

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Expresión genética de la aromatasa *cyp19a1a* durante la  
reversión sexual en el cíclido joya, *Hemichromis guttatus***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Sergio Alberto Luna Peña**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Sergio Alberto Luna Peña**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**  
Codirector de tesis

---

**Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro**  
Codirector de tesis

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**

**Dr. Axayácatl Rocha Olivares**



---

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Sergio Alberto Luna Peña © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Sergio Alberto Luna Peña** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Expresión genética de la aromatasa *cyp19a1a* durante la reversión sexual en el cíclido joya, *Hemichromis guttatus***

Resumen aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
**Codirector de tesis**

\_\_\_\_\_  
Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro  
**Codirector de tesis**

El cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) es una especie exótica, nativa de África, la cual fue reportada por primera vez en México en 1996 en el Área Natural Protegida de Cuatrociénegas, Coahuila. Desde entonces sus poblaciones se han incrementado, desplazando especies endémicas. Como forma de erradicación de esta especie se propone el modelo descrito por Gutierrez y Teem en 2006, basado en la introducción de individuos portadores de cromosomas sexuales “troyanos” (*i.e.* YY) a la población exótica. Para aplicar esta forma de control es necesario generar una cruce entre hembras sexualmente revertidas (hembras XY) y machos normales, cuya descendencia está compuesta por hembras XX, machos XY y machos YY. Para identificar a estos individuos es necesario contar con un método que permita evaluar su genotipo sexual. El gen de la aromatasa, *cyp19a1a*, desempeña un papel fundamental durante los eventos de diferenciación sexual, y su expresión depende del genotipo sexual. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la expresión genética de la aromatasa mediante RT-PCR en tiempo real, en larvas y juveniles de cíclido joya expuestos a tratamientos de reversión sexual. Para lo anterior se sometieron larvas de cíclido joya a tratamientos de feminización y masculinización mediante la administración de 17 $\beta$ -estradiol y fadrozol, respectivamente, a través de la dieta desde los 15 hasta 60 días después de la eclosión (DDE). Un grupo control recibió la misma dieta sin tratamiento hormonal. Los resultados mostraron que los tratamientos no afectaron de manera significativa el peso, la longitud o la supervivencia de los organismos al final del experimento. A la edad de 6 meses se sacrificaron 36 individuos por tratamiento para evaluar la proporción de sexos. Los tratamientos control y masculinización no mostraron diferencias en la proporción de sexos respecto a la proporción esperada de 1:1, lo que sugiere que probablemente se requiere de una mayor concentración de fadrozol para la masculinización en esta especie. En cambio, el tratamiento de feminización fue altamente significativo ya que presentó un 100% de hembras. En cuanto a la expresión genética, no se encontraron niveles significativos de la aromatasa a los 30, 45 o 60 DDE. No obstante, a los 30 DDE los niveles de expresión del gen *foxl2*, el cual es un factor transcripcional que regula la expresión de la aromatasa, mostraron diferencias significativas entre los organismos feminizados y el tratamiento control; por lo que en estudios posteriores se requiere evaluar la utilidad de este gen durante los siguientes pasos de la producción de machos YY.

**Palabras clave:** Cíclido joya, *Hemichromis guttatus*, citocromo P450 aromatasa, *cyp19a1a*, reversión sexual

Abstract of the thesis presented by **Sergio Alberto Luna Peña** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

**Genetic expression of aromatase *cyp19a1a* during sex reversal in the jewel cichlid, *Hemichromis guttatus***

Abstract approved by:

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
**Thesis Codirector**

\_\_\_\_\_  
Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro  
**Thesis Codirector**

The jewel cichlid (*Hemichromis guttatus*) is an exotic species native to Africa, which was first reported in Mexico in 1996 in the Natural Protected Area of Cuatrociénegas, Coahuila. Since then, its population size has increased, displacing endemic species. As an approach to the control and eradication of this species, the strategy described by Gutierrez and Teem in 2006 was adopted, based on the introduction of individuals carrying "Trojan" sex chromosomes (*i.e.* YY) to the exotic population. In order to apply this strategy, it is necessary to cross sexually reverted females (XY females) and XY males, whose offspring are comprised of XX females, XY males and YY males. To identify these individuals, it is necessary to apply a method to evaluate the sexual genotype of the offspring. The aromatase gene, *cyp19a1a*, has an important role during sex differentiation, and its expression is dependent on the sexual genotype of the organism. The aim of the present work was to characterize the genetic expression of aromatase using real-time RT-PCR, in jewel cichlid larvae and juveniles exposed to a feminization and masculinization treatment. For this purpose, jewel cichlid larvae were fed either a diet containing 17 $\beta$ -estradiol or fadrozole, from 15 to 60 days after hatching (DAH). A control group received the same diet without hormones. Results showed that treatments did not significantly affect final weight, length or survival of the organisms at the end of the experiments. At the age of 6 months, 36 individuals were sacrificed to evaluate the sex ratio from each treatment. Organisms from the control and masculinization treatment showed a sex ratio similar to the expected 1:1, suggesting that a higher concentration of fadrozole was needed to achieve total masculinization. In contrast, the feminization treatment was highly effective since 100% females were observed. As for the gene expression, no significant aromatase expression could be detected at 30, 45 or 60 DAH. However, at 30 DAH the expression levels of the *foxl2* gene, which is a transcriptional factor regulating aromatase expression, showed significant differences between the feminized organisms and the control treatment. These results warrant the further evaluation of *foxl2* expression after YY male production process to identify YY males.

**Keywords:** Jewel cichlid, *Hemichromis guttatus*, cytochrome P450 aromatase, *cyp19a1a*, sex reversion

## Dedicatoria

*"If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants"*  
-Isaac Newton

A mis padres y a toda mi familia, ya que gracias a su apoyo he logrado continuar en este proyecto llamado vida. Ustedes son los gigantes de mi historia.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto de maestría (no. de becario 337926) y a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el financiamiento del proyecto LI003 “Evaluación de alternativas para el control del cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) africano”.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado en el programa de posgrado.

A mi Comité de tesis: Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, Dr. Roberto Mendoza Alfaro, Dr. Benjamín Barón Sevilla y Dr. Axayácatl Rocha Olivares; así como a la Dra. Dvorak Montiel, Dr. Jesús Montemayor y Dr. Carlos Aguilera, por su asesoría e invaluable aportaciones para la culminación de este trabajo de investigación.

Al equipo del laboratorio de Ecofisiología, U.A.N.L. y a Pronatura Noreste A.C., por su apoyo en la colecta de los organismos en Cuatrociénegas. A la Dra. Dvorak Montiel por permitirme realizar los ensayos de expresión genética en el Laboratorio de Ciencias Genómicas, U.A.N.L. A Elías Lozano, por su apoyo durante los ensayos de reversión y el sexado de los juveniles. Al Dr. Miguel Angel del Río y a Jaqueline Flores, por su ayuda en el diseño de los cebadores para el gen de la aromatasa. A Claudia Aguilar, Jaqueline Flores y Karen Garza por su apoyo durante los ensayos de expresión genética.

A los profesores del departamento de Acuicultura y el personal de CICESE, quienes contribuyeron directa o indirectamente en este proyecto. Y a mis compañeros de generación, Ana, Benito, Bety, César, Eduardo, Enrique, Erik, Gabo, Jonathan, Josué, Juan, Laura, Lili, Noemí, Omar y Rigo por los buenos momentos y experiencias compartidas durante esta etapa.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español .....	ii
Resumen en inglés .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Teoría del cromosoma Y troyano (TYC) .....	3
1.1.2 Determinación y diferenciación sexual en peces .....	6
1.1.3 Aromatasa.....	8
1.2 Justificación .....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos .....	11
1.4.1 Objetivo general .....	11
1.4.2 Objetivos específicos .....	11
<b>Capítulo 2. Material y métodos .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material biológico .....	12
2.2 Preparación de la dieta .....	12
2.3 Reversión sexual.....	14
2.4 Proporción de sexos .....	15
2.5 Expresión genética .....	15
2.5.1 Extracción de RNA.....	16
2.5.2 Transcripción reversa.....	16
2.5.3 Extracción de DNA .....	16
2.5.4 PCR en tiempo real .....	17
2.6 Análisis estadístico .....	18
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>19</b>
3.1 Reversión sexual.....	19
3.2 Proporción de sexos .....	23

3.3	Expresión genética .....	24
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>		<b>32</b>
4.1	Reversión sexual.....	32
4.2	Expresión genética .....	34
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>		<b>40</b>
<b>Capítulo 6. Recomendaciones .....</b>		<b>41</b>
<b>Literatura citada .....</b>		<b>42</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1 Esquema de los eventos de reproducción, reversión sexual e introducción de machos YY para el control del cíclido joya en Cuatrociénegas mediante TYC (adaptado de Gutierrez y Teem, 2006).....	4
2 Esquema de la regulación de genes que se expresan durante los eventos de determinación y diferenciación sexual en teleósteos (modificado de Piferrer y Guiguen, 2008; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010 y Siegfried, 2010).....	8
3 Papel de la aromatasa (P450aro) dentro de la esteroidogénesis gonadal en peces.....	9
4 Ubicación del Área Natural Protegida Cuatrociénegas y sitio de colecta de adultos de cíclido joya en la Poza Churince.....	13
5 Cuidado biparental de las larvas de cíclido joya antes de los tratamientos de reversión sexual. En el acercamiento se observan las larvas aun con reservas de vitelo (a, b). Juveniles de 36 DDE (aprox. 10 mm LT) expuestos al tratamiento de feminización (c) y de masculinización antes de ingerir uno de los nauplios (d). Ejemplares en los muestreos del día 30 (e) y 60 DDE (f).....	20
6 Peso de los ejemplares de cíclido joya expuestos a los tratamientos de reversión sexual. Media $\pm$ SD. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para cada día ( $P > 0.05$ ).....	21
7 Supervivencia de larvas del cíclido joya al final de los tratamientos de reversión sexual. Se muestran las tres réplicas por tratamiento.....	22
8 Inspección visual y tinción gonadal en juveniles de cíclido joya a la edad de 6 meses. Gónada de una hembra (a) y un macho (d). Tinción con aceto-carmín (squash gonadal visto al microscopio) de una muestra de hembra (b, c; 100X) y de macho (e, f; 200X)....	24
9 Producto de amplificación de la aromatasa <i>cyp19a1a</i> sobre DNA (a) y cDNA ovárico (b) con los cebadores diseñados para el cíclido joya. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio.....	25
10 Diagrama de la estructura del gen de la aromatasa <i>cyp19a1a</i> en tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ; tomado de Chang et al., 2005).....	25
11 Análisis de la integridad del RNA. Se observan las bandas pertenecientes a las subunidades 18s y 28s de RNA ribosomal. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, cloro al 1 %, tinción con bromuro de etidio.....	26
12 Producto de amplificación de la aromatasa <i>cyp19a1a</i> por RT-qPCR en muestras de larvas de cíclido joya a los 15 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio.....	27
13 Curva de acumulación de fluorescencia durante la amplificación de aromatasa <i>cyp19a1a</i> a los 45 DDE mediante qPCR. La línea roja horizontal indica el nivel umbral de fluorescencia (determinado en el software CFX manager, Bio-Rad).....	28

14	Amplificación de aromatasas <i>cyp19a1a</i> , <i>foxl2</i> y 18s mediante PCR punto final en muestras de cíclido joya de los días 30 y 45 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio.....	29
15	Amplificación de <i>foxl2</i> y 18s mediante PCR punto final en muestras de cíclido joya de los días 30 y 60 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio.....	29
16	Expresión relativa de <i>foxl2</i> en juveniles de cíclido joya expuestos a tratamientos de reversión sexual a los 30 y 45 DDE. Se muestra la mediana, cuartiles, rango y puntos extremos (n= 9). Las letras indican diferencias significativas en los niveles de expresión entre tratamientos para cada día, mientras que el asterisco (*) indica diferencias para cada tratamiento entre los dos días ( $P < 0.05$ ).....	30

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de los genes de cíclido joya en el presente estudio.....	17
2	Condiciones de calidad de agua registradas durante los tratamientos de reversión sexual del cíclido joya. Media $\pm$ SD de las tres réplicas experimentales.....	22
3	Proporción de sexos de juveniles de cíclido joya expuestos a tratamientos de reversión sexual.....	23

## Capítulo 1. Introducción

---

La introducción de especies exóticas es actualmente la segunda causa de pérdida de la biodiversidad a nivel mundial, solo superada por la destrucción del hábitat (Myers et al., 2000). A nivel de los ecosistemas, los ambientes acuáticos se han destacado por ser especialmente susceptibles al impacto generado por especies invasoras, lo que se ha visto reflejado en una mayor tasa de extinción de la fauna en ambientes dulceacuícolas respecto a los ecosistemas terrestres (Rahel, 2002; Leprieur et al., 2008). En México, se tiene registro de 506 especies de peces dulceacuícolas, de las cuales 169 se encuentran en alguna categoría de riesgo y 25 se consideran ya extintas, siendo la introducción de especies exóticas una de las principales causas (Contreras-Balderas et al., 2003; Mendoza y Koleff, 2014).

El cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) es una especie nativa de África la cual fue reportada desde 1996 en la poza Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, y desde entonces sus poblaciones se han expandido rápidamente (Contreras-Balderas y Ludlow, 2003; Aguilar-Aguilar et al., 2014). Se desconoce el motivo de la introducción, aunque probablemente se deba a la liberación por algún acuarista, ya que la poza fue empleada anteriormente con fines turísticos (Contreras-Balderas y Ludlow, 2003; APFFC, 2008). Cuatrociénegas está clasificada como Área Natural Protegida en México y, a pesar de tratarse de la ecorregión acuática de menor extensión en México, presenta altos niveles de endemismo. En esta región actualmente se reportan 13 especies de peces bajo alguna categoría de riesgo (Cohen et al., 2005; Jelks et al., 2008), sobre algunas de las cuales el cíclido joya ha provocado impactos por competencia como *Ictalurus sp.*, *Gambusia marshi*, *Herichthys minckleyi* y *Astyanax mexicanus* (Cohen et al., 2005; Lozano-Vilano et al., 2006; Marks et al., 2011). En especial han sido afectadas las poblaciones del cíclido *H. minckleyi*, ya que se ha reportado comportamiento agresivo del cíclido joya hacia esta especie, así como la inhibición potencial de su reproducción (Dugan, 2014) y el traslape de dietas entre la especie invasora y los individuos juveniles de *H. minckleyi* (Marks et al., 2011). Lo anterior, aunado a cambios en la comunidad de macroinvertebrados y alteraciones de las redes tróficas debido a la presencia de la especie invasora, puede conducir eventualmente a un impacto en las comunidades formadoras de estromatolitos presentes en Cuatrociénegas (Elser et al., 2005; Hulseley et al., 2005; Dugan, 2014), lo cual tendría enormes repercusiones no sólo para la biodiversidad, sino para la historia evolutiva del país y del planeta.

En efecto, las comunidades microbianas formadoras de estromatolitos, constituidas principalmente por bacterias, se consideran entre las formas de vida más antiguas de la Tierra. En Cuatrociénegas, a diferencia de otros sitios, estas poblaciones coexisten con gasterópodos que se alimentan de ellas. Por lo cual su estudio reviste una gran importancia para comprender los cambios en

las redes tróficas durante la transición del periodo Precámbrico-Cámbrico (Elser et al., 2005). Por su parte *H. minckleyi* ha atraído especial interés en estudios ecológicos y evolutivos por sus aspectos reproductivos, dicromatismo sexual (Oldfield et al., 2015) y polimorfismo trófico (Cohen et al., 2005). Considerando lo anterior, resulta imperativo implementar un método de control para mitigar de manera eficaz la invasión del cíclido joya en Cuatrociénegas.

Históricamente se han empleado diversas estrategias para el control y erradicación de poblaciones de peces invasores. Entre ellas destacan el uso de químicos como la rotenona (Loope et al., 1988; Hill y Cichra, 2005), el control biológico (Hoddle, 2004) y estrategias basadas en la modificación genética (Twohey et al., 2003; Snow et al., 2005; Bergstedt y Twohey, 2007). Sin embargo, estos métodos suelen ser inespecíficos, controversiales o de difícil implementación (Cotton y Wedekind, 2007). En el caso de la invasión del cíclido joya en Cuatrociénegas, se ha reportado un esfuerzo aparentemente exitoso en la erradicación de esta especie mediante su captura, así como la restauración de la fauna nativa en la poza San José del Anteojo. Sin embargo, aunque esto demuestra la factibilidad de remoción manual de especies exóticas en espacios reducidos, el procedimiento puede ser costoso y prolongado, ya que fueron requeridas un total de 20 visitas durante un período de 4 años para el trampeo (Lozano-Vilano et al., 2006; Dugan, 2014).

