



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

Informe final publicable de proyecto

Búsqueda de genes candidatos a la determinación sexual del esturion siberiano usando una estrategia sin a priori en gónadas indiferenciadas de individuos sexados a nivel genómico

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172495

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2025

LASALLE GERLA, André (Responsable Técnico - Científico)

KLOPP, Christophe (Investigador)

VIZZIANO CANTONNET, Denise (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Los esturiones son peces antiguos del grupo Chondrostei, entre los cuales se encuentra el *Acipenser baerii*. En Uruguay su cultivo para producir caviar tiene gran relevancia económica, ubicando al país como octavo productor mundial.

Se postula que la determinación sexual en esturiones sigue un sistema ZZ/ZW, con un posible gen maestro ligado al cromosoma W. En 2020 se identificó un marcador genético del sexo a nivel de ADN, validado por nuestro laboratorio para *A. baerii*, con lo cual se abrió la posibilidad de sexar a los individuos durante cualquier etapa de su desarrollo y así trabajar con hembras y machos previo a la diferenciación gonadal.

Este proyecto busca identificar genes candidatos a la determinación sexual mediante transcriptómica gonadal en estadios tempranos, antes de la diferenciación morfológica, en individuos sexados. Se generaron bases transcriptómicas, se analizaron genes de la vía femenina y masculina. Los transcriptomas fueron ensamblados y analizados para detectar genes diferencialmente expresados.

Este trabajo permitió validar por primera vez en esturiones sexados en una etapa muy temprana de desarrollo (2,5 meses) los genes femeninos vinculados en trabajos previos con la diferenciación del sexo (*hsd17b1*; *foxl2*; *cyp19a1*). Se encontraron nuevos genes vinculados a la vía de diferenciación femenina, y un vínculo directo de algunos de ellos con los estrógenos, así como un apoyo bibliográfico que los marca como reguladores de la diferenciación ovárica en otros vertebrados, los más relevantes fueron *jun-b* y *fos-c*. Hormonas nunca antes vinculadas a este proceso adquieren un potencial rol, por ejemplo, la melatonina. Por primera vez surgen en etapas tan tempranas genes masculinos como *tbx1* (conocido solo en truchas dentro del grupo de peces), en lo que refiere a la diferenciación testicular. No se encontró el gen determinante del sexo, pero se rompió el esquema clásico de la diferenciación sexual, integrando nuevos genes al proceso.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Reproductiva (aspectos médicos van en "Ciencias Médicas y de la Salud") / diferenciación y determinación del sexo

Palabras clave: Esturión Siberiano / transcriptómica / determinación sexual /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Los esturiones son peces muy antiguos pertenecientes a los Actinopterygios (Chondrostei). Su historia evolutiva incluye tres rondas de duplicación completa del genoma, lo que explica su condición tetraploide (256 cromosomas) (Peng et al., 2007; Rajkov et al., 2014; Mogue & Barmintseva, 2018) y el gran tamaño de su genoma, que duplica el de especies diploides como el *Danio rerio* (Lamatsch et al., 2000; Zhou et al., 2011; Bytyutskyy et al., 2012). Estos peces, presentan cromosomas homomórficos (Fontana, 1994), por lo que no es posible distinguir los sexuales. Esta característica ocurre en la mayoría de los peces (Arkhipchuk, 1995; Scharl et al., 2016), pero sumado a esto la falta de dimorfismo sexual evidente, ha dificultado la identificación de genes determinantes del sexo.

El descubrimiento reciente de un marcador genético del sexo en esturiones, incluido el siberiano (*Acipenser baerii*), por Kuhl et al. (2021), permitió por primera vez sexar individuos en estadios indiferenciados, abriendo la posibilidad de estudiar directamente las primeras etapas del desarrollo gonadal. Este avance resolvió una limitación fundamental: conocer el sexo genético antes de la diferenciación morfológica, condición necesaria para buscar el gen maestro de la determinación sexual.

A diferencia de los mamíferos, donde el gen SRY en machos XY dirige la diferenciación testicular (Sinclair et al., 1990; Koopman et al., 1991), los peces presentan una enorme diversidad de mecanismos de determinación sexual. Con más de 27.000 especies (Nelson et al., 2016), se observan sistemas genéticos

monofactoriales, polifactoriales y también determinación ambiental, mediada principalmente por la temperatura. Entre los sistemas genéticos, existen especies con machos heterogaméticos (XX/XY) y otras con hembras heterogaméticas (ZZ/ZW) (Penman & Piferrer, 2008).

