1):13-29.
- Strüssmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Takashima F. 1997. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *The Journal of experimental zoology* 278(3):167-177.
- Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin IT, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K. 2014. Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nat Commun* 5:4157.
- Tave D. 1986. *Genetics for fish hatchery managers*: AVI Publishing Co., Inc.
- Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y. 2003. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. *Genome research* 13(3):382-390.
- Thorgaard GH. 1977. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science* 196(4292):900-902.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung B-C, Place AR. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology* 290(5):475-483.
- Tzchori I, Zak T, Sachs O. 2004. Masculinization of genetic females of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) by dietary administration of an aromatase inhibitor.

- Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 137(1):11-20.
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ. 2003. Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *The American Naturalist* 161(4):676-683.
- Van Eenennaam A, Van Eenennaam J, Medrano J, Doroshov S. 1999. Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity* 90(1):231-233.
- Venkatesh B. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. *Current opinion in genetics & development* 13(6):588-592.
- Vizziano-Cantonnet D, Anglade I, Pellegrini E, Gueguen MM, Fostier A, Guiguen Y, Kah O. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *General and comparative endocrinology* 170(2):346-355.
- Vizziano-Cantonnet D, Di Landro S, Lasalle A, Martínez A, Mazzoni TS, Quagio-Grassiotto I. 2016. Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Molecular reproduction and development*.
- 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(8):2198-2206.
- Volff JN, Schartl M. 2001. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111(1-3):101-110.
- Waldman JR, Nolan K, Hart J. 1996. Genetic differentiation of three key anadromous fish populations of the Hudson River. *Estuaries* 19(4):759-768.
- Wang D-S, Kobayashi T, Zhou L-Y, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K-i, Nagahama Y. 2007. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Molecular endocrinology* 21(3):712-725.
- Wang ZJ, Jeffs B, Ito M, Achermann JC, Richard NY, Hales DB, Jameson JL. 2001. Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(14):7988-7993.
- Wei Q, Ke Fe, Zhang J, Zhuang P, Luo J, Zhou R, Yang W. 1997. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes* 48(1-4):241-255.
- Wibbels T, Crews D. 1994. Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Journal of endocrinology* 141(2):295-299.
- Williot P, Rouault T, Brun R, Pelard M, Mercier D. 2002. Status of caught wild spawners and propagation of the endangered sturgeon *Acipenser sturio* in France: a synthesis. *International Review of Hydrobiology* 87(5):515-524.
- Wirgin II, Stabile JE, Waldman JR. 1997. Molecular analysis in the conservation of sturgeons and paddlefish. *Environmental Biology of Fishes* 48(1-4):385-398.
- Xie Q-P, He X, Sui Y-N, Chen L-L, Sun L-N, Wang D-S. 2016. Haploinsufficiency of SF-1 Causes Female to Male Sex Reversal in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology:en*. 2015-2049.
- Yamamoto T-O. 1969. Sex differentiation. *Fish physiology* 3(3):117-175.
- Yamazaki F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33(1):329-354.
- 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 : CB* 22(15):1423-1428.
- Yao HH-C. 2005. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Molecular and cellular endocrinology* 230(1):87-93.
- Yntema C, Mrosovsky N. 1979. Incubation temperature and sex ratio in hatchling loggerhead turtles: a preliminary report. *Marine Turtle Newsletter* 11:9-10.

- Zaitsev YP. 1993. Impact of eutrophication on the Black Sea fauna. Studies and Reviews-
General Fisheries Council for the Mediterranean (FAO).
- Zhang Y, Sun H, Liu X, Sun D, Qu Q. 2012. Histological observation of gonadal differentiation
and effect of rearing temperature on sex differentiation in Amur sturgeon *Acipenser
schrenckii*. *J Fish Sci China* 19:1008-1017.

