

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL AUMENTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CYP19A Y CYP19B EN OVAS Y LARVAS DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis sp.*)

Yerly Magnolia Useche Salvador¹, Mauricio Carrillo Avila² 

¹Grupo de Investigación y Desarrollo en Ciencia, Tecnología e Innovación – BioGRID, Sociedad de Doctores e Investigadores de Colombia - SoPhic, Calle 52 No. 14 – 64, Ap 301 2021, Bogotá, Colombia.

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Surcolombiana, Avenida Pastrana Borrero - Carrera 1, Neiva, Colombia.

Resumen— La determinación sexual en peces depende del genotipo y de factores ambientales, entre ellos se encuentra la temperatura que determina el sexo durante la embriogénesis, días o semanas después de la fertilización. El sexo se determina sólo hasta después de la eclosión de los huevos, durante los estadios larvarios y postlarvarios. El aumento de la temperatura en éstos primeros estadios aumenta el número de machos, debido a la inhibición de la expresión de las isoformas de la aromatasa (genes Cyp19a y Cyp19b). En este estudio se analizó el efecto de la temperatura en ovas y larvas sobre la determinación sexual de la Tilapia roja (*Oreochromis sp.*), a través de análisis de expresión de los genes citados. La disminución de la expresión de Cyp19a se observó en ovas a 33°C, y en larvas a 33°C y a 35°C. La expresión del gen Cyp19b no disminuyó en ninguno de los tratamientos. La variabilidad en los patrones de expresión de las aromatasas impone un reto para usar la temperatura en cultivos de tilapia como inductor de producción de machos. Se requiere el análisis de fenómenos de regulación de expresión génica intrínseca y extrínseca, para aproximarse a un modelo de producción monosexo más estable.

Palabras Clave— Tilapia, *Oreochromis*, Cyp19a, Cyp19b, determinación sexual.

Abstract— Sex determination in fish depends on the genotype and environmental factors, among them is the temperature that determines sex during embryogenesis, days or weeks after fertilization. Sex is determined only until after the eggs hatch, during the larval and postlarval stages. The increase in temperature in these early stages increases the number of males, due to the inhibition of the expression of aromatase isoforms (Cyp19a and Cyp19b genes). In this study, the effect of temperature in eggs and larvae on the sex determination of red Tilapia (*Oreochromis sp.*) Was analyzed, through expression analysis of the aforementioned genes. The decrease in the expression of Cyp19a was observed in eggs at 33°C, and in larvae at 33°C and 35°C. The expression of the Cyp19b gene did not decrease in any of the treatments. The variability in the expression patterns of aromatases poses a challenge to use the temperature in tilapia cultures as an inducer of male production. The analysis of intrinsic and extrinsic gene expression regulation phenomena is required to approximate a more stable monosex production model.

Keywords— Tilapia, Oreochromis, Cyp19a, Cyp19b, sex determination.

Introducción

La expresión del sexo en los peces puede ser de varios tipos: gonocóricos (sexos ocurren en individuos diferentes), hermafroditas (ambos sexos están presentes en el mismo individuo) y unisexuados (especies con apenas un solo sexo). Las especies cultivadas que, en su mayoría, son de tipo gonocórico, pueden ser de tipo diferenciado o indiferenciado. En las especies indiferenciadas, la gónada inicialmente se desarrolla en tejido semejante al ovario que más tarde se transforma en ovarios o testículos en una proporción 1:1. En las especies diferenciadas, la gónada sufre diferenciación directa en testículo u ovario (Yamazaki, 1983; Devlin & Nagahama, 2002). La expresión del sexo depende de dos eventos: la determinación sexual y la diferenciación sexual.

Determinación sexual

De manera general, la determinación sexual es el conjunto de procesos genéticos (genotipo) y ambientales, que conducen a un fenotipo sexual y que suceden en tiempos diferentes. En la determinación sexual genotípica, el sexo se establece en la fertilización o muy poco tiempo después de ella, dando por resultado diferencias genéticas entre los sexos, por la combinación de los cromosomas provenientes de los gametos y se define como la suma de los genes responsables de la formación de gónadas y de sus características. Estos genes pueden estar dispersos en el genoma (sistema polifactorial) o concentrados en los cromosomas sexuales (monofactoriales).

La determinación ambiental del sexo sucede en la embriogénesis, durante días o hasta semanas después de la fertilización y cambios en una variable ambiental determinan el sexo de los individuos, siendo esta variable cualquiera de las múltiples que afectan el desarrollo embrionario. En este caso, el sexo no se determina hasta después de la eclosión de los huevos, durante los estadios larvarios y postlarvarios. De las variables ambientales que han sido estudiadas, sólo los efectos de la temperatura y en menor grado del pH sobre la determinación del sexo, han sido verificados (Piferrer Francesc, en Carrillo., 2009).

El aumento de la temperatura en los primeros estadios de desarrollo (larval y post-larval) afecta la proporción sexual aumentando el número de machos, debido a la inhibición de la expresión de la aromatasa, enzima que convierte los andrógenos en estrógenos y que es sintetizada a partir de los genes Cyp19a (isoforma gonadal) y Cyp19b (isoforma cerebral) (Piferrer y Blázquez, 2005). La inhibición del gen de la aromatasa mediada por metilación de dinucleótidos CG sobre el promotor fue descrito por Navarro-Martín et al. (2007) en el fletan japonés *Paralychthis olivaceus*. En el caso del pH, Romer y Beisenherz (1996) mostraron una mayor producción de hembras a pH bajos en más de 30 especies de Cíclidos del género *Apistogramma*.

En resumen, existen tres formas de determinación sexual que pueden ser aplicadas en peces: cromosómica, poligénica e interacción genotipo-ambiente (Yamazaki, 1983; Piferrer, 2001; Baroiller et al., 1999). Donde la determinación del sexo es controlada por la acción de una

variedad de señales bioquímicas, envolviendo diferentes proteínas (factores de transcripción, enzimas esteroidogénicas, sistemas de receptores y mensajeros secundarios).