En esturiones, estudios de ginogénesis indican que el sistema de determinación sexual es del tipo ZZ/ZW, con hembras ZW y machos ZZ (*A. transmontanus*, Van Eenennaam et al., 1999; *H. huso* × *A. ruthenus*, Omoto et al., 2005; *A. brevirostrum*, Flynn et al., 2006; *A. baerii*, Fopp-Bayat, 2010; *A. nudiventris*, Saber & Hallajian, 2014). Dichos estudios mostraron progenies con aproximadamente 80% de hembras y 20% de machos, compatibles con un sistema ZZ/ZW, y relaciones de sexos 1:1 tanto en cautiverio como en la naturaleza (Vizziano-Cantonnet et al., 2018a), lo que sugiere un sistema monofactorial de determinación sexual.

Desde la publicación del marcador sexo-específico (Kuhl et al., 2021), nuestro laboratorio lo ha validado en *A. baerii*, comprobando en dos cohortes generadas en Uruguay que la relación de sexos se mantiene 1:1 (Lasalle et al., 2024). Este hallazgo, junto con la localización del marcador en el genoma femenino (Kuhl et al., 2020), refuerza la hipótesis de un sistema ZZ/ZW.

A pesar de estos avances, aún no se ha identificado formalmente el gen determinante del sexo en esturiones. La ausencia de un gen conservado entre peces que regule este proceso dificulta una estrategia basada en genes candidatos. En cada especie estudiada, el gen determinante ha sido distinto (Matsuda et al., 2002; Hattori et al., 2012; Kamiya et al., 2012; Myosho et al., 2012; Yano et al., 2012; Takehana et al., 2014; Koyama et al., 2019), y las estrategias empleadas también difirieron. En truchas, la identificación del gen determinante se logró mediante análisis transcriptómico comparando gónadas indiferenciadas de cohortes monosexo (Yano et al., 2012), basándose en el período de diferenciación molecular previamente definido (Vizziano et al., 2007).

En esturiones, los intentos previos de identificar el gen maestro mediante análisis genómicos o búsqueda de SNPs asociados al sexo (Kuhl et al., 2021; Lasalle et al., 2021a) no tuvieron éxito. Sin embargo, el estudio de Kuhl et al. (2021) aportó información valiosa: la región del genoma asociada al marcador sexual se ha conservado intacta en los distintos géneros de *Acipenser* durante unos 180 millones de años, a pesar de sucesivas duplicaciones del genoma. Esto sugiere que el gen determinante pudo haberse conservado también a lo largo de la evolución.

Dado que las estrategias genómicas previas no permitieron su identificación, propusimos en este proyecto adoptar la metodología empleada para truchas (Yano et al., 2012): comparar los transcriptomas de gónadas indiferenciadas en estadios tempranos (2,5 meses), sexadas previamente a nivel de ADN genómico.

En *A. baerii*, se ha demostrado que a los tres meses de edad existe ya una clara diferenciación molecular hacia la vía femenina, con activación de los genes *cyp19a1a* (aromatasa), *foxl2* y *hsd17b1* (Vizziano-Cantonnet et al., 2016; 2018b; Lasalle et al., 2021, Lasalle et al., 2024). Esto indica que el gen determinante del sexo debería expresarse antes de esa etapa. En la mayoría de los peces donde se identificó dicho gen, su activación ocurre muy temprano, mostrando expresión dimórfica entre sexos que puede desaparecer luego de la diferenciación gonadal. Generalmente, estos genes mantienen su expresión durante todo el período de diferenciación, aunque su duración varía según la especie (Matsuda et al., 2002; Hattori et al., 2012; Myosho et al., 2012; Yano et al., 2012; Takehana et al., 2014).

En el esturión siberiano, los tres genes relacionados con la síntesis de estrógenos (*cyp19a1a*, *foxl2* y *hsd17b1*) fueron validados como activados en futuras gónadas femeninas de individuos de 3,5 meses, previamente sexados (Lasalle et al., 2024). Estos resultados confirman que la diferenciación molecular inicia antes de los tres meses, razón por la cual el proyecto se centra en estadios más tempranos.