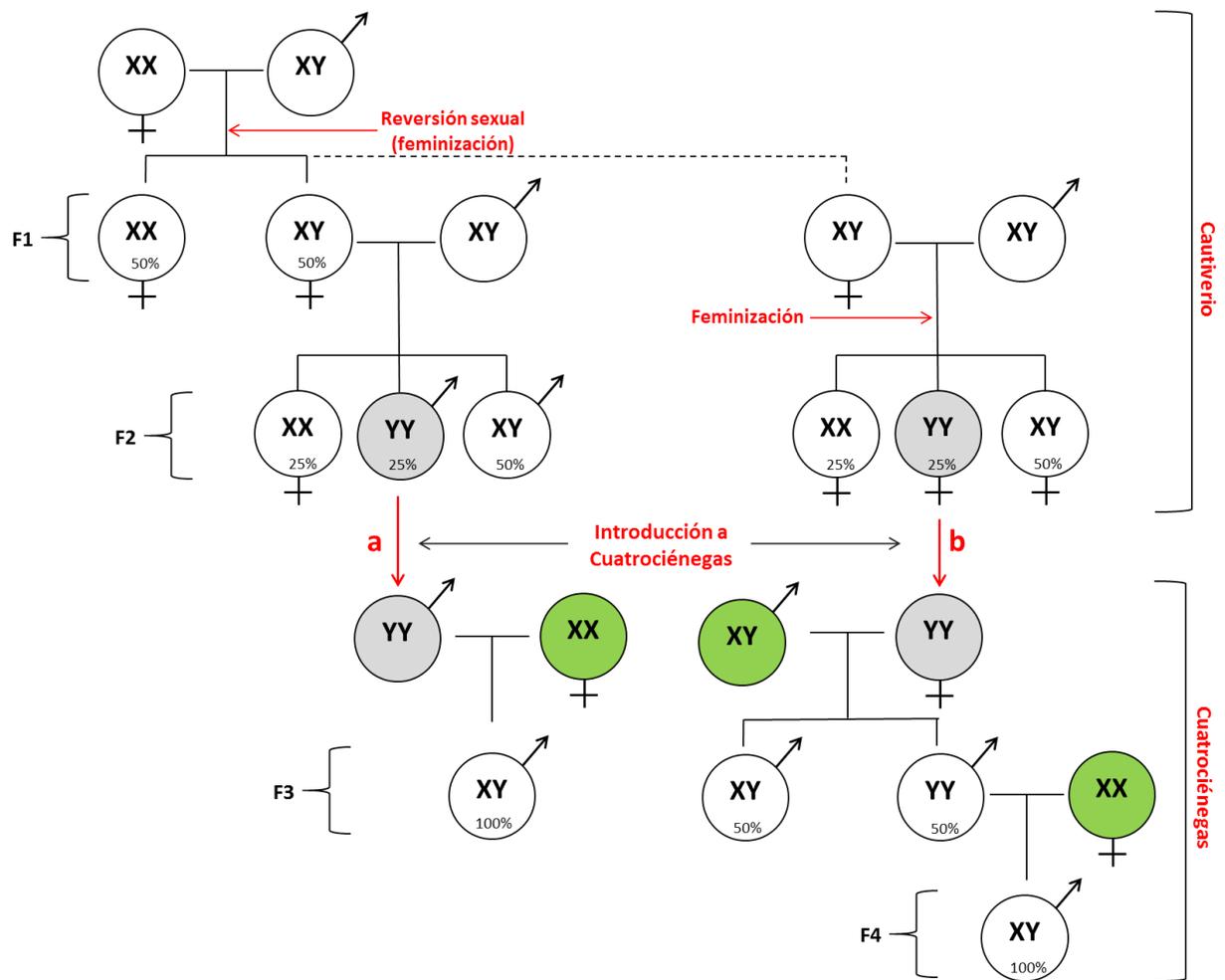
Recientemente se ha sugerido una forma de control de poblaciones exóticas mediante la introducción de individuos portadores de cromosomas sexuales “troyanos” (TYC, Trojan Y Chromosome), la cual involucra la introducción de individuos con dos cromosomas sexuales Y en las poblaciones exóticas (Gutierrez y Teem, 2006). Debido a sus características cromosómicas, la introducción de estos individuos en una población tendría el efecto de reducir la proporción de hembras ya que su descendencia consiste exclusivamente en machos. Así, en el caso del cíclido joya, la introducción de organismos YY durante varias generaciones, conduciría a un aumento paulatino en la proporción de machos debido a un flujo desproporcionado del cromosoma Y, reduciendo el número de hembras hasta lograr la extinción de la población (Gutierrez y Teem, 2006; Cotton y Wedekind, 2007). Además, el cíclido joya cumple con los requerimientos para la implementación de esta forma de control, ya que tiene un sistema de determinación sexual donde los machos son heterogaméticos y un período de diferenciación sexual lábil (D’Cotta et al., 2001; Kumar et al., 2006; Gutierrez et al., 2012). Adicionalmente, sus poblaciones se encuentran confinadas en espacios reducidos, lo que facilitaría el monitoreo de la proporción de sexos durante el control.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Teoría del cromosoma Y troyano (TYC)

La estrategia TYC para la erradicación de especies invasoras implica la liberación de individuos portadores de dos cromosomas Y, de ahí el nombre de cromosoma troyano, ya sean machos YY, también conocidos como supermachos, o de ser posible hembras YY (Figura 1). La introducción de estos individuos a una tasa constante en una población establecida que contiene machos y hembras, conduciría a un cambio en la proporción de sexos a lo largo de las generaciones. Lo anterior debido a que un supermacho solo produce gametos sexuales con el cromosoma Y, por lo cual su descendencia consistiría exclusivamente de machos XY al reproducirse con una hembra XX silvestre (Figura 1a). El impacto en la proporción de sexos sería aún mayor si se introdujeran hembras YY (Figura 1b), ya que éstas al reproducirse con un macho XY silvestre, producirían una descendencia que consistiría en 50% de machos XY y 50% de machos YY, y estos últimos continuarían reduciendo la proporción de hembras durante la siguiente generación. Además, en generaciones sucesivas existiría la probabilidad de cruce entre éstos machos YY silvestres con hembras YY introducidas, generando una descendencia de 100% de machos YY. Con el tiempo la mayor incidencia de machos ocasionaría que eventualmente el número de hembras llegara a cero, por lo que al alcanzar este momento al dejar de introducir individuos se lograría la extinción local de la población (Gutierrez y Teem, 2006; Gutierrez et al., 2012).

No obstante, existen requisitos *sine qua non* para que la implementación de este modelo sea exitosa, como el hecho de que la especie invasora sea susceptible de reversión sexual (e. g. mediante administración de estrógenos) y que tenga un sistema de determinación XY. Aunque aún no se han reportado resultados experimentales sobre la aplicación de esta estrategia, el análisis de un modelo matemático aplicado a la tilapia ha mostrado que, para una población exótica, la introducción continua de al menos 3.2% de hembras YY durante varias generaciones puede conducir efectivamente a la extinción de la población, asumiendo que la supervivencia y características reproductivas no difieren entre los organismos YY introducidos y los individuos silvestres (viabilidad, fecundidad, probabilidad de apareamiento, etc.) (Gutierrez y Teem, 2006; Cotton y Wedekind, 2007). En el caso de aquellas especies en las que las hembras YY no son viables, la introducción de machos YY también conduciría a la extinción de la población, aunque sería necesario un mayor tiempo o frecuencia de introducción de estos individuos (Parshad et al., 2013). El tiempo necesario para lograr la extinción de la población se encontrará definido por el número total de individuos silvestres presentes y la cantidad y frecuencia de introducción de los individuos YY (Cotton y Wedekind, 2007).



**Figura 1.** Esquema de los eventos de reproducción, reversión sexual e introducción de machos YY para el control del cíclido joya en Cuatrociénegas mediante TYC (adaptado de Gutierrez y Teem, 2006). **a)** Se muestra el efecto de la introducción de machos YY producidos en cautiverio (F2), cuya descendencia (F3) consiste sólo de machos XY. **b)** Adicionalmente sería posible introducir hembras YY para lo cual sería necesario un segundo paso de feminización de la F2. La introducción de estas hembras continuaría ejerciendo un aumento en la proporción de machos hasta la F4. El fenotipo sexual esperado de los individuos se muestra con el símbolo ♂ (macho) y ♀ (hembra), mientras que el genotipo sexual se indica con los cromosomas X y Y. Los porcentajes indican la proporción de los individuos en la descendencia correspondiente. El color verde indica los individuos silvestres presentes en Cuatrociénegas, mientras que el gris corresponde a los machos o hembras YY introducidos.

Desde su postulación como estrategia para el control de especies invasoras (Gutierrez y Teem, 2006), el uso de cromosomas Y troyanos ha generado mucha atención, especialmente desde un punto de vista teórico, ya que se ha analizado su eficacia mediante modelos matemáticos y la influencia de distintos parámetros poblacionales (Parshad, 2011; Parshad et al., 2013; Wang et al., 2014, 2016). De aquí que se haya extrapolado el modelo a especies donde las hembras son el sexo heterogamético (*i.e.* cromosomas W troyanos) y a especies con un sistema de determinación sexual polifactorial (Cotton y Wedekind, 2007; Senior et al., 2013). Adicionalmente se ha modelado la dinámica poblacional en sistemas dendríticos

(Gutierrez et al., 2012) y se ha evaluado su potencial uso en combinación con otras estrategias de control de especies invasoras (Teem y Gutierrez, 2014). Incluso se ha analizado su utilidad en especies invasoras particulares (Teem y Gutierrez, 2010; Chapman y Funicelli, 2016)

En cuanto a resultados empíricos, sólo se ha reportado la producción de machos YY de la trucha *Salvelinus fontinalis*, una especie introducida en el norte de Estados Unidos (Schill et al., 2016). A este respecto, los autores reportan la feminización exitosa de machos XY de esta especie mediante administración de  $17\beta$ -estradiol a través de la dieta, así como la viabilidad de las hembras revertidas y la posibilidad de cruce entre machos y hembras YY. Así mismo reportan la identificación del genotipo sexual de su descendencia (XX, XY o YY) mediante el uso de marcadores moleculares ligados al cromosoma Y, considerado un aspecto esencial para el establecimiento de esta forma de control (Cotton y Wedekind, 2007). Sin embargo, aún no hay reportes de la liberación de estos individuos en el ambiente o en condiciones controladas con el fin de evaluar su efecto con respecto a la proporción de sexos de una población a través del tiempo.

Considerando las premisas anteriores el empleo de esta estrategia para el control de las poblaciones de cíclido joya podría resultar factible ya que esta especie además de cumplir con los requisitos básicos del modelo: susceptibilidad de reversión sexual y un sistema de determinación sexual XY; se apega a la factibilidad teórica del modelo aplicado a la tilapia (Gutierrez y Teem, 2006), una especie filogenéticamente cercana al cíclido joya (Schwarzer et al., 2015) para la cual se ha reportado la producción de machos y hembras YY viables (Mair et al., 2011).

En la acuicultura se han implementado diversas estrategias para la obtención de poblaciones monosexuales en especies en las cuales el cultivo de un sexo presenta ventajas comerciales. Así, por ejemplo, por androgénesis o ginogénesis es posible producir progenie monosexual en una sola generación (Bhise y Khan, 2002; Ezaz et al., 2004). Sin embargo, para la producción de machos YY el mecanismo que se ha empleado con más frecuencia, y en un mayor número de especies, es por reversión sexual (Figura 1; Beardmore et al., 2001; Piferrer, 2001; Fuentes-Silva et al., 2013).

Derivado de lo anterior, ya que durante el proceso de generación de machos YY se generan diversos genotipos sexuales, resulta necesario contar con un procedimiento para la correcta identificación de dichos individuos (Schill et al., 2016). Con tal propósito se han realizado diversos estudios sobre los patrones de regulación genética durante los procesos de determinación y diferenciación sexual en teleósteos.

### 1.1.2 Determinación y diferenciación sexual en peces

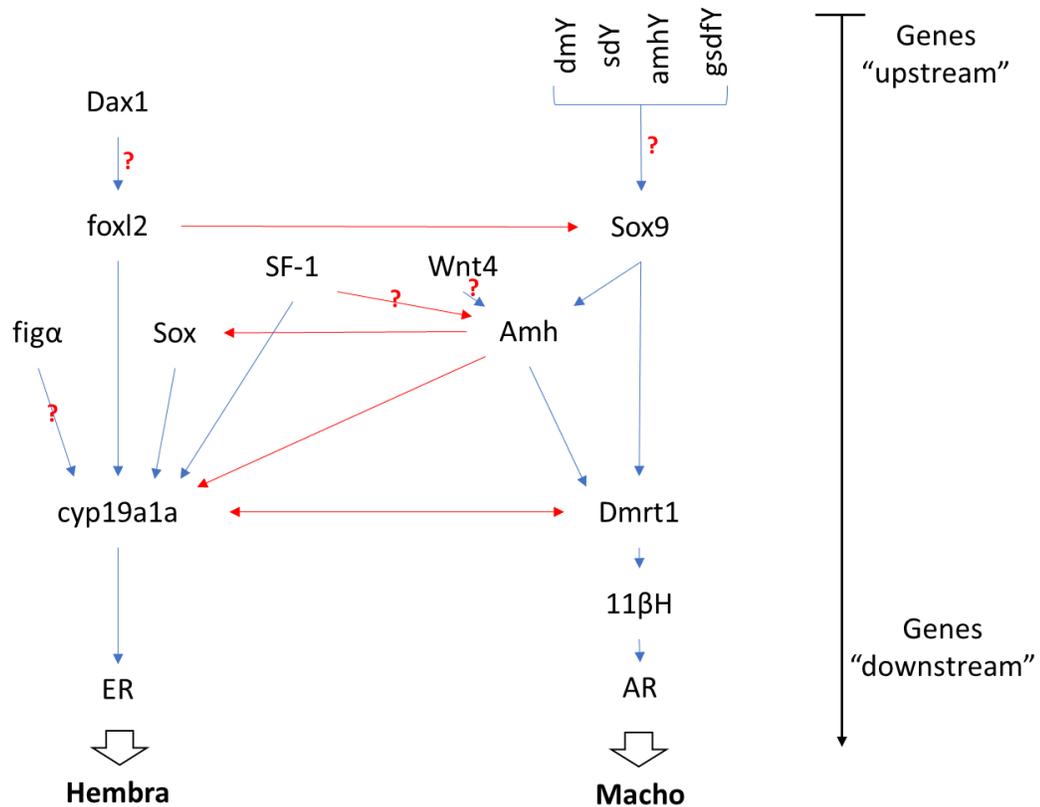
La determinación sexual es el mecanismo por el cual se define el sexo de un organismo, en cambio la diferenciación sexual comprende los procesos ontogenéticos por los cuales, una vez determinado el sexo, se desarrollan las gónadas correspondientes. En peces se han reconocido diversos mecanismos de determinación sexual para las especies gonocóricas, los cuales se agrupan en mecanismos genéticos (Genetic sex determination, GSD) y ambientales (Environmental sex determination, ESD). En especies con GSD, como su nombre lo indica, el sexo está determinado por factores genéticos, por lo cual el sexo del individuo se define en el momento de la fertilización (Wootton y Smith, 2014). Generalmente esto se refleja en la presencia de cromosomas sexuales, como los XY o ZW (Reichwald et al., 2015). En cambio, en especies con ESD el sexo se determina en un periodo posterior a la fertilización de acuerdo a las condiciones ambientales en las que los organismos se encuentren durante los estadios tempranos de desarrollo. El principal factor involucrado en este proceso es la temperatura, aunque también se ha reportado la influencia del pH y la salinidad (Conover, 1984; Wootton y Smith, 2014).

El grupo de los peces teleósteos, a diferencia de los tetrápodos, muestra una gran diversidad en los mecanismos de determinación sexual, incluyendo diversas formas de GSD, ESD e interacciones entre ambas (Wootton y Smith, 2014; Brykov, 2015). En contraste, los procesos que conducen a la diferenciación sexual se encuentran relativamente conservados (Ijiri et al., 2008) aunque muestran un alto grado de plasticidad, por lo que es común que el sexo se vea influenciado por factores externos (*e. g.* administración de esteroides exógenos) (Piferrer y Guiguen, 2008; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010). En efecto, en etapas tempranas del desarrollo existe un período crítico durante el cual el sexo puede ser revertido experimentalmente mediante distintos métodos, como exposición a tratamientos hormonales o temperaturas altas (reversión sexual primaria) (Devlin y Nagahama, 2002; Fuentes-Silva et al., 2013). Incluso es posible revertir el sexo en organismos sexualmente diferenciados de algunas especies gonocóricas (reversión sexual secundaria) aunque son necesarias mayores dosis o tiempos de exposición más prolongados (Sun et al., 2014).

Se han realizado diversos estudios para la determinación del sexo en etapas tempranas en especies de importancia económica, especialmente en aquellas en las que uno de los sexos presenta ventajas comerciales o de cultivo (Griffiths y Tiwari, 1993; Haugen et al., 2012). Sin embargo, es importante contar con un método que permita evaluar su genotipo sexual. Por esta razón ha tomado gran relevancia la amplificación de marcadores moleculares mediante PCR, ya que es posible obtener resultados utilizando solo pequeñas muestras de tejido (Scholz et al., 2003; Rasheeda et al., 2010). Dentro de los diversos marcadores tienen relevancia los genes que definen el sexo de un individuo, denominados genes maestros determinantes del sexo. Por ejemplo, *dmY* es el gen maestro determinante del sexo en medaka, *Oryzias*

*latipes*, el cual se expresa exclusivamente en machos y solo se encuentra en el cromosoma Y (Matsuda et al., 2002). Por lo que en esta especie resulta posible determinar el sexo en etapas tempranas del desarrollo mediante la amplificación de fragmentos de este gen mediante PCR. Sin embargo, a diferencia de otros grupos taxonómicos, y a causa de la gran diversidad de especies, los genes determinantes del sexo no se encuentran conservados en todos los peces teleósteos (Volff et al., 2003). Incluso se han observado variaciones entre especies del mismo género, ya que mientras *dmY* es el gen determinante del sexo en *Oryzias latipes*, en *O. luzonensis* el gen maestro es *gsdfY* (gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome) (Myosho et al., 2012) y *sox3Y* en *O. dancena* (Takehana et al., 2014). Solo en los salmónidos se ha conservado el gen determinante del sexo, *sdY* (sexually dimorphic on the Y-chromosome), aunque incluso en este grupo se refleja la diversidad de mecanismos genéticos de determinación, ya que este gen se encuentra relacionado con la región C-terminal del interferón *irf9*, un gen del sistema inmune (Yano et al., 2012a, b). En cambio, los genes involucrados en los procesos de diferenciación sexual muestran un mayor grado de conservación evolutiva (genes “downstream” en la Figura 2; Piferrer y Guiguen, 2008). En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la cascada regulatoria con algunos de los genes principales que se expresan durante los eventos de determinación y diferenciación sexual en distintas especies de teleósteos.

Debido a que el periodo de diferenciación sexual es específico para cada especie y la ontogenia de la expresión genética es muy diversa es necesario evaluar genes cuya expresión sea dependiente del sexo (Raghuveer et al., 2005). Uno de los genes de gran importancia para este fin es el que codifica para la aromatasa *cyp19a1a*, el cual tiene un papel esencial en la regulación de la diferenciación gonadal de las hembras y se encuentra ampliamente conservado dentro del grupo de los teleósteos (Guiguen et al., 2010; Tao et al., 2013).