Diferenciación sexual

La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual un rudimento gonadal ya formado pero sexualmente indiferenciado se transforma en un ovario o un testículo. Este proceso está controlado por una serie de mecanismos moleculares y fisiológicos que se traducen en cambios morfológicos. En el caso de los testículos la diferenciación ha terminado cuando todas las células germinales son espermatogonias (células que no han iniciado meiosis) y se identifican claramente las células somáticas. En el ovario, por el contrario puede existir un proceso de meiosis sin haber terminado el desarrollo del ovario, por lo tanto no es fácil definir el momento exacto de finalización del proceso de diferenciación (Carrillo et al., 2009)

El origen embrionario para los dos: ovarios y testículos es la zona cortical de la gónada indiferenciada, de tal manera que factores ambientales puedan ocasionar diferenciación en uno u otro sentido o de forma parcial como ocurre con las especies intersexos, donde siendo especies gonocoristas presentan gónadas con tejido ovárico y testicular, o con algunas células germinales de un sexo dentro de una gónada del sexo contrario.

Control endocrino de la diferenciación sexual

Dentro de los productos de secreción más importantes de las gónadas están los esteroides sexuales: progestágenos, andrógenos y estrógenos. Según lo demostró Yamamoto (1969), la aplicación de andrógenos en una gónada indiferenciada resulta en masculinización, mientras que la de estrógenos en feminización, independientemente de su sexo genotípico.

Los esteroides sexuales se sintetizan a partir del colesterol, el cual es trasladado al interior de la mitocondria de las células esteroidogénicas por StAR, una proteína transportadora (Arakane et al., 1997). La transformación de colesterol a los esteroides sexuales está mediado por diferentes enzimas donde la principal es la enzima citocromo P450 aromatasa que tiene dos isoformas la aromatasa gonadal (otras nominaciones P450aromA, cyp19a ó cyp19a1) y la aromatasa cerebral o neuronal (conocida como P450aromB, cyp19b ó cyp19a2) que determinan la formación de los estrógenos por la aromatización de andrógenos: estrona y estradiol-17 β . Un bloqueo de las isoformas de la aromatasa habilita la línea de producción de andrógenos como 11-cetotestosterona, 11 β -hidroxitestosterona y 11 β hidroxandrostenediona. (D`Cotta et al., 2001).

Desde hace varios años, se pensaba que P450arom era codificada por un único gen y sus transcritos sufrían un splicing alternativo en los diferentes tejidos. Sin embargo, Corbin (1995) aisló una isoforma funcional de la aromatasa del ovario porcino la cual presentaba un 87% de homología de aminoácidos con la forma conocida clonada a partir de la placenta. Múltiples formas de la aromatasa también se han encontrado en teleósteos incluyendo goldfish, zebrafish y lubina. Los genes de la aromatasa están localizados en cromosomas diferentes, y codifican proteínas enzimáticas que tienen un 60% de homología de secuencia entre sí. Los estudios demostraron que las isoformas de aromatasa tienen diferente distribución en los tejidos, respuesta a estrógenos exógenos y el patrón de expresión durante la ontogenia gonadal (Chang et al., 2005).

Un punto importante es que en todos los peces teleósteos investigados hasta el momento, la aromatasa es un gen duplicado (Guigen et al., 2010), excepto en las anguilas, en donde la duplicación pudo perderse durante el curso de la evolución (Cheshenko et al., 2008). Así, en la mayoría de peces teleósteos, esta duplicación de genes dio lugar a dos diferentes genes, el

cyp19a1a y el cyp19a1b. El primero, también llamado aromatasa gonadal o aromatasa ovárica (otras nominaciones P450aromA, cyp19a ó cyp19a1) se expresa ampliamente durante la diferenciación sexual y en la gónada de los adultos (principalmente en el ovario) de peces teleósteos. El gen cyp19a1b es llamado “aromatasa neuronal” o “aromatasa cerebral” (conocida como P450aromB, cyp19b ó cyp19a2) ya que se encuentra expresado en el cerebro de teleósteos, tanto en machos como hembras y está fuertemente inducido por los estrógenos (Guiguen et al., 2010). Además, un segundo gen cerebral de la aromatasa (cyp19a1bII) se ha encontrado en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y podría ser también funcional (Dalla Valle et al., 2005 en Guigen et al., 2010). La aromatasa gonadal, CYP19a1a se ha asociado fuertemente a la determinación del sexo gonadal (Devlin y Nagahama, 2002; Blázquez et al., 2009; Guiguen et al., 2010); sin embargo, la función de la aromatasa del cerebro CYP19a1b no está bien establecida y los últimos estudios la relacionan con neurogénesis (Blázquez y Piferrer, 2004; Mouriec, et al., 2008; Forlano et al., 2009).

Metodología

Tratamientos y muestreo

Los tratamientos consistieron en someter ovas y larvas de Tilapia roja (*Oreochromis sp.*) a las temperaturas 33, 35 y 37°C. El material biológico fue tomado de las instalaciones de la Empresa 3C, finca Pérez chiquito (Aipe, Huila). Las ovas fertilizadas fueron obtenidas de la boca de hembras en reproducción y puestas en un sistema de incubación con temperatura y aireación constantes. La revisión diaria de las incubadoras permitió seleccionar los alevines recién nacidos o con pocas horas de nacidos cuando aún conservan el vitelo. Para cada temperatura se montaron 3 incubadoras y de cada una de ellas se tomaron tres réplicas de 20 alevines. Cada alevín fue disectado eliminando el vitelo y separando la sección cefálica de la caudal, cortando a la altura de las agallas (Fig.1A), el material de cada 20 larvas fue dispuesto en tubos eppendorf de 1,5 ml y colocados a -20°C antes del proceso de extracción de RNA. Las larvas de dos o tres días de nacidas (sin vitelo) fueron tomadas del sistema de incubación del laboratorio de la empresa y colocadas en un sistema de recirculación a temperatura y aireación constantes. En el sistema se dispusieron 12 hapas cada una con 120 larvas, de las sobrevivientes a la primera semana de tratamiento se tomaron 60 larvas provenientes de tres hapas seleccionadas al azar. Para las siguientes semanas se tomaron 30 larvas pues su tamaño era muy grande para ser procesado en la fase molecular. Cada larva fue disectada de la misma forma que los alevines obteniendo una sección cefálica y una caudal (Fig.2A), el material fue dispuesto de forma equitativa en tres tubos eppendorf de 1,5 ml y puestos a -20°C antes del proceso de extracción de RNA.