Nuestra hipótesis plantea que el esturión siberiano posee un sistema de determinación del tipo ZZ/ZW, y que existe un gen ligado al cromosoma W que comienza a expresarse muy temprano —antes de los tres meses— en las futuras hembras.

Considerando que la gónada se forma aproximadamente un mes después de la eclosión, se propone un estudio transcriptómico de gónadas de machos y hembras sexados a los 2,5 meses de edad. El objetivo

será identificar genes con alta expresión en futuras hembras, sobreexpresados y con abundantes lecturas en los transcriptomas gonadales. Suponemos que el gen determinante se expresará antes de los tres meses, dado que a esa edad el programa femenino ya está activo (Vizziano-Cantonnet et al., 2018b; Lasalle et al., 2021, Lasalle et al., 2024).

La expresión de los genes candidatos se analizará en el transcriptoma previamente publicado (Vizziano-Cantonnet et al., 2018b), que incluye gónadas de 3, 5, 6 y hasta 14 meses, abarcando el período de diferenciación molecular y la etapa inmadura. Esto permitirá confirmar si alguno de los genes presenta un patrón compatible con los determinantes del sexo ya conocidos (Matsuda et al., 2002; Hattori et al., 2012; Myosho et al., 2012; Yano et al., 2012).

Además los estudios de expresión diferencial permitirán entender los procesos de diferenciación del sexo en las etapas más tempranas posible en hembras y machos, para los cuales aún falta abarcar mucho terreno, ya que la información es escasa para ambos sexos en estos periodos iniciales del desarrollo.

Objetivos

Identificar genes candidatos a la determinación sexual de los esturiones usando una estrategia *sin a priori* en gónadas indiferenciadas sexadas a nivel de ADNg, así como evaluar los principales genes vinculados a la diferenciación del sexo de la vía femenina y de la vía masculina. Diseño de investigación y

Objetivos específicos

Objetivo 1.- Obtener una base de datos del transcriptoma gonadal de futuros machos y futuras hembras en un momento temprano de su desarrollo que coincide con la indiferenciación sexual morfológica, pero en momentos en donde la diferenciación molecular ya se inició. El sexo será identificado a nivel del ADNg (Kuhl et al., 2020).

Objetivo 2.- Buscar potenciales genes activados en hembras entre los que se pueda encontrar el determinante sexual, bajo la hipótesis de una determinación del sexo del tipo ZZ/ZW en el esturión siberiano.

En conjunto, este enfoque permitirá identificar genes expresados tempranamente en las futuras hembras y evaluar su posible papel como determinantes de la vía femenina. La combinación de sexado genómico, transcriptómica gonadal y estudios bioinformáticos de validación y expresión diferencial, así como análisis de vías funcionales (GO), ofrece una estrategia integral para avanzar en la comprensión del control genético de la determinación sexual en esturiones, y de los procesos de diferenciación gonadal en ambos sexos, en un grupo clave tanto desde el punto de vista evolutivo como productivo.

Metodología/Diseño del estudio

Estrategia

Teniendo en cuenta que sabemos que a los 3 meses la diferenciación molecular ya está en marcha (Vizziano-Cantonnet et al 2018b, Lasalle et al., 2021; Lasalle et al., 2024) y que podemos sexar a los animales, nos centraremos en estudiar hembras y machos en un período muy temprano en el desarrollo y cercano al momento de formación de la gónada.

Se obtuvieron las gónadas de machos y hembras a los 2,5 meses de edad. El transcriptoma nos permitió hacer la comparación global de todos los genes con expresión dimórfica en este período clave. En este sistema de determinación (ZZ/ZW), el gen determinante debe estar sobre expresado de forma muy marcada en hembras así como se ha visto con los genes determinantes masculinos en peces XX/XY (Matsuda et al., 2002; Hattori et al., 2012; Myosho et al., 2012; Yano et al., 2012). Esta estrategia, aplicada en el momento

indicado del desarrollo y con las herramientas correctas de trabajo, debemos lograr obtener un gen candidato sólido a determinar el sexo del esturión siberiano. Además, esta misma estrategia es la más indicada para ahondar en los genes vinculados al inicio del proceso de diferenciación gonadal en cada uno de los sexos.