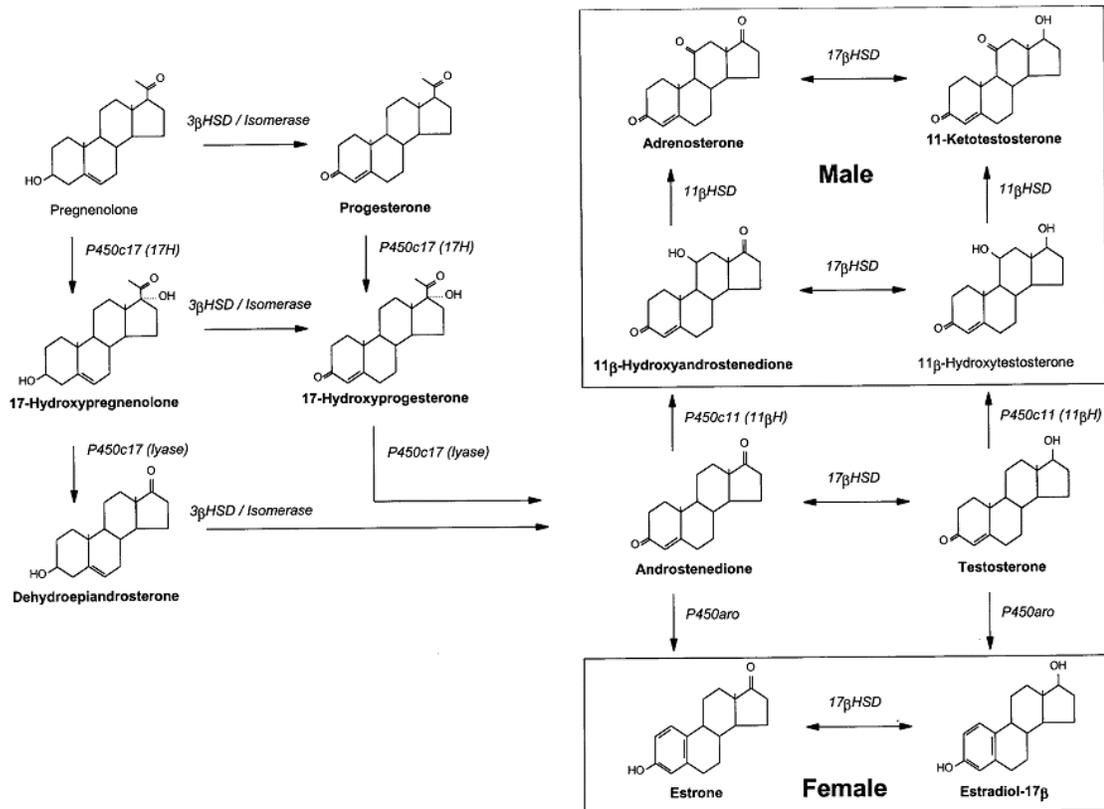


**Figura 2.** Esquema de la regulación de genes que se expresan durante los eventos de determinación y diferenciación sexual en teleosteos (modificado de Piferrer y Guiguen, 2008; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010 y Siegfried, 2010). Los genes *dmY*, *sdY*, *amhY* y *gsdY*, son algunos de los genes maestros determinantes del sexo que se han encontrado en peces. El modelo no representa alguna especie en particular. Las flechas azules y rojas indican regulación positiva y negativa, respectivamente; el símbolo “?” indica que aún falta evidencia para confirmar la regulación correspondiente.

### 1.1.3 Aromatasa

La enzima citocromo P450 aromatasa, también conocida simplemente como aromatasa, es una enzima esteroidogénica que se encuentra implicada en la diferenciación sexual de los vertebrados (Figura 3), ya que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Piferrer y Blázquez, 2005; Guiguen et al., 2010). En tetrápodos la aromatasa es codificada por un único gen (*cyp19*) el cual presenta diversos promotores específicos para su regulación en diversos tejidos (Simpson et al., 1994). Sin embargo, en teleosteos se han reportado dos isoformas, *cyp19a1a* y *cyp19a1b*, cuya presencia se debe a un evento de duplicación cromosómica (Chiang et al., 2001; Guiguen et al., 2010), excepto en especies del orden Elopomorpha, las cuales parecen haber perdido la isoforma *cyp19a1b* durante su evolución (Jeng et al., 2005; Peñaranda et al., 2014). Ambas enzimas tienen afinidad por sustratos androgénicos, principalmente testosterona, aunque difieren poco en su secuencia y expresión. Así, una de las principales diferencias entre ambas isoformas es que el gen *cyp19a1a* se expresa generalmente en las gónadas, principalmente

en el ovario (Piferrer y Guiguen, 2008; aunque véase Böhne et al., 2013), mientras que *cyp19a1b* se expresa de forma predominante en el cerebro (Chiang et al., 2001; Trant et al., 2001). La presencia de *cyp19a1b* indica que la aromatasa también se encuentra involucrada en mecanismos de neuroplasticidad y neurogénesis en teleósteos (Forlano et al., 2001; Kwon et al., 2001).



**Figura 3.** Papel de la aromatasa (P450aro) dentro de la esteroidogénesis gonadal en peces. Su nombre deriva de su función en la aromatización del primer anillo de la testosterona (Baroiller et al., 1999).

En peces el gen *cyp19a1a* codifica para una proteína de unos 515 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 58 kDa (Guiguen et al., 2010). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de este gen se encuentran altamente conservadas en vertebrados, aunque el tamaño del gen es mucho menor en peces (2.6 kb en medaka) respecto a mamíferos (70 kb en el humano) debido a la presencia de intrones de mayor tamaño en los últimos (Simpson et al., 1994; Tanaka et al., 1995). La actividad enzimática de la aromatasa es afectada principalmente por la temperatura. Lo cual contribuye a explicar que en algunas especies el ambiente pueda influir en los procesos de diferenciación sexual (D’Cotta et al., 2001). Además, en especies hermafroditas, se ha encontrado que la aromatasa participa en la remodelación de las gónadas durante la transición sexual (Bhandari et al., 2004; Kroon et al., 2005; Sunobe et al., 2005). Y en especies gonocóricas, la expresión de la aromatasa es suficiente para la diferenciación gonadal en hembras (Wong et al., 2006), lo que explica cómo la inhibición de la actividad esteroidogénica

por sustancias químicas de gran afinidad a la aromatasa, como el fadrozol o exemestano, conduce al proceso de reversión sexual en estas especies (Ankley et al., 2002; Ruksana et al., 2010).

Por su importancia durante el desarrollo, la aromatasa se encuentra regulada a nivel transcripcional de forma muy precisa (ver Figura 2). Lo cual deriva de la presencia de diversos sitios de unión a nivel del promotor (Tanaka et al., 1995; Piferrer y Guiguen, 2008), dentro de los cuales se encuentran elementos de respuesta a los andrógenos (ARE), estrógenos (ERE), glucocorticoides (GRE), cAMP (CRE), Ad4BP/SF-1, AhR/Arnt, GATA-4, PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  y SOX. Cabe destacar el papel del gen *foxl2* (forkhead box protein L2) el cual codifica un factor transcripcional tipo *forkhead* altamente asociado a la expresión de la aromatasa, específicamente activando la transcripción de *cyp19a1a* por medio de varios sitios de unión presentes en su región promotora (Uhlenhaut et al., 2009; Hu et al., 2014). Los factores de transcripción *forkhead* regulan diversos procesos biológicos, por lo que también se ha encontrado expresión de *foxl2* en otros tejidos como cerebro, branquias y bazo. No obstante, durante los procesos de diferenciación sexual los mayores niveles de expresión se encuentran en el ovario (Wang et al., 2004, 2012; Yamaguchi y Kitano, 2008).

Se ha encontrado que los niveles de expresión de la aromatasa muestran un dimorfismo sexual durante alguna etapa del período de diferenciación sexual. Lo cual ocurre prácticamente en todas las especies de vertebrados analizadas (Kitano et al., 1999; Valenzuela et al., 2013), por lo cual el gen que codifica para esta enzima ha sido considerado como el mejor marcador molecular del sexo para aquellas especies en las que se desconoce el gen maestro determinante del sexo o para las cuales no existen marcadores ligados al cromosoma sexual Y o W (Piferrer y Guiguen, 2008). Además, se ha reportado que sus niveles pueden estar influenciados por el genotipo sexual del organismo (Kotula-Balak et al., 2008).

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar un tratamiento de reversión sexual en el cíclido joya, primer paso durante la producción de machos YY, y correlacionar los niveles de expresión genética de la aromatasa con el sexo.

## 1.2 Justificación

El cíclido joya (*Hemichromis guttatus*) es una especie exótica introducida en el valle de Cuatrociénegas, Coahuila, cuyo establecimiento y proliferación ha derivado en la disminución de diversas poblaciones de peces endémicos. Por consiguiente, es de vital importancia el desarrollo de medidas para su control y erradicación. El empleo de cromosomas sexuales troyanos ha surgido como una alternativa de control de especies invasoras. Lo anterior basado en que la introducción continua de machos o hembras YY, cuya descendencia se encuentra formada exclusivamente por machos, conducirá a una disminución

paulatina en la proporción de hembras de la población exótica, contribuyendo eventualmente a su extinción.

Ya que durante la producción de machos YY es necesario contar con marcadores para la identificación de los distintos fenotipos y genotipos sexuales (XX, XY y YY), la cuantificación de los niveles de expresión de la aromatasa, por su papel esencial en la diferenciación sexual, contribuirá en la identificación del sexo durante este proceso.

### **1.3 Hipótesis**

Los niveles de expresión de la aromatasa *cyp19a1a* permitirán distinguir el fenotipo sexual en juveniles del cíclido joya expuestos a tratamientos de feminización y masculinización.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

- Caracterizar la expresión genética de la aromatasa *cyp19a1a* en juveniles del cíclido joya durante una exposición a tratamientos de reversión sexual.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Feminizar y masculinizar larvas de cíclido joya mediante exposición a tratamientos con 17 $\beta$ -estradiol y fadrozol, respectivamente.
- Amplificar el cDNA parcial de la aromatasa en el cíclido joya.
- Cuantificar los niveles de expresión genética de la aromatasa *cyp19a1a* en juveniles de cíclido joya durante una exposición a tratamientos de feminización y masculinización.

## Capítulo 2. Material y métodos

---

### 2.1 Material biológico

Para la obtención de larvas se colectaron ejemplares adultos de cíclido joya directamente del sitio donde originalmente fueron introducidos, en la poza Churince (26° 50' 24.42" N; 102° 8' 2.31" O) en el Área Natural Protegida de Cuatrociénegas, Coahuila (Figura 4). Para la colecta se utilizaron nasas (permiso de pesca de fomento PPF/DGOPA-188/14) en las que se introdujeron bombones de colores y alimento para perro como carnada. Posteriormente los organismos fueron trasladados y mantenidos en cautiverio en el laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., donde fueron realizados los bioensayos de reversión sexual.

Con el fin de inducir la reproducción para la obtención de larvas se acondicionaron acuarios de 20 galones, colocando rafias a modo vegetación y un macetero como sitio de anidación y desove. En cada acuario fueron colocados de 5 a 6 individuos adultos y se realizaron recambios de agua del 30% dos veces por semana para simular la temporada de lluvias e inducir la formación de parejas. Los individuos fueron alimentados tres veces al día a saciedad aparente con alimento vivo (lombrices de tierra, anfípodos y larvas de quironómidos y mosquitos) y/o dieta comercial (Nutripec, 32% proteína). Una vez formada una pareja, lo cual se constató por el cambio en la coloración de ambos individuos y la custodia del nido, se removió el resto de los peces y se continuó con las condiciones anteriores hasta el momento del desove (Greenberg, 1961). Debido a que la especie muestra cuidado biparental, las larvas fueron mantenidas con los progenitores hasta los 14 días después de la eclosión (DDE). Durante este periodo las larvas fueron alimentadas tres veces al día con *Paramecium* spp. desde que se observó el nado libre (3-4 DDE) y a los 12 DDE se comenzó la transición a la dieta con nauplios de *Artemia franciscana*. Al final del día 14 DDE las larvas fueron distribuidas aleatoriamente en los acuarios destinados a los tratamientos de reversión sexual: control, feminización y masculinización; los cuales consistieron en el suministro de agentes feminizantes y masculinizantes a través de la dieta como se indica en la siguiente sección.

### 2.2 Preparación de la dieta

Los experimentos de reversión sexual consistieron en un tratamiento de feminización mediante administración de 17 $\beta$ -estradiol y uno de masculinización utilizando fadrozol, un inhibidor de la aromatasas (Sigma-Aldrich). Ambos reactivos fueron previamente disueltos en etanol al 70% (6.66 mg/ml) y se administraron a través de la dieta utilizando nauplios enriquecidos con la hormona correspondiente. El grupo control fue alimentado con nauplios sin enriquecer.



**Figura 4.** Ubicación del Área Natural Protegida Cuatrociénegas y sitio de colecta de adultos de ciclido joya en la Poza Churince.

Para el enriquecimiento de los nauplios se realizó una adaptación de protocolos establecidos previamente (Martin-Robichaud et al., 1994; Stewart et al., 2001; Vidal-lópez et al., 2009). Diariamente se hidrataron quistes comerciales de *Artemia franciscana* (Brine Shrimp Direct, Inc.) durante 1 hora y se decapsularon durante 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (cloro comercial). El cloro se desactivó con tiosulfato de sodio (anticloro comercial) y los quistes decapsulados fueron filtrados, enjuagados con agua dulce y transferidos a un recipiente cónico con aireación desde el fondo, donde se incubaron en un medio salino (30 ups) a 25 °C durante 24 horas.

Después de la incubación los nauplios fueron colectados y transferidos en un recipiente limpio. Se calculó la densidad promediando el número de nauplios presentes en 10 muestras de 1 ml y se dividieron en tres medios de incubación de acuerdo a los tratamientos de reversión sexual. Para el tratamiento de feminización los nauplios se enriquecieron en un medio nutritivo (selco, modificado por Lozano-Peña, 2017) con  $17\beta$ -estradiol a una concentración de 200 mg/kg de alimento. Lo anterior considerando que, para el lote de quistes utilizado, después de la eclosión había 100 nauplios por mg de peso y la incorporación de estradiol en los nauplios es de 461 ng/mg (Stewart et al., 2001) asumiendo un 100 de absorción.

Ya que no se encontraron reportes sobre el enriquecimiento de nauplios utilizando fadrozol, para el tratamiento de masculinización se asumió el mismo porcentaje y concentración de incorporación que el estradiol y se utilizó una concentración de 100 mg/kg de alimento. Los nauplios utilizados para el tratamiento control fueron expuestos a la misma cantidad de etanol sin tratamiento hormonal. La concentración final de etanol a la que fueron expuestos los organismos fue menor a 0.21% y 0.01%, respectivamente para el medio de enriquecimiento de los nauplios y los acuarios con las larvas de cíclido joya expuestas a los tratamientos.

## **2.3 Reversión sexual**

Los tratamientos de reversión sexual se llevaron a cabo por triplicado en acuarios de 10 galones distribuidos de forma completamente aleatoria. Se utilizaron un total de 50 larvas por acuario, con un tiempo de exposición de 45 días a partir de los 15 DDE. Para los tratamientos de feminización y masculinización las larvas fueron alimentadas con los nauplios enriquecidos con  $17\beta$ -estradiol y fadrozol, como se indicó en la sección anterior, y en el grupo control las larvas fueron alimentadas con los nauplios expuestos a etanol.

La alimentación se realizó a saciedad aparente dos veces por día después de 2 y 5 horas de enriquecimiento de los nauplios. Los acuarios se mantuvieron a un volumen de 20 L, con aireación

constante y se realizaron recambios del 50% dos veces por semana para mantener la calidad del agua. Se registraron los valores de temperatura tres veces por día, de pH dos veces por semana y de concentración de amoníaco, nitritos y nitratos una vez por semana utilizando un kit colorimétrico (Freshwater master test kit, API).

Para los análisis de expresión genética se sacrificaron 12 larvas por tratamiento (cuatro por réplica) a los 15, 30, 45 y 60 DDE, para las cuales se cuantificó rápidamente el peso y la longitud total (LT; solo a los 60 DDE) e inmediatamente fueron almacenadas en RNAlater (Qiagen) a -20°C hasta la extracción de RNA. Al finalizar el tiempo de exposición a los tratamientos (60 DDE) se contaron los organismos sobrevivientes y se calculó el porcentaje de supervivencia. Posteriormente los organismos fueron alimentados a saciedad tres veces por día con una dieta comercial (Nutripec, 32% proteína).

## **2.4 Proporción de sexos**

Se determinó la proporción de sexos en cada tratamiento para evaluar la eficiencia de la reversión sexual y correlacionar los niveles de expresión genética. Para lo cual se sacrificaron 36 individuos a la edad de 199-235 DDE y se determinó el sexo mediante disección e inspección visual de la gónada o tinción con aceto-carmín. La técnica de tinción con aceto-carmín ha probado ser útil en la evaluación de sexos de forma rápida y eficiente, incluso al tratarse de individuos pequeños (Wassermann y Bertolla-Afonso, 2002). Para la tinción se preparó una solución de aceto-carmín (índigo-carmín al 0.5%, ácido acético al 45%), la cual fue previamente calentada hasta ebullición por 5 min y filtrada para eliminar el exceso de colorante. Una vez removida la gónada se colocó una muestra de tejido sobre un cubreobjetos, se agregaron unas gotas de aceto-carmín y se presionó la muestra con un cubreobjetos (squash gonadal). La preparación fue analizada en un microscopio óptico a 100X y 200X para determinar el sexo de los organismos de acuerdo a las estructuras presentes (Guerrero y Shelton, 1974; Wassermann y Bertolla-Afonso, 2002).

## **2.5 Expresión genética**

Todas las pruebas moleculares fueron realizadas en el Laboratorio de Ciencias Genómicas de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Para cuantificar los niveles de expresión genética de la aromatasa se extrajo el RNA total de cada larva para construir el cDNA, el cual fue posteriormente amplificado mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando cebadores específicos para este gen como se indica en las siguientes secciones.

### 2.5.1 Extracción de RNA

El RNA total de cada larva fue extraído en Trizol (Ambion) de acuerdo al protocolo del fabricante, utilizando 10 volúmenes del reactivo durante la homogenización para reducir la contaminación con DNA genómico (Heidary y Pahlevan, 2014). Brevemente, cada larva completa fue homogenizada en Trizol y centrifugada a 12,000 *g* (10 min, 4 °C). El sobrenadante fue incubado a temperatura ambiente durante 5 min, mezclado con cloroformo y centrifugado a 12,000 *g* (15 min, 4 °C). La fase superior acuosa fue recuperada e incubada toda la noche a -20 °C con isopropanol al 90%. Posteriormente se centrifugó a 12,000 *g* (10 min, 4 °C) y el precipitado (RNA) fue lavado con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 7,500 *g* (5 min, 4°C) y el pellet se dejó secar durante 5-10 min en una campana de flujo laminar e inmediatamente se disolvió en agua estéril.