Extracción de RNA y amplificación RT-PCR

La extracción de RNA se realizó siguiendo las especificaciones del Kit RNeasy Mini de Quiagen. Inmediatamente, se obtuvo cDNA por retro-transcripción a partir de 2 µl de RNA total y usando 2 µl de random primers, 8.5 µl de agua libre de RNAsas, esta mezcla se incubó a 65°C x 5 min y luego se puso en hielo. Posteriormente, se adicionan a la mezcla 4 µl de Buffer 5X, 0.5 µl de Inhibidor de RNAsas, 2 µl dNTPs mix 10mM, 1 µl de Transcriptasa reversa (reactivos Fermentas), el volumen total de 20 µl se incubó a 42°C por 60 min y luego a 70°C por 10 min. El cDNA obtenido fue mantenido a -20°C hasta el proceso de RT-PCR.

Se verificó que la concentración del cDNA estuviera entre 10 y 100 ng/µl con Nanodrop. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con la tecnología Taqman y el equipo Applied Biosystems a 60°C, usando como gen endógeno GAPDH. La preparación incluyó: 2 µl de Taqman 2X, 2 µl de cada primer forward y reverse (50-900 nM), 2 µl de sonda (50-250 nM), 2 µl de cDNA y 2 µl

de agua NFW. Los primers para amplificar Cyp19a fueron F: GGTGATGATGAAGGCCATCC, R: CAGGTTGTTGGTCTGCTTGA y sonda: CTCTCCTGTCTCGGTACACCTGTGTGTCCTCAT; Cyp19b F: GGTCACCTCTCCTGTCTCGGTCA, R: GACAGGTTGTTGGTCTGCTTGA y sonda: TGTGTCCTCATCAAGGCTGCACACTCAGCA. La amplificación se verificó por la curva de amplificación.



Figura 1. A. Alevín con saco vitelino (etapa 10-15 días). Foto tomada de Cantor (2007). B. Cría 15-30 días talla de 3 a 5 cm. Foto tomada de (Acosta *et al.*, 2009). La línea negra indica el corte para separar cabeza de cola.

Resultados y Discusión

Expresión diferencial de los genes Cyp19a y Cyp19b en el cuerpo de la tilapia

De acuerdo a lo reportado el gen Cyp19a se expresa ampliamente durante la diferenciación sexual y en la gónada de los adultos (principalmente en el ovario) de peces teleósteos. El gen Cyp19b se expresa en el cerebro de teleósteos, tanto en machos como hembras y está fuertemente inducido por los estrógenos (Guiguen *et al.*, 2010). Nuestros resultados indican que la expresión de Cyp19a y Cyp19b se presenta tanto en órganos ubicados en la cabeza como en la cola de la larva de tilapia. De acuerdo al sitio de corte en la porción anterior (cefálica) se encuentran los órganos oculares, boca y parte anterior del tubo digestivo, agallas, el bazo, cerebro y segmento anterior de la médula espinal; por otro lado, en la porción posterior (caudal) se encuentra el resto del tubo digestivo que incluye el estómago e intestino, gónadas, hígado, riñón, uréteres y vejiga natatoria (Figura 2). De hecho, en un análisis de expresión de genes se encontró que en *Oreochromis niloticus*, las isoformas Cyp19a y Cyp19b se expresan en otros órganos, además de en gónadas y cerebro respectivamente; la isoforma gonadal se expresa en bazo, y la isoforma cerebral se expresa en retina y riñón (Piferrer & Blázquez, 2005).

El análisis en los alevines que nacieron de las ovas (larvas de menos de 10 días de nacidos – dpn- con saco vitelino), la expresión del gen Cyp19a a 33°C es significativamente igual en la porción cefálica y caudal (1.86, $p = 0.179534$), por el contrario a 35°C la expresión de esta isoforma fue tres veces menor en la porción caudal que en la cefálica (Figura 3A). Esto significa que a diferencia de lo esperado la isoforma gonadal presentó la mayor expresión en la porción cerebral, debido probablemente a la expresión en el bazo cuando se someten las ovas a 35°C. Con respecto al gen Cyp19b, los alevines (< 10 dpn) sometidos en estadio de ova a 33°C presentaron expresión significativamente dos veces mayor en la sección caudal que en la cefálica ($p = 3 \times 10^{-6}$); mientras a 35°C la expresión fue significativamente igual ($p = 0.5726$) (Figura 1B). En este caso la isoforma cerebral presentó la mayor expresión tanto en la sección cefálica como caudal a 35°C.

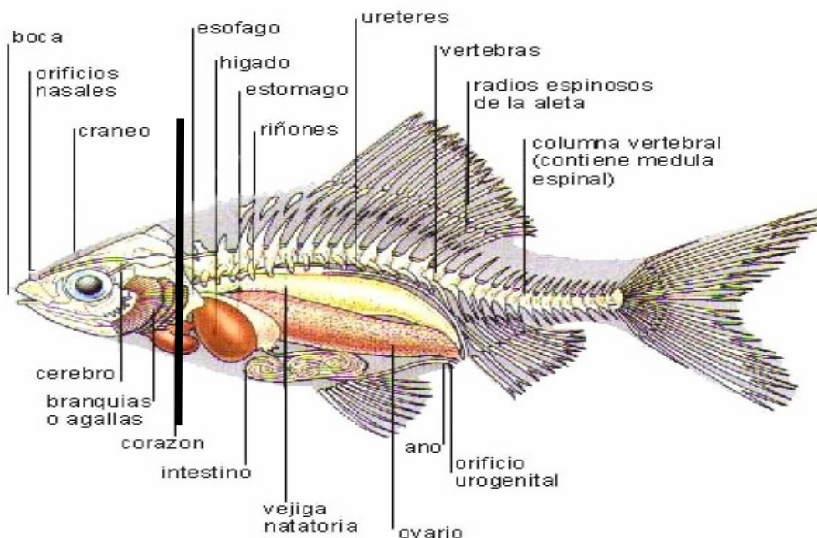


Figura 2. Morfología interna de tilapia Cantor (2007). La línea negra indica el corte para separar cabeza de cola.

