

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Descripción de la gonadogénesis e identificación del periodo
de diferenciación sexual de *Totoaba macdonaldi***

Tesis

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

Presenta:

Arely Eliam Paredes Martínez

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Arely Eliam Paredes Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

Dra. Blanca Claudia Farfán
Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Arely Eliam Paredes Martínez** como requisito para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Descripción de la gonadogénesis e identificación del periodo de diferenciación sexual de *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

Dra. Blanca Claudia Farfán
Codirectora de tesis

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es un pez marino endémico del Golfo de California declarada en peligro de extinción desde 1976. Esta especie ha sido objeto de diversos estudios orientados a su cultivo principalmente con fines de repoblamiento pero aún no se ha descrito su gonadogénesis o identificado el periodo lábil durante el cual la gónada sexualmente indiferenciada pudiera ser inducida a la conversión sexual. En este estudio se describe la gonadogénesis de *T. macdonaldi* mediante análisis histológico y con el apoyo de la expresión relativa del gen *cyp19a* se delimita el periodo en el que ocurre la diferenciación sexual. Para los análisis de la expresión relativa de la aromatasa gonadal se aislaron y secuenciaron fragmentos de cDNA de *cyp19a* de *T. macdonaldi* (*Tmcyp19a*) así como de siete posibles genes de mantenimiento (*tubb*, *actb*, *EIF3*, *QM-like*, *ND1*, *RPS35*, *eTIF3g*). A partir de los 29 días después de la eclosión (DDE) y hasta los 44 DDE (longitud total 1.2 a 4.6 cm) se detectó la presencia de células germinales en las gónadas indiferenciadas. La primera evidencia de diferenciación se observó a los 51 DDE (longitud total 6.3 a 8 cm) con la formación de la cavidad ovárica la cual transcurre en dirección céfalo caudal, pero en organismos de 69 DDE (longitud total 8.4 a 9.7 cm) se hizo evidente que este proceso no ocurre de manera simultánea en ambas gónadas. En ejemplares de 85 a 161 DDE (longitud total 10.4 a 13 cm y 16.5 a 18.5 cm) el desarrollo de la gónada se mantuvo sin cambios notables. En organismos de 15 meses de edad se identificaron ovarios y testículos diferenciados. En los ovarios se identificaron ovogonias, ovocitos primarios en fase I y ovocitos primarios en fase II. La estructura de los testículos se caracterizó por la presencia de células germinales y espermatogonias. Para los análisis de la expresión relativa de la aromatasa gonadal (*Tmcyp19a*) se utilizó como gen de referencia interna β -tubulina (*Tmtubb*). La aromatasa gonadal se expresó en todas las etapas del desarrollo pero los niveles de intensidad en las bandas de amplificación por PCR fueron significativamente mayores en algunos juveniles de 36 DDE en adelante. Esto sugiere que al igual que en otros teleósteos, en *T. macdonaldi* la expresión de la aromatasa gonadal precede a la diferenciación fenotípica de la gónada y que en ensayos para feminizar la gónada el periodo lábil a considerar es alrededor de los 36 DDE y se extiende hasta los 51 DDE.

Palabras clave: *cyp19a*, diferenciación sexual, gonadogénesis, *Totoaba macdonaldi*, aromatasa.

Abstract of the thesis presented by **Arely Eliam Paredes Martínez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Description of gonadogenesis and identification of the sex differentiation period of *Totoaba macdonaldi*

Abstract approved by

PhD. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Co-director

PhD. Blanca Claudia Farfán
Thesis Co-director

The totoaba (*Totoaba macdonaldi*) is a marine fish endemic to the Gulf of California declared as an endangered species since 1976. This species has been the subject of several studies focused on its cultivation mainly for repopulation purposes but its gonadogenesis has not yet been described or identified the labile period during which the sexually undifferentiated gonad could be induced to sexual conversion. In this study the histological gonadogenesis of *T. macdonaldi* is described and with the support of the relative expression of the *cyp19a* gene, the period of sex differentiation is delimited. For the analysis of the relative expression of the gonadal aromatase, cDNA fragments of *cyp19a* of *T. macdonaldi* (*Tmcp19a*) were isolated and sequenced, as well as seven housekeeping genes (*tubb*, *actb*, *EIF3*, *QM-like*, *ND1*, *RPS35*, *eTIF3g*). From 29 days post hatching (DPH) and up to 44 DPH (total length range 1.2 to 4.6 cm) only germ cells were present in the undifferentiated gonads. The first evidence of differentiation was observed at 51 DPH (total length 6.3 to 8 cm) with the formation of the ovarian cavity, which occurs in caudal to cephalic direction, but in 69 DPH organisms (total length 8.4 to 9.7 cm) it became evident that this process does not occur simultaneously in both gonads. In specimens 85 to 161 DPH (total lengths 10.4 to 13 cm and 16.5 to 18.5 cm, respectively) the development of the gonad remained without notable changes. In organisms 15 months-old, differentiated ovaries and testicles were identified. In the ovaries ovogonias, primary oocytes in a phase I and primary oocytes in phase II were present. The structure of the testes was characterized by the presence of germ cells and spermatogonia. To assess the relative expression of gonadal aromatase (*Tmcp19a*), β -tubulin (*Tmtubb*) was used as the internal reference gene. Gonadal aromatase was expressed at all stages of development but intensity levels of the RT-PCR amplification bands were higher in some juveniles from 36 DPH onwards. This suggests that, as in other teleosts, in *T. macdonaldi* the expression of gonadal aromatase precedes the phenotypic differentiation of the gonad and that in bioassays for the feminization of the gonad the labile period to consider starts around 36 DPH and extends to 51 DPH.

Keywords: *cyp19a*, sex differentiation, gonadogenesis, *Totoaba macdonaldi*, aromatase

Dedicatoria

A mi padre Miguel Ángel † aunque ya no estás conmigo, te llevo en el alma y me inspiras a ser una mejor persona.

A mi madre María por ser un pilar en mi vida, por todos los consejos, apoyo e inmenso amor.

A César por tu comprensión y amor en este largo camino.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para alcanzar esta meta.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado en su programa de Maestría.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, por aceptarme como su estudiante de maestría, por su paciencia, por motivarme a incursionar en el ámbito de la biología molecular, por compartir sus conocimientos y el apoyo incondicional durante mi formación académica. Sobre todo, por su amistad

A la Dra. Blanca Claudia Farfán por compartir sus conocimientos, su apoyo incondicional y paciencia durante mi formación académica.

A los miembros de mi comité de tesis Dr. Miguel Ángel del Río y Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez por sus comentarios, sugerencias y apoyo que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer este trabajo. Sobre todo por el apoyo con las técnicas moleculares, por su paciencia y entusiasmo.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura, por su apoyo en la técnica histológica, comentarios, por su paciencia y amistad.

A la Biol. Uvinai Salgado, técnico del Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura, por el apoyo brindado durante el cultivo de las totoabas y la producción de alimento vivo.

A Miriam y Brenda, por brindarme su amistad y compañía.

A mis compañeros de generación José Antonio, Marco Antonio, Priscila, Estrella, Vladimir y Eloy. Fue muy grato compartir esta etapa con todos ustedes

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 <i>Totoaba macdonaldi</i>	2
1.1.2 Gonadogénesis.....	4
1.1.3 Células germinales primordiales.....	5
1.1.4 Desarrollo de los testículos.....	7
1.1.5 Desarrollo de los ovarios.....	8
1.1.6 Determinación del sexo.....	8
1.1.7 Diferenciación sexual.....	10
1.1.8 Esteroides sexuales.....	11
1.1.9 Gen <i>cyp19a</i>	13
1.2 Justificación.....	14
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específico.....	15
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Cultivo de <i>Totoaba macdonaldi</i>	16
2.2 Descripción del proceso de gonadogénesis.....	16
2.2.1 Muestreo de larvas y juveniles.....	16
2.2.2 Análisis histológico.....	17

2.3 Obtención de secuencias del gen <i>cyp19a</i> y genes de referencia de <i>Totoaba macdonaldi</i>	18
2.3.1 Aislamiento y secuenciación del cDNA parcial del gen <i>cyp19a</i> y genes de referencia de <i>T. macdonaldi</i>	18
2.3.1.1 Extracción de RNA total.....	18
2.3.1.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	19
2.3.1.3 Diseño de iniciadores y amplificación.....	19
2.3.2 Expresión del gen <i>cyp19a</i> en larvas y juveniles de <i>T. macdonaldi</i>	22
2.3.2.1 Muestreo de larvas y juveniles, extracción de RNA total y síntesis de cDNA....	22
2.3.2.2 Amplificación de los iniciadores específicos.....	22

Capítulo 3. Resultados

3.1. Descripción del proceso de gonadogénesis.....	24
3.1.1 29 DDE (Longitud total de 1.2 a 1.5 cm).....	25
3.1.2 34 DDE (longitud total de 2.4 a 3.3 cm).....	29
3.1.3 41 DDE (Longitud total de 3.3 a 4.8 cm).....	30
3.1.4 44 DDE (Longitud total de 3.7 a 4.6 cm).....	32
3.1.5 51 DDE (Longitud total de 6.3 a 8 cm).....	33
3.1.6 69 DDE (Longitud total de 8.4 a 9.7 cm).....	36
3.1.7 85 DDE (Longitud total de 10.4 a 13 cm).....	38
3.1.8 100 DDE (Longitud total de 12.5 a 15.5 cm) y 161 DDE (Longitud total de 16.1 a 18.5 cm).....	40
3.1.9 Ovarios.....	40
3.1.10 Testículos.....	42
3.2 Obtención de secuencias del gen <i>cyp19a</i> y genes de referencia de <i>Totoaba macdonaldi</i>	43
3.2.1 Aislamiento y secuenciación del cDNA parcial del gen <i>cyp19a</i> y genes de referencia.....	43
3.2.1.1 Cantidad y calidad de RNA total de organismos adultos.....	43
3.2.1.2 Obtención de secuencias del gen <i>cyp19a</i> y genes de referencia.....	43
3.3 Expresión del gen <i>cyp19a</i> en larvas y juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	50
3.3.1 Cantidad y calidad del RNA total de larvas y juveniles.....	50
3.3.2 Amplificación con los iniciadores específicos.....	50
3.3.3 Expresión del gen <i>cyp19a</i>	51

Capítulo 4 .Discusión	
4.1 Descripción del proceso de gonadogénesis.....	54
4.2 Expresión del gen <i>cyp19a</i> en larvas y juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	57
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones.....	60
Literatura citada.....	62
Anexos.....	74

Lista de figuras

Figura	Página
1 Golfo de California, se indican los límites de la distribución de <i>Totoaba macdonaldi</i> (imagen tomada de Google Earth y modificada).....	2
2 Adulto de <i>Totoaba macdonaldi</i> (tomada de http://sargazo.com/?product=totoaba).....	3
3 Ruta de síntesis de los principales esteroides sexuales a partir de pregnenolona. Se incluyen las principales enzimas esteroideogénicas implicadas en el proceso. La enzima aromatasasa (P450arom) es la responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos (tomada de Baroiller <i>et al.</i> , 1999 y modificada). Abreviaturas: 3 β HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa), 11 β HSD (11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa), P450c11(11 β H) (11 β -hidroxilasa), P450c17(17H) (17-hidroxilasa), P450c17(liasa) (17,20 liasa), 17 β HSD (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa).....	12
4 Planos corporales en los que se realizaron los cortes para el análisis histológico de las gónadas. Sagital va de la parte anterior hacia la parte posterior dividiendo al organismo en izquierda y derecha. Transversal pasa en forma horizontal al cuerpo dividiéndolo en anterior y posterior (tomada de http://sargazo.com/?product=totoaba y modificada).....	24
5 Diagrama que ilustra las secciones de la región media de <i>Totoaba macdonaldi</i> donde se hicieron los cortes histológicos transversales (tomado de http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Totoaba+macdonaldi&l=spanish y modificada).....	25
6 Corte transversal (sección b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 29 DDE con 1.5 cm de longitud total. Se observan diferentes órganos y la posición de las gónadas. G: gónada, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria.....	26
7 Corte transversal (sección b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 29 DDE con 1.5 cm de longitud total. A. Detalle de la gónada en la que se observa una célula germinal y células somáticas. B. Detalle de las características morfológicas de una célula germinal. G: gónada, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria, CG: célula germinal, C: citoplasma, N: núcleo.....	27

8	Corte sagital de una larva de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 29 DDE con 1.2 cm de longitud total. A. Se observa la posición de las gónadas. B. Detalle de las características morfológicas de las células germinales encontradas en la gónada indiferenciada. G: gónada, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria, CG: célula germinal, C: citoplasma, N: núcleo.....	28
9	Corte transversal (sección b) de una larva de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 34 DDE con 2.3 cm de longitud total. Se observa la ubicación de las gónadas dentro de la cavidad celómica, unidas a la pared peritoneal por el mesogonio. No se observan cambios significativos en la morfología de la gónada. G: gónada, MG: mesogonio, I: intestino, M: músculo, R: riñón.....	29
10	Corte sagital de una larva de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 34 DDE con 2.5 cm de longitud total. A. La gónada indiferenciada ha aumentado en longitud y ancho. B. Detalle de las principales características morfológicas de la célula germinal encontrada en la gónada. C: citoplasma, CG: célula germinal, I: intestino, G: gónada, N: núcleo, VN: vejiga natatoria.....	30
11	Corte transversal (sección b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los día 41 DDE con 3.3 cm de longitud total. A. La gónada indiferencia presenta los primeros cambios morfológicos. B. Detalle de la gónada donde se puede distinguir diferencias entre el arreglo de los elementos somáticos que la conforman. G: gónada, I: intestino, M: músculo, MG: mesogonio, VN: vejiga natatoria.....	31
12	Corte sagital de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 44 DDE con 4.4 cm de longitud total. A. La gónada ha aumentado en longitud y ancho. B. Detalle de células germinales en la gónada, se observan las principales características morfológicas. C: citoplasma, CG: célula germinal, I: intestino, G: gónada, N: núcleo, VN: vejiga natatoria.....	32
13	Corte transversal (sección b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total. Se muestran algunos de los órganos que se encuentran en la región abdominal y la posición de las gónadas. El cambio en la morfología de las gónadas se hace más evidente. G: gónada, MG: mesogonio, H: hígado, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria.....	33
14	Detalle del corte transversal de la gónada (sección b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total, en etapa de diferenciación. Se pueden observar los vasos sanguíneos y las elongaciones de tejido somático que eventualmente formaran la cavidad ovárica. EL: elongación, MG: mesogonio, VS: vasos sanguíneos.....	34
15	Corte transversal (sección a) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total. Se observan algunos órganos además de la ubicación de las gónadas, las elongaciones de tejido somático ya se encuentran fusionadas. G: gónada, H: hígado, I: intestino, MG: mesogonio, M: músculo, VN: vejiga natatoria.....	35