El extracto de RNA fue cuantificado por espectrofotometría (Nanodrop, ThermoScientific) utilizando 1.5 µl de la muestra y se determinó su calidad de acuerdo a su densidad óptica 260/280 (para lo cual se recomiendan valores entre 1.8 y 2). Además, se evaluó la integridad de las subunidades 18s y 28s de RNA ribosomal por electroforesis de 1 µg de RNA total en un gel de agarosa al 1% incluyendo cloro comercial al 1% como agente desnaturizante e inhibidor de ribonucleasas (Gayral et al., 2011; Aranda et al., 2012). Para la tinción se utilizó bromuro de etidio y los geles fueron analizados en un fotodocumentador Gel Doc XR+ utilizando el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad).

### 2.5.2 Transcripción reversa

La construcción del DNA complementario (cDNA) se realizó con el kit de transcripción reversa de Omniscript (Qiagen) utilizando hexámeros al azar de acuerdo al protocolo del fabricante con algunas modificaciones. El RNA total (125 ng) fue incubado a 65 °C por 5 min y a temperatura ambiente por 5 min. La transcripción reversa se realizó en un volumen de 10 µl con una mezcla de reacción de 0.125 µl de buffer RT 10X, 0.5 µl de dNTP 5 mM, 2.5 ng de hexámeros al azar, 0.125 µl de enzima RT, 0.01 µl de inhibidor de RNAsas y agua hasta completar el volumen final. La mezcla se incubó en un termociclador por 10 min a 25 °C, 60 min a 37 °C y 15 min a 70 °C, y se utilizó inmediatamente o se almacenó a -20 °C hasta su amplificación en la reacción de PCR.

### 2.5.3 Extracción de DNA

Para corroborar el tamaño de la región amplificada de la aromatasa (debido a la presencia de intrones) se extrajo DNA a partir de muestras de tejido muscular de adultos utilizando el método

tradicional de extracción de fenol:cloroformo. El tejido fue incubado a 48°C por 90 min en un buffer de lisis (0.5% SDS, 100 mM EDTA (pH 8), 200 mM Tris-HCl (pH 8), 250 mM NaCl y 0.3 mg/ml de proteinasa K). Posteriormente la muestra se homogenizó, se mezcló en una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 5000 g (10 min, 25 °C). Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el DNA con isopropanol a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó nuevamente a 5000 g (10 min, 25 °C), el pellet de DNA se dejó secar en una campana de flujo laminar y se disolvió en agua estéril. Posteriormente fue cuantificado en Nanodrop y almacenado a -20 °C hasta su uso

#### 2.5.4 PCR en tiempo real

Para la amplificación de los fragmentos de la aromatas *cyp19a1a* se diseñaron cebadores a partir de regiones conservadas de las secuencias disponibles para otras especies de cíclidos (National Center for Biotechnology Information database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el software MEGA7 para el alineamiento de las secuencias. Adicionalmente (ver resultados) se evaluó la expresión del gen *foxl2* (Flores-Salinas, 2017). Como gen de referencia se utilizó el 18s ribosomal (Aguilar, 2017). La secuencia de cebadores, temperatura de alineamiento y el tamaño de fragmento esperado para cada gen se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de los genes de cíclido joya en el presente estudio.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño esperado	Temperatura de alineamiento
<i>Cyp19a1a</i>	Directo	5' CAT GAA CGA GAG AGG CAT CA 3'	216 pb	56.1 °C
	Reverso	5' AGA TGT CCA CCA CAG TGC AG 3'		
<i>Foxl2</i> <sup>1</sup>	Directo	5' CCG GAT CCG TCC CAG AA 3'	59 pb	56.9 °C
	Reverso	5' CGG ATA GCC ATG GCA ATGA 3'		
<i>18s</i> <sup>2</sup>	Directo	5' CCC TTC AAA CCC TCT TAC CC 3'	111 pb	54.5 °C
	Reverso	5' CCA CCG CTA AGA GTC GTA TT-3'		

<sup>1</sup>Flores-Salinas, 2017

<sup>2</sup>Aguilar, 2017

Los niveles de expresión fueron determinados mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando los valores de acumulación de fluorescencia durante la amplificación con el fluoróforo SYBRgreen (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Cada muestra fue analizada por duplicado en un volumen de reacción de 10 µl (1 µl de cDNA, 1 µl de cebadores (5 µM cada uno), 3 µl de H<sub>2</sub>O estéril y 5 µl de SYBR Green 2X supermix). La amplificación se realizó en microplacas de 96 celdas en un termociclador CFX96 RealTime System (Bio-Rad) con las siguientes condiciones: hot start de 95 °C (3 min); 40 ciclos de 95 °C (30 s), 5X.X °C (30 s, ver Tabla 1), 72 °C (30 s); y extensión final a 72 °C (1 min). Se programaron las

lecturas de fluorescencia al final de cada ciclo de extensión y para analizar la pureza del producto se realizó una curva de disociación con un gradiente de temperatura de 65 a 95 °C en incrementos de 0.5 °C/5 s.

Para el análisis de expresión de cada muestra, se determinó el valor umbral de acumulación de fluorescencia de cada gen ( $C_q$ ) obtenido durante la amplificación utilizando el software CFX manager (Bio-Rad). Para cada muestra se determinó la expresión de *cyp19a1a* o *foxl2* (target) mediante la normalización de sus valores con los del gen 18s utilizando la ecuación de expresión relativa  $2^{-\Delta Cq}$ , donde:

$$\Delta Cq = Cq_{\text{target}} - Cq_{18s} \quad (1)$$

## 2.6 Análisis estadístico

Solo los datos de crecimiento y supervivencia cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica. Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento en peso a los 30, 45 y 60 DDE, y longitud total a los 60 DDE. Los valores de supervivencia fueron evaluados mediante un ANOVA de una vía después de ser transformados por medio de la función arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje. Debido a que los valores de expresión relativa no cumplieron los supuestos de normalidad y homoscedasticidad, se evaluaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba Conover-Iman para identificar diferencias entre los tratamientos. Para evaluar cambios en la expresión relativa de un tratamiento en dos días distintos se realizó una prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (Pohlert, 2014; Göppert et al., 2016). La proporción de sexos fue evaluada mediante una prueba de  $X^2$  contra la proporción esperada de 1:1 (Mair et al., 2011). La significancia estadística se aceptó a  $P \leq 0.05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R v3.3.1 (Logan, 2010).

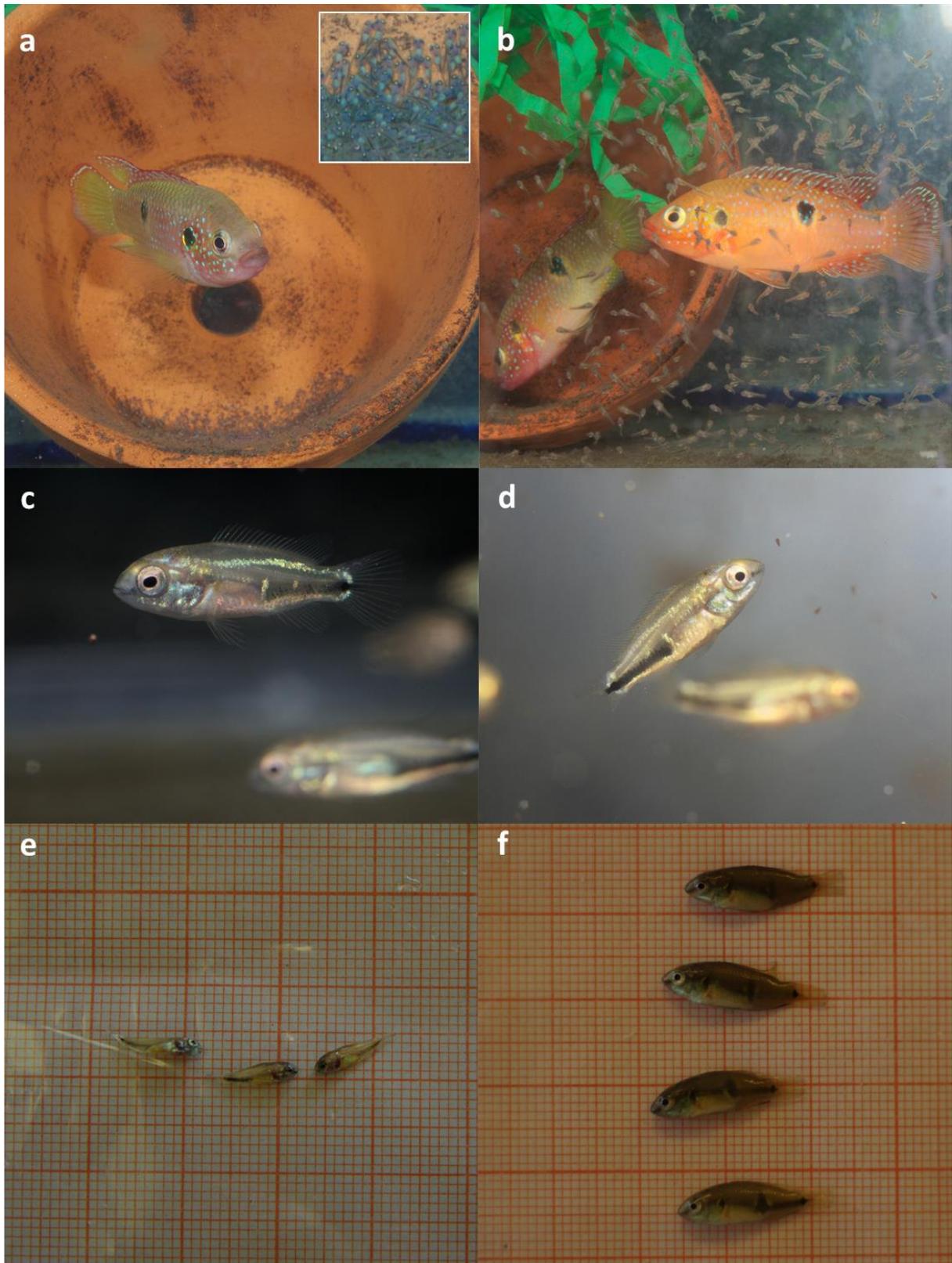
## Capítulo 3. Resultados

---

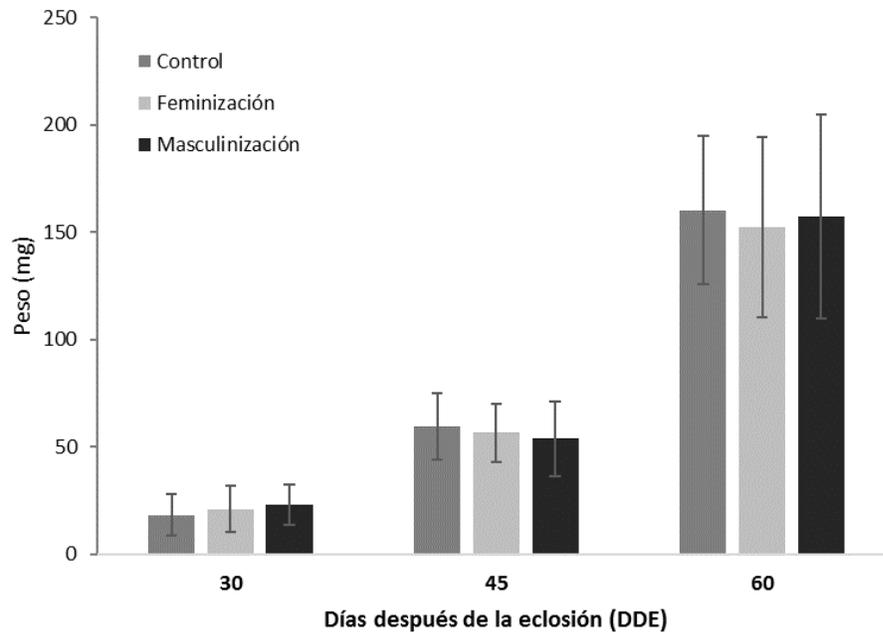
### 3.1 Reversión sexual

Las larvas expuestas a los tratamientos de reversión sexual fueron obtenidas a partir del desove de dos parejas distintas, con una diferencia de 4 h entre el momento en que se observaron las puestas. No fue posible determinar el tamaño de la puesta o la tasa de eclosión debido a que la especie muestra cuidado biparental de la descendencia y las hembras suelen resguardar los huevos en la boca durante los primeros días. Se utilizaron un total de 424 larvas provenientes de una pareja y 26 larvas de otra (Figura 5), las cuales no presentaron diferencias significativas en cuanto a peso,  $2.42 \pm 0.46$  mg ( $t = -0.01$ ,  $df = 21$ ,  $P = 0.98$ ), y longitud total,  $6.31 \pm 0.42$  mm ( $t = -2.01$ ,  $df = 12.81$ ,  $P = 0.06$ ) a los 14 DDE, momento en que fueron distribuidas en los acuarios destinados a los tratamientos de reversión.

Durante el experimento las larvas aceptaron la dieta de nauplios enriquecidos sin ningún problema (Figura 5d). Respecto al control, los tratamientos de feminización y masculinización no afectaron de forma significativa el peso de los individuos a los 30 ( $P = 0.48$ ), 45 ( $P = 0.66$ ) y 60 DDE ( $P = 0.89$ ; Figura 6). La longitud total a los 60 DDE fue de  $21.35 \pm 1.74$ ,  $20.33 \pm 1.79$  y  $20.62 \pm 1.89$  mm para el tratamiento control, feminización y masculinización, respectivamente, para lo cual tampoco se registraron diferencias significativas ( $P = 0.37$ ).



**Figura 5.** Cuidado biparental de las larvas de cíclido joya antes de los tratamientos de reversión sexual. Se observa la coloración característica de la especie durante la temporada reproductiva. En el acercamiento se observan las larvas aun con reservas de vitelo (**a**, **b**). Juveniles de 36 DDE (aprox. 10 mm LT) expuestos al tratamiento de feminización (**c**) y de masculinización antes de ingerir uno de los nauplios (**d**). Ejemplares en los muestreos del día 30 (**e**) y 60 DDE (**f**).



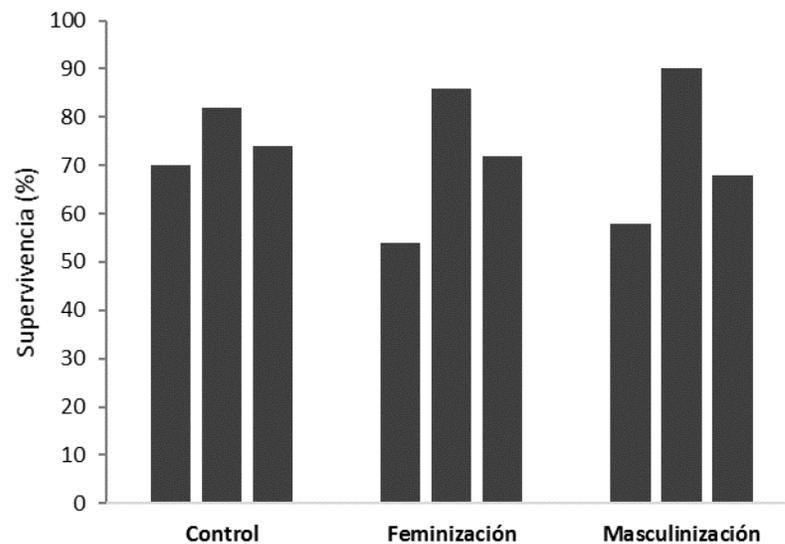
**Figura 6.** Peso de los ejemplares de cíclido joya expuestos a los tratamientos de reversión sexual. Media  $\pm$  SD. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para cada día ( $P > 0.05$ ).

Los parámetros de calidad del agua se mantuvieron dentro de los rangos recomendados para la especie durante todo el periodo experimental (Tabla 2). No obstante, debido a las bajas temperaturas presentes durante algunos días se tuvieron que utilizar calentadores para mantener las condiciones adecuadas. El valor mínimo y máximo registrado de temperatura fue de 22 °C y 33.2 °C, respectivamente. Debido a que se presentaron problemas con la calibración del medidor de oxígeno no fue posible registrar los valores de este parámetro. Sin embargo, no se considera que éste haya sido un factor limitante dado el tamaño de los organismos y la baja densidad (2.5 larvas/litro). Por disponibilidad de los reactivos, la concentración de nitratos, nitritos y amoníaco se comenzó a registrar dos semanas después del inicio del tratamiento, y siempre permaneció por debajo de la concentración mínima de detección, por lo cual es poco probable que la concentración se haya incrementado durante los días en que no se realizaron las mediciones, ya que las larvas tenían un menor tamaño al inicio del experimento.

**Tabla 2.** Condiciones de calidad de agua registradas durante los tratamientos de reversión sexual del cíclido joya. Media  $\pm$  SD de las tres réplicas experimentales. ND: no detectable.

Tratamiento	Temperatura (°C)	pH	Nitritos (ppm)	Nitratos (ppm)	Amonio (ppm)
Control	27.7 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 0.25	ND	ND	ND
Feminización	27.6 $\pm$ 2.2	8.4 $\pm$ 0.22	ND	ND	ND
Masculinización	27.6 $\pm$ 2.1	8.4 $\pm$ 0.31	ND	ND	ND

La supervivencia promedio al final de los tratamientos fue de 75, 71 y 72%, para el tratamiento control, feminización y masculinización, respectivamente (Figura 7). Aunque se observó una mortalidad ligeramente mayor en algunas réplicas de los tratamientos de feminización y masculinización, éstos no mostraron diferencias significativas con respecto al control ( $P=0.95$ ). Cabe destacar que la mayor parte de la mortalidad ocurrió durante la primera semana del experimento, por lo cual esto posiblemente se debió a la manipulación de las larvas durante su distribución en los acuarios y no a un efecto de los tratamientos hormonales.



**Figura 7.** Supervivencia de larvas del cíclido joya al final de los tratamientos de reversión sexual. Se muestran las tres réplicas por tratamiento.