Con respecto a los experimentos desarrollados en larvas, la expresión del gen Cyp19a presentó diferencias significativas entre la sección cefálica y caudal en la mayoría de los tratamientos, excepto en la primera semana a 33°C y en la primera y tercera semana a 37°C (Tabla 1). La expresión del gen bajo el efecto de 33°C y 35°C de temperatura fue significativamente mayor en las secciones caudales de la segunda, tercera y cuarta semanas con respecto a las secciones cefálicas de las mismas semanas, lo que se espera para el gen gonadal; sin embargo, durante la primera semana el efecto tanto en la sección cefálica como caudal fue la disminución de la expresión de esta isoforma. El efecto de la temperatura 37°C fue diferente a lo descrito anteriormente, en este caso la expresión fue mayor en las porciones cefálicas de la tercera y cuarta semana que sus contrapartes caudales.

De manera similar que en la isoforma anterior, en el gen Cyp19b la expresión fue diferente en las porciones cefálica y caudal a 33°C y 35°C en la mayoría de los casos, mientras que a 37°C la expresión no tiene diferencias significativas en las regiones del cuerpo (Tabla 1). A 33°C las porciones caudales presentaron mayor expresión que las cefálicas en las semanas primera y tercera; mientras a 35°C se presentó mayor expresión en la sección cefálica de la segunda semana y en la cuarta semana pero en la sección caudal.

Tabla 1. ANOVA. Comparación de las medias de expresión de los genes Cyp19a y Cyp19b entre las porciones cefálica y caudal de larvas.

T°	Semana	Cyp19a		Cyp19b	
		Varianza	Valor P	Varianza	Valor P
33	1	0.01	0.8621	3.48	0.0000*
	2	0.36	0.0215*	0.04	0.3628
	3	0.84	0.0068*	10.28	0.0000*
	4	0.28	0.0140*	0.78	0.0003*
35	1	0.16	0.0497*	0.38	0.0000*
	2	2.15	0.0002*	0.98	0.0000*
	3	0.55	0.0342*	18.68	0.0000*
	4	7.39	0.0000*		
37	1	0.0	0.8178	1.86	0.0745
	2	2.25	0.0000*	0.06	0.3722
	3	0.58	0.0648	0.10	0.2459
	4	0.87	0.0480*	1.72	0.0000*

Diferencias significativas $p < 0.05$.*Efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes Cyp19a y Cyp19b en ovas.*

Los análisis siguientes dan cuenta sólo de los tratamientos a 33°C y 35°C ya que no hubo sobrevivencia de las ovas sometidas a 37°C. En términos generales, encontramos que en las larvas provenientes de las ovas sometidas a 33°C se presentó menor expresión del gen Cyp19a que en las larvas control a temperatura ambiente (27°C, $p < 0.05$). Por el contrario, la porción caudal de las larvas cuyas ovas fueron sometidas a 35°C no presentaron diferencias significativas con los controles ($p > 0.05$) e incluso en las porciones cefálicas presentaron mayor expresión que el control. Es importante resaltar, que la reducción en la expresión del gen Cyp19a se observa sin importar la porción cefálica o caudal usada como control negativo. Esto indica que la producción de la enzima aromatasa a temperatura ambiente no difiere en huevos, ni en los primeros estadios larvales comparando porciones cefálicas y porciones caudales, de tal manera que la aromatasa se produce en todo el cuerpo dando lugar al sexo indicado por la genética de cada individuo.

Por el contrario, la expresión del gen Cyp19b, isoforma cerebral, no se disminuye por efecto del aumento de la temperatura. De hecho, las porciones cefálicas y porciones caudales de las larvas provenientes de ovas tratadas a 33°C presentaron niveles significativamente similares a las muestras control (27°C, $p > 0.05$) y el tratamiento de 35°C aumenta la expresión de este gen. Por lo tanto, sólo el efecto de 33°C en ovas disminuye la producción de la aromatasa gonadal; sin embargo, si los efectos de la expresión de los genes Cyp19a y Cyp19b son aditivos, el aumento de la expresión de Cyp19b 1.86 \pm 0.5 urc (unidades relativas de cuantificación) y 2.55 \pm 0.5 urc (Fig. 1B), son superiores a la disminución de la expresión de Cyp19a 0.84 \pm 0.4 urc y 0.95 \pm 0.4 urc (Fig.1A), generando como efecto total de los dos genes aumento en la expresión del gen Cyp19 y posiblemente incremento en la aromatasa, lo que provocaría aumento de hembras.