16	Detalle del corte transversal (sección a) de las gónadas diferenciadas de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total. Se aprecia que las elongaciones de tejido somático ya se han fusionado formando la cavidad ovárica. CO: cavidad ovárica, MG: mesogonio, VN: vejiga natatoria, VS: vaso sanguíneo.....	36
17	Corte transversal (sección b) de las gónadas de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 69 DDE con 9.5 cm de longitud total. A. Detalle de la gónada en la que se ha formado la cavidad ovárica. B. Detalle de la gónada en donde las elongaciones de tejido somático aún no se han fusionado. CO: cavidad ovárica, EL: elongación, M: músculo, VN: vejiga natatoria, VS: vaso sanguíneo.....	37
18	Corte transversal (sección b) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 85 DDE con 13 cm de longitud total. Se observa el patrón de desarrollo correspondiente a la formación de la cavidad ovárica. G: gónada, I: intestino, M: músculo, MG: mesogonio, VN: vejiga natatoria.....	38
19	Corte transversal (sección b) de las gónadas de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 85 DDE con 12.3 cm de longitud total. El patrón de desarrollo no se había observado anteriormente, probablemente corresponde a la diferenciación testicular.....	39
20	Ubicación de las gónadas (flecha roja) de <i>Totoaba macdonaldi</i> en la cavidad peritoneal, adyacentes a la vejiga natatoria. VN: vejiga natatoria.....	40
21	Ovario de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 15 meses de edad. A. Corte sagital de un ovario, se observan la pared y el estroma ovárico. B. Detalle del estroma ovárico compuesto por células germinales y ovocitos en distintas fases de desarrollo. Flechas blancas: ovogonias, OI: ovocitos primarios (estadio I), OII: ovocitos perinucleolares (estadio II).....	41
22	Testículo de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 15 meses de edad. A. Sección sagital de un testículo. B. Detalle del testículo, se observan lóbulos compuestos por espermatogonias rodeadas de células somáticas y separados por trabéculas. CS: células somáticas, ES: espermatogonias, T: trabéculas.....	42
23	Productos de PCR del gen <i>cyp19a</i> y siete genes de referencia, obtenido a partir de cDNA de la gónada de hembra y de bazo, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 70 min en solución amortiguadora TBE 1X. TU: <i>tubb</i> , β -A: <i>actb</i> , EL: <i>EF1A</i> , ND: <i>ND1</i> , QM: <i>QM-like</i> , ET: <i>eTIF3g</i> , RP: <i>RPS35</i> , 1A1: <i>cyp19a</i> , Mm: marcador molecular de 100 pb.....	43
24	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>cyp19a</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG944245).....	44

25	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>tubb</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG944246).....	45
26	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>actb</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG966521).....	46
27	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>EF1A</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG966522).....	46
28	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>ND1</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG966524).....	47
29	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>QM-like</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG966523).....	47
30	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>RPS35</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG966525).....	48
31	Secuencia parcial del cDNA del gen <i>eTIF3g</i> de <i>Totoaba macdonaldi</i> (acceso GenBank MG966526).....	49
32	Productos de PCR del gen <i>cyp19a</i> y seis genes de referencia específicos de <i>Totoaba macdonaldi</i> , obtenidos a partir de cDNA de ovario. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 70 min en solución amortiguadora TBE 1X. TU: <i>tubb</i> , QM: <i>QM-like</i> , EL: <i>EF1A</i> , ND: <i>ND1</i> , RP: <i>RPS35</i> , ET: <i>eTIF3g</i> , 1A1: <i>cyp19a</i> . Mm: marcador molecular 100 pb	50
33	Productos de PCR del gen <i>cyp19a</i> y siete genes de referencia específicos de <i>Totoaba macdonaldi</i> , obtenidos a partir de la mezcla de cDNA de larvas y juveniles de todas las edades. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 75 min en solución amortiguadora TBE 1X. TU: <i>tubb</i> , QM: <i>QM-like</i> , EL: <i>EF1A</i> , β -A: <i>actb</i> ND: <i>ND1</i> , RP: <i>RPS35</i> , ET: <i>eTIF3g</i> , 1A1: <i>cyp19a</i> . Mm: marcador molecular 100 pb.....	51
34	Expresión, en términos relativos, del gen <i>Tmcyp19a</i> (170 pb) en larvas y juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> determinado mediante PCR, como referencia se utilizó el gen <i>Tmtubb</i> (80 pb). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 70 min en solución amortiguadora TBE 1X. Mm: marcador molecular 100 pb, C-: control negativo, C+: control positivo (cDNA de ovario), DDE: días después de la eclosión.....	52
35	Expresión, en términos relativos, de la aromatasasa gonadal (<i>Tmcyp19a</i>) en larvas y juveniles de <i>T. macdonaldi</i>	53

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Secuencias de iniciadores utilizados para la amplificación de fragmentos de cDNA del gen <i>cyp19a</i> y genes de referencia de <i>Totoaba macdonaldi</i>	21
2	Secuencias de iniciadores específicos de <i>Totoaba macdonaldi</i> para la amplificación del gen <i>cyp19a</i> y de los genes de referencia.....	48

Capítulo 1. Introducción

La totoaba es un pez marino endémico del Golfo de California y uno de los sciaénidos de mayor tamaño. La pesca de la totoaba inició en 1920, como resultado de la gran demanda que tenía la vejiga natatoria o, comúnmente llamado, “buche” en el mercado asiático, y en la década de los años 40 fue la pesquería más importante del Golfo de California. Sin embargo, debido a la sobreexplotación su captura comenzó a declinar. En 1975 se declaró en veda permanente y actualmente está declarada como especie en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010; Valenzuela- Quiñonez et al., 2011).

Esta especie se ha cultivado con fines de repoblamiento e investigación por la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Sin embargo, ha despertado el interés del sector acuícola debido a sus características biológicas, tales como alta tasa de crecimiento, buenos índices de conversión de alimento, la calidad de su carne y la buena aceptación entre los consumidores, estas características hacen que su producción se considere rentable.

En el contexto de la acuicultura es importante conocer el periodo en el cuál ocurre la diferenciación sexual de la especie en cultivo, ya que entre los peces es común la existencia de dimorfismo sexual y es deseable cultivar poblaciones monosexo de organismos que posean características tales como mayor crecimiento, mejor tasa de conversión alimenticia, madurez sexual tardía, entre otras. Con este propósito, se pueden aplicar técnicas de control del sexo cuando los peces todavía están sexualmente indiferenciados (Piferrer, 2001; Strüssmann y Nakamura, 2002; Piferrer y Guiguen, 2008). La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual el primordio gonadal, sexualmente indiferenciado, se desarrollará como ovario o testículo dando lugar al sexo fenotípico (Piferrer, 2009). El periodo lábil de las gónadas puede determinarse mediante estudios histológicos o mediante el estudio de la expresión de algún marcador genético involucrado en el proceso. Se ha demostrado en diversas especies de teleósteos que la enzima citocromo P450arom (aromatasa gonadal) es un elemento esencial para la diferenciación ovárica, por lo tanto sus niveles de expresión pueden ser utilizados para inferir el sexo de la gónada en desarrollo (Nakamura *et al.*, 1998).

A la fecha no se han realizado trabajos relacionados con la diferenciación sexual de la totoaba, por lo que en este trabajo se describe la gonadogénesis de *Totoaba macdonaldi* mediante técnicas histológicas y se delimita el período lábil para la diferenciación de la gónada con apoyo de la expresión relativa de la aromatasa gonadal en las gónadas en desarrollo.

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Totoaba macdonaldi*

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es un pez marino endémico del Golfo de California perteneciente a la familia Sciaenidae, cuyas especies se conocen de forma común como corvinas, en esta familia se incluyen aproximadamente 66 géneros y alrededor de 283 especies (<http://www.fishbase.org/Summary/FamilySummary.php?ID=331>), en algunos lugares les llaman tambores o roncadors por el sonido que producen al utilizar su vejiga natatoria. El área de distribución de la totoaba comprende desde la desembocadura del Río Colorado hasta Bahía Concepción en la costa oeste del Golfo y en el este hasta la desembocadura del Río Fuerte (Figura 1)(Valenzuela- Quiñonez *et al.*, 2011; Cárdenas, 2012; Mata-Sotres *et al.*, 2015).

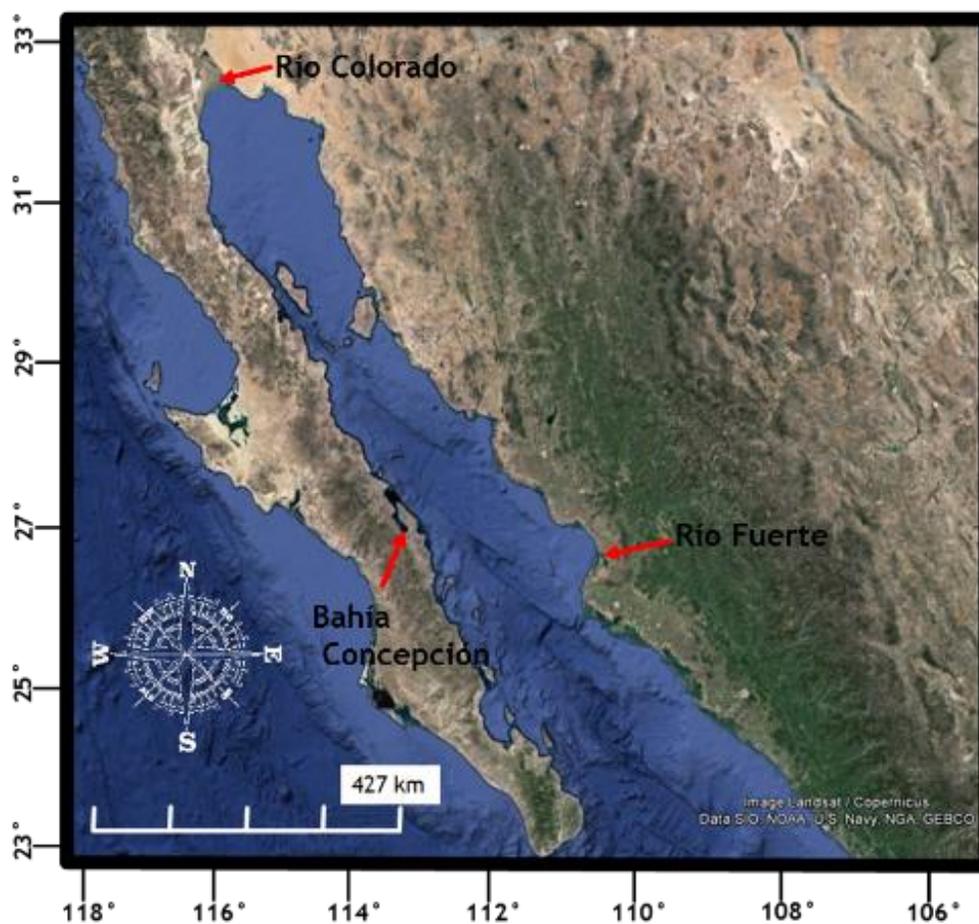


Figura 1. Golfo de California, se indican los límites de la distribución *Totoaba macdonaldi* (imagen tomada de Google Earth y modificada)

La totoaba posee un cuerpo alargado y comprimido, cubierto de escamas tipo ctenoideo, la coloración de los adultos es gris, aunque pueden presentar tonalidades doradas y azules (Figura 2), mientras que los juveniles tienen manchas oscuras en el dorso (Arvizu y Chávez, 1972; Chávez, 1973). Es uno de los sciaenidos de mayor tamaño, puede llegar a medir hasta 2 m de longitud total y pesar más de 100 kg, son peces longevos que llegan a vivir entre 20 y 25 años, su madurez sexual es tardía, entre los 6 y 7 años de edad (Cisneros-Mata *et al.*, 1995; De Anda-Montañez *et al.*, 2013). En época de reproducción, que comienza a finales de febrero y se extiende hasta principios de junio, migran hacia la parte del Alto Golfo de California, aprovechándola como zona de desove, desarrollo y crianza (Arvizu y Chávez, 1972; Flanagan y Hendrickson, 1976; Barrera-Guevara, 1990). Es una especie iterópara y gonocórica con un desarrollo ovárico asincrónico, los huevos tienen un diámetro aproximado de 0.9 mm y la longitud de las larvas recién eclosionadas es de 2 a 6 mm (Cárdenas, 2012).

La pesca de la totoaba inició en 1920, como resultado de la gran demanda que tenía la vejiga natatoria o, comúnmente llamado, "buche" en el mercado asiático, el resto del pez se consideraba un sub producto. En la década de los años 40, su pesquería fue la más importante del Golfo de California. En 1942 las capturas alcanzaron su máximo histórico con 2 261 t. Sin embargo, su captura empezó a decaer dramáticamente, para 1958 se capturaron 280 t y para 1975 solo 59 t (Valenzuela- Quiñonez *et al.*, 2011; Mata-Sotres *et al.*, 2015).



Figura 2. Adulto de *Totoaba macdonaldi* (tomada de <http://sargazo.com/?product=totoaba>)

Los esfuerzos para su conservación iniciaron en 1949, cuando se prohibió a los pescadores la utilización de redes agalleras en la desembocadura del Río Colorado, del 20 de marzo al 30 abril, periodo de desove de la totoaba. En 1975 se declaró una veda permanente y en 1976 fue incluida en el apéndice I de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES,

por sus siglas en inglés) y se declaró en peligro de extinción. En 1991 fue declarada especie en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010. En 1996, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) la incluyó en la Lista Roja de las Especies Amenazadas como en peligro crítico (Arvizu y Chávez, 1972; Valenzuela- Quiñonez *et al.*, 2011; Mata-Sotres *et al.*, 2015).

Las poblaciones de totoaba son afectadas por la pesca incidental de juveniles (“machorros”) durante la pesquería de camarón, los pre adultos son diezmados debido a la pesca deportiva, mientras que los adultos son capturados incidentalmente por redes tiburonerías y también son pescados en forma ilegal (Cisneros-Mata *et al.*, 1997). Además, las áreas de desove y crianza en el Alto Golfo de California han sido alteradas por el control del flujo del río Colorado y por el vertimiento de las aguas de uso agrícola, lo que ha provocado cambios en la salinidad, temperatura y en el patrón de corrientes. Sin embargo, el efecto de estos factores sobre las poblaciones de totoabas no se ha demostrado (Flanagan y Hendrickson, 1976; Barrera-Guevara, 1990).

A partir de 1993, en la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Nacional Autónoma de Baja California (UABC) inició las investigaciones para establecer las condiciones del cultivo de totoabas con fines de repoblamiento (True, 2012). Por otra parte, en el 2011 el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora registró la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) por parte de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVC) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), que le autoriza a realizar investigación, reproducción, aprovechamiento extractivo y repoblamiento de esta especie. Las instalaciones de la UMA se encuentran en el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES).

Actualmente la totoaba es cultivada por la empresa Earth Ocean Farms (La Paz, Baja California Sur) para el consumo humano, debido a sus características biológicas y por la buena aceptación entre los consumidores.