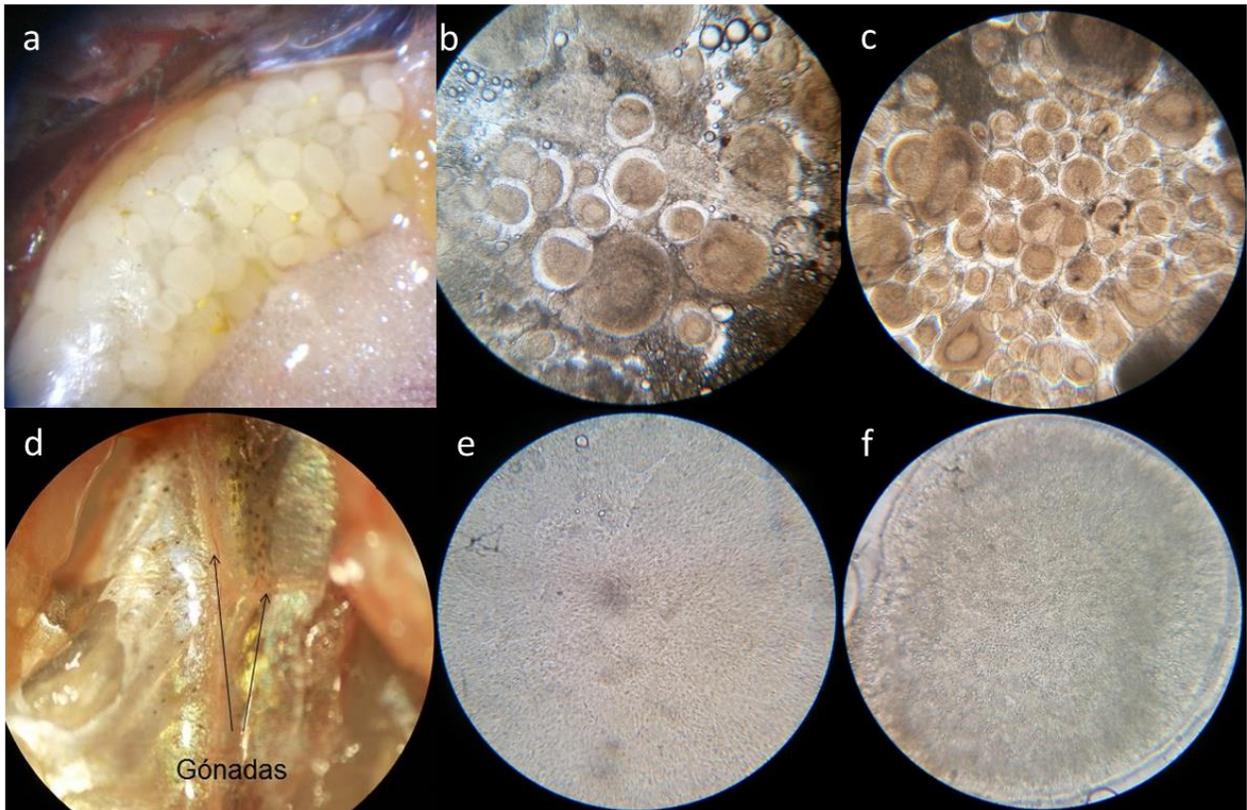
### 3.2 Proporción de sexos

Para evaluar la eficiencia de la reversión se sacrificaron 36 organismos por tratamiento y se constató el sexo de cada individuo mediante biopsias y observación de las gónadas utilizando la técnica de tinción con aceto-carmín. En el presente estudio la identificación de la mayoría de las hembras fue relativamente fácil, ya que la gónada estaba plenamente desarrollada y los ovocitos se observaban a simple vista (Figura 8a, d). Lo cual indicaba que los organismos se encontraban cerca de la madurez sexual. Incluso se formó una pareja (aparentemente) a los 5 meses de edad, ya que ambos individuos mostraban la coloración nupcial característica y se mostraban agresivos hacia los otros ejemplares.

Para la identificación el sexo en los ejemplares más pequeños fue necesario realizar la tinción con aceto-carmín, debido al tamaño de las gónadas. Bajo observación microscópica el tejido ovárico se caracterizó por la presencia de ovocitos en el estadio perinucleolar (Figura 8b, c). La estructura testicular no se apreciaba bien a 100X, sin embargo, a 200X se observó la estructura característica de las espermatogonias (Figura 8e, f). Como resultado en el grupo control la proporción de sexos fue de 1:1.4 (Tabla 3), lo cual no fue diferente de la proporción esperada de 1:1 ( $\chi^2= 1$ ;  $P= 0.31$ ). En cambio, el tratamiento de feminización fue altamente significativo al registrarse 100% de hembras ( $\chi^2= 32$ ;  $P< 0.001$ ). Sin embargo, aunque el tratamiento de masculinización presentó un mayor porcentaje de machos respecto al control, no resultó ser significativamente diferente respecto a este tratamiento ( $\chi^2= 0.69$ ;  $P= 0.4$ ), ya que resultó en una proporción de sexos de 1:1. Esto posiblemente se debió a que se requería una mayor concentración de fadrozol para la masculinización del cíclido joya (Tabla 3).

**Tabla 3.** Proporción de sexos de juveniles de cíclido joya expuestos a tratamientos de reversión sexual. El asterisco (\*) indica diferencias altamente significativas respecto a la proporción esperada de 1:1 ( $\chi^2$ ,  $P< 0.001$ ).

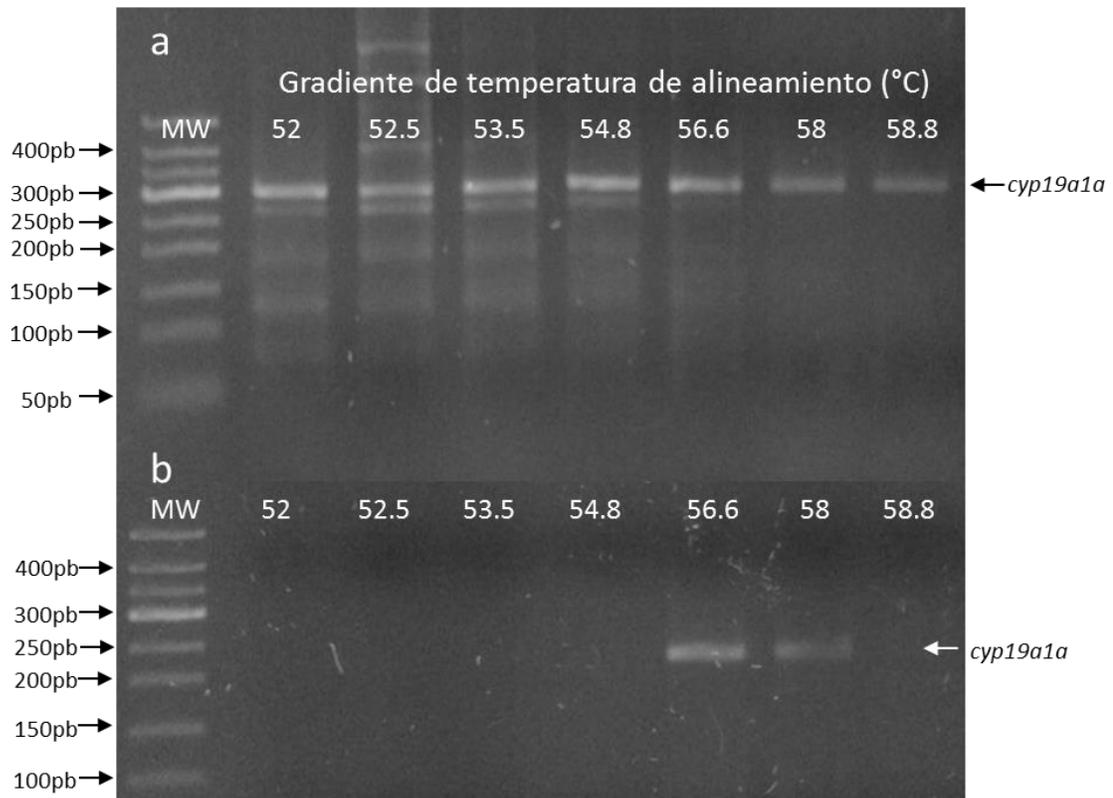
Tratamiento	Machos	Hembras	Porcentaje de hembras
Control	15	21	58%
Feminización	0	36	*100%
Masculinización	18	18	50%



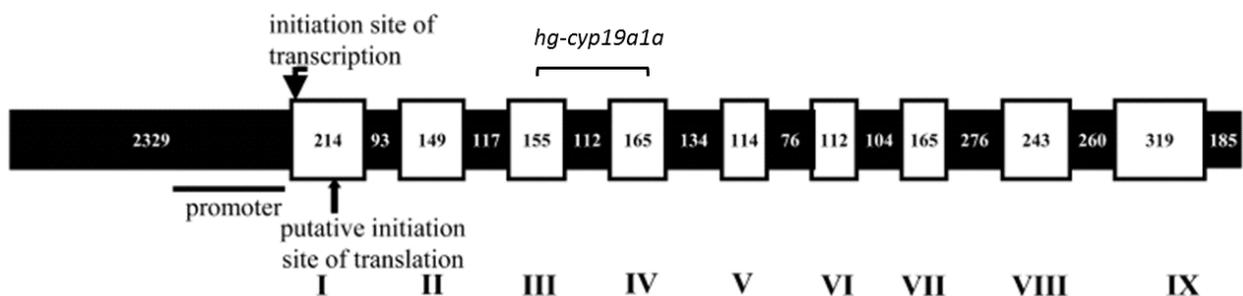
**Figura 8.** Inspección visual y tinción gonadal en juveniles de cíclido joya a la edad de 6 meses. Gónada de una hembra (a) y un macho (d). Tinción con aceto-carmín (squash gonadal visto al microscopio) de una muestra de hembra (b, c; 100X) y de macho (e, f; 200X).

### 3.3 Expresión genética

Respecto a las pruebas moleculares, se logró la amplificación del cDNA de la aromatasa en el cíclido joya con los cebadores diseñados para este estudio. Los resultados del análisis de 26 geles fotodocumentados muestran que el tamaño del producto amplificado por RT-PCR fue de aproximadamente ( $\sim$ ) 210 pares de bases (pb; Figura 9a), mientras que por PCR se amplificó un producto de  $\sim$ 322 pb (Figura 9b), lo cual corresponde al tamaño de los fragmentos esperados para cíclidos: 206 y 318 pb, respectivamente (Ye et al., 2012). El alineamiento de las secuencias de los cebadores en tilapia (*Oreochromis niloticus*) muestra que el fragmento corresponde a una región parcial del cDNA de la aromatasa abarcando los exones 3 y 4 (nucleótidos 453-658 del cDNA), mientras que en DNA el amplicon también incluye el intron 3, de un tamaño de 112 pb (Figura 10; Chang et al., 1997, 2005). Cabe destacar que esta diferencia en el tamaño del fragmento, permitió distinguir la contaminación por DNA genómico durante la estandarización del protocolo de extracción de RNA y posterior amplificación mediante PCR.



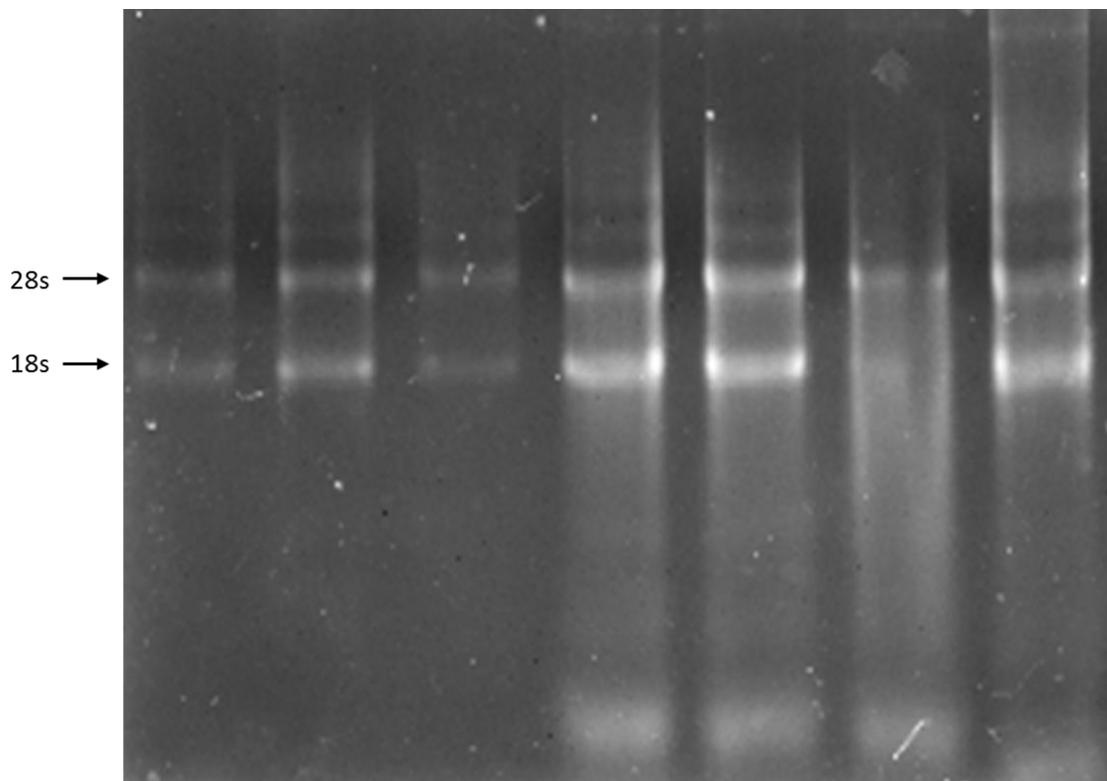
**Figura 9.** Producto de amplificación de la aromatasa *cyp19a1a* sobre DNA (a) y cDNA ovárico (b) con los cebadores diseñados para el ciclido joya. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. El RNA fue extraído en columna de silica-matrix (RNeasy, Qiagen). MW: marcador de peso molecular.



**Figura 10.** Diagrama de la estructura del gen de la aromatasa *cyp19a1a* en tilapia (*Oreochromis niloticus*; tomado de Chang et al., 2005). Las regiones correspondientes a los exones (I-IX) e intrones se muestran en blanco y negro, respectivamente. Se indica el tamaño de cada sección en pares de bases y la región correspondiente al fragmento amplificado en el ciclido joya (*hg-cyp19a1a*).

La calidad del RNA fue verificada utilizando los valores de absorbancia  $A_{260/280}$ . Durante la extracción, las muestras presentaron los valores recomendados de  $>1.8$ , excepto para 4 muestras ( $A_{260/280} = 1.68 - 1.79$ ); sin embargo, debido a que estos valores no se encontraron muy alejados de lo

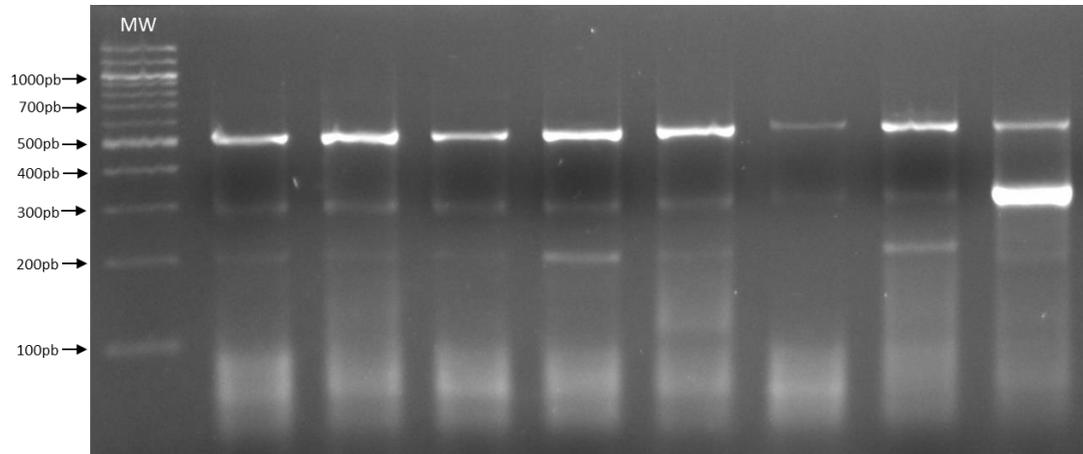
recomendado, dichas muestras fueron incluidas en los análisis de expresión, y en efecto ninguna de estas muestras mostró niveles anormales de expresión relativa (*outliers*). Además, se evaluó la integridad del RNA al observar la migración de las subunidades 18s y 28s ribosomal (Figura 11). Aunque para esto, se utilizó un procedimiento con cloro como agente desnaturante (Aranda et al., 2012), el cual es una alternativa más práctica y menos costosa que otros métodos; sin embargo, no permite evaluar adecuadamente la proporción esperada de 2:1 en la intensidad de las bandas 28s:18s de RNA ribosomal. Por lo cual esta técnica solo fue utilizada como indicador de una posible degradación del RNA y/o contaminación por DNA durante la extracción.



**Figura 11.** Análisis de la integridad del RNA. Se observan las bandas pertenecientes a las subunidades 18s y 28s de RNA ribosomal. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, cloro al 1 %, tinción con bromuro de etidio.