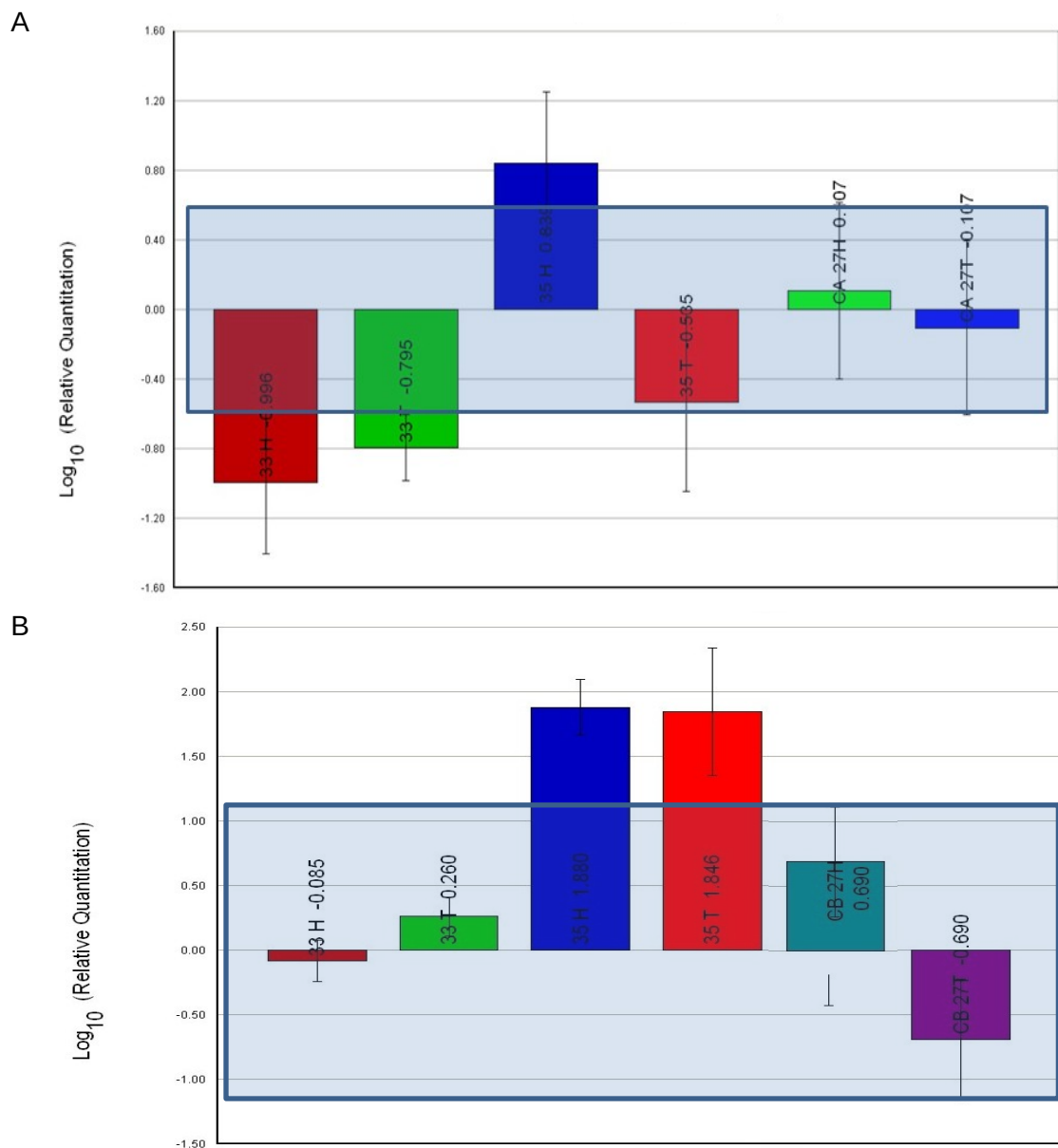


Figura 1. Expresión relativa del gen A. Cyp19a isoforma gonadal y B. Cyp19b isoforma cerebral, en la porción cefálica (H) y en la porción caudal (T) de larvas de Tilapia roja, sometidas a 33°C y 35°C en estado de ova; comparando con la expresión en los controles de la porción cefálica y caudal. La franja azul resalta la expresión significativamente igual de los tratamientos y los controles.

Expresión de los genes Cyp19a y Cyp19b en larvas bajo el efecto del incremento de la temperatura

El efecto de la temperatura 33°C en larvas difirió con respecto al número de semanas durante las cuales se realizó el tratamiento. Durante las semanas 1 y 3 la expresión del gen Cyp19a fue menor que a 27°C ($p < 0.05$), tanto en porciones cefálicas como en las porciones caudales de la semana 3. Las restantes semanas presentaron expresión del gen similar al control (Fig. 2A). A 35°C la disminución en la expresión del gen Cyp19a se presentó durante las

semanas 1 a la 4ª en las porciones cefálicas y sólo en la primera semana en las porciones caudales. Los demás tratamientos en porciones caudales presentaron expresión similar a la temperatura ambiente con un ligero aumento en la 4ª semana (Fig. 2B). El tratamiento a 37°C disminuyó la expresión del gen en la 2ª semana en las porciones cefálicas; sin embargo aumentó en la semana 4ª en mayor proporción en las porciones cefálicas y algo menos en las porciones caudales (Fig. 2C). Para este caso es mayor el aumento de la expresión que la disminución, por lo que la acción de 37°C en larvas no produce inducción de machos.

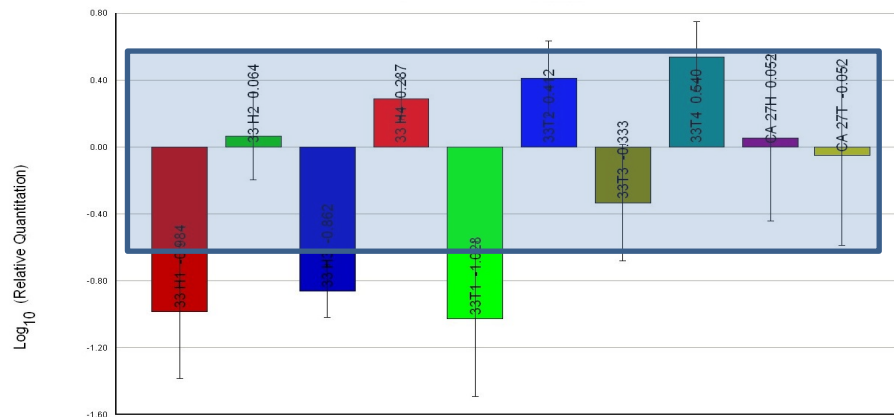
En resumen, la disminución de la expresión del gen Cyp19a se presentó en larvas tratadas a 33°C durante 1 y 3 semanas y a 35°C durante las cuatro semanas. Sin embargo, seleccionar una de las dos temperaturas como tratamiento para obtener progenies macho, sería una tarea compleja si se tiene en cuenta que no existen diferencias significativas entre la cantidad relativa de expresión a 33°C que estuvo entre 0.86 y 1.08 urc y a 35°C con valores entre 0.58 y 1.28 urc ($p < 0,0005$).

Con respecto al gen Cyp19b y el tratamiento a 33°C, encontramos que en todos los casos la expresión de la enzima fue ligeramente mayor en porciones cefálicas y porciones caudales con un valor promedio de 1.153 urc, excepto en las porciones cefálicas durante 1 y 3 semanas de tratamiento cuya expresión fue significativamente igual al control (Fig. 3A). Al analizar el tratamiento a 35°C los resultados son similares, los tratamientos de las semanas 2 y 4 en porciones cefálicas y semana 4 en porciones caudales presentaron mayor expresión que el control con un promedio de 0,916 urc; los demás casos no presentaron diferencias con la temperatura ambiente, excepto el tratamiento de la primera semana en porciones cefálicas donde se presentó una ligera disminución en la expresión (Fig. 3B). Por su parte, en el tratamiento de 37°C en todos los casos la expresión del gen Cyp19b fue mayor con un valor promedio de 1,974 urc. (Fig. 3C). Teniendo en cuenta los resultados de la aplicación de las tres temperaturas en larvas, la expresión del gen Cyp19b no se disminuye por lo que no sería un tratamiento adecuado para la obtención de progenies macho.