Animales

Fueron brindados por la empresa de producción de caviar Estuario del Plata con la cual cooperamos. Utilizamos ejemplares de *A. baerii* de 2,5 meses de edad mantenidos en el "LEA de animales productivos" del FREP desde su llegada (2 meses) y durante 2 semanas hasta el momento del sacrificio por decervicación (CHEA protocolo1516).

Muestreo

Extracción de ADNg de aleta y sexado

Un pequeño trozo de tejido (aleta) es lisado con proteinasa k y RNAsa. Luego se añade NaCl separando así las proteínas del ADNg, se utiliza isopropanol para precipitar el ADNg y finalmente se lava con etanol 70%. Se retoma el pellet de ADNg en buffer TE. A partir del ADNg extraído se realizará una PCR tiempo final siguiendo los protocolos correspondientes a la enzima utilizada y con los cebadores "AllWSex2" que marcan el sexo genético (Kuhl et al. 2021). Se revelará el resultado mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%.

Muestreo de gónada

Se colectaron entre 20 gónadas de animales de 2,5 meses previamente sexados mediante PCR utilizando el marcador genético del sexo (Kuhl et al., 2021) (10 machos y 10 hembras). A los 2,5 meses las gónadas tienen un tamaño que permite colectarlas individualmente. Las gónadas extraídas fueron inmediatamente utilizadas para obtener el ARN evitando así su degradación, luego conservado el ARN a -80°C hasta su utilización.

Extracción de ARN gonadal para RNA-seq

Se extrajo el ARN de la totalidad de muestras, la calidad del ARN es fundamental ya que se utiliza para secuenciado masivo por ello se utilizará un kit comercial de la empresa New England Biolabs y se siguieron los pasos indicados por sus protocolos. El ARN obtenido se midió por Bioanalyzer (para evaluar el RIN). Luego se seleccionaron en base al RIN obtenido las mejores 6 muestras de machos y 6 muestras de hembras para cada uno de los meses. Se envió a secuenciar el transcriptoma de las muestras con un RIN superior a 8 como indica la empresa Macrogen. En total se secuenciaron 12 muestras en una corrida con lecturas pareadas de 2×100 bp.

Librerías

Serán realizadas por Macrogen utilizando kits "TruSeq" fabricados por Illumina.

Ensamblado

Se seguirá el protocolo creado por el equipo de trabajo del Ing. Klopp : "De novo RNASeq Assembly Pipeline" (DRAP) (Cabau et al., 2017). Al finalizar el protocolo se conservaron contigs de alta calidad que posean una longitud mínima de 200 pb.

Análisis del transcriptoma

Los análisis bioinformáticos de expresión diferencial de genes se realizaron mediante el paquete "edgeR" (Robinson et al., 2010). Los genes se consideraron como diferencialmente expresados cuando el FDR (False Discovery Rate) < 0.05, también se hicieron los análisis de "Gene Ontology" (GO) mediante el paquete topGO

(Alexa, 2016). Los términos con un p-valor ajustado < 0.05 fueron retenidos.

Se identificaron los genes diferencialmente expresados en hembras durante las etapas más tempranas de 2,5. Los genes con mayores sobreexpresiones a partir de los dos meses fueron considerados como potenciales genes determinantes, todos los diferencialmente expresados fueron estudiados teniendo en cuenta los procesos de diferenciación del sexo tanto para la diferenciación óvarica o la diferenciación testicular.

Como se mencionó anteriormente esta estrategia permite abordar la búsqueda de genes determinantes como el estudio de las vías de diferenciación del sexo en etapas tempranas de la diferenciación gonadal.