1.1.2 Gonadogénesis

La gonadogénesis es el proceso mediante el cual se desarrollan las gónadas. A diferencia de los rudimentos de otros órganos, que solo pueden diferenciarse en un órgano determinado, el rudimento gonadal es bipotencial y puede dar origen a ovarios o testículos. Las gónadas se forman a partir de células somáticas

que darán soporte y estructura a la gónada, y de células germinales primordiales (CGPs) a partir de las cuales se originaran los gametos (Strüssmann y Nakamura, 2002; Gilbert, 2010).

Las células somáticas de las gónadas de los anfibios, aves y mamíferos tienen un origen embriológico dual: la corteza se deriva de las células de la pared peritoneal y la médula a partir de las células del blastema mesonéfrico. El ovario se desarrolla a partir de las células de la corteza y las células de la médula degeneran. Por el contrario el desarrollo de los testículos involucra el desarrollo de la médula y la degeneración de la corteza (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002). En contraste, el tejido somático de las gónadas de los peces teleósteos se deriva solamente de células de la pared peritoneal, como lo confirman los estudios desarrollados por Nakamura (1978) en siete especies de teleósteos (*Oreochromis mossambicus*, *Oncorhynchus masou*, *Oncorhynchus keta*, *Salvelinus leucomaenis*, *Carassius auratus*, *Oryzias latipes* y *Gambusia affinis*). En la mayoría de los teleósteos las gónadas son órganos pares, se encuentran dispuestos en posición dorso lateral, una a cada lado del mesenterio dorsal, dentro de la cavidad peritoneal (Nakamura *et al.*, 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002; Zanuy *et al.*, 2009).

1.1.3 Células germinales primordiales

Las células germinales primordiales (CGPs) se especifican y separan de las células somáticas al inicio de la embriogénesis, y se originan mediante dos mecanismos diferentes. El primero es mediante la preformación, que implica la herencia de determinantes citoplasmáticos maternos localizados en el ovocito antes de la fertilización. Los determinantes citoplasmáticos o plasma germinal, conformados por proteínas y mRNAs (ácido ribonucleico mensajero, por sus siglas en inglés) son los responsables de la especificación de las CGPs, por lo tanto las células que hereden este plasma germinal darán origen a las CGPs (Houston y King, 2000; Extavour y Akam, 2003; Seydoux y Braun, 2006). Este mecanismo de determinación se ha encontrado en especies modelo como *Drosophila melanogaster* (Williamson y Lehmann, 1996), *Caenorhabditis elegans* (Hird *et al.*, 1996) y *Xenopus laevis* (Whittington y Dixon, 1975). En algunos peces teleósteos como *Danio rerio*, *Oryzias latipes* y *Gadus morhua* la especificación de las CGPs es por preformación, sin embargo aún no está claro si este mecanismo es común para todos los teleósteos (Extavour y Akam, 2003; Presslauer *et al.*, 2012).

El segundo mecanismo de especificación de las CGPs es mediante la inducción, común en los mamíferos, donde las células germinales surgen como resultado de señales inductivas provenientes del ectodermo extraembrionario y del endodermo. Un grupo de células epiblasticas pluripotentes son capaces de interpretar estas señales y se diferencian como CGPs (Extavour y Akam, 2003; Raz, 2003; Seydoux y Braun, 2006). Este tipo de especificación de las CGPs se ha observado en embriones de ratón (Ginsburg *et al.*, 1990), donde este proceso es mediado por la secreción de factores reguladores, algunos de ellos son miembros de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) (Ying *et al.*, 2001).

Hace algunos años la identificación de las CGPs se hacía por medio de microscopia óptica y electrónica, basándose en sus características morfológicas, ya que en comparación con las células somáticas, las CGPs son de mayor tamaño (10-20 μm), de forma ovalada, poseen un núcleo grande (6-10 μm), en el citoplasma se encuentran pocos organelos y mitocondrias de gran tamaño. Estas mitocondrias se encuentran asociadas a los gránulos germinales (*nuage*), los cuales se localizan cerca de los poros nucleares y contienen mRNAs, RNA mitocondrial y ribosomal, así como proteínas necesarias para el desarrollo de las células de la línea germinal (Devlin y Nagahama, 2002; Raz, 2003; Seydoux y Braun, 2006). Actualmente las CGPs pueden distinguirse de las células somáticas mediante la expresión de genes específicos de la línea germinal (Aoki *et al.*, 2009). Uno de ellos es el gen *Vasa*, identificado por primera vez en *D. melanogaster* (Hay *et al.*, 1988), también se ha observado en *Danio rerio* (Yoon *et al.*, 1997) y otros teleósteos. En *Gadus morhua* (Presslauer *et al.*, 2012) y en *Oryzias latipes* se ha demostrado que el gen *Vasa* es necesario para la migración de las CGPs ya que el silenciamiento de este gen produce patrones anormales de migración de estas células (Li *et al.*, 2009).

Una vez que se han formado las CGPs, permanecen asociadas a los tejidos endodérmicos y en las etapas posteriores del desarrollo embrionario migran a través del mesenterio dorsal del intestino, desde el sitio donde se originaron, hacia la región donde se han formado las crestas germinales. Cuando las CGPs están dentro de las crestas germinales, comienzan su proliferación y diferenciación sexual (Houston y King, 2000; Devlin y Nagahama, 2002). Posteriormente, entran en la primera etapa de gametogénesis y reciben el nombre de gonias (ovogonias en las hembras y espermatogonias en los machos). Mediante el proceso de espermatogénesis u ovogénesis, se convierten en espermatoцитos u ovocitos, respectivamente. Finalmente maduran en espermatozoide y óvulos (Extavour y Akam, 2003).

1.1.4 Desarrollo de los testículos

Después de que las CGPs migraron hacia las crestas germinales, se dividen por mitosis y se diferencian en espermatogonias, conjuntamente inicia la diferenciación y migración de las células somáticas para formar el tejido conectivo de sostén, los túbulos seminíferos, células de Leydig y de Sertoli (Devlin y Nagahama, 2002; Uribe *et al.*, 2014).

En los peces teleósteos los testículos son generalmente órganos pareados alargados, están unidos a la pared dorsal de la cavidad corporal por el mesorquio, ambos testículos convergen caudalmente en un conducto deferente central, que se abre al exterior a través del poro urogenital. Hay algunas especies que tienen un solo testículo o testículos parcial o totalmente fusionados (Zanuy *et al.*, 2009; Uribe *et al.*, 2014). Durante el desarrollo puede resultar difícil la identificación de las gónadas que se diferenciarán en testículos, ya que los elementos germinales y somáticos se mantienen sin cambios por largo tiempo. Sin embargo, en la mayoría de las especies de teleósteos estudiadas hasta ahora, el primer signo de diferenciación testicular es la formación del primordio del conducto eferente que se observa como un espacio en forma de hendidura en el tejido del estroma. Otra característica de la diferenciación testicular es el inicio de la espermatogénesis, que se caracteriza por una intensa división mitótica de las células germinales, posteriormente se observa la formación de cistos de células germinales o lóbulos en la periferia de las gónadas. Estos rasgos histológicos suelen observarse después de que ha ocurrido el desarrollo gonadal en las hembras (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002).

El testículo está constituido por dos compartimientos: el intersticial en donde se encuentran macrófagos y mastocitos, vasos sanguíneos y linfáticos, tejido conectivo y células somáticas de Leydig que son la fuente principal de esteroides. El compartimiento lobular, separado del compartimiento intersticial por la membrana basal y células mioideas peritubulares, alberga al epitelio germinal. Este epitelio está formado por las células germinales y por células somáticas o de Sertoli. Las células de Sertoli se encuentran sobre la membrana basal, llevan a cabo la función de mantenimiento de las células germinales, ya que regulan y proporcionan la entrada de nutrientes, factores de crecimiento, de diferenciación y de mitógenos, además, las protegen de daños y de su propio sistema inmune. Las células germinales se encuentran rodeadas por las extensiones citoplasmáticas de las células de Sertoli (Lo Nostro *et al.*, 2003; García-López *et al.*, 2005; Zanuy *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

1.1.5 Desarrollo de los ovarios

El desarrollo gonadal de las hembras puede identificarse por la proliferación de células germinales (mitosis), por el inicio de la meiosis y por el arreglo característico de las células somáticas que eventualmente formarán la cavidad ovárica (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002). Se han descrito tres procesos distintos para la formación de la cavidad ovárica. En *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann *et al.*, 1996) el tejido somático de los bordes ventral y dorsal del primordio gonadal comienzan a extenderse hacia la pared corporal lateral y finalmente se fusionan entre sí formando una cavidad ovárica ancha y plana en la región lateral de la gónada. En *C. auratus* (Nakamura, 1978) los extremos del primordio gonadal se extienden hacia unas pequeñas agregaciones de células somáticas que se desarrollan en la pared peritoneal, finalmente se fusionan entre sí y forman una cavidad ovárica estrecha entre la gónada y la pared peritoneal. En *G. affinis* (Nakamura, 1978), la cavidad ovárica se forma hasta que ha ocurrido la diferenciación del ovario. Los bordes laterales del ovario se extienden dorsalmente y se fusionan con la pared del celoma, la cavidad ovárica se dispone en la parte dorsal del ovario (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002).

Los ovarios de los teleósteos pueden ser órganos alargados pares o impares, unidos a la pared del celoma por el mesovario y pueden tener funciones adicionales a la producción de ovocitos, tales como la capacidad de almacenar esperma o ser el lugar en donde ocurre la fertilización, la alimentación y desarrollo de los embriones (Kopiejewska, 2003; Zanuy *et al.*, 2009). En algunas especies los ovocitos son liberados en la cavidad ovárica, en otras los folículos se abren mediante ductos a la cavidad corporal, en donde se liberan los ovocitos (Zanuy & Carrillo, 1987; Zanuy *et al.*, 2009).

1.1.6 Determinación del sexo

La determinación del sexo puede definirse como el proceso mediante el cual se establece el género de un individuo y puede ser controlado por la información genética que hereda de sus progenitores (Hayes, 1998; Piferrer, 2009) o ser influenciada por factores ambientales (Devlin y Nagahama, 2002; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010). El sexo de un individuo también se puede alterar con tratamientos hormonales, la exposición a andrógenos resulta en el desarrollo de testículos mientras que los estrógenos promueven el desarrollo de ovarios (Tang *et al.*, 2010).

La determinación genética del sexo (GSD, por sus siglas en inglés) implica que el sexo del individuo se establece en el momento de la fertilización o poco después de ella y existen diferencias genéticas entre los sexos (Piferrer, 2009). Los genes determinantes del sexo pueden estar distribuidos en el genoma ya sea localizados en varios cromosomas o restringidos a un solo cromosoma (Devlin y Nagahama, 2002), estos genes desencadenan una secuencia de eventos que resultan en la diferenciación gonadal (Hayes, 1998). La herencia del sexo incluye sistemas monogénicos o poligénicos. En el sistema monogénico los factores sexuales se segregan en un par de cromosomas o múltiples cromosomas sexuales, lo más común es la presencia de machos (XY) o hembras heterogaméticas (ZW) (Penman y Piferrer, 2008; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010), que pueden presentar cromosomas sexuales heteromórficos (diferentes en tamaño o forma, o similares en tamaño y forma pero al utilizar alguna tinción presentan diferente patrón de bandas) o bien pueden tener cromosomas sexuales homomórficos (sin diferencias en tamaño, forma o patrón de bandas) que son difíciles de identificar (Baroiller y D’Cotta, 2001; Penman y Piferrer, 2008).

En vertebrados, los genes determinantes del sexo no se encuentran conservados y difieren entre los grupos taxonómicos, en mamíferos corresponde al gen *Sry* (Sinclair *et al.*, 1990) y en aves al gen *DMRT1* (Smith *et al.*, 2009). A la fecha, en peces teleósteos se han identificado cinco genes determinantes del sexo *Dmy* en *Oryzias latipes* (Matsuda *et al.*, 2002), *amhy* en *Odontesthes hatcheri* (Hattori *et al.*, 2012), *Gsdf α* en *Oryzias luzonensis* (Myosho *et al.*, 2012), *Amhr2* en *Takifugu rubripes* (Kamiya *et al.*, 2012) y *sdY* en *Oncorhynchus mykiss* (Yano *et al.*, 2012) (Kikuchi y Hamaguchi, 2013). En el modelo poligénico no hay cromosomas sexuales, el sexo es determinado por la acción genética acumulativa de todos los factores involucrados en la diferenciación masculina o femenina que recibió el individuo, el sexo resultante depende de la proporción de dichos factores (Devlin y Nagahama, 2002; Piferrer, 2009; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010).

En la determinación ambiental del sexo (ESD, por sus siglas en inglés) el sexo se establece después de la eclosión de los huevos, en los estadios larvarios y post larvarios, entre los factores ambientales que pueden influenciar este proceso se encuentra la temperatura, el pH y la salinidad (Baroiller *et al.*, 1999; Piferrer, 2009). Este proceso es muy flexible, incluso individuos con determinación sexual genética pueden estar influenciados por factores ambientales (Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010).

Entre los factores ambientales determinantes del sexo, la temperatura parece ser el principal y es el más estudiado, esta condición se denomina determinación sexual dependiente de la temperatura, TSD (por sus siglas en inglés). La fluctuación de la temperatura en el hábitat de los peces durante periodos sensibles de

desarrollo (período lábil) puede determinar el sexo fenotípico a través de la alteración de las rutas bioquímicas e inducir el desarrollo de un macho o una hembra (Hayes, 1998; Piferrer, 2009; Guerrero-Estévez y Moreno-Mendoza, 2010). Este proceso parece estar influenciado en parte por la actividad de la aromatasa y la síntesis de estradiol en las hembras y por los receptores de esteroides en ambos sexos (Devlin y Nagahama, 2002). Las especies de peces que poseen TSD pueden ser agrupados en tres patrones de acuerdo a la proporción de sexos producida en respuesta a la temperatura ambiental: (1) a mayores temperaturas la proporción de machos es mayor (2) a mayores temperaturas la proporción de hembras es mayor (3) a temperaturas altas y bajas la proporción de machos es mayor (Ospina-Álvarez y Piferrer 2008).

1.1.7 Diferenciación sexual

La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual el primordio gonadal, sexualmente indiferenciado, se desarrollará como ovario o testículo dando lugar al sexo fenotípico (Piferrer y Guiguen, 2008; Piferrer, 2009). En los peces teleósteos gonocoristas se identifican dos tipos de diferenciación gonadal. El primer tipo corresponde a las especies denominadas gonocoristas diferenciadas en las cuales las gónadas se diferenciarán directamente en ovario o testículo. El segundo tipo corresponde a las especies gonocoristas indiferenciadas en las cuales el desarrollo gonadal inicia como ovario, en los individuos que se diferenciaran como machos ocurre un proceso de masculinización y se desarrolla una gónada intersexual que finalmente será un testículo, mientras que en los individuos que se desarrollarán como hembras, el desarrollo ovárico continúa (Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002).

La diferenciación sexual en los peces gonocoristas tiene un período lábil, en el cual los procesos que determinan el desarrollo de los primordios gonadales hacia un fenotipo particular, pueden ser alterados por factores endógenos o exógenos e influir en el destino de la gónada. Los factores que inducen este cambio son especie específicos, al igual que el periodo lábil, que ocurre antes de que se observe la diferenciación morfológica de la gónada (Raghuveer *et al.*, 2005; Piferrer y Guiguen, 2008). Una vez que se ha establecido el sexo de un individuo, su género se mantiene estable durante toda su vida (Devlin y Nagahama, 2002; Kikuchi y Hamaguchi, 2013; Brykov, 2014).