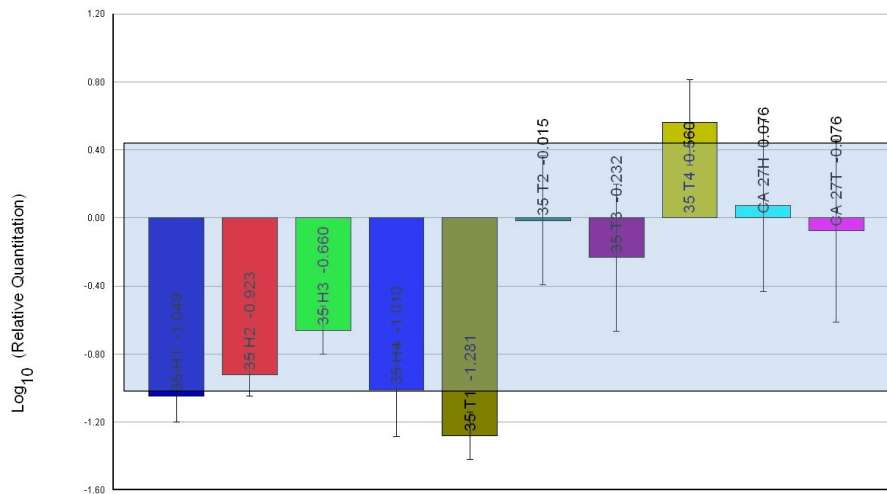
En conclusión, la expresión del gen Cyp19a disminuye a 33°C durante las semanas 1 y 3 y a 35°C durante las cuatro semanas (0.58 - 1.28 urc), mientras que la expresión del gen Cyp19b en términos generales aumenta (0,666 – 4,527 urc). Teniendo en cuenta que la expresión de las dos formas del gen puede presentarse de forma simultánea se encontraría que la disminución de la expresión en Cyp19a es sobrepasada por el aumento de la expresión en Cyp19b de tal manera, que en los tratamientos 35°C (semanas 2 y 4) y 33°C (semana 3) no se esperaría un cambio en el fenotipo si se trata de hembras genotípicas. Por el contrario, los tratamientos: 33°C y 35°C (semana 1) producen una disminución neta en la expresión de los dos genes. A pesar, que el aumento de temperatura ha sido reportado como un factor que induce producción de machos en algunas especies de peces y reptiles, el mecanismo no se ha dilucidado bien. Por ejemplo, se hipotetiza que el aumento de la temperatura podría generar en hembras genotípicas la pérdida del punto de chequeo para el ingreso a meiosis que ocurre siempre primero en hembras que en machos. Este hecho soporta que el tratamiento a 33°C y 35°C sea más efectivo durante la primera semana para establecer progenies monosexo.

Las diferencias encontradas en la expresión de las dos isoformas del gen Cyp19 se puede explicar por los diferentes factores que la afectan, principalmente factores intrínsecos y extrínsecos de regulación. Otro factor no menos importante es que las larvas y alevines analizados son un mosaico genético originado por la mezcla indiscriminada de diferentes líneas genéticas de tilapia. De esta manera se presenta una alta diversidad genética con expresión génica igualmente diversa.

A



B



C

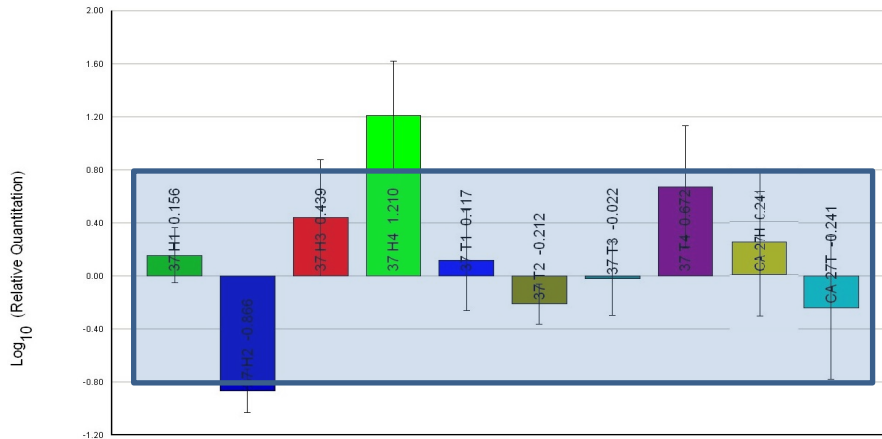
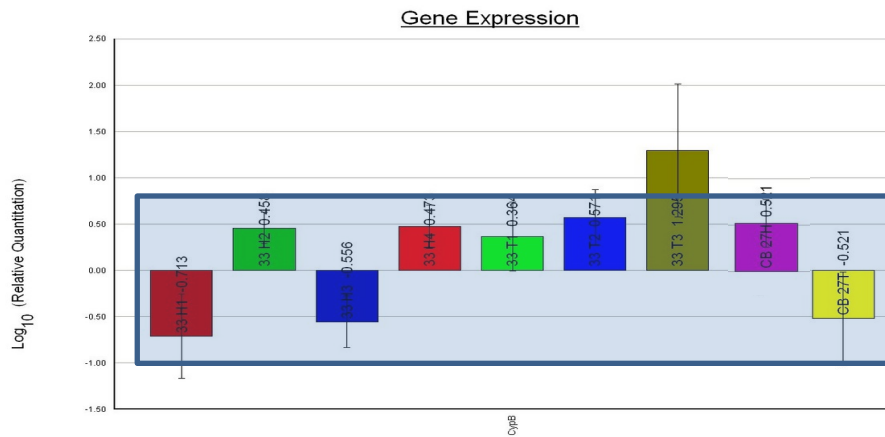
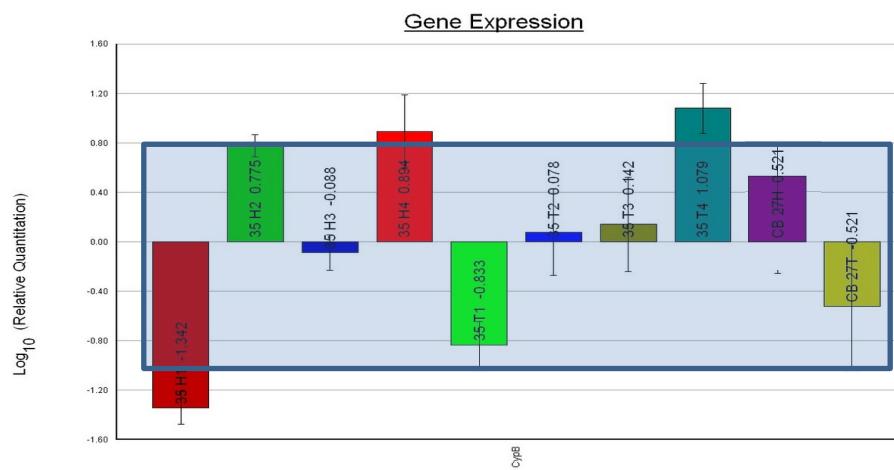