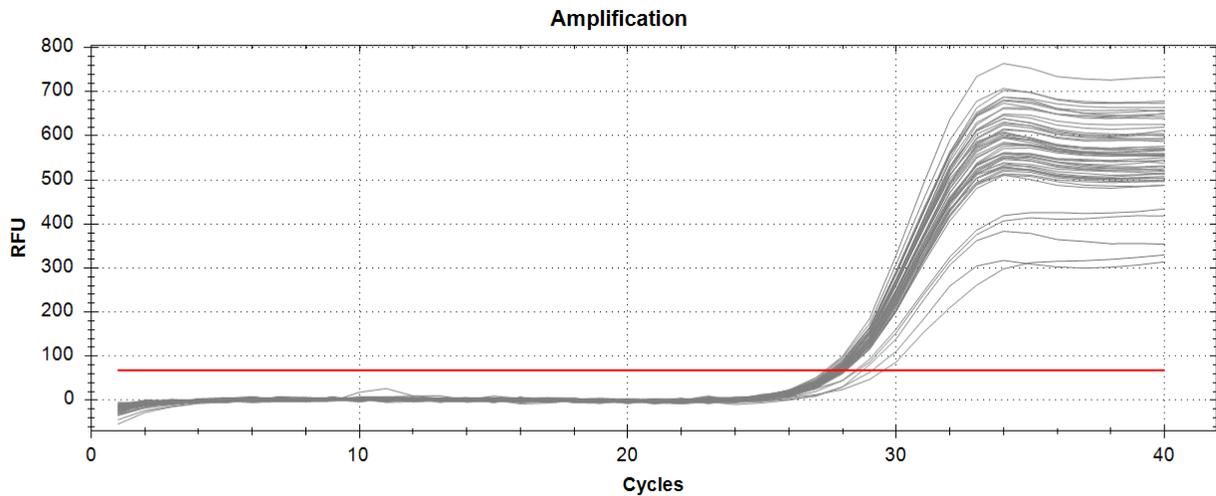
Debido al tamaño de los organismos al inicio de los tratamientos las muestras de los 15 DDE fueron procesadas en grupos de tres larvas. En estas muestras no fue posible cuantificar la expresión de la aromatasa mediante RT-qPCR, debido a que al migrar el producto amplificado se observaron bandas inespecíficas de ~300 y ~500 pb (Figura 12). No obstante, el fragmento esperado para cDNA (~208 pb) sí estuvo presente, lo cual sugiere que la aromatasa si se expresa a los 15 DDE. La presencia de estas bandas no permitió cuantificar la amplificación mediante los valores de fluorescencia obtenidos en qPCR, sin

embargo, al analizar el gel en el fotodocumentador se determinó que para los fragmentos de 208 pb la intensidad relativa de la banda más intensa fue 10.73 veces mayor respecto a la banda más tenue. Lo anterior puede reflejar diferencias en los niveles de expresión entre machos y hembras, ya que estas larvas se muestrearon antes de su primera alimentación con los nauplios enriquecidos, por lo que no hay influencia de los tratamientos hormonales.



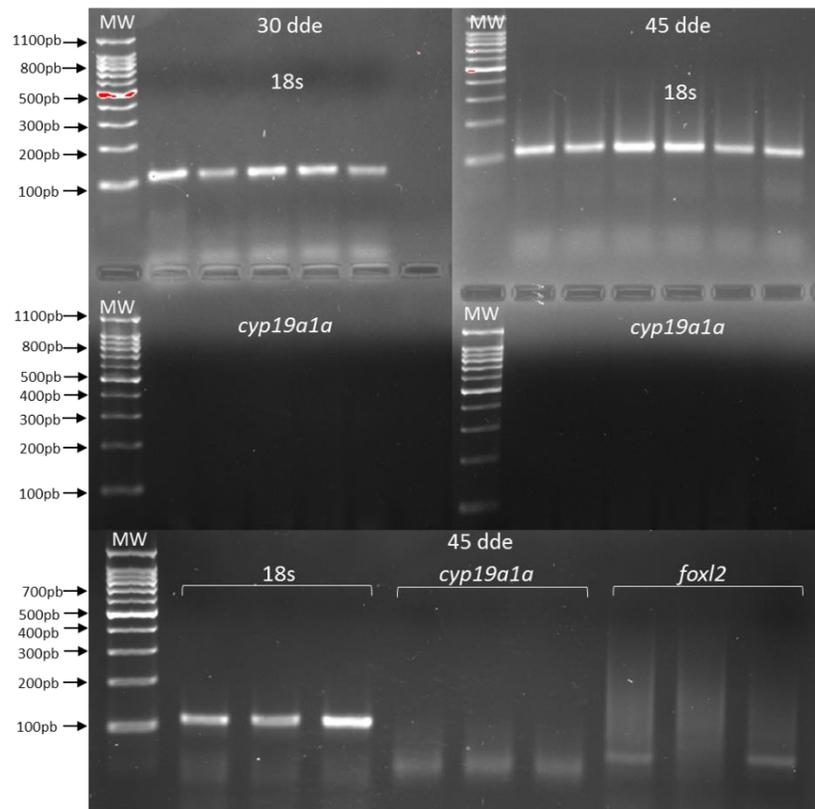
**Figura 12.** Producto de amplificación de la aromatasa *cyp19a1a* por RT-qPCR en muestras de larvas de cíclido joya a los 15 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.

Posteriormente se procesaron las muestras de individuos de 30 y 45 DDE, las cuales, a diferencia de los 15 DDE, si fueron manejadas de forma individual por su mayor tamaño. Por RT-qPCR no se encontraron niveles significativos de expresión de aromatasa en las larvas de estas edades, ya que los niveles de fluorescencia detectados durante la amplificación fueron muy bajos y cercanos al control NTC ( $C_q = 27.3-28.1$ ; Figura 13). Esto pudo ser confirmado al no observarse el producto mediante electroforesis. Igualmente, no fue posible detectar la expresión de la aromatasa en muestras de 60 DDE por RT-PCR, incluso al extraer el RNA de la sección del tronco de los organismos. Lo anterior se realizó con el fin de reducir la dilución de los mRNA de aromatasa en el RNA total de la larva, ya que en este día los individuos tenían una longitud promedio de 20 mm lo cual facilitó su disección.

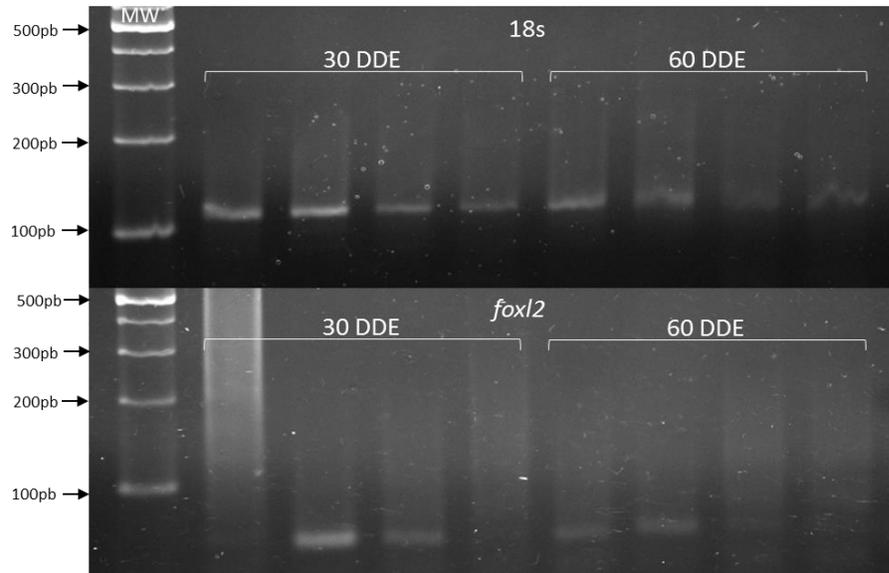


**Figura 13.** Curva de acumulación de fluorescencia durante la amplificación de aromatasa *cyp19a1a* a los 45 DDE mediante qPCR. La línea roja horizontal indica el nivel umbral de fluorescencia (determinado en el software CFX manager, Bio-Rad). RFU: Unidades de fluorescencia relativa.

Para descartar un posible efecto debido al tamaño del producto amplificado (>150 pb) se realizaron distintas modificaciones en los protocolos de extracción de RNA y transcripción reversa. Sin embargo, no se obtuvo amplificación de la aromatasa a los 30, 45 y 60 DDE (Figura 14). En contraste, si fue posible amplificar el gen 18s ribosomal y otros genes que se estuvieron trabajando para esta especie (datos no mostrados), entre ellos *foxl2* (Figura 15), uno de los principales reguladores de la transcripción de la aromatasa.

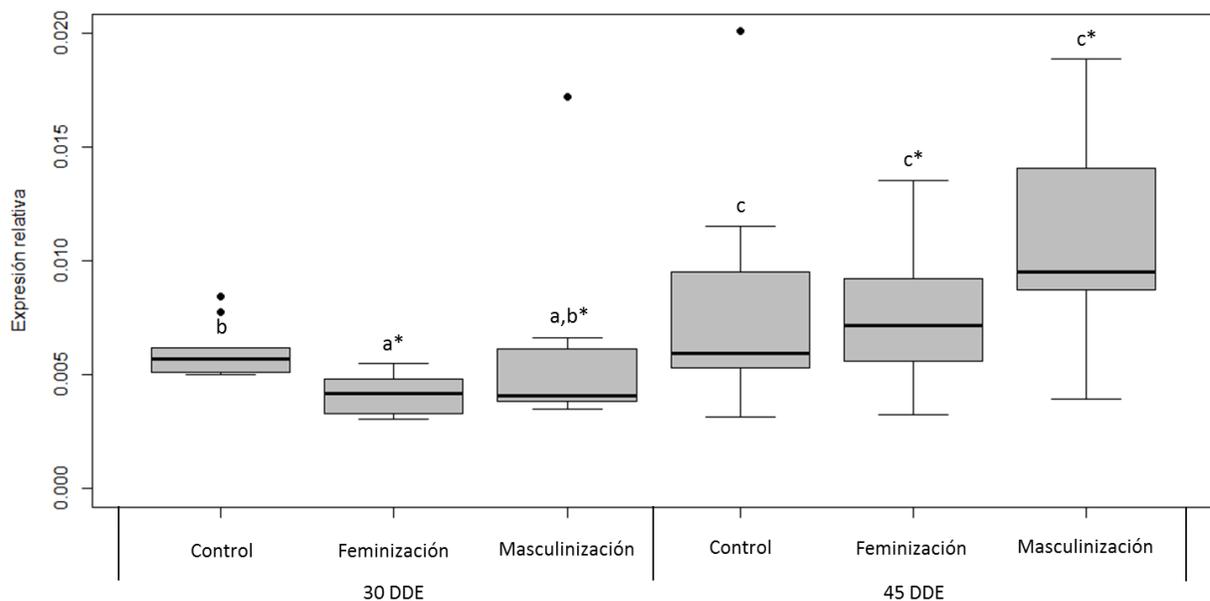


**Figura 14.** Amplificación de aromatasa *cyp19a1a*, *foxl2* y 18s mediante PCR punto final en muestras de cíclido joya de los días 30 y 45 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.



**Figura 15.** Amplificación de *foxl2* y 18s mediante PCR punto final en muestras de cíclido joya de los días 30 y 60 DDE. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular.

Debido a que *foxl2* es un factor transcripcional que promueve la expresión de la aromatasa y cuya expresión sí fue evidenciada mediante RT-PCR en los días 30 y 45, se decidió cuantificar los niveles de expresión relativa de este gen mediante RT-qPCR (Figura 16). Como resultado se observó que, al normalizar los niveles con el gen de referencia, se encontraron diferencias significativas en la expresión entre tratamientos a los 30 DDE (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 8.39$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.01$ ). Específicamente la expresión en el tratamiento control fue significativamente mayor que en el tratamiento de feminización (Conover's-test,  $P > 0.01$ ) y el tratamiento de masculinización, aunque en este último no alcanzó la significancia estadística (Conover's-test,  $P = 0.11$ ). A los 45 DDE no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los tratamientos (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 2.02$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.36$ ). De acuerdo a los resultados de RT-PCR a los 60 DDE los niveles de expresión de *foxl2* fueron menores respecto a los días 30 y 45, por lo cual no fueron cuantificados mediante qPCR.



**Figura 16.** Expresión relativa de *foxl2* en juveniles de cíclido joya expuestos a tratamientos de reversión sexual a los 30 y 45 DDE. Se muestra la mediana, cuartiles, rango y puntos extremos ( $n = 9$ ). Las letras indican diferencias significativas en los niveles de expresión entre tratamientos para cada día, mientras que el asterisco (\*) indica diferencias para cada tratamiento entre los dos días ( $P < 0.05$ ).

Debido a que no existe un equivalente no paramétrico para el ANOVA de dos vías, se utilizó una prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon para evaluar cambios en la expresión relativa de cada tratamiento en el tiempo (Figura 16). Observándose que en todos los tratamientos los valores mostraron una mayor variación, y respecto al día 30 los niveles de expresión a los 45 DDE fueron significativamente mayores para los tratamientos de feminización ( $W= 12, P= 0.01$ ) y masculinización ( $W= 14, P= 0.02$ ), aunque no en el tratamiento control ( $W= 35, P= 0.65$ ).

## Capítulo 4. Discusión

---

La introducción de especies exóticas invasoras es considerada actualmente como la segunda causa de pérdida de la biodiversidad nivel mundial (Myers et al., 2000) y en Cuatrociénegas ya se han reportado impactos sobre las poblaciones de especies endémicas por la introducción del cíclido joya (Lozano-Vilano et al., 2006; Marks et al., 2011; Dugan, 2014). Como forma de control se ha propuesto la introducción de individuos portadores cromosomas Y troyanos, con el fin de sesgar la proporción de sexos hasta reducir el número de hembras a cero y extinguir la población exótica. Con este propósito en el presente estudio se realizó una primera aproximación a la producción de hembras revertidas y la identificación de marcadores moleculares para el sexo en esta especie.

### 4.1 Reversión sexual

Existen antecedentes documentados sobre la utilización de nauplios como vehículo para la administración de  $17\beta$ -estradiol en peces, cuya utilización ha permitido alcanzar exitosamente la feminización de larvas de *Cyclopterus lumpus* (Martin-Robichaud et al., 1994) y lobina *Micropterus salmoides* (Garrett, 1989). De igual forma, al utilizarlos como vehículo de  $17\alpha$  metiltestosterona se ha logrado la masculinización del cíclido *Petenia splendida* (Vidal-lópez et al., 2009) y de la lobina *Micropterus salmoides* mediante el uso de testosterona o androsterona (Garrett, 1989).

En el presente estudio se llevaron a cabo tratamientos de reversión sexual con larvas del cíclido joya utilizando nauplios como vehículo de los tratamientos hormonales. Como era de esperarse en el tratamiento control la proporción de sexos no fue diferente de la proporción esperada de 1:1, lo que confirma que no existió una influencia marcada de la temperatura en la reversión sexual. Esto debido a que la temperatura es uno de los factores de mayor importancia durante la diferenciación sexual en peces teleósteos, ya que suele influir en la proporción de sexos (Piferrer y Guiguen, 2008). Aunque no se han reportado estudios de la influencia de la temperatura sobre la proporción de sexos en especies de cíclido joya, en la tilapia *Oreochromis niloticus* se ha determinado una temperatura umbral de 36 °C, más allá de la cual se han registrado niveles significativos de masculinización de los organismos (Bezault et al., 2007; Azaza et al., 2008).

En lo que respecta a la efectividad de los tratamientos hormonales, se logró la feminización del 100% de las larvas de cíclido joya expuestas a  $17\beta$ -estradiol a una concentración de 200 mg/kg de los nauplios de artemia enriquecidos, sin afectar significativamente el crecimiento y supervivencia de los organismos. Cabe destacar que en el presente estudio se asumió un 100% de asimilación de estradiol por

los nauplios de artemia. Sin embargo, se ha reportado que los nauplios enriquecidos con estradiol pueden llegar a perder hasta 13% de la hormona asimilada después de 4 horas del enriquecimiento (Martin-Robichaud, et al., 1994), por lo cual es posible que la concentración real de estradiol ingerida por las larvas de cíclido joya haya sido menor. Independientemente de esto, la alimentación de las larvas de cíclido joya con los nauplios enriquecidos a esta concentración logró el 100% de reversión sexual. En estudios similares se ha logrado un 100% feminización en larvas de la lobina *Micropterus salmoides* y un 98% en larvas del lumpo *Cyclopterus lumpus*, utilizando nauplios de artemia incubados en estradiol a una concentración de 5 y 20 mg/L, respectivamente (Garrett, 1989; Martin-Robichaud et al., 1994). Ya que estos autores no reportan la densidad de nauplios presentes en el medio de enriquecimiento, no es posible comparar estas concentraciones con las utilizadas en el presente estudio; no obstante, esto reafirma la efectividad de la administración del estradiol por este medio.

En lo concerniente al control de especies invasoras mediante TYC, hasta ahora sólo se ha reportado la producción de machos YY de la trucha *Salvelinus fontinalis*, para lo cual los organismos se feminizaron mediante administración de estradiol a través de una dieta formulada a una concentración de 20 mg/kg, obteniéndose un 99.6% de reversión sexual (Schill et al., 2016).

En cuanto, al tratamiento de masculinización, aunque el porcentaje de machos fue mayor que en el control (50% y 41.6% respectivamente), no se observaron diferencias significativas en cuanto a la proporción de sexos. Aunque en la estrategia empleada para la producción de machos YY no es necesario ningún paso de masculinización, el tratamiento con fadrozol se llevó a cabo para contar con un control negativo de expresión de la aromatasa, ya que en el tratamiento control se esperaba una proporción sexual de 1:1, por lo que en los análisis moleculares se obtendría niveles de expresión genética de machos y hembras. La baja eficiencia de tratamiento de masculinización probablemente se deba a que es requerida una mayor concentración de fadrozol para el cíclido joya. Sin embargo, en otras especies de peces se ha logrado un 100% de reversión con la misma dosis de fadrozol, e incluso se han alcanzado niveles significativos de masculinización a concentraciones más bajas. Por ejemplo, empleando una concentración similar a la utilizada en el presente estudio (100 mg/kg de alimento) se logró la masculinización del 100% de hembras de *Danio rerio*, y hasta un 62.5% de masculinización al administrar 10 mg/kg (Uchida et al., 2004). En el lenguado *Paralichthys olivaceus*, a 100 mg/kg se alcanzó el 100% de reversión, y una dosis de 1 mg/kg de fadrozol logró masculinizar a un 25% de las hembras, lo cual es estadísticamente significativo (Kitano et al., 2000). No obstante, en otras especies de cíclidos se han reportado resultados contradictorios, como en la tilapia *Oreochromis niloticus*, para la cual se ha reportado un 100% de masculinización con dosis de 75 o 100 mg/kg durante 30 días (Afonso et al., 2001), mientras que otros

autores reportan que con concentraciones tan altas como 500 mg/kg no siempre se ha logrado obtener 100% de machos (Kwon et al., 2000).

Si bien, en los estudios anteriores el fadrozol se administró a través de una dieta, no se puede descartar un efecto por la forma de administración, ya que no se ha reportado enriquecimiento de nauplios con fadrozol para tratamientos de reversión sexual. En cambio, como se mencionó anteriormente, al enriquecer nauplios con  $17\beta$ -estradiol se han reportado pérdidas de la hormona después del enriquecimiento (Martin-Robichaud et al., 1994). Por lo cual se vuelve necesario confirmar si la concentración de fadrozol disminuye en los nauplios después del enriquecimiento.