1.1.8 Esteroides sexuales

Los esteroides sexuales están implicados en la diferenciación sexual y son el principal producto hormonal de las gónadas (Piferrer y Guiguen, 2008), incluyen a los progestágenos, andrógenos y estrógenos (Gómez-Chang *et al.*, 2012). Los andrógenos inducen la masculinización de la gónada indiferenciada y los estrógenos su feminización, independientemente del sexo genotípico (Yamamoto, 1969; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002; Arezo *et al.*, 2014). En las hembras, los estrógenos, principalmente el 17- β estradiol (E2), son esenciales para la diferenciación ovárica. Mientras que para la diferenciación testicular los andrógenos más importantes son la 11-cetotestosterona (11-KT), 11 β -hidroxiandrostenediona y 11 β -hidroxitestosterona (11 β -hidroxi-T) (Baroiller *et al.*, 1999; Piferrer y Guiguen, 2008). Estas hormonas se sintetizan a partir del colesterol, que se obtiene a través de la ingesta de alimentos o se sintetiza a partir de Acetil coenzima A. El colesterol es transportado al interior de la mitocondria de las células esteroidogénicas por la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR, por sus siglas en inglés). Una vez que el colesterol se encuentra dentro de la mitocondria se escinde la cadena lateral del colesterol para producir pregnenolona, esta reacción es catalizada por la enzima P450_{scc} (colesterol desmolasa, codificada por el gen *CYP11A1*), la pregnenolona migra hacia el citosol donde ocurren las reacciones para la síntesis de los esteroides (O'Malley y Strott, 1999; Gómez-Chang *et al.*, 2012;). Además de P450_{scc}, otras enzimas esteroidogénicas importantes son 17-hidroxilasa/liasa (P450_{c17}), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD), 11 β -hidroxilasa (P450_{11 β}) y P450 aromatasa (*cyp19*) (Piferrer y Guiguen, 2008) (Figura 3).

Bogart (1987) propuso que la diferenciación sexual dependía del balance entre andrógenos y estrógenos, este balance depende de la enzima citocromo P450 aromatasa, codificada por el gen *cyp19a*, diversos estudios han demostrado que la actividad de esta enzima es importante para la diferenciación sexual de las hembras (Guiguen *et al.*, 1999; Kitano *et al.*, 2000; Maack y Segner, 2003).

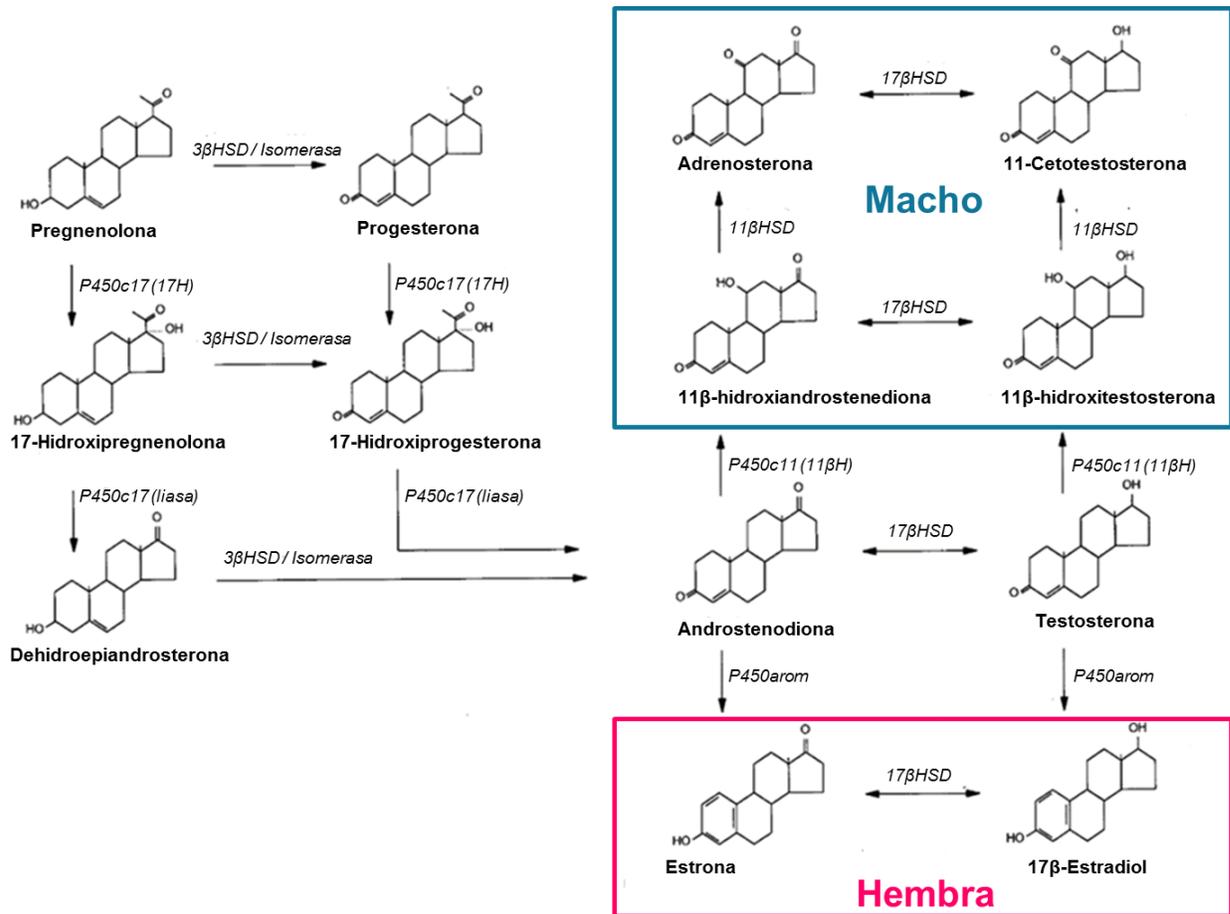


Figura 3. Ruta de síntesis de los principales esteroides sexuales a partir de pregnenolona. Se incluyen las principales enzimas esteroidogénicas implicadas en el proceso. La enzima aromatasa (P450arom) es la responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos (tomada de Baroiller *et al.*, 1999 y modificada). Abreviaturas: **3βHSD** (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa), **11βHSD** (11β- hidroxiesteroide deshidrogenasa), **P450c11 (11βH)** (11β-hidroxilasa), **P450c17 (17H)** (17-hidroxilasa), **P450c17 (liasa)** (17,20 liasa), **17βHSD** (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa).

Debido a que los esteroides sexuales no se almacenan después de su síntesis, sino que son liberados para que lleven a cabo sus funciones autocrinas, paracrinas o endocrinas, como indicadores de la síntesis de esteroides se evalúan los cambios en la expresión de los genes que codifican las enzimas necesarias para su síntesis o la actividad catalítica de las enzimas (Piferrer, 2009).

1.1.9 Gen *cyp19a*

En todos los vertebrados la biosíntesis de estrógenos está mediada por la enzima citocromo P450 aromatasa (P450arom), codificada por el gen *cyp19a*, esta es la enzima terminal en la biosíntesis de las hormonas esteroideas (Blázquez y Piferrer, 2004; Sawyer *et al.*, 2006). La aromatasa está compuesta por 515 aminoácidos, tiene un peso molecular aproximado de 58 kDa y cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Guiguen, Fostier, Piferrer, & Chang, 2010). La aromatasa mantiene el balance entre las hormonas esteroideas, esto es de gran importancia en los procesos de desarrollo y diferenciación gonadal, crecimiento, comportamiento reproductivo y desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Barney *et al.*, 2008)

En la mayoría de los vertebrados solo existe una copia del gen *cyp19*, sin embargo en los peces teleósteos, estudiados hasta ahora, se han reportado dos isoformas del gen (*cyp19a* y *cyp19b*) (Chang *et al.*, 2005). El tamaño de estos genes varía entre las especies de teleósteos principalmente la longitud de los intrones, sin embargo, mantiene regiones muy conservadas con aproximadamente un 85% de similitud (Guiguen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). La isoforma *cyp19a*, codifica la aromatasa gonadal (P450aromA), posee 9 exones y 8 intrones y se expresa principalmente en las gónadas. La expresión de *cyp19a* es clave no solo para la diferenciación y desarrollo de los ovarios, sino también para la producción de estradiol (E2) que es importante para la reproducción y sus niveles de expresión pueden variar durante el ciclo reproductivo (Sawyer *et al.*, 2006; Guiguen *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2016). La isoforma *cyp19b* está compuesta por 10 exones y 9 intrones, es expresada principalmente en el cerebro y codifica para la aromatasa cerebral (P450aromB), puede tener funciones en la neurogénesis promoviendo la síntesis de neuroestrógenos, además de incidir en el comportamiento sexual los niveles de expresión de este gen pueden permanecer sin cambios durante el ciclo reproductivo (Zhang *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2016). Las isoformas *cyp19a* y *cyp19b* tienen diferente actividad catalítica y patrones de expresión distintos (Barney *et al.*, 2008).

Debido a su posición central en la diferenciación sexual de las hembras, es posible utilizar los niveles de expresión de *cyp19a* como marcador de la diferenciación ovárica (Vizziano *et al.*, 2007). Para especies en las que se desconoce la existencia de genes determinantes del sexo o no presentan dimorfismo sexual para identificar el sexo genotípico, *cyp19a* es el mejor marcador molecular (Piferrer y Guiguen, 2008)

1.2. Justificación

La totoaba es una especie con potencial para la acuicultura debido a sus características biológicas, por tal motivo ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones acerca de su cultivo y nutrición. Sin embargo, un aspecto básico de su desarrollo que aún no ha sido explorado es la génesis gonadal que incluye la identificación del periodo en el que ocurre la diferenciación sexual.

Debido a que en los peces es común la existencia de dimorfismo sexual y es deseable cultivar poblaciones monosexo de organismos que posean características tales como mayor crecimiento, mejor tasa de conversión alimenticia, madurez sexual tardía, entre otras. Es importante conocer el período lábil para la diferenciación de la gónada, lo que permitirá la aplicación de técnicas para controlar el sexo de las poblaciones en cultivo.

1.3. Hipótesis

- ❖ En las hembras de *Totoaba macdonaldi*, al igual que en otros teleósteos, la diferenciación sexual de la gónada se caracteriza por la formación de la cavidad ovárica y la expresión temprana de la aromatasa gonadal (*cyp19a*).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- ❖ Describir la gonadogénesis y delimitar el período en el que ocurre la diferenciación sexual de *Totoaba macdonaldi*

1.4.2 Objetivos específicos

- ❖ Describir la gonadogénesis mediante análisis histológico.
- ❖ Aislar y secuenciar fragmentos del gen de la aromatasa gonadal (*cyp19a*) y de siete genes de mantenimiento con potencial para ser utilizados como genes de referencia interna en estudios de expresión genética.
- ❖ Realizar pruebas de la expresión relativa del gen *cyp19a* en larvas y juveniles mediante RT-PCR punto final como complemento y apoyo a los resultados del estudio histológico.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo de *Totoaba macdonaldi*

Los huevos de totoaba fueron proporcionados por el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Posteriormente se transportaron en bolsas plásticas vía aérea y terrestre al Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Ensenada, Baja California, México. Los huevos se sembraron en una incubadora cilíndrica de fibra de vidrio, con fondo cónico y de 2 000 L de capacidad, a una densidad de 50 a 100 huevos L⁻¹. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura de 25± 1° C, salinidad 35 ups, oxígeno disuelto 6.5±0.05 mg L⁻¹ y fotoperiodo de 12:12 (L:O). A partir del 1 día después de la eclosión (DDE) y hasta 19 DDE las larvas se alimentaron con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a una densidad inicial de 3 rotíferos mL⁻¹ y hasta una densidad de 5 rotíferos mL⁻¹. Los rotíferos se alimentaron con pasta de microalgas (Instant Algae, Reed Mariculture Inc. USA) y 12 horas antes de proporcionárselos a las larvas se enriquecieron con Origreen® (Skretting, Noruega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Entre los 12 y 27 DDE las larvas fueron alimentadas simultáneamente con rotíferos y nauplios de *Artemia franciscana*. (*Artemia International, Grade AA*) recién eclosionados y enriquecidos con Origreen® (Skretting, Noruega), con una densidad inicial de 1 nauplio mL⁻¹ y hasta una densidad final de 5 nauplios mL⁻¹. El suministro de rotíferos fue disminuyendo progresivamente en una proporción de 75, 50, 25 y 0% a partir de 12 a 17 DDE.

A partir de 21 DDE se hizo el cambio gradual de alimento, de *Artemia franciscana* a alimento balanceado (Othohime®, Reed Mariculture, Campbell, CA.). El tamaño de la partícula estuvo relacionada con la apertura de la boca (B1= 200-360 µm; B2= 360-620 µm y C1= 200-360 µm) (Mata-Sotres *et al.*, 2015).

Las larvas se alimentaron tres veces al día (9:00, 14:00 y 18:00 h).

2.2 Descripción del proceso de gonadogénesis

2.2.1 Muestreo de larvas y juveniles

Para la descripción histológica del desarrollo gonadal, se tomaron muestras de cinco organismos entre los 29 y 161 DDE (días después de la eclosión). Se midió la longitud de las larvas en un microscopio estereoscópico (modelo M5A, WildHeerbrugg) equipado con un ocular micrométrico y para los juveniles se utilizó un vernier Mecanic Typ 60901, con una precisión de ± 0.05 mm.

2.2.2 Análisis histológico

Las muestras se fijaron en solución Davidson (Anexo 1) por siete días, los organismos con edades de 34 hasta 161 DDE se transfirieron a una solución de ácido fórmico-formalina (Anexo 2) por 10 días para su descalcificación. Los ejemplares menores a 3 cm se procesaron en su totalidad y a los ejemplares mayores a 3 cm solo se les disecó la región abdominal.

Una vez que concluyó el periodo de fijación y descalcificación, las muestras se colocaron dentro de casetes histológicos y fueron sometidas a un proceso de deshidratación y aclaración (Anexo 3) utilizando un procesador automático de tejidos (Leica, modelo TP1020), se incluyeron en parafina mediante un incluidor automático de tejidos (Leica, modelo EG1160). Se realizaron cortes histológicos seriados con un grosor de 6 a 8 micras utilizando un micrótopo (Leica, modelo RM2255). Los cortes obtenidos se extendieron en un baño con agua desionizada, grenetina y alcohol a 50 °C, se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar 24 h a 65°C en una estufa (Precision Scientific Co, modelo 4). Una vez obtenidos los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (Anexo 4) (Howard *et al.*, 2004) y se montaron con resina (Cytoseal 60 Thermo Scientific).