Resultados, análisis y discusión

Expresión diferencial entre gónadas de hembras y machos

El transcriptoma gonadal de esturiones siberianos hembras y machos de 2,5 meses de edad produjo un ensamblado de 91.581 contigs. De estos, 119 presentaron expresión diferencial entre los sexos (FDR $< 0,05$): un 0,07% (n=62) estuvo sobreexpresado en hembras, y un 0,06% (n=57) en machos. Los 91.462 contigs restantes no mostraron diferencias significativas. De los 62 contigs activados en hembras, solo 32 codificaron proteínas, mientras que de los 57 activados en machos, solo 29 codificaron proteínas. En ambos sexos, los contigs restantes corresponden a ARN no codificantes (ncRNA) sobreexpresados.

hsd17b1 y tbx1 son los genes más significativamente sobreexpresados en hembras y machos, respectivamente. En hembras, hsd17b1 fue el gen más relevante (FDR = $2,18E-11$), seguido por cyp19a1 (FDR = $9,17E-07$) y foxl2 (FDR = $1,57E-05$). En machos, tbx1 (FDR = $1,38E-07$) estuvo seguido por perilipina 1 (plin1, FDR = $3,59E-06$) y neurexina 3 (nrxn3, FDR = $4,69E-05$).

Un análisis del heatmap de los 20 contigs codificantes más relevantes generó cinco clústeres según la similitud en sus patrones de expresión.

El clúster 1 (C1) agrupa genes con sesgo masculino, como perilipina (plin1), chitin synthase 2-like (chs-2-like), intercambiador sodio/hidrógeno 3 (slc9a3) y receptor acoplado a proteína G tipo E3 (adgre3). Otro gen con sesgo masculino, hatching enzyme 1.2-like, forma su propio clúster (C2).

Por el contrario, los clústeres 3 (C3) y 4 (C4) están formados por genes con sesgo femenino. El C3 agrupa hsd17b1, cyp19a1, foxl2 y el receptor nicotínico colinérgico subunidad alfa-7 (chrna7). En el C4 se observa la activación de genes que codifican factores de transcripción, como c-fos y jun-b, así como el gen de respuesta temprana inmediata (ier2). Además de esto, también se detectó la activación de factores de señalización, como di-ras2, y de genes involucrados en la acción hormonal, como el receptor de la hormona liberadora de tirotropina (trh-r).

El clúster 5 (C5) incluye genes codificantes masculinos como tbx1 y nrxn3, junto con una variante de cada uno. Además, se encontraron carboxipeptidasa A1-like y un gen hipotético con marco de lectura abierto (ORF), aún no caracterizado en ninguna base de datos.

Al comparar los clústeres femeninos C3 y C4, se observó que el grupo C4 presentó una expresión significativamente más alta (Shapiro-Wilk $p = 0,09$; Levene $p = 0,02$; Mann-Whitney $p = 0,005$).

Enriquecimiento de Ontología Génica (GO)

El análisis GO de los contigs sobreexpresados en hembras (n=62) reveló 186 términos significativamente enriquecidos en la categoría Procesos Biológicos (BP), 3 en Componentes Celulares (CC) y 6 en Funciones Moleculares (MF) (valor p ajustado $< 0,05$). En machos, el análisis de los contigs sobreexpresados (n=57)

identificó 256 términos GO enriquecidos para BP, 7 para CC y 23 para MF (valor p ajustado < 0,05) (Archivo adicional 4).

A partir de estas listas, se seleccionaron los términos asociados con procesos gonadales vinculados a la diferenciación y maduración sexual. Entre los términos más destacados en hembras se encontraron: "biosíntesis de hormonas esteroides", "respuesta a gonadotropinas (FSH, LH)", "diferenciación de células de la granulosa", y "factores de transcripción tipo AP-1". En machos, los términos más relevantes incluyeron "proceso metabólico hormonal" y "señalización por ácido retinoico".

Este estudio constituye el primer análisis transcriptómico de gónadas indiferenciadas de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) sexados genéticamente a los 2,5 meses de edad, una etapa temprana del proceso de diferenciación sexual molecular. Este enfoque permitió obtener una instantánea de la complejidad de los eventos que ocurren durante un período crítico del desarrollo gonadal, revelando las redes génicas y de señalización que dirigen la diferenciación de las gónadas.

Los resultados mostraron que el perfil transcriptómico es en gran medida conservado entre sexos, dado que el 99,87% de los contigs no presentaron diferencias significativas de expresión. Solo el 0,13% del total de genes mostró activación sesgada por sexo (0,07% en hembras y 0,06% en machos). Esto sugiere que, en las etapas iniciales de la diferenciación sexual, un conjunto reducido de genes guía el proceso, mientras que la mayoría participan en funciones esenciales de mantenimiento y proliferación celular, como se ha observado también en mamíferos.