## 4.2 Expresión genética

Un aspecto crítico para la implementación de una estrategia de control de especies invasoras mediante TYC, y en general para la producción de poblaciones monosexuales en acuicultura, es la disponibilidad de marcadores para la identificación del sexo (Beardmore et al., 2001; Cotton y Wedekind, 2007). Ya que se desconoce el gen maestro determinante del sexo y no se han reportado marcadores ligados a cromosomas sexuales para ninguna especie de cíclido joya, la aromatasa constituía la siguiente mejor opción como marcador molecular del sexo (Piferrer y Guiguen, 2008). Por lo anterior, uno de los principales objetivos del presente estudio fue cuantificar los niveles de expresión del gen *cyp19a1a*, uno de los genes que codifica la enzima aromatasa, cuya función muestra un alto grado de conservación en los procesos de diferenciación sexual en peces teleósteos y difiere en sus niveles de expresión en etapas tempranas del desarrollo de acuerdo al sexo (Böhne et al., 2013). Además, sus niveles pueden diferir entre organismos revertidos en algunas especies; es decir, entre machos XX, XY y YY (Kotula-Balak et al., 2008) de ahí su potencial utilidad para la discriminación de genotipos durante la producción de machos YY en el cíclido joya. Así se ha demostrado que mediante el uso de los niveles de expresión de la aromatasa es posible determinar la proporción sexos en una población mediante el sacrificio de una pequeña muestra de individuos (Piferrer y Guiguen, 2008), incluso en larvas o juveniles, reduciendo el número de generaciones necesarias para la obtención de los machos YY (Schill et al., 2016).

En este trabajo se pretendía asociar la expresión del gen *cyp19a1a* con la reversión sexual en el cíclido joya, tal como ha sido reportado en otros teleósteos (Blázquez et al., 2008; Ijiri et al., 2008). Hasta el momento este es el primer reporte de la amplificación del gen de la aromatasa en una especie de cíclido joya (*Hemichromis* spp). Utilizando los cebadores diseñados se logró la amplificación de un fragmento de 322 pb en DNA, lo cual corresponde a una región parcial del gen de la aromatasa de acuerdo a la secuencia

reportada en otras especies de cíclidos. El gen *cyp19a1a* presenta 10 exones y 9 intrones en todas las especies de teleósteos analizados, excepto para algunos grupos que han perdido algunos de los intrones durante su evolución (Wang et al., 2014). El alineamiento de los cebadores diseñados con las secuencias reportadas para tilapia mostraron que el fragmento amplificado en cíclido joya corresponde a los exones 3 y 4 (206) y el intron 3 (112 pb). De igual forma, el fragmento de 210 pb amplificado por RT-PCR corresponde al tamaño esperado de 206 pb en cDNA el cual no incluye el intron 3, correspondiendo al mRNA maduro.

En cuanto a los niveles expresión, los resultados sugieren que efectivamente a los 15 DDE la aromatasa se estaba expresando. No obstante, los niveles de expresión no pudieron ser cuantificados por la presencia de dos bandas inespecíficas de 306 y 550 pb en la electroforesis del producto de la qPCR, lo cual se corroboró con la presencia de 3 picos en la curva de disociación. La naturaleza de la banda de 550 pb es desconocida, y durante la estandarización nunca se encontró una banda mayor a 400 pb con las temperaturas de alineamiento utilizadas. Cabe mencionar que durante la estandarización se amplificó cDNA obtenido de organismos juveniles (>30 DDE) o de gónadas de adultos, por lo que es posible que esta banda corresponda a un transcrito específico del día 15 DDE. En cuanto a la banda de 300 pb, ya que corresponde al tamaño esperado de aromatasa en DNA genómico, posiblemente sea producto de contaminación por DNA durante la extracción del RNA. Algo común durante el procedimiento de extracción de RNA por Trizol en muestras pequeñas, ya que durante la precipitación con cloroformo las fases están muy cercanas por lo que existe una importante probabilidad de contaminación durante el pipeteo (Gayral et al., 2011).

A pesar de estas dificultades técnicas, si se logró observar un producto de ~208 pb, correspondiente al tamaño esperado para la aromatasa en cDNA, lo que sugiere la existencia de expresión a los 15 DDE. Además, el análisis semicuantitativo en el fotodocumentador mostró variaciones en la intensidad relativa de este fragmento en las muestras. Específicamente la banda más intensa fue 10.73 veces mayor respecto a la banda más tenue, lo que presumiblemente puede reflejar diferencias en los niveles de expresión de aromatasa entre machos y hembras en este día.

El mismo análisis se realizó para las muestras de larvas a los 30, 45 y 60 DDE, y en estos casos no se observó el fragmento esperado. Debido a que ya no se obtuvo amplificación de aromatasa a los 30, 45 y 60 DDE, es probable que este gen se haya expresado de forma significativa en un período muy precoz y hasta antes de los 30 DDE. De hecho, mediante histología se ha revelado la presencia de estructuras gonadales en tilapia (*Oreochromis niloticus*) a los 15 días después de la fertilización (DDF) y para el día 36 DDF los ovarios ya son distinguibles. En cuanto a la aromatasa, en esta misma especie se ha reportado que los niveles de expresión difieren entre machos y hembras a partir de los 8 DDE (Li et al., 2013) e incluso se

han encontrado incrementos significativos en hembras desde los 5 DDE (Tao et al., 2013). Por lo cual no se descarta que los patrones de expresión de la aromatasa en el cíclido joya pudieran ser similares a los de la tilapia.

En cambio, en muestras gonadales de adultos sí se detectó expresión de la aromatasa (datos no mostrados) por lo cual probablemente en organismos juveniles tratados este gen se continuará expresando en niveles basales hasta el periodo de maduración gonadal y posteriores eventos de recrudescencia donde presumiblemente aumente su expresión (Rasheeda et al., 2010; Johnsen et al., 2013). Por lo anterior en futuros análisis se recomienda cuantificar los niveles de aromatasa en el cíclido joya en etapas muy tempranas, entre los 5 y 20 DDE.

Aunque, no fue posible correlacionar los niveles de expresión de la aromatasa con los tratamientos de reversión sexual, si fue posible cuantificar la expresión de otro gen asociado al desarrollo sexual, *foxl2*. El gen *foxl2* codifica un factor de transcripción que está implicado en la diferenciación sexual, inhibiendo la acción de genes masculinos y promoviendo la expresión de la aromatasa (Li et al., 2013; Tao et al., 2013). Específicamente se une a la región promotora del gen *cyp19a1a*, la cual tiene diversos sitios de unión para este factor transcripcional, activando su transcripción a través de su dominio *forkhead* (Wang et al., 2007). Este tipo de factores de transcripción regulan diversos procesos biológicos, por lo que se ha encontrado expresión de *foxl2* en otros tejidos como cerebro, branquias y bazo. No obstante, los mayores niveles de expresión se encuentran en ovario durante los procesos de diferenciación sexual (Wang et al., 2004, 2012; Yamaguchi y Kitano, 2008).

Por el número de muestras solo fue posible evaluar la expresión de *foxl2* en los días 30, 45 y 60 DDE, observándose que a los 30 DDE la expresión relativa fue mayor para el tratamiento control, respecto al de masculinización, aunque no de forma significativa ( $P= 0.11$ ). Lo cual era de esperarse dado que ambos presentaron la misma proporción de sexos. No obstante, el tratamiento de masculinización mostró niveles de expresión más cercanos a los del tratamiento de feminización ( $P= 0.79$ ), lo que sugiere que el fadrozol si pudo haber influido en la expresión genética de los organismos expuestos a este tratamiento. Lo cual explicaría el incremento (no significativo) en el número de machos (50%) con respecto al control (41.6%), aunque los niveles no fueron suficientes para lograr la reversión de un mayor número de ejemplares. Por lo que se podría esperar que a una mayor concentración de fadrozol los niveles de *foxl2* pudieran descender aún más.

De hecho se ha reportado que en hembras de tilapia la expresión de *foxl2* en las gónadas disminuye durante un tratamiento de masculinización con fadrozol a una concentración de 200 mg/kg de alimento (Sun et al., 2014). Mientras que una concentración igual a la que se utilizó en el presente estudio

reduce significativamente la expresión de *foxl2* en el tejido ovárico del bagre *Silurus meridionalis* (Liu et al., 2003).

De forma contraria a la esperada, la expresión de *foxl2* en el tratamiento de feminización fue significativamente menor que en el control a los 30 DDE ( $P > 0.01$ ). Esto podría deberse a una retroalimentación negativa en donde el estradiol exógeno fue suficiente para llevar a cabo la diferenciación sexual suprimiendo la subsecuente expresión de *foxl2*. No obstante, no se ha reportado la disminución en la expresión de *foxl2* por tratamiento con estradiol exógeno. De hecho se ha reportado lo contrario; en la tilapia *Oreochromis niloticus* la expresión de *foxl2* aumentó en hembras normales y revertidas a los 10 y 20 DDE, mientras que en machos no se observaron niveles significativos (Wang et al., 2007). De igual forma, del ciprínido *Gobiocypris rarus* y de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* a tratamientos con estradiol produce un aumento en los niveles de expresión de *foxl2* (Baron et al., 2004; Jiang et al., 2011; Wang et al., 2012). Igualmente en medaka, *Oryzias latipes*, la administración de estradiol conduce a un aumento en los niveles de expresión de *foxl2* en días posteriores a su administración (Nakamoto et al., 2006). Incluso, la delección de *foxl2* en el genoma de hembras de la tilapia *Oreochromis niloticus* ocasiona distintos grados de degeneración en las estructuras ováricas, e incluso la reversión sexual completa en algunos individuos (Li et al., 2013), corroborando su importancia en los eventos de diferenciación de las hembras.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la proporción de sexos, la expresión de *foxl2* en los organismos feminizados es la única que se puede asociar con el sexo fenotípico, ya que los otros tratamientos mostraron una proporción de sexos cercana a 1:1. De hecho, solo en los organismos tratados con estradiol se observó que los niveles de expresión relativa de *foxl2* presentaron normalidad estadística, mientras que en el tratamiento control los niveles no fueron normales, lo cual probablemente deriva de que en este último tratamiento existe un patrón bimodal de expresión: uno para hembras y otro para machos, algo que ya ha sido reportado en los niveles de esteroides sexuales durante la etapa de diferenciación sexual en tilapia (Hines et al., 1999). No obstante, vale la pena considerar que los niveles de expresión en hembras naturales no necesariamente serán similares a los niveles encontrados para los organismos feminizados debido a la posible influencia del estradiol exógeno sobre su expresión.

A los 45 DDE no se encontraron diferencias en la expresión de *foxl2* en los tratamientos. Además, los niveles encontrados en el tratamiento control no mostraron un aumento significativo respecto al día 30 DDE, aunque los niveles si fueron significativamente mayores para los tratamientos de feminización y masculinización respecto al muestreo anterior. Esto parece indicar que el estradiol y fadrozol continuaron ejerciendo su efecto a través del tiempo.

En el tratamiento control los niveles de expresión de *foxl2* a los 45 DDE mostraron una mayor variación, por lo cual probablemente a este tiempo ya se muestran mayores diferencias en la expresión de este gen entre ambos sexos. Y a los 60 DDE los niveles de expresión de este gen disminuyeron, de acuerdo a pruebas de RT-PCR. Por lo cual posiblemente en el cíclido joya los niveles de expresión de este gen alcancen un máximo entre los 30 y 60 DDE y posteriormente descienden a niveles basales.

Tomando en cuenta que en el tratamiento control los niveles no aumentaron significativamente entre el día 30 y 45, y que disminuyeron hacia el día 60, es probable que el tiempo de exposición a estradiol se pudiera acortar, reduciendo el uso de reactivos y alimento vivo, ya que es recomendable una intervención mínima (Piferrer y Lim, 1997). Por lo que sería recomendable realizar pruebas reduciendo el tiempo de duración de la exposición a estradiol. En efecto, el período sensible para la reversión sexual en tilapia se encuentra entre los días 14 y 30 DDE (Mair et al., 2011), y ya que el género *Oreochromis* se encuentra filogenéticamente muy cercano de *Hemichromis* (Farias et al., 1999), es probable que el periodo de exposición también se pueda reducir a 15 días, en lugar de 45.

Dos de los pasos críticos para la implementación de TYC como estrategia de control para el cíclido joya son la reversión sexual de machos a hembras (obtención de hembras revertidas) y la reproducción de una hembra revertida con un macho normal. En el presente estudio se logró la feminización del 100% de los organismos expuestos a estradiol. Además, independientemente del patrón de regulación genética, se lograron asociar los niveles de expresión de *foxl2* con estos organismos a los 30 DDE, ya que los niveles de expresión de este gen fueron diferentes respecto al control.

Además, durante el paso de obtención de machos YY será necesario contar con un procedimiento de identificación de la descendencia entre una hembra revertida y un macho normal, la cual tendrá una descendencia de machos y hembras normales y machos YY. Dentro de este propósito el empleo de *foxl2* para la determinación de la proporción sexual de esta descendencia, servirá para conocer el genotipo en tiempos generacionales más cortos, mediante el sacrificio de una muestra pequeña de la población (Piferrer y Guiguen, 2008).

En resumen, en el presente proyecto se aborda una primera aproximación al desarrollo de organismos con cromosomas sexuales troyanos, como una estrategia de control para las poblaciones del cíclido joya, una especie invasora presente en el Área Natural Protegida de Cuatrociénegas. Se logró el 100% de reversión sexual de machos a hembras en esta especie mediante un tratamiento con  $17\beta$ -estradiol, administrado a través de la dieta durante 45 días utilizando nauplios de artemia enriquecidos.

Mediante PCR se demostró que el gen de la aromatasa *cyp19a1a* está presente en el genoma de esta especie y, al parecer, se expresa en etapas muy tempranas del período de diferenciación sexual. Además, mediante RT-qPCR se encontraron diferencias en los niveles de expresión del gen *foxl2*, entre los organismos feminizados y el tratamiento control al día 30 DDE, lo cual los hace candidatos para la identificación molecular del sexo fenotípico en esta especie.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

-Se implementó un protocolo exitoso de feminización de juveniles del cíclido joya (100% de reversión) mediante administración de  $17\beta$ -estradiol a través de la dieta utilizando nauplios de artemia enriquecidos a una concentración de 200 mg/kg.

-Los tratamientos de reversión sexual se llevaron a cabo sin afectar significativamente el crecimiento y la supervivencia.

-No fue posible masculinizar por completo a la población de larvas del cíclido joya con la concentración de fadrozol administrada en los nauplios de artemia que se utilizaron como vehículo.

-Se demostró la presencia del gen *cyp19a1a* que codifica para la aromatasa en el genoma del cíclido joya y mediante RT-PCR se evidenció la expresión de este gen a los 15 DDE.

-Los resultados preliminares indican que hay expresión de la aromatasa a los 15 DDE y disminuye a niveles no detectables en los días 30, 45 y 60 DDE.

-Se cuantificaron los niveles de expresión del gen *foxl2* a los 30 y 45 DDE mediante RT-qPCR, y se encontraron diferencias entre los organismos feminizados respecto al control a los 30 DDE.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

Debido a que el método de control por TYC requiere múltiples introducciones de machos YY, lo cual a su vez requiere feminización de varias generaciones de individuos, sería recomendable realizar ensayos de feminización disminuyendo los tiempos y/o concentraciones de exposición. Lo anterior para reducir la cantidad de estradiol y alimento vivo (nauplios) requerido durante el proceso.

Aunque el objetivo del tratamiento de masculinización solo fue tener un control en la expresión de la aromatasa, no se logró una reversión significativa, por lo que se recomienda realizar experimentos con mayores concentraciones de fadrozol o en su defecto utilizar otros agentes masculinizantes (testosterona, exemestano, etc.).

Ya que no fue posible encontrar niveles expresión de aromatasa después de los 15 DDE, se recomienda cuantificar su expresión en días más tempranos o utilizar técnicas más sensibles y específicas como el diseño de sondas al momento de clonar el cDNA.

## Literatura citada

---

- Afonso, L.O., Wassermann, G.J., Terezinha de Oliveira, R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *The Journal of Experimental Zoology*, 290(2), 177-181.
- Aguilar-Aguilar, R., Martínez-Aquino, A., Espinosa-Pérez, H., Pérez-Ponce De León, G. 2014. Helminth parasites of freshwater fishes from Cuatro Ciénegas, Coahuila, in the Chihuahuan Desert of Mexico: Inventory and biogeographical implications. *Integrative Zoology*, 9(3), 328-339.
- Aguilar, C. 2017. Identificación genotípica y fenotípica por PCR de hembras de *Hemichromis* sp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L. 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67(1), 121-130.
- Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas (APFFC). 2008. Monitoreo del Pez Joya (*Hemichromis guttatus*) en el Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas. Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, (200), 1-3.
- Aranda, P.S., Lajoie, D.M., Jorcyk, C.L. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369.
- Azaza, M.S., Dhraïef, M.N., Kraïem, M.M. 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*, 33(2), 98-105.
- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Fostier, A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 910-931.
- Baron, D., Cocquet, J., Xia, X., Fellous, M., Guiguen, Y., Veitia, R.A. 2004. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33(3), 705-715.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197(1-4), 283-301.
- Bergstedt, R.A., Twohey, M.B. 2007. Research to support sterile-male-release and genetic alteration techniques for sea lampre control. *Journal of Great Lakes Research*, 33(2), 48-69.
- Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., Baroiller, J.F. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, 272(S1), S3-S16
- Bhandari, R.K., Higa, M., Komuro, H., Nakamura, S., Nakamura, M. 2004. Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Molecular Reproduction and Development*, 67, 303-307.
- Bhise, M.P., Khan, T. a. 2002. Androgenesis : the best tool for manipulation of fish genomes. *Turkish Journal of Zoology*, 26, 317-325.
- Blázquez, M., González, A., Papadaki, M., Mylonas, C., Piferrer, F. 2008. Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 158(1), 95-101.