2.3 Obtención de secuencias del gen *cyp19a* y genes de referencia de *Totoaba macdonaldi*

2.3.1 Aislamiento y secuenciación del cDNA parcial del gen *cyp19a* y genes de referencia de *T. macdonaldi*

En GeneBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson *et al.*, 2013) para *T. macdonaldi* solo están registradas las secuencias de cDNA de los genes *16S* y *18S* rRNA, *COI*, varios microsatélites de la región mitocondrial, cuatro enzimas digestivas y cuatro genes con diversas funciones. En estudios de expresión genética se utilizan genes de referencia (conocidos en inglés como *housekeeping genes*) que sirven como control interno para eliminar variaciones debidas cantidad de tejido y técnica empleada para la extracción del RNA total, la síntesis de cDNA y aquellos relacionados con las ampliaciones por PCR (Sun y Hu, 2015), permitiéndonos asumir que las variaciones se deben a si hay o no expresión de un gen de interés y no atribuido a otros motivos. Los genes de referencia, generalmente están involucrados en el mantenimiento de las funciones básicas del metabolismo celular, se expresa en diferentes tejidos y etapas de desarrollo del organismo a niveles constantes independientemente de las condiciones experimentales o externas (Kozera y Rapacz, 2013). Por tal motivo, como primer paso para realizar el estudio de expresión genética en *T. macdonaldi* fue necesario aislar, mediante PCR, fragmentos del gen *cyp19a* y de varios genes de referencia que pudieran ser utilizados en el presente y futuros estudios de expresión y con en esas secuencias diseñar los iniciadores específicos para *T. macdonaldi*.

2.3.1.1 Extracción de RNA total

Para aislar dichos fragmentos de cDNA se tomaron muestras de tejido del bazo, hígado, y gónadas (ovario y testículo) de totoabas adultas (*Totoaba macdonaldi*). Los tejidos se colocaron en tubos Eppendorf® de 1.7 mL, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se hizo la extracción de RNA. El RNA total de cada tejido se extrajo con TRIzol® (Ambion) según las instrucciones del fabricante.

La integridad del RNA total se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 60 volts con la solución amortiguadora TBE 1X, usando como referencia un marcador molecular de 1 Kb (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) y como solución de tinción se utilizó el colorante GelRed™ (Biotium,

Fremont, CA, EUA) a una concentración de 30X. El gel se visualizó en un sistema digital de fotodocumentación Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD®, EUA) bajo luz UV, la imagen se capturó con el programa Quantity One (BIO-RAD®, EUA). El RNA total se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop-2000 (NanoDrop Technologies®, Thermo Scientific, EUA) y se verificó su pureza a través de la medición de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm, (Sambrook y Russell, 2001).

2.3.1.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de cDNA se realizó con el kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) según las instrucciones del fabricante. Para la transcripción reversa se utilizó 1 µg de RNA total, se agregó 1µL de una solución 50 µM de iniciadores hexámeros aleatorios, 4 µL dNTP 2.5 mM; 4 µL de solución amortiguadora First-Strand 5X, 2 µL DTT 0.1 M; 1 µL de enzima Superscript™ II RT y agua DEPC hasta completar un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó en un termociclador Mini MJ™ (Modelo PTC-1148, BIO-RAD®) a 25 °C por 10 min, 42 °C por 50 min y 70 °C por 15 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.3.1.3 Diseño de los iniciadores y amplificación

Para diseñar los iniciadores se realizó una búsqueda de secuencias en GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson *et al.*, 2013) del gen *cyp19a* y de varios genes de referencia que han sido utilizados frecuentemente en estudios de expresión genética en especies de la familia Sciaenidae (Sun & Hu, 2015) o filogenéticamente cercanas. Para identificar los fragmentos más conservados se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7.0 (MEGA 7.0) (Kumar *et al.*, 2016) y con el programa PRIMER 3 (Rozen y Skaletsky, 2000) se diseñaron los iniciadores específicos (Tabla1).

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 12.5 µL utilizando 9.42 µL de agua libre de RNAsas, 1.25 µL de solución amortiguadora 10X, 0.38 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.25 µL de dNTPs (25 mM), 0.25 µL de cada iniciador (10 mM), 0.2 µL de Taq DNA polimerasa (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y 0.5 µL de cDNA. La amplificación se hizo en un termociclador Veriti® (modelo 96-Well, Applied Biosystems®), las condiciones de amplificación por RT-PCR fueron las siguientes: 94 °C por 3 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s y temperatura de alineamiento dependiendo del gen y de los pares de primer diseñados

(Tabla 1) por 30 s y 72 °C por 1 min, con extensión final a 72 °C por 8 min. Los productos resultantes se analizaron en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 70 min en solución amortiguadora TBE 1X usando como referencia un marcador molecular de 100 Pb (Promega, Madison, Wisconsin, EUA).

Las bandas de amplificación del tamaño esperado se purificaron con el kit QIAquick® Gel Extraction (QUIAGEN®, Valencia, CA, EUA) y el producto se envió a secuenciar a la empresa SeqXcel® (San Diego, CA, EU).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos de GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson *et al.*, 2013) utilizando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar su identidad y determinar su homología con otras secuencias reportadas. Las secuencias obtenidas de *T. macdonaldi* se utilizaron para diseñar, con el programa PRIMER 3 (Rozen y Skaletsky, 2000), iniciadores específicos para el análisis de la expresión genética en larvas y juveniles de *T. macdonaldi*.

Tabla 1. Secuencias de iniciadores utilizados para la amplificación de fragmentos de cDNA y *cyp19a* y genes de referencia de *Totoaba macdonaldi*

Gen	Función	Secuencias (5' → 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño esperado (pb)
<i>cyp19a</i>	Aromatasa gonadal	F: TCACCAGAGGCACAAGACAG R: GAAGTAACGGCGAGGAGCAT	63	558
<i>tubb</i>	Proteína del citoesqueleto	F: TGGACTCTGTCCTGGATGTG R: ATGTCACAGACAGCGGTCTT	58	729
<i>actb</i>	Proteína del citoesqueleto	F: ATCGCTGACAGGATGCAGAA R: GCCGGACTCATCATACTCCT	60	173
<i>EF1A</i>	Síntesis de proteínas	F: GTGGCTGGTGACAGCAAGAA R: TGGTCTCAACAGCCTTGATG	60	357
<i>ND1</i>	Transporte de electrones	F: TGTGCAGCCTGGAGAAGTT R: AACATGGCCTCCAGGAAGAC	60	189
<i>QM-like</i>	Síntesis de proteínas	F: GCAGGAAGAAGGCCAAGGT R: GCTTCTCGGCCATCATGTC	61	455
<i>RPS35</i>	Síntesis de proteínas	F: CATGCCAGTGGATCAGGAC R: GGCAGAGGGCCATTCTGTA	63	231
<i>eTIF3g</i>	Síntesis de proteínas	F: GGTCCCTAATGTCGCCACCAC R: GCACTCCTGCGATGGCTCT	63	557

2.3.2 Expresión del gen *cyp19a* en larvas y juveniles de *T. macdonaldi*

2.3.2.1 Muestreo de larvas y juveniles, extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Para el estudio de expresión genética se colectaron cinco larvas a los 29, 32, 36 y 38 DDE, e igual número de juveniles a los 41, 44, 47, 50 y 51 DDE. La longitud de las larvas se midió en un microscopio estereoscopio (modelo M5A, WildHeerbrugg) equipado con un ocular micrométrico y para los juveniles se utilizó un vernier Mecanic Typ 60901, con una precisión de ± 0.05 mm. Posteriormente, se colocaron individualmente en aluminio, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de RNA.

Para la extracción de RNA total se tomaron tres organismos de cada edad, en las larvas de 29, 32 y 36 DDE se procesó toda la región abdominal debido a que en esta etapa del desarrollo las gónadas son muy pequeñas y no se pueden disecar. Para las larvas de 38 DDE y los juveniles de 41, 44, 47, 50 y 51 DDE también se procesó la región abdominal, pero se retiró la piel, la mayor parte de músculo y el alimento que se encontraba en el intestino. Se obtuvieron muestras de entre 50 a 300 mg de tejido para la extracción de RNA total y posterior síntesis de cDNA. Estos dos procedimientos se realizaron de acuerdo a lo descrito en las secciones 2.3.1.1 y 2.3.1.2.

2.3.2.2 Amplificación de los iniciadores específicos

Todos los iniciadores se probaron primero con el cDNA de la gónada de una hembra adulta y con una mezcla del cDNA de larvas y juveniles de cada uno de los días de muestreo (del 29 al 51 DDE). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 8 μ L utilizando 1.6 μ L de 2X GoTaq[®] G2 DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 0.048 μ L de cada iniciador (10 mM), 0.96 μ L de MgCl₂ (25 mM), 3.65 μ L de agua libre de RNAsas, 0.2 μ L de Taq (5 U/ μ L) y 1.5 μ L de cDNA (150 ng/ μ L). La amplificación se hizo en un termociclador Veriti[®] (modelo 96-Well, Applied Biosystems[®]), bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 2 min, 35 ciclos a 90 °C por 30 s, 64.4 °C por 30 s y 72 °C por 40 s, con extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos resultantes de las amplificaciones se analizaron en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 75 min en solución amortiguadora TBE 1X usando como referencia un marcador molecular de 100 Pb (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Las condiciones de corrida y las

concentraciones de los reactivos de las reacciones de la amplificación, se estandarizaron para una óptima amplificación tanto en la hembra adulta como en la mezcla de larvas y juveniles.

Para el análisis de la expresión del gen *cyp19a* de *T. macdonaldi* como gen de referencia interna se utilizó solo uno de los siete posibles genes de referencia. Las amplificaciones del cDNA individual de larvas y juveniles (tres organismos por día de muestreo) se realizaron según se describió anteriormente. La intensidad de las bandas amplificadas se determinó con el software Image Lab™ versión 5.2.2 (bio-Rad®). Los niveles de expresión, en términos relativos, de la aromatasa gonadal de cada uno de los organismos se estimaron mediante la razón *Tmcyp19a/Tm* gen de referencia (D'Cotta *et al.*, 2001; Karube *et al.*, 2007), previamente se normalizaron ambos valores con respecto a la intensidad determinada en la gónada de la hembra adulta.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Descripción del proceso de gonadogénesis

Para estudiar y describir la gonadogénesis se procesaron histológicamente 22 organismos con edades entre los 29 y 161 días después de la eclosión (DDE.)

Durante las primeras etapas de desarrollo, las larvas y juveniles de totoaba poseen gónadas muy pequeñas lo que hace complicado ubicarlas, extraerlas y procesarlas. En atención a esto, para identificar la posición de las gónadas y realizar el análisis histológico de manera exitosa, se realizaron cortes en el plano sagital y transversal (Figura 4).

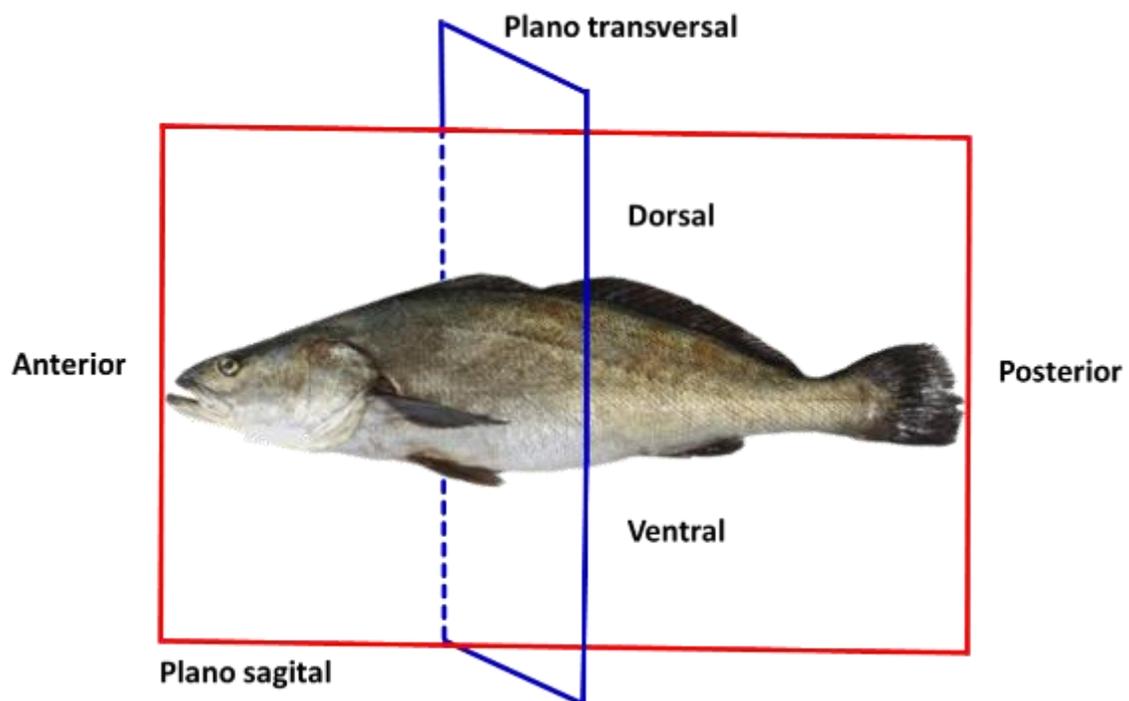


Figura 4. Planos corporales en los que se realizaron los cortes para el análisis histológico de las gónadas. Sagital va de la parte anterior hacia la parte posterior dividiendo al organismo en izquierda y derecha. Transversal pasa en forma horizontal al cuerpo dividiéndolo en anterior y posterior (tomada de <http://sargazo.com/?product=totoaba> y modificada).

Los cortes sagitales se hicieron en individuos con edades de 29 hasta 50 DDE. Los cortes transversales se realizaron en organismos de todas las edades (desde 29 DDE hasta 161 DDE). Para este propósito se disecó la región abdominal de los organismos y se seccionó en tres partes, tomando como referencia las espinas (e) y radios (r) de las aletas dorsal anterior y posterior: sección a, de la séptima hasta la décima espina de la aleta dorsal anterior; sección b, de la primera espina hasta el tercer radio de la aleta dorsal posterior; sección c, del cuarto hasta el séptimo radio de la aleta dorsal posterior (Figura 5).