Figura 2. Expresión relativa del gen Cyp19a en la porción cefálica (H) y porción caudal (T) de larvas de Tilapia roja sometidas a: A. 33°C, B. 35°C y C. 37°C, comparada con la expresión del gen en las porciones cefálica y caudal de las larvas control (27°C). La franja azul resalta la expresión significativamente igual de los tratamientos y los controles.

A



B



C

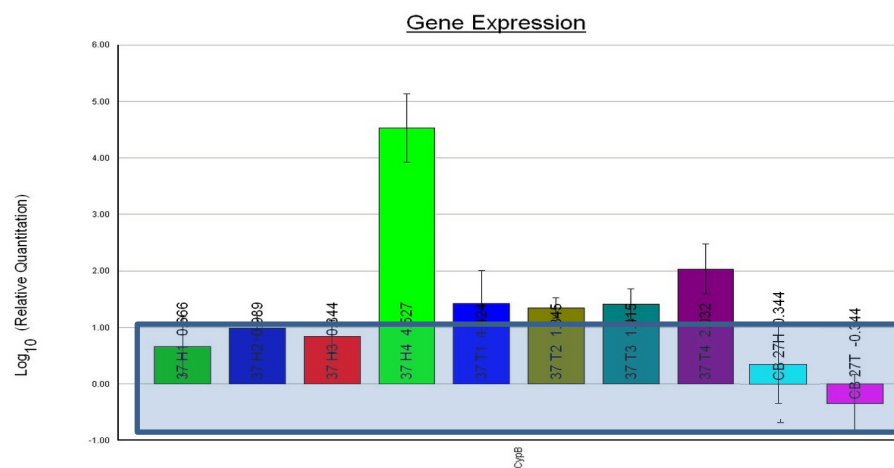


Figura 3. Expresión relativa del gen Cyp19b en la porción cefálica (H) y porción caudal (T) de larvas de Tilapia roja sometidas a: A. 33°C, B. 35°C y C. 37°C, comparada con la expresión del gen en las larvas control (27°C). La franja azul resalta la expresión significativamente igual de los tratamientos y los controles.

Con respecto a la regulación intrínseca, los receptores de esteroides sexuales son factores de transcripción que actúan tras la unión de sus ligandos correspondientes. Hasta el momento se han encontrado algunos factores con diferentes grados de asociación con la diferenciación sexual en peces: DMRT-1 posible inhibidor de aromatasa (Deloffre *et al.*, 2009), familia de factores de transcripción Sox involucrados en organogénesis (Navarro-Martín *et al.*, 2009), SF-1/Ad4BP/FTZ-F1 reguladores de la transcripción de enzimas esteroidogénicas (Yoshiura *et al.*, 2003). Sin embargo, los estudios de expresión durante el desarrollo temprano de los principales receptores son el receptor de andrógeno y los receptores de estrógeno (ER α , ER β 1 y ER β 2) en *Oreochromis niloticus* no han arrojado evidencias directas de su influencia en la diferenciación sexual (Sudhakumari *et al.*, 2005).

La región promotora de ambos genes tiene más de 20 sitios de regulación como receptores para esteroides sexuales y por lo menos cinco factores de transcripción. Estos elementos reguladores de la expresión tienen a su vez factores que afectan su interacción, por ejemplo, en *Gobiodion histrio* existe en el promotor del gen de la aromatasa un receptor de glucocorticoides, abriendo la posibilidad de que el control en el cambio del sexo se pueda determinar por los niveles de cortisol, a través de la vía de la aromatasa.

Para el caso específico de *Oreochromis niloticus* se han encontrado factores de transcripción para las dos isoformas como GATA-4 (factor de transcripción GATA 4), CRE (elemento de respuesta a cAMP) y de forma exclusiva Ad4BP/SF-1 (proteína de unión Ad4/factor productor de esteroides 1), SRY-SOX (región determinante del sexo del gen Y – caja HMG similar SRY), WT1-KTS (factor de nefroblastoma de Wilms 1) y ERE (elemento de respuesta a estrógenos) en Cyp19a y ROR α 1 (receptor alfa1 relacionado a RAR) en Cyp19b. Cada uno de estos factores de transcripción promueve la expresión de la aromatasa, pero se desconoce el efecto del aumento de la temperatura en su actividad promotora de expresión. Igualmente la actividad de la aromatasa puede ser inhibida rápidamente por la presencia de ATP y Mg²⁺ condiciones que promueven la fosforilación. Así que eventos que cambien la concentración de Ca²⁺, como los impulsos nerviosos o liberación de hormonas o neuropéptidos pueden rápidamente afectar la aromatasa y su función.