Nuevos candidatos implicados en la diferenciación sexual

El análisis de agrupamiento (heatmap) permitió identificar nuevos genes candidatos relacionados con la diferenciación sexual. Los genes asociados a la síntesis de estrógenos (*hsd17b1*, *cyp19a1*, *foxl2*) se agruparon en un clúster específico, mientras que otro grupo mostró sobreexpresión en gónadas femeninas e incluyó *jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2* y *trh-r*. La homogeneidad en los niveles de expresión dentro de cada clúster sugiere la existencia de "grupos de coexpresión sinérgica" o *synexpression groups*, formados por genes potencialmente co-regulados que actúan en vías comunes orientadas a un mismo objetivo biológico: la diferenciación sexual específica.

Muchos de estos genes podrían ser sensibles a estrógenos o actuar como componentes aguas abajo de la señalización estrogénica. Los genes de respuesta inmediata *jun-b* y *c-fos* son conocidos por ser inducidos por estrógenos, mientras que *egr-1*, también sobreexpresado en hembras, ha sido descrito como regulador del crecimiento y la diferenciación celular bajo estímulos mitogénicos. En peces hermafroditas como *Acanthopagrus latus*, *egr-1* se sobreexpresa en la hipófisis durante la transición hacia el ovario definitivo, mostrando un patrón de diferenciación femenina indirecto. En mamíferos, su expresión varía con el ciclo estral y su sobreexpresión afecta la plasticidad cerebral y comportamientos femeninos, reforzando su identidad sexual femenina.

Los genes *ier2* y *di-ras2*, también agrupados en el mismo clúster, podrían ser regulados por estrógenos. *trh-r* (receptor de la hormona liberadora de tirotrópina) también parece sensible a estrógenos, dado que estos regulan positivamente su expresión en células mamotrópicas. Por ello, se propone que los genes de este clúster forman un grupo de coexpresión inducido por estrógenos, coordinadamente activado por los productos de *hsd17b1*, *cyp19a1* y *foxl2*.

Funciones destacadas dentro del clúster femenino

Los genes *jun-b* y *c-fos* resultan particularmente relevantes por su papel como genes de respuesta

temprana y factores de transcripción que conforman el complejo AP-1, capaz de regular la expresión de *cyp19a1* y, por ende, la producción de estrógenos. Este complejo participa además en procesos de proliferación y diferenciación celular. En otras especies, *c-fos* se ha vinculado con el desarrollo ovárico, y la inhibición de *jun* en aves induce masculinización fenotípica por represión de genes femeninos clásicos (*foxl2*, *cyp19a1*, *esr1*) y activación de la vía masculina (*dmrt1*, *sox9*). Aunque su papel en peces aún no se ha reportado, estos hallazgos sugieren que *jun-b* y *c-fos* podrían desempeñar funciones reguladoras clave en las primeras etapas de la diferenciación ovárica del esturión siberiano.

El gen *di-ras2*, por su parte, actúa como supresor tumoral inhibiendo la vía Wnt/ β -catenina, la cual controla la proliferación y diferenciación celular en numerosos organismos y está implicada en la diferenciación gonadal en mamíferos. Se plantea que *di-ras2* podría regular la proliferación de tipos celulares específicos estimulados por estrógenos, bajo la acción conjunta de *jun-b* y *c-fos*.

La activación del receptor *trh-r* en gónadas femeninas resulta interesante, ya que la vía tiroidea suele asociarse a la diferenciación masculina. En *Xenopus laevis*, la inhibición de TSH produce feminización, mientras que en peces como *Danio rerio* o *Oryzias latipes*, la administración de hormonas tiroideas promueve la diferenciación testicular. Esto sugiere que en el esturión siberiano la función del eje tiroideo podría diferir de lo observado en otras especies, actuando posiblemente en forma autocrina o paracrina en la gónada femenina.

Sorprendentemente, los genes del clúster femenino menos conocidos (*jun-b*, *c-fos*, *ier2*, *di-ras2*, *trh-r*) mostraron niveles de expresión significativamente superiores a los de los genes clásicos asociados a la producción de estrógenos, lo cual resalta su potencial relevancia en la regulación temprana de la diferenciación ovárica.