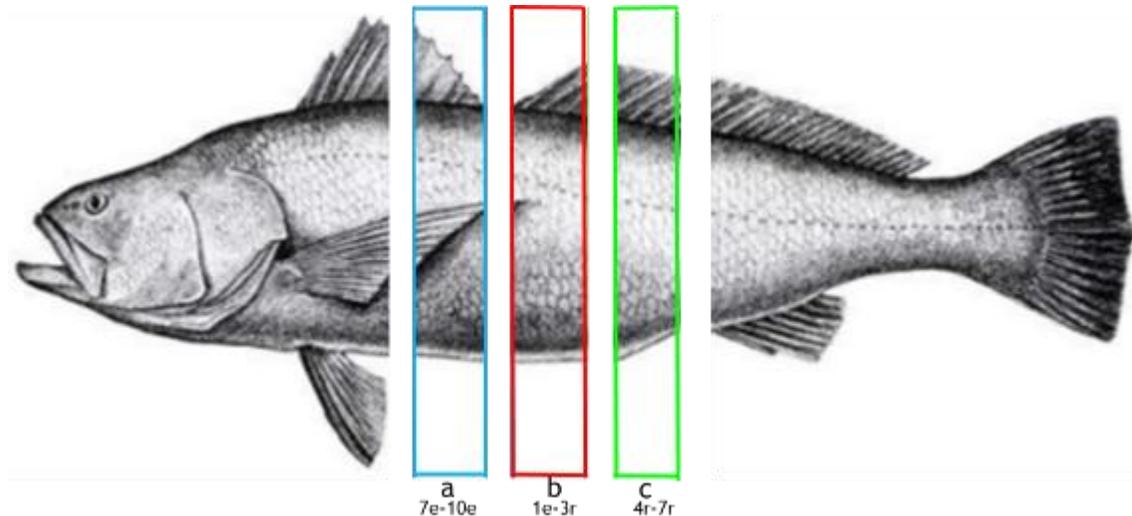


Figura 5. Diagrama que ilustra la sección de la región media de *Totoaba macdonaldi* donde se hicieron los cortes histológicos transversales (tomado de <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Totoaba+macdonaldi&l=spanish> y modificada).

3.1.1 29 DDE (Longitud total de 1.2 a 1.5 cm)

En los cortes transversales de la región media (sección b) de larvas de *T. macdonaldi*, se observan las dos gónadas indiferenciadas, localizadas dentro de la cavidad peritoneal, entre la vejiga natatoria y el intestino (Figura 6). Están formadas por tejido conectivo, por células germinales que están rodeadas de células somáticas de forma irregular (Figura 7. A).

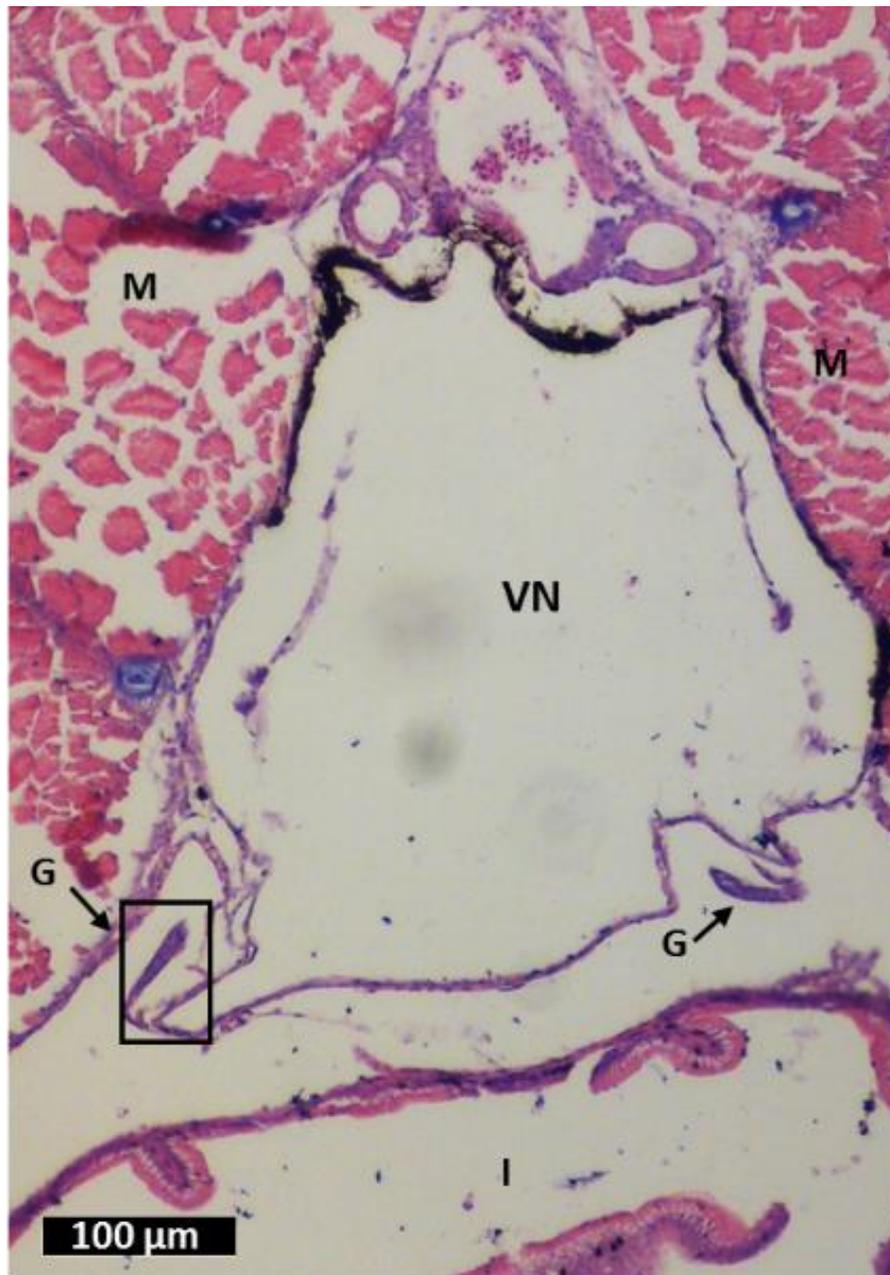


Figura 6. Corte transversal (sección b) de *Totoaba macdonaldi* a los 29 DDE con 1.5 cm de longitud total. Se observan diferentes órganos y la posición de las gónadas. G: gónada, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria.

Las células germinales se identificaron por su tamaño (10-20 μm) y forma ovalada, núcleo grande (6-10 μm) y poco citoplasma (Figura 7. B).

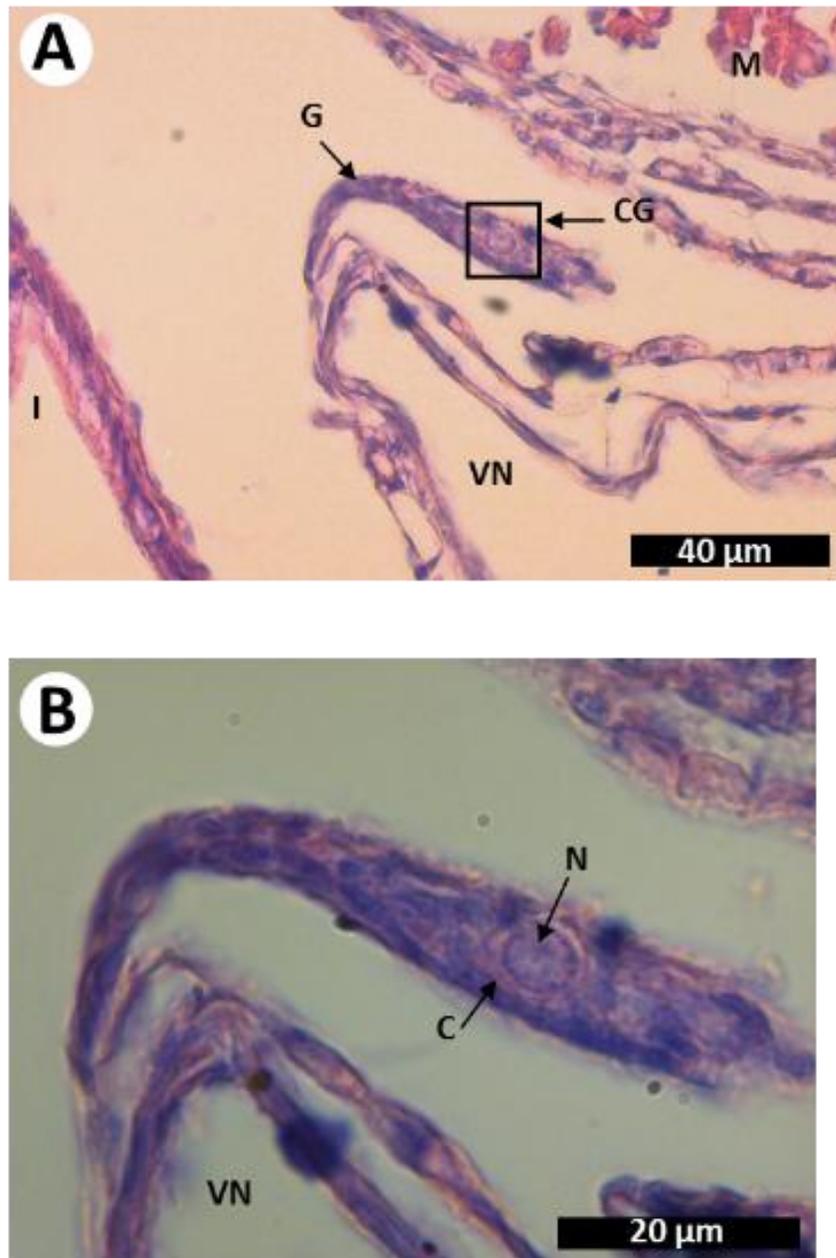


Figura 7. Corte transversal (sección b) de *Totoaba macdonaldi* a los 29 DDE con 1.5 cm de longitud total. A. Detalle de la gónada en la que se observa una célula germinal y células somáticas. B. Detalle de las características morfológicas de una célula germinal. G: gónada, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria, CG: célula germinal, C: citoplasma.

En las secciones sagitales, al igual que en las secciones transversales, se observa que las gónadas se localizan dentro de la cavidad peritoneal, por encima del intestino y por debajo del extremo caudal de la vejiga natatoria (Figura 8. A). Dentro de la gónada se observan células germinales (Figura 8. B), las características generales de estas células son las mismas que las descritas para la célula germinal

encontrada en el corte transversal, también se encuentran rodeadas por células somáticas de forma irregular y por tejido conectivo.

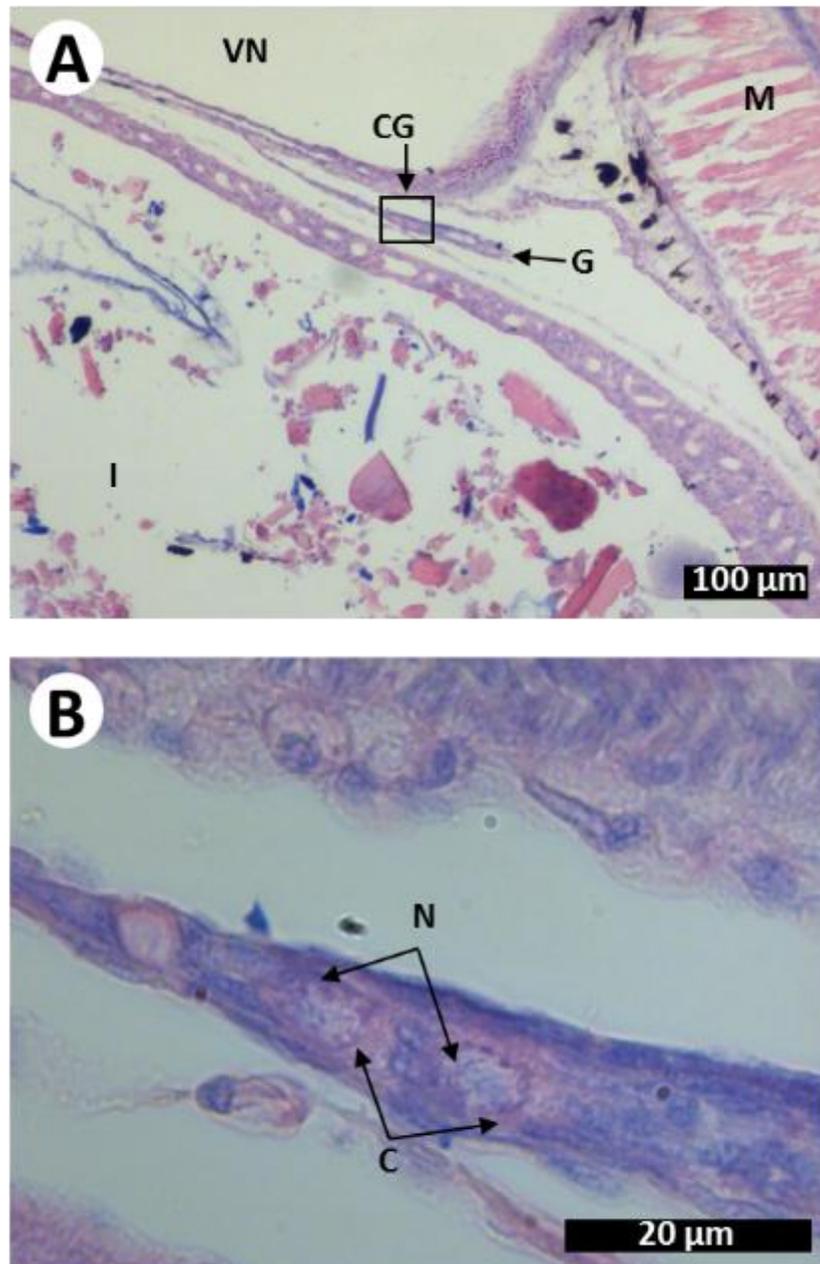


Figura 8. Corte sagital de una larva de *Totoaba macdonaldi* a los 29 DDE con 1.2 cm de longitud total. A. Se observa la posición de las gónadas. B. Detalle de las características morfológicas de las células germinales encontradas en la gónada indiferenciada. G: gónada, I: intestino, M: músculo, VN: vejiga natatoria, CG: célula germinal, C: citoplasma, N: núcleo.

3.1.2 34 DDE (Longitud total de 2.4 a 3.3 cm)

En los cortes transversales de estos organismos se observa que las gónadas se encuentran unidas a la pared peritoneal por el mesogonio, ésta es una estructura delgada formada por tejido conectivo y células somáticas. Se observa que el riñón tiene una ubicación retroperitoneal (fuera del peritoneo) (Figura 9). En esta etapa no se observan cambios morfológicos significativos en las gónadas, en la serie de cortes transversales no se observó ninguna célula germinal, solo células somáticas irregulares y tejido conectivo.