- Böhne, A., Heule, C., Boileau, N., Salzburger, W. 2013. Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in east african cichlid fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 30(10), 2268-2285.
- Brykov, V.A. 2015. Mechanisms of sex determination in fish: evolutionary and practical aspects. *Russian Journal of Marine Biology*, 40(6), 407-417.
- Chang, X., Kobayashi, T., Kajiura, H., Nakamura, M., Nagahama, Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 18, 57-66.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthikumar, 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*). *General and Comparative Endocrinology*, 141(2), 101-115.
- Chapman, F.A., Funicelli, N.A. 2016. A potential methodology for biocontrol of lionfish (*Pterois* spp.). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 9(6), 1331-1335.
- Chiang, E., Yan, Y., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B. 2001. Two *Cyp19* (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4), 542-550.
- Cohen, A.E., Hendrickson, D. a., Parmesan, C., Marks, J.C. 2005. Habitat segregation among trophic morphs of the Cuatro Ciénegas Cichlid (*Herichthys minckleyi*). *Hidrobiológica*, 15(2), 169-181.
- Conover, D. 1984. Adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a fish. *The American naturalist*, 123(3), 297-313.
- Contreras-Balderas, S., Almada-Villela, P., Lozano-Vilano, L., García-Ramírez, M.E. 2003. Freshwater fish at risk or extinct in México. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12(8), 241-251.
- Contreras-Balderas, S., Ludlow, A. 2003. *Hemichromis guttatus* Günther, 1862 (Pisces: Cichlidae), nueva introducción en México, en Cuatro Ciénegas, Coahuila. *Vertebrata Mexicana*, 12, 1-5.
- Cotton, S., Wedekind, C. 2007. Control of introduced species using Trojan sex chromosomes. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(9), 441-443.
- D’Cotta, H.D., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., Baroiller, J. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59, 265-276.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364.
- Dugan, L.E. 2014. Invasion risk and impacts of a popular aquarium trade fish and the implications for policy and conservation management. PhD dissertation. The University of Texas at Austin.
- Elser, J.J., Schampel, J.H., Garcia-Pichel, F., Wade, B.D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A., Farmer, J.D. 2005. Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808-1825.
- Ezaz, M.T., Myers, J.M., Powell, S.F., McAndrew, B.J., Penman, D.J. 2004. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 232(1-4), 205-214.
- Farias, I.P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family

- Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution*, 703-711.
- Flores-Salinas, J. 2017. Evaluación de la expresión de genes relacionados a la diferenciación sexual de hembras en *Hemichromis guttatus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H. 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.
- Fuentes-Silva, C., Soto-Zarazúa, G.M., Torres-Pacheco, I., Flores-Rangel, A. 2013. Male tilapia production techniques: a mini-review. *African Journal of Biotechnology*, 12(36), 5496-5502.
- Garrett, G. 1989. Hormonal sex control of largemouth bass. *The Progressive Fish-Culturist*, 51(3), 146-148.
- Gayral, P., Weinert, L., Chiari, Y., Tsagkogeorga, G., Ballenghien, M., Galtier, N. 2011. Next-generation sequencing of transcriptomes: a guide to RNA isolation in nonmodel animals. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 650-661.
- Göppert, C., Harris, M., Boila, A. 2016. Inhibition of aromatase induces partial sex change in a cichlid fish: distinct functions for sex steroids in brains and gonads, *Sexual Development*, 10, 97-110.
- Greenberg, B. 1961. Spawning and parental behavior in female pairs of the jewel fish, *Hemichromis bimaculatus* Gill. *Behaviour*, 18(1), 44-61.
- Griffiths, R., Tiwari, B. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 15(90), 8324-8326.
- Guerrero-Estévez, S., Moreno-Mendoza, N. 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101-121.
- Guerrero, R.D., Shelton, W.L. 1974. An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1), 56.
- 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.
- Gutierrez, J.B., Hurdal, M.K., Parshad, R.D., Teem, J.L. 2012. Analysis of the Trojan Y chromosome model for eradication of invasive species in a dendritic riverine system. *Journal of Mathematical Biology*, 64(1-2), 319-340.
- Gutierrez, J.B., Teem, J.L. 2006. A model describing the effect of sex-reversed YY fish in an established wild population: the use of a Trojan Y chromosome to cause extinction of an introduced exotic species. *Journal of Theoretical Biology*, 241(2), 333-341.
- Haugen, T., Almeida, F.F.L., Andersson, E., Bogerd, J., Male, R., Skaar, K.S., Schulz, R.W., Sørhus, E., Wijgerde, T., Taranger, G.L. 2012. Sex differentiation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): morphological and gene expression studies. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 47.
- Heidary, M., Pahlevan, M. 2014. TRIzol-based RNA extraction: a gold standard method for gene expression studies. *Journal of Sciences*, 25(1), 13-17.
- Hill, J.E., Cichra, C.E. 2005. Eradication of a reproducing population of convict cichlids, *Cichlasoma nigrofasciatum* (Cichlidae), in North-Central Florida. *Florida Scientist*. 68(2): 65-74.
- Hines, G.A., Boots, L.R., Wibbels, T., Watts, S.A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the Tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cyprinoidei). *General and*

Comparative Endocrinology, 114(2), 235-248.

- Hoddle, M.S. 2004. Restoring balance: using exotic species to control invasive exotic species. *Conservation Biology*, 18(1), 38-49.
- Hu, Q., Guo, W., Gao, Y., Tang, R., Li, D. 2014. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the rice-field eel *Monopterus albus*. *Scientific Reports*, 4, 6884.
- Hulsey, C.D., Hendrickson, D.A., García De León, F.J. 2005. Trophic morphology, feeding performance and prey use in the polymorphic fish *Herichthys minckleyi*. *Evolutionary Ecology Research*, 7(2), 1-22.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., Nagahama, Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78(2), 333-341.
- Jelks, H.L., Walsh, S.J., Burkhead, N.M., Contreras-balderas, S., Diaz-pardo, E., Hendrickson, D.A., Lyons, J., Mandrak, N.E., McCormick, F., Nelson, J.S., Platania, S.P., Porter, B.A., Renaud, C.B., Schmitter-soto, J.J., Taylor, E.B., Warren, M.L. 2008. Conservation status of imperiled North American freshwater and diadromous fishes. *Fisheries*, 33(8), 372-407.
- Jeng, S., Dufour, S., Chang, C. 2005. Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Zoology*, 303A, 802-812.
- Jiang, W., Yang, Y., Zhao, D., Liu, X., Duan, J., Xie, S., Zhao, H. 2011. Effects of sexual steroids on the expression of *foxl2* in *Gobiocypris rarus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 160(4), 187-193.
- Johnsen, H., Tveiten, H., Torgersen, J.S., Andersen, Ø. 2013. Divergent and sex-dimorphic expression of the paralogs of the Sox9-Amh-Cyp19a1 regulatory cascade in developing and adult atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Molecular Reproduction and Development*, 80(5), 358-370.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Abe, S.I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 23(2), 167-176.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., Abe, S.I. 2000. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -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.
- Kotula-Balak, M., Zielińska, R., Glogowski, J., Kowalski, R.K., Sarosiek, B., Bilińska, B. 2008. Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 149(2), 188-196.
- Kroon, F.J., Munday, P.L., Westcott, D.A., Hobbs, J.A., Liley, N.R. 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proceedings of the Royal Society B*, 272, 1399-1405.
- Kumar, R., Nakamura, M., y Kobayashi, T. 2006. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 145, 20-24.
- Kwon, J.Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L.M., McAndrew, B.J., Penman, D.J. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*, 287(1), 46-53.
- Kwon, J.Y., McAndrew, B.J., Penman, D.J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain

- and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59, 359-370.
- Leprieur, F., Beauchard, O., Blanchet, S., Oberdorff, T., Brosse, S. 2008. Fish invasions in the world's river systems: when natural processes are blurred by human activities. *PLoS Biology*, 6(2), 0404-0410.
- Li, M.H., Yang, H.-H., Li, M.-R., Sun, Y.-L., Jiang, X.-L., Xie, Q.P., Wang, T.R., Shi, H.J., Sun, L.N., Zhou, L.Y., Wang, D.S. 2013. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs. *Endocrinology*, 154(12), 4814-4825.
- Liu, Z., Wu, F., Jiao, B., Zhang, X., Hu, C., Huang, B., Zhou, L., Huang, X., Wang, Z., Zhang, Y., Nagahama, Y., Cheng, C.H.K., Wang, D. 2003. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *Journal of Endocrinology*, 194, 223-241.
- Logan, M. 2010. *Biostatistical design and analysis using R: a practical guide*. John Wiley & Sons, Inc.
- Loope, L.L., Sanchez, P.G., Tarr, P.W., Loope, W.L., Anderson, R.L. 1988. Biological invasions of arid land nature reserves. *Biological Conservation*, 44(1-2), 95-118.
- Lozano-Peña, E. 2017. *Feminización del Cíclido Joya (*Hemichromis guttatus*) utilizando 17-β-estradiol y flutamida*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Lozano-Vilano, M., Contreras-Balderas, A.J., García-Ramírez, M. 2006. Eradication of Spotted Jewelfish, *Hemichromis guttatus*, from Poza San José del Anteojo, Cuatro Ciénegas Bolsón, Coahuila, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 51(4), 553-555.
- Mair, G.C., Abucay, J.S., Abella, T.A., Beardmore, J.A., Skibinski, D. 2011. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 404(1991), 396-404.
- Marks, J.C., Williamson, C., Hendrickson, D.A. 2011. Coupling stable isotope studies with food web manipulations to predict the effects of exotic fish: lessons from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(4), 317-323.
- Martin-Robichaud, D.J., Peterson, R.H., Benfey, T.J., Crim, L.W. 1994. Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) using 17β-oestradiol-enriched *Artemia* as food. *Aquaculture*, 123(1-2), 137-151.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559-563.
- Mendoza, R., Koleff, P. 2014. Introducción de especies exóticas acuáticas en México y en el mundo. En: Mendoza, R., Koleff, P. (Eds.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp. 17-41.
- Myers, J.H., Simberloff, D., Kuris, A.M., Carey, J.R. 2000. Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(8), 316-320.
- 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.
- Nakamoto, M., Matsuda, M., Wang, D.S., Nagahama, Y., Shibata, N. 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1), 353-361.

- Oldfield, R.G., Mandrekar, K., Nieves, M.X., Hendrickson, D.A., Chakrabarty, P., Swanson, B.O., Hofmann, H.A. 2015. Parental care in the Cuatro Ciénegas cichlid, *Herichthys minckleyi* (Teleostei: Cichlidae). *Hydrobiologia*, 748(1), 233-257.
- Parshad, R.D. 2011. Long time behavior of a PDE model for invasive species control. *International Journal of Mathematical Analysis*, 5(37-40), 1991-2015.
- Parshad, R., Kouachi, S., Gutierrez, J. 2013. Global existence and asymptotic behavior of a model for biological control of invasive species via supermale introduction. *Commun. Math. Sci.*, 11(4), 951-972.
- Peñaranda, D.S., Mazzeo, I., Gallego, V., Hildahl, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Pérez, L., Weltzien, F., Asturiano, J.F. 2014. The regulation of aromatase and androgen receptor expression during gonad development in male and female European eel. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(3), 512-21.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 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., Lim, L.C. 1997. Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1, 113-118.
- Pohlert, T. 2014. The pairwise multiple comparison of mean ranks rackage (PMCMR). R package, <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>.
- Raghuvver, K., Garhwal, R., Wang, D.S., Bogerd, J., Kirubakaran, R., Rasheeda, M.K., Sreenivasulu, G., Bhattacharya, N., Tharangini, S., Nagahama, Y., Senthilkumaran, B. 2005. Effect of methyl testosterone- and ethynyl estradiol-induced sex differentiation on catfish, *Clarias gariepinus*: expression profiles of *DMRT1*, cytochrome P450aromatases and 3  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(2-3), 143-147.
- Rahel, F.J. 2002. Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(2002), 291-315.
- Rasheeda, M.K., Sridevi, P., Senthilkumaran, B. 2010. Cytochrome P450 aromatases: impact on gonadal development, recrudescence and effect of hCG in the catfish, *Clarias gariepinus*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(2), 234-245.
- Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B.R., Hartmann, N., Pietsch, S., Baumgart, M., Chalopin, D., Felder, M., Bens, M., Sahm, A., Szafranski, K., Taudien, S., Groth, M., Arisi, I., Weise, A., Bhatt, S.S., Sharma, V., Kraus, J.M., Schmid, F., Priebe, S., Liehr, T., Görlach, M., Than, M.E., Hiller, M., Kestler, H.A., Volff, J.N., Scharl, M., Cellerino, A., Englert, C., Platzer, M. 2015. Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell*, 163(6), 1527-1538.
- Ruksana, S., Pandit, N.P., Nakamura, M. 2010. Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 152(1), 69-74.
- Schill, D.J., Heindel, J.A., Campbell, M.R., Meyer, K.A., Mamer, E.R.J.M. 2016. Production of a YY male brook trout broodstock for potential eradication of undesired brook trout populations. *North American Journal of Aquaculture*, 78(1), 72-83.
- Scholz, S., Rösler, S., Schäffer, M., Hornung, U., Scharl, M., Gutzeit, H.O. 2003. Hormonal induction and

- stability of monosex populations in the medaka (*Oryzias latipes*): expression of sex-specific marker genes. *Biology of reproduction*, 69(2), 673-678.
- Schwarzer, J., Lamboj, A., Langen, K., Misof, B., Schliewen, U.K. 2015. Phylogeny and age of chromidotilapiine cichlids (Teleostei: Cichlidae). *Hydrobiologia*, 748, 185-199.
- Senior, A.M., Krkosek, M., Nakagawa, S. 2013. The practicality of Trojan sex chromosomes as a biological control: an agent based model of two highly invasive *Gambusia* species. *Biological Invasions*, 15(8), 1765-1782.
- Siegfried, K.R. 2010. In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *Journal of Fish Biology*, 76(8), 1879-1902.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., Bulun, S.E. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15(3), 342-355.
- Snow, A.A., Andow, D.A., Gepts, P., Hallerman, E.M., Power, A., Tiedje, J.M., Wolfenbarger, L.L. 2005. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecological Applications*, 15(2), 377-404.
- Stewart, A.B., Spicer, A.V., Inskeep, E.K., Dailey, R.A. 2001. Steroid hormone enrichment of *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 202(1-2), 177-181.
- Sun, L.N., Jiang, X.L., Xie, Q.P., Yuan, J., Huang, B.F., Tao, W.J., Zhou, L.Y., Nagahama, Y., Wang, D.S. 2014. Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia. *Endocrinology*, 155(4), 1476-1488.
- Sunobe, T., Nakamura, M., Kobayashi, Y. 2005. Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 141, 54-59.
- Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M.L., Kawakami, K., Shin-I, T., 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*. *Nature communications*, 5, 4157.
- Tanaka, M., Fukada, S., Matsuyama, M., Nagahama, Y. 1995. Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Biochemistry*, 117(4), 719-25.
- Tao, W., Yuan, J., Zhou, L., Sun, L., Sun, Y., Yang, S., Li, M., Zeng, S., Huang, B., Wang, D. 2013. Characterization of gonadal transcriptomes from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals differentially expressed genes. *PLoS ONE*, 8(5), e63604.
- Teem, J., Gutierrez, J. 2010. A theoretical strategy for eradication of Asian carps using a Trojan Y chromosome to shift the sex ratio of the population. *American Fisheries Society Symposium* 74:000-000.
- Teem, J.L., Gutierrez, J.B. 2014. Combining the Trojan Y chromosome and daughterless carp eradication strategies. *Biological Invasions*, 16(6), 1231-1240.
- Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *The Journal of Experimental Zoology*, 290(5), 475-483.
- Twohey, M.B., Heinrich, J.W., Seelye, J.G., Fredricks, K.T., Bergstedt, R. a, Kaye, C. a, Scholefield, R.J.,

- McDonald, R.B., Christie, G.C. 2003. The sterile-male-release technique in Great Lakes sea lamprey management. *Journal of Great Lakes Research*, 29(S1), 410-423.
- 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, 137(3), 11-20.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., Riethmacher, D., Schütz, G., Cooney, A.J., Lovell-Badge, R., Treier, M. 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139(6), 1130-1142.
- Valenzuela, N., Neuwald, J.L., Literman, R. 2013. Transcriptional evolution underlying vertebrate sexual development. *Developmental Dynamics*, 242(4), 307-319.
- Vidal-lópez, J.J.M., Álvarez-González, C.A., Contreras-Sánchez, W., Hernández-Vidal, U., Miguel, W., Ulises, C. 2009. Masculinización del cíclido nativo Tenhuayaca, *Petenia splendida* (Günther, 1862), usando nauplios de *Artemia* como vehículo del esteroide 17- $\alpha$  metiltestosterona. *Hidrobiológica*, 19(3), 211-216.
- Volff, J.N., Kondo, M., Schartl, M. 2003. Medaka *dmY/dmrt1Y* is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends in Genetics*, 19(4), 196-199.
- Wang, C., Wang, J., Li, M., Miao, L., Chen, J. 2014. The genomic structure and expression patterns of Cyp19a1a and Cyp19a1b genes in the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 14, 785-793.
- Wang, D., Kobayashi, T., Zhou, L., Nagahama, Y. 2004. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(1), 83-89.
- Wang, D., Kobayashi, T., Zhou, L., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K., 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, H., Wu, T., Qin, F., Wang, L., Wang, Z. 2012. Molecular cloning of *Foxl2* gene and the effects of endocrine-disrupting chemicals on its mRNA level in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 653-664.
- Wang, X., Walton, J.R., Parshad, R.D. 2016. Stochastic models for the Trojan Y-Chromosome eradication strategy of an invasive species. *Journal of Biological Dynamics*, 10(1), 179-199.
- Wang, X., Walton, J.R., Parshad, R.D., Storey, K., Boggess, M. 2014. Analysis of the Trojan Y-Chromosome eradication strategy for an invasive species. *Journal of Mathematical Biology*, 68(7), 1731-1756.
- Wassermann, G.J., Bertolla-Afonso, L.O. 2002. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Ciência Rural*, 32(1), 133-139.
- Wong, T.T., Ijiri, S., Zohar, Y. 2006. Molecular biology of ovarian aromatase in sex reversal: complementary DNA and 5'-flanking region isolation and differential expression of ovarian aromatase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biology of Reproduction*, 74(5), 857-864.
- Wootton, R., Smith, C. 2014. Reproductive biology of teleost fishes. John Wiley & Sons, Ltd.
- Yamaguchi, T., Kitano, T. 2008. The mechanism of transcriptional regulation of P450 aromatase gene by Foxl2 in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Cybio*, 32(1), 74-76.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A.,

- Guiguen, Y. 2012. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423-1428.
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guiguen, Y. 2012. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486-496.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134.