Con respecto a la regulación extrínseca de la aromatasa, se ha comprobado que el tratamiento con fadrozol o alta temperatura en individuos juveniles de zebrafish resulta en la supresión de la expresión del gen de la aromatasa P450, inducción de apoptosis de oocitos y diferenciación de espermatogonias (Uchida *et al.*, 2004). Adicionalmente, el gen Cyp19b es sensible a la acción de los estrógenos exógenos y actualmente se utiliza como biomarcador de la presencia de sustancias estrogénicas en el medio ambiente (Blázquez, *et al.*, 2009; Guiguen, *et al.*, 2010). Adicionalmente, la temperatura puede afectar las tasas de metilación de DNA las cuales podrían posteriormente afectar la expresión del gen.

Por otro lado, además de la aromatasa p450 existen otras enzimas que juegan un papel importante en la diferenciación sexual. De hecho, la segunda enzima más estudiada en este proceso es la citocromo P450 11 β -hidroxilasa, codificada por el gen cyp11b que convierte androstenediona y testosterona en 11-cetotestosterona, 11 β -hidroxitestosterona y 11 β hidroxandrostenediona, inductores de diferenciación sexual testicular (Liu *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2009. Baroiller *et al.*, 2009). De esta manera, se requeriría analizar el comportamiento de la expresión de ésta y otras enzimas involucradas bajo el efecto del aumento de temperatura.

Conclusiones

La disminución de la expresión de Cyp19a se observó en ovas a 33°C, y en larvas a 33°C y a 35°C. La expresión del gen Cyp19b no disminuyó en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, la variabilidad en los patrones de expresión de las aromatasas impone un reto para usar la temperatura en cultivos de tilapia como inductor de producción de machos. Esta variabilidad puede ser resultado de la estructura genética de las larvas y alevines analizados, que componen un mosaico genético, originado por la mezcla indiscriminada de diferentes líneas genéticas de tilapia. Se requiere el análisis de fenómenos de regulación de expresión génica, como el efecto de factores de transcripción, hormonas y patrones de fosforilación. De esta manera, se podría obtener una mejor aproximación a un modelo de producción monosexo más estable.

Agradecimientos

Agradecemos a la Empresa 3C por el aporte del material biológico, que fue base para el desarrollo de la investigación. Financiación: Recursos del Fondo Nacional de Regalías del departamento del Huila 2010.

Referencias Bibliográficas

- Arakane F., King S.R., Du Y., Kallen C.B., Walsh L.P., Watari H., Stocco D.M. y Strauss J.F. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272: 32656-32662.
- Baroiller, J. F.; Guigen, Y.; Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular Molecular Life Sciences*, v.55, p.910-931.
- Baroiller, J.F.; D'Cotta, H.; Bezault, E; Wessels, S.; Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 153: 30–38.
- Blazquez, 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*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 219, 83–94.
- Blázquez, M., Somoza, G.M. (2009). Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, doi:10.1016/j.ygcen.2009.10.004
- Cantor Atlatenco F. (2007). Manual de Producción de Tilapia. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla. México. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/26642997/Curso-de-Cultivo-de-Tilapia>
- Carrillo M. (2009). La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Ed. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. CSIC. Madrid
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C.C., Nagahama, Y. (2005). Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 101–115.
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I. (2008). Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31–62.

Corbin, C.J., Khalil, M.W., Conley, A.J. (1995). Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 30, 29–37.

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*, v.59, p.265-276.

Deloffre L., Martins R.S.T., Mylonas C.C. y Canario A.V.M. (2009). Alternative transcripts of DMRT1 in the European sea bass expression during gonadal differentiation. *Aquaculture* (en prensa)

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

Forlano, P.M., Schlinger, B.A., Bass, A.H. (2009). Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems. *Frontiers Neuroendocrinol.* 27, 247–274.

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

Hurtado T. N. Ingenieros Consultores. (2003). Tilapia: La alternativa social y económica del tercer milenio.

Liu S., Govoroun M., D'Cotta H., Ricordel M.J., Lareyre J.J., McMeel O.M., Smith T., Nagahama Y. y Guiguen Y. (2000). Expression of cytochrome P45011beta (11 beta-hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75: 291-298

Mouriec, K., Pellegrini, E., Anglade, I., Menuet, A., Adrio, F., Thieulant, M.L., Pakdel, F., Kah, O. (2008). Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Res. Bull.* 75, 274–280.

Navarro-Martín, L., Viñas J., Gutiérrez A., Di Croce L., Piferrer F. (2007). Sex-dependent differences in DNA-methylation levels in the promoter of the gonadal aromatase gene in a fish, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), pp. 32 en 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. (3-8 de junio, 2007. Saint-Malo, Francia), editado por G.

Roudaut, C. Labbé y J.Bobe. Université de Rennes I. Rennes.
Navarro-Martín, L., Galay-Burgos M., Sweeney G., y Piferrer F. (2009). European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *sox17*. Molecular cloning, gene structure, tissue distribution, and expression during early development and throughout sex differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160: 3-11.

Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M., Marmignon, M., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O. (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501, 150–167.

Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, v.197, p.229-281.

Piferrer F. y Blázquez M. (2005). Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31:215–226.

Romer, U. y W. Beisenherz. (1996). Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *J. Fish Biol.* 48: 714-725.

Strobl-Mazzulla, P.H., Lethimonier, C., Gueguen, M.M., Karube, M., Fernandino, J.I., Yoshizaki, G., Patiño, R., Strüssmann, C.A., Kah, O., Somoza, G.M. (2008). Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: neuroanatomical and functional relations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 191–201.

Sudhakumari C.C., Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., Wang D.S., Yoshikuni M., Nagahama Y., Senthilkumaran B. (2005). Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation. *Fish Physiol.Biochem.* 31: 129-135.

Yamamoto T. (1969). Sex differentiation, pp 117-175 en *Fish Physiology*, vol 3: Reproduction, editado por W.H. Hoar y D.J. Randall. Academic Press, Nueva York

Yamazaki, F. (1983). Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 33: 329-354.

Yoshiura Y., Senthilkumaran B., Watanabe M., Oba Y., Kobayashi T. y Nagama Y. (2003). Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggest transcriptional interaction. *Biol. Reprod.*, 68: 1545-1553.

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 isolated ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol* 135:381-390.