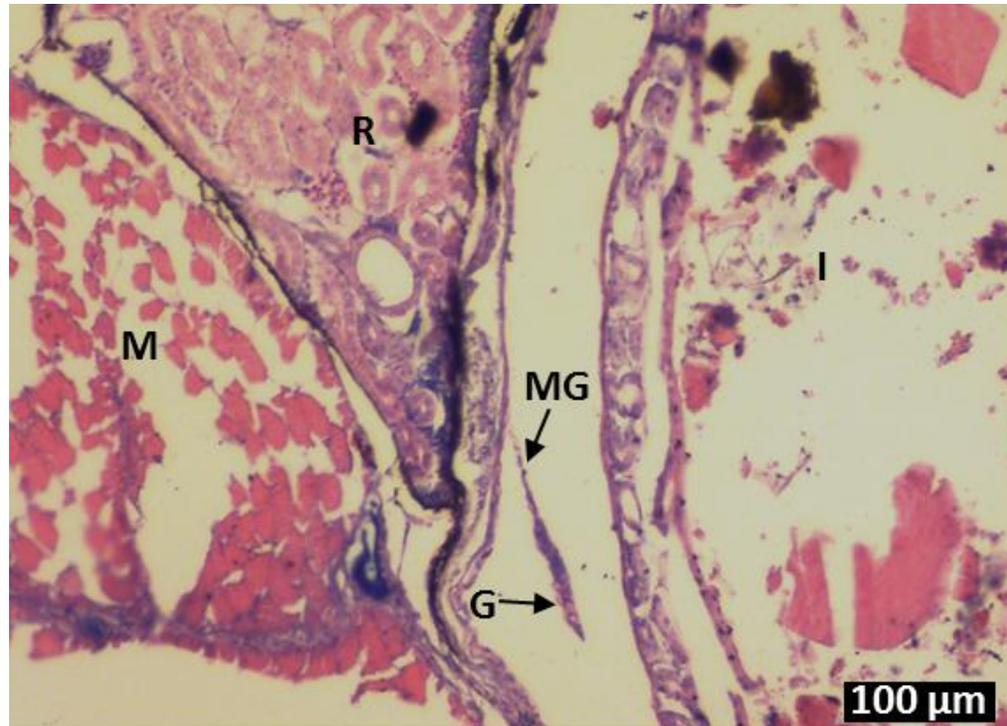


Figura 9. Corte transversal (sección b) de una larva de *Totoaba macdonaldi* a los 34 DDE con 2.3 cm de longitud total. Se observa la ubicación de las gónadas dentro de la cavidad celómica, unidas a la pared peritoneal por el mesogonio. No se observan cambios significativos en la morfología de la gónada. **G:** gónada, **I:** intestino, **MG:** mesogonio, **M:** músculo, **R:** riñón.

En las secciones sagitales se observa que se ha incrementado el ancho y la longitud de la gónada (Figura 10. A), esto se puede atribuir al incremento en el número de células somáticas, sin embargo, no se detectó actividad mitótica de las células germinales. Además, en la serie de cortes solo se encontró una célula germinal con características similares a las descritas en la etapa anterior (Figura 10. B).

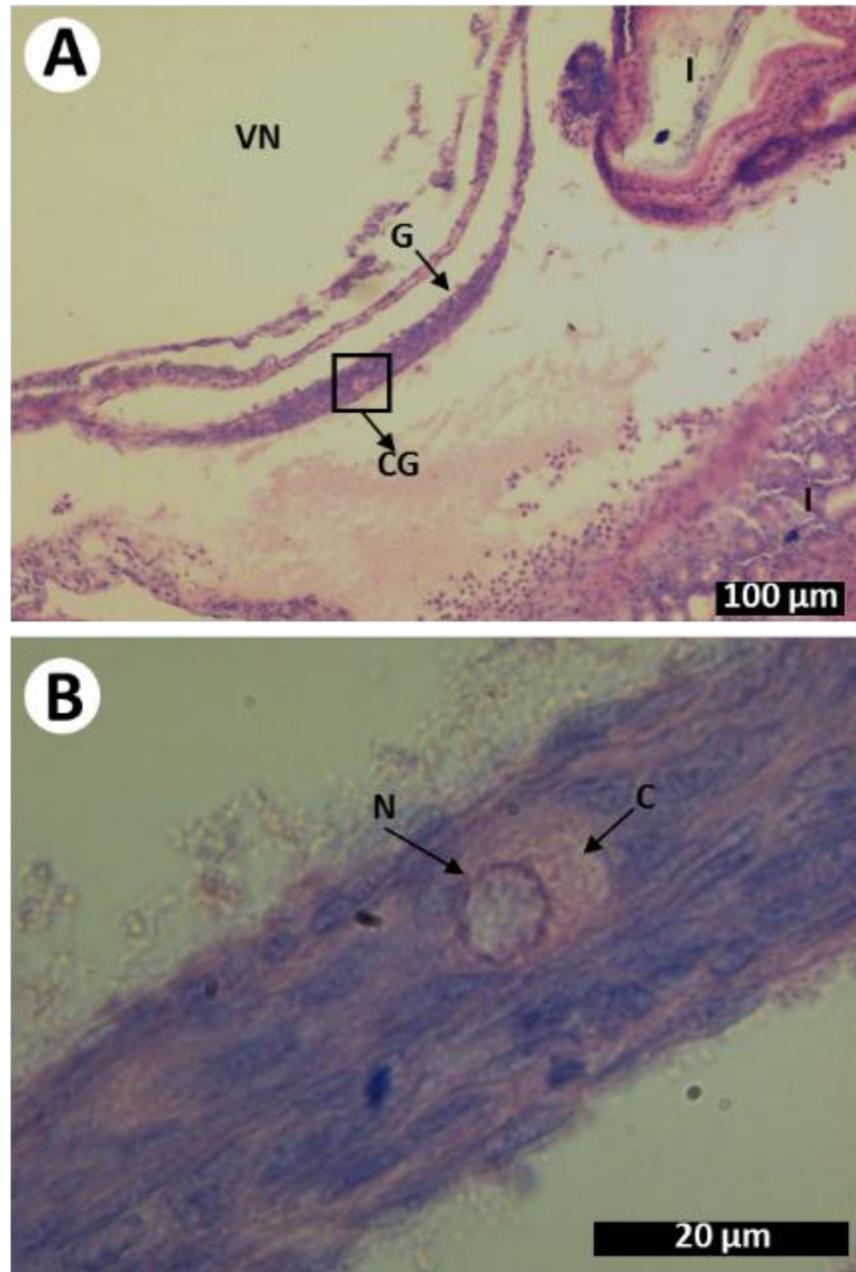


Figura 10. Corte sagital de una larva de *Totoaba macdonaldi* a los 34 DDE con 2.5 cm de longitud total. **A.** La gónada indiferenciada ha aumentado en longitud y ancho. **B.** Detalle de las principales características morfológicas de la célula germinal encontrada en la gónada. **C:** citoplasma, **CG:** célula germinal, **I:** intestino, **G:** gónada, **N:** núcleo, **VN:** vejiga natatoria.

3.1.3 41 DDE (Longitud total de 3.3 a 4.8 cm)

Durante esta etapa del desarrollo se puede considerar que la gónada se encuentra en transición hacia la

diferenciación (Figura 11 A). En los cortes transversales se observa un cambio en la morfología de las células somáticas de la gónada las cuáles se agrupan de forma distinta. En el extremo proximal de la gónada los elementos somáticos tienen una forma irregular mientras que las células somáticas que se encuentran agrupadas en el extremo distal son redondeadas, el núcleo se localiza en la periferia y son muy similares a las que conforman la pared peritoneal (Figura 11 B).

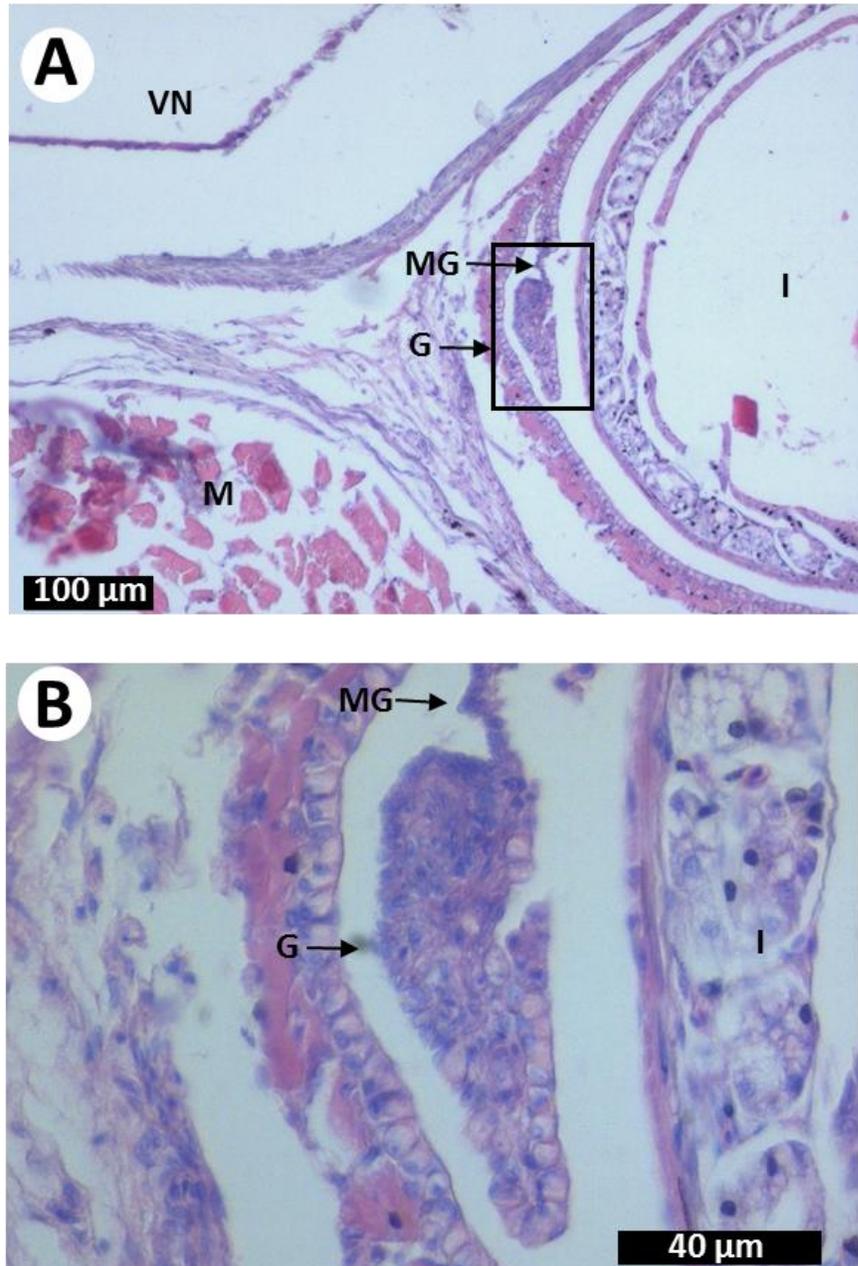


Figura 11. Corte transversal (sección b) de *Totoaba macdonaldi* a los 41 DDE con 3.3 cm de longitud total. **A.** La gónada indiferencia presenta los primeros cambios morfológicos. **B.** Detalle de la gónada donde se puede distinguir diferencias entre el arreglo de los elementos somáticos que la conforman. **G:** gónada, **I:** intestino, **M:** músculo, **MG:** mesogonio, **VN:** vejiga natatoria.

3.1.4 44 DDE (Longitud total de 3.7 a 4.6 cm)

En las secciones transversales de los organismos de esta edad no se observan cambios morfológicos significativos, con respecto a la etapa anterior.

En los cortes sagitales se aprecia que la gónada ha aumentado en longitud y ancho (Figura 12. A.) es probable que haya aumentado el número de células germinales. Al igual que en etapas anteriores se observó la presencia de células germinales (Figura 12. B).

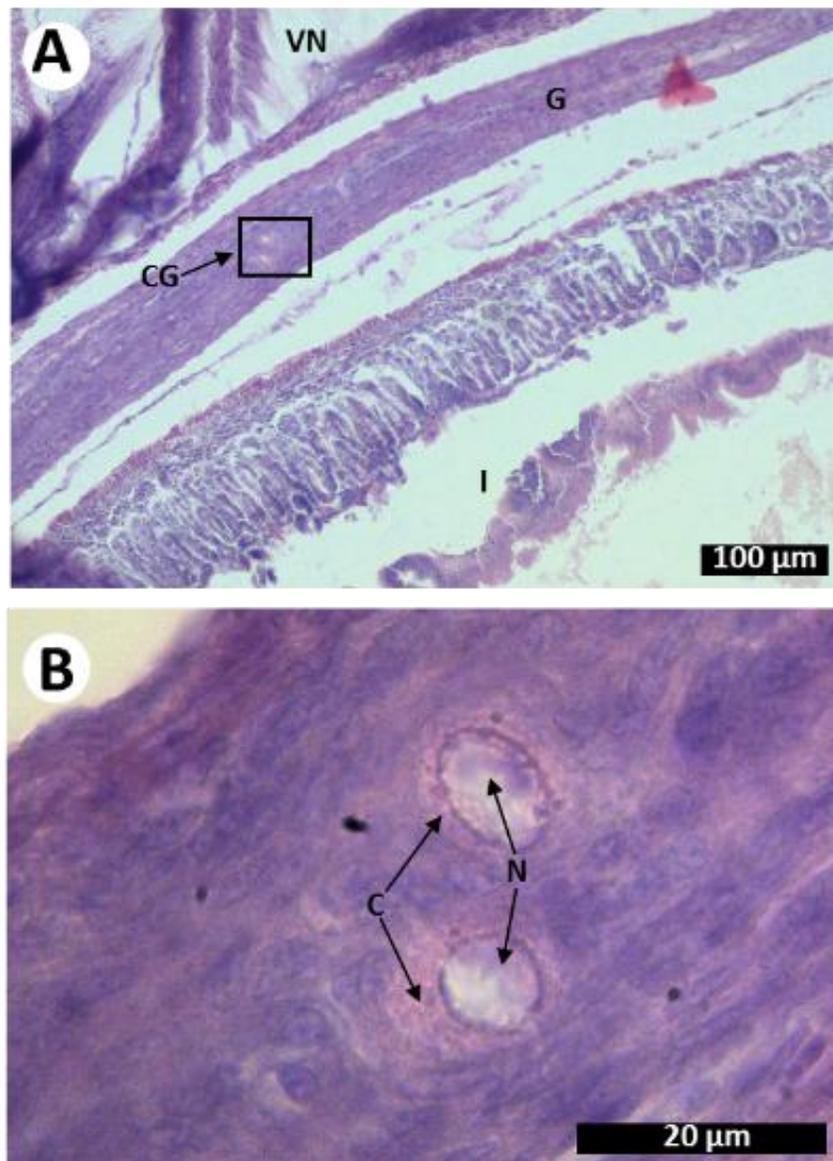


Figura 12. Corte sagital de *Totoaba macdonaldi* a los 44 DDE con 4.4 cm de longitud total. A. La gónada ha aumentado en longitud y ancho. **B.** Detalle de células germinales en la gónada, se observan las principales características morfológicas. **C:** citoplasma, **CG:** célula germinal, **I:** intestino, **G:** gónada, **N:** núcleo, **VN:** vejiga natatoria.

3.1.5 51 DDE (Longitud total de 6.3 a 8 cm)

Al analizar los cortes transversales de la sección b del pez (Figura 13) se observó que las gónadas se encuentran dispuestas a los lados de la vejiga natatoria y suspendidas de la pared del peritoneo por el mesogonio, una está cercana al hígado mientras que la otra lo está del intestino. Es evidente que la vejiga natatoria ocupa un espacio considerable dentro de la cavidad abdominal.