Nuevos componentes hormonales en la diferenciación ovárica

La sobreexpresión de la enzima serotonina N-acetiltransferasa y la presencia del término GO "metabolismo de melatonina" representan un hallazgo novedoso. La melatonina, tradicionalmente asociada a los ritmos circadianos, se ha relacionado con procesos reproductivos y se produce también en tejidos gonadales. En carpas (*Cyprinus carpio*), tratamientos que inhiben la aromatasa durante la diferenciación sexual reducen simultáneamente los niveles de estradiol y melatonina, lo que sugiere una acción sinérgica entre ambas hormonas en la diferenciación ovárica.

Modelo regulador del ovario en etapas tempranas

Los resultados confirman que, a los 2,5 meses, las gónadas femeninas son capaces de producir estrógenos mediante la activación de *hsd17b1*, *cyp19a1* y *foxl2*. Además, se identificaron nuevos genes diana de los estrógenos, como *jun-b*, *c-fos* y *egr-1*, los cuales se activan aguas abajo de la señalización estrogénica. Se propone un nuevo bucle de retroalimentación positiva en el que *jun-b* y el complejo AP-1 estimulan la expresión de aromatasa independientemente de *foxl2*, reforzando la identidad estrogénica del ovario. Estos genes, junto con *egr-1*, controlan la proliferación y diferenciación celular necesarias para el desarrollo gonadal temprano. Asimismo, la posible interacción de hormonas como melatonina y TRH con los estrógenos añade un nivel adicional de complejidad al proceso.

Perspectivas sobre la diferenciación testicular

La ruta temprana de diferenciación masculina permanece poco caracterizada. En este trabajo se identificaron 29 contigs con marcos de lectura abiertos (ORF) sobreexpresados en machos. Si bien no se detectaron genes clásicos de diferenciación testicular, se observó la activación del gen *tbx1*, previamente vinculado con la formación de testículos en trucha y otras especies. *tbx1* es el gen masculino más significativamente expresado y constituye un fuerte candidato a marcador temprano de diferenciación

testicular. En anfibios y reptiles, *tbx1* reprime las vías ováricas (*cyp19a1*, *foxl2*) y estimula genes testiculares (*amh*, *dmrt1*, *sox9*). En el esturión siberiano, la ausencia de genes relacionados con la producción de andrógenos refuerza la hipótesis de que las etapas tempranas de la diferenciación testicular son independientes de los esteroides y podrían estar reguladas por *tbx1*.

Este trabajo aporta las bases moleculares a través de la investigación básica, que podrán ser utilizadas para la generación de proyectos biotecnológicos que busquen la producción de poblaciones monosexo, y la mejora de la productividad de caviar a largo plazo.

Conclusiones y recomendaciones

En conjunto, los resultados confirman que la diferenciación sexual a nivel molecular comienza alrededor de los 2,5 meses y que el desarrollo gonadal femenino está más avanzado que el masculino. Este primer análisis transcriptómico de gónadas indiferenciadas revela tanto genes clásicos relacionados con los estrógenos como nuevos genes sensibles e independientes de esta hormona, además de identificar *tbx1* como un fuerte candidato temprano para la vía testicular. También se confirma la ausencia de producción androgénica específica en machos, lo que refuerza la hipótesis de una diferenciación testicular independiente de esteroides.

La definición del gen determinante del sexo aún queda pendiente ya que no se ha descubierto con esta estrategia, sin embargo a partir de este estudio, *hsd17b1* sigue siendo un firme candidato al cual se debe mirar de cerca y estudiar más a fondo.