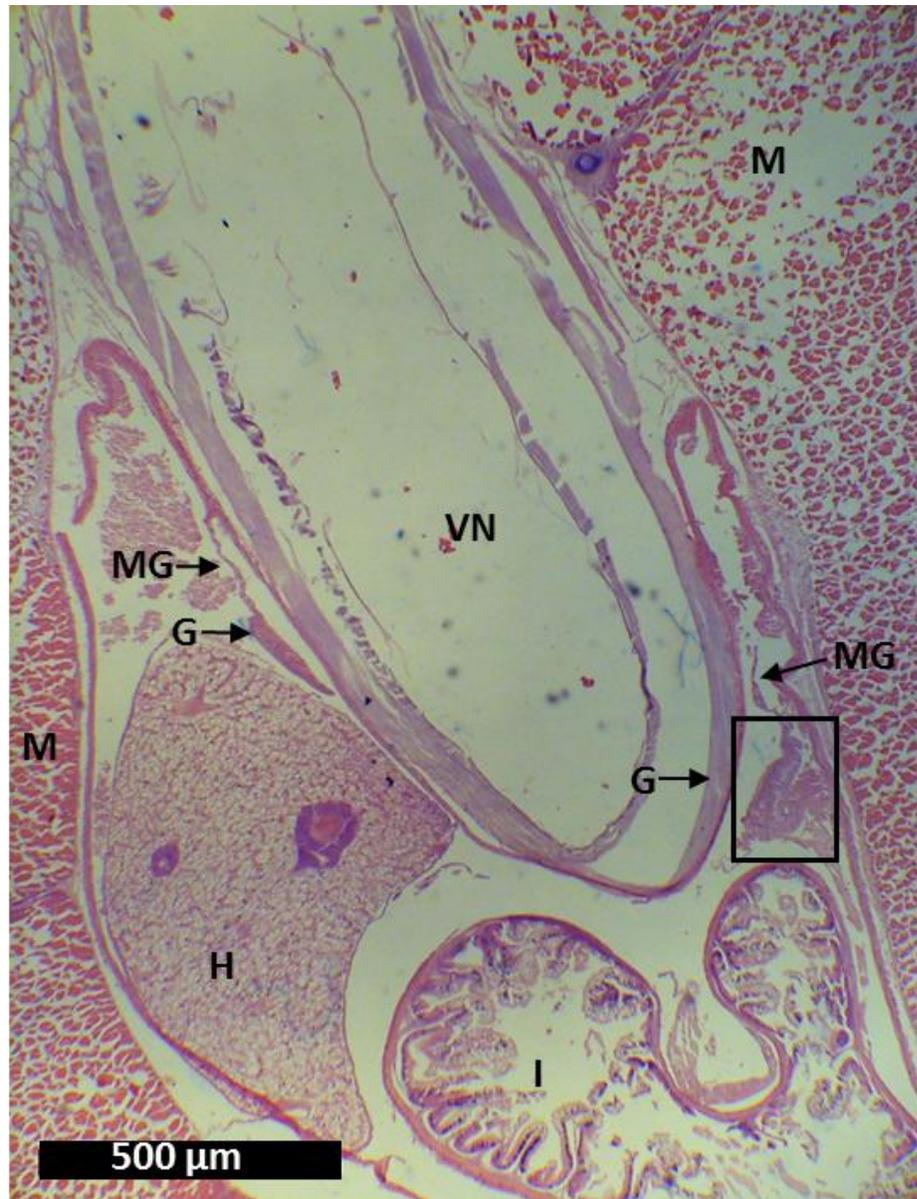


Figura 13. Corte transversal (sección b) de *Totoaba macdonaldi* a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total. Se muestran algunos de los órganos que se encuentran en la región abdominal y la posición de las gónadas. El cambio en la morfología de las gónadas se hace más evidente. **G:** gónada, **MG:** mesogonio, **H:** hígado, **I:** intestino, **M:** músculo, **VN:** vejiga natatoria

En esta etapa del desarrollo se consideró que la gónada se encontraba en proceso de diferenciación; la gónada tiene cambios evidentes en la morfología y se pueden distinguir fácilmente los principales vasos sanguíneos. En la región media de una de las gónadas, se observó que en sus extremos dorsal y ventral, se desarrollan dos elongaciones de tejido somático que se orientan hacia la pared peritoneal, posteriormente estas elongaciones se fusionaran entre sí para formar la cavidad ovárica (Figura 14). También, existe una diferencia con respecto a la organización de las células somáticas que rodearan a la futura cavidad ovárica, donde se albergará el tejido germinal, y las células somáticas que conforman el resto de la gónada.

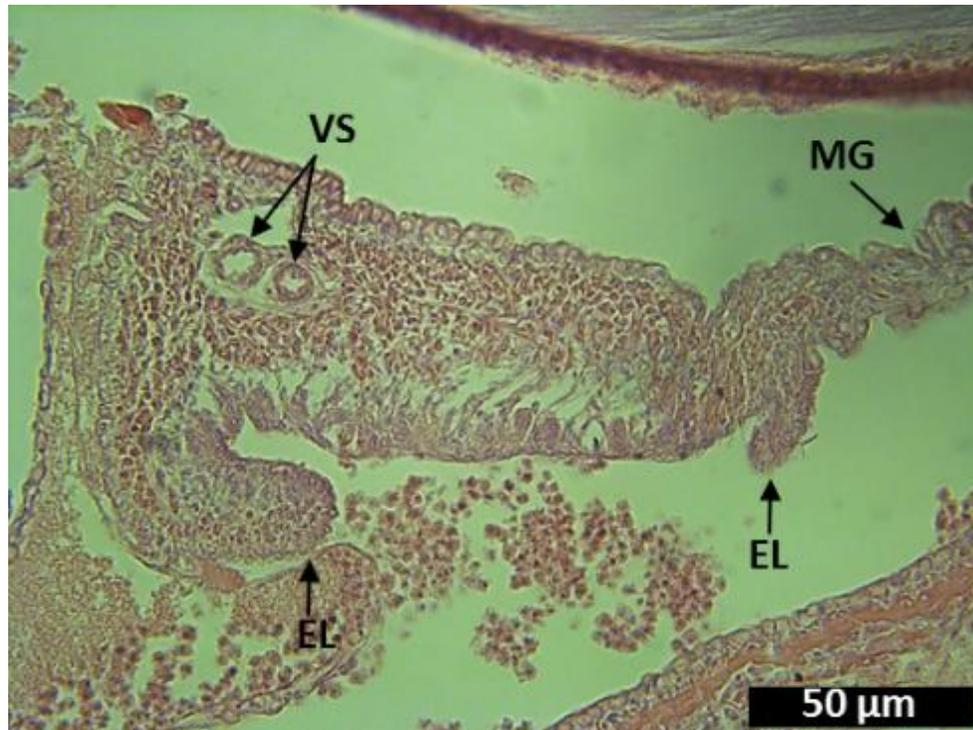


Figura 14. Detalle del corte transversal de la gónada (sección b) de *Totoaba macdonaldi* a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total, en etapa de diferenciación. Se pueden observar los vasos sanguíneos y las elongaciones de tejido somático que eventualmente formaran la cavidad ovárica. **EL:** elongación, **MG:** mesogonio, **VS:** vasos sanguíneos.

En las secciones transversales de la región anterior de la gónada, se encontró la primera evidencia de diferenciación sexual (Figura 15). En ambas gónadas las elongaciones de tejido somático ya se encontraban fusionadas formando la cavidad ovárica, espacio ubicado en la parte central de la gónada (Figura 16. A y B), probablemente la formación de la cavidad ovárica comienza en la región anterior de la gónada y se extiende de forma progresiva hacia la región caudal del organismo.

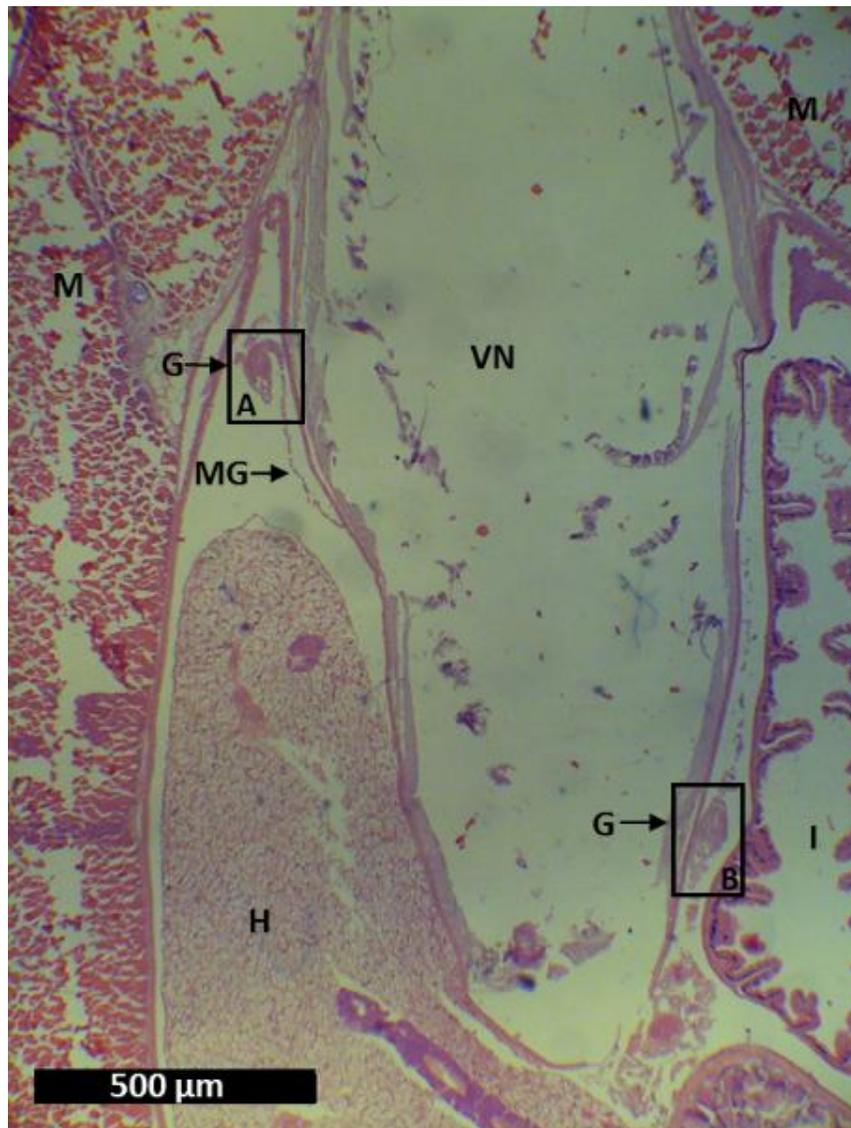


Figura 15. Corte transversal (sección a) de *Totoaba macdonaldi* a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total. Se observan algunos órganos además de la ubicación de las gónadas, las elongaciones de tejido somático ya se encuentran fusionadas. G: gónada, H: hígado, I: intestino, MG: mesogonio, M: músculo, VN: vejiga natatoria.

Aunque no se observaron indicios de células germinales diferenciadas. Las gónadas que mostraron este patrón de desarrollo se consideraron como ovarios. Hasta esta etapa del desarrollo (51 DDE) no se observaron indicios de diferenciación testicular.

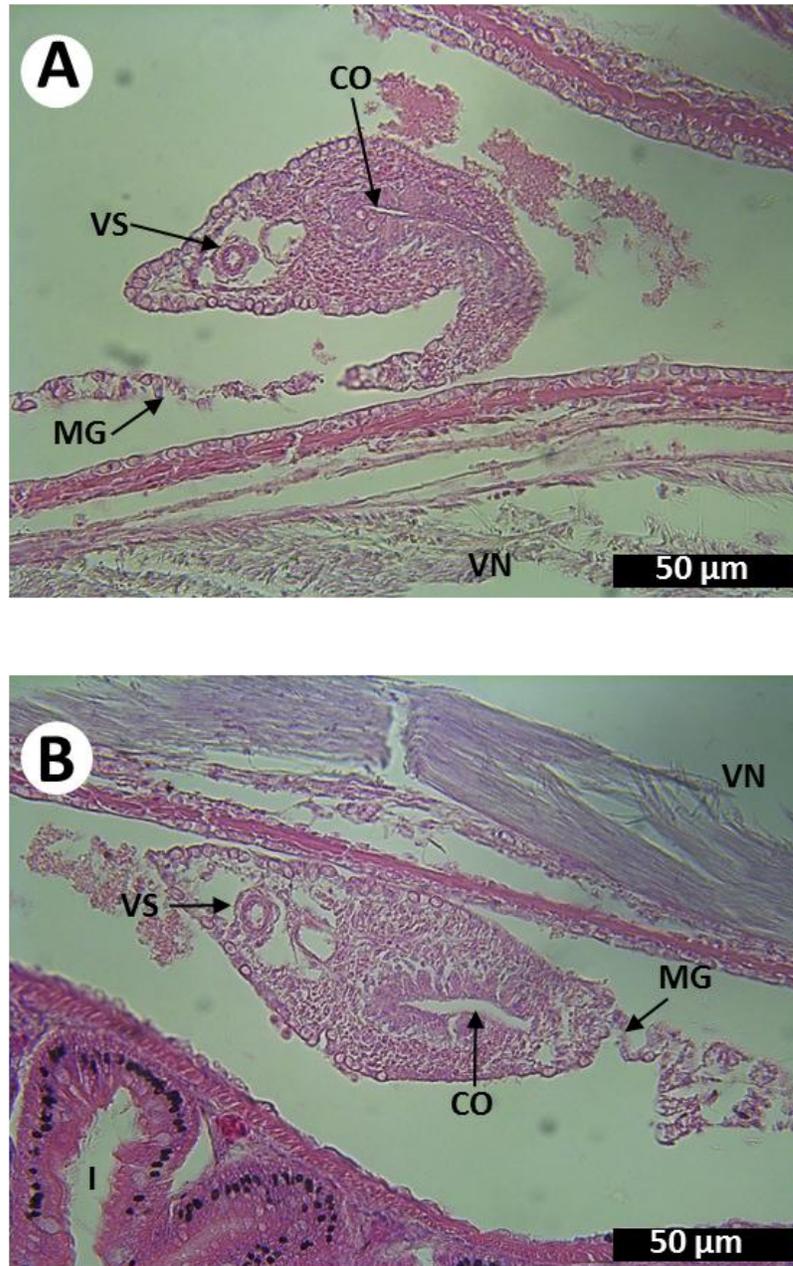


Figura 16. Detalle del corte transversal (sección a) de las gónadas diferenciadas de *Totoaba macdonaldi* a los 51 DDE con 6.8 cm de longitud total. Se aprecia que las elongaciones de tejido somático ya se han fusionado formando la cavidad ovárica. CO: cavidad ovárica, MG: mesogonio, VN: vejiga natatoria, VS: vaso sanguíneo.

3.1.6 69 DDE (Longitud total de 8.4 a 9.7 cm)

A los 69 DDE la estructura de la gónada es muy parecida a la etapa anterior, en la figura 17. A, se observa el vaso sanguíneo principal así como la cavidad ovárica, mientras que en la otra gónada las elongaciones

de tejido somático aún no se habían fusionado (Figura 17. B). Asimismo, en los cortes de la región anterior (sección a) se observa que la cavidad ovárica ya estaba formada en ambas gónadas.