En términos generales, este trabajo exploratorio destaca la complejidad de las redes involucradas en la diferenciación gonadal y propone nuevas hipótesis sobre los mecanismos y factores que podrían operar durante las fases iniciales del desarrollo sexual en peces basales como el esturión siberiano.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Sex-specific gonadal transcriptome during early development of Siberian sturgeon	A. Lasalle Gerla; C. Klopp; G. Benech-Correa; D. Vizziano Cantonnet		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53469	Finalizado

Referencias bibliográficas

- Arkhipchuk, V., 1995. Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. *Hydrobiological Journal*. 31 55-65.
- Bytyutskyy, D., Srp, J., Flajšhans, M., 2012. Use of Feulgen image analysis densitometry to study the effect of genome size on nuclear size in polyploid sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology*. 28 704-708.
- Flynn, S., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D., Benfey, T., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. *Aquaculture*. 253 721-727.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in *Acipenseriformes* (Pisces). *Genome*. 37 888-892.
- Fopp-Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*. 305 174-177.
- Hattori, R.S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S.K., Sakamoto, T., et al., 2012. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 2955-2959.
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., et al., 2012. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genet*. 8 e1002798.
- Klopp, C., Cabau, C., Greif, G., Lasalle, A., Di Landro, S., Vizziano-Cantonnet, D., 2020. Siberian sturgeon multi-tissue reference transcriptome database. *Database*.
- Klopp, C., Cabau, C., Lasalle, A., Landro, S.D., Greif, G., Vizziano-Cantonnet, D., 2020. Multi-tissue Siberian sturgeon RNA sequencing data. *Data in Brief* 105820.
- Klopp, C., Lasalle, A., Di Landro, S., Vizziano-Cantonnet, D., 2020. RNA-Seq transcriptome data of undifferentiated and differentiated gonads of Siberian sturgeon. *Data in Brief* 105741.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*. 351 117-121.
- Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., et al., 2019. A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in *Seriola* Fishes. *Current Biology*.
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Keuz, E., Klopp, C., Du, K., et al., 2021. A 180 My-old female-specific genome

region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. bioRxiv.

Lamatsch, D., Steinlein, C., Schmid, M., Scharl, M., 2000. Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 39 91-95.

Lasalle, A., Cáceres, P., Montenegro, T., Araneda, C., Yáñez, J., Vizziano-Cantonnet, D., 2021. Development of a dense SNP panel for the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using high-depth RAD-seq. *Conservation Genetics Resources*.

Lasalle, A., Norbis, W., Vizziano-Cantonnet, D., 2021. Sex identification of morphologically undifferentiated Siberian sturgeon with statistical analysis of gene expression patterns. *Journal of Applied Ichthyology*.

Lasalle A, Benech-Correa G, Brunet FG, Vizziano-Cantonnet D. *hsd17b1* is a key gene for ovarian differentiation of the Siberian sturgeon. *Mol Reprod Dev*. 2024;91:e23729.

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

Mugue, N., Barmintseva, A., Genetic Variability in Wild Populations and Farmed Broodstocks of the Siberian Sturgeon in Russia. In: P. Williot, G. Nonnotte, M. Chebanov, (Eds.), *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 - Farming*, Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 347-369.

Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., et al., 2012. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*. 191 163-170.

Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V., *Fishes of the World*, John Wiley & Sons 2016.

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 × *Acipenser ruthenus* male). *Aquaculture*. 245 39-47.

Peng, Z., Ludwig, A., Wang, D., Diogo, R., Wei, Q., He, S., 2007. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes).

Penman, D.J., Piferrer, F., 2008. Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*. 16 16-34.

Rajkov, J., Shao, Z., Berrebi, P., 2014. Evolution of polyploidy and functional diploidization in sturgeons: microsatellite analysis in 10 sturgeon species. *Journal of Heredity*. 105 521-531.

Saber, M.H., Hallajian, A., 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquaculture international*. 22 273-279.

Scharl, M., Schmid, M., Nanda, I., 2016. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma*. 125 553-571.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., et al., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346 240-244.

Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M.L., Kawakami, K., Shin, I.T., et al., 2014. Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nat Commun*. 5 4157.

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*. 90 231-233.

Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Sex Determination and Differentiation of the Siberian Sturgeon. *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1-Biology*, Springer 2018, pp. 93-113.

Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C., Genthon, C., 2018. De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *General and comparative endocrinology*. 268 96-109.

Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzone, T.S., Quaggio-Grassiotto, I.,

2016. Identification of the molecular sex&differentiation period in the siberian sturgeon. Molecular reproduction and development 19-36.

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

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., et al., 2012. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*. 22 1423-1428.

Zhou, H., Fujimoto, T., Adachi, S., Yamaha, E., Arai, K., 2011. Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* in relation to other species of *Acipenseriformes*. *Journal of Applied Ichthyology*. 27 484-491.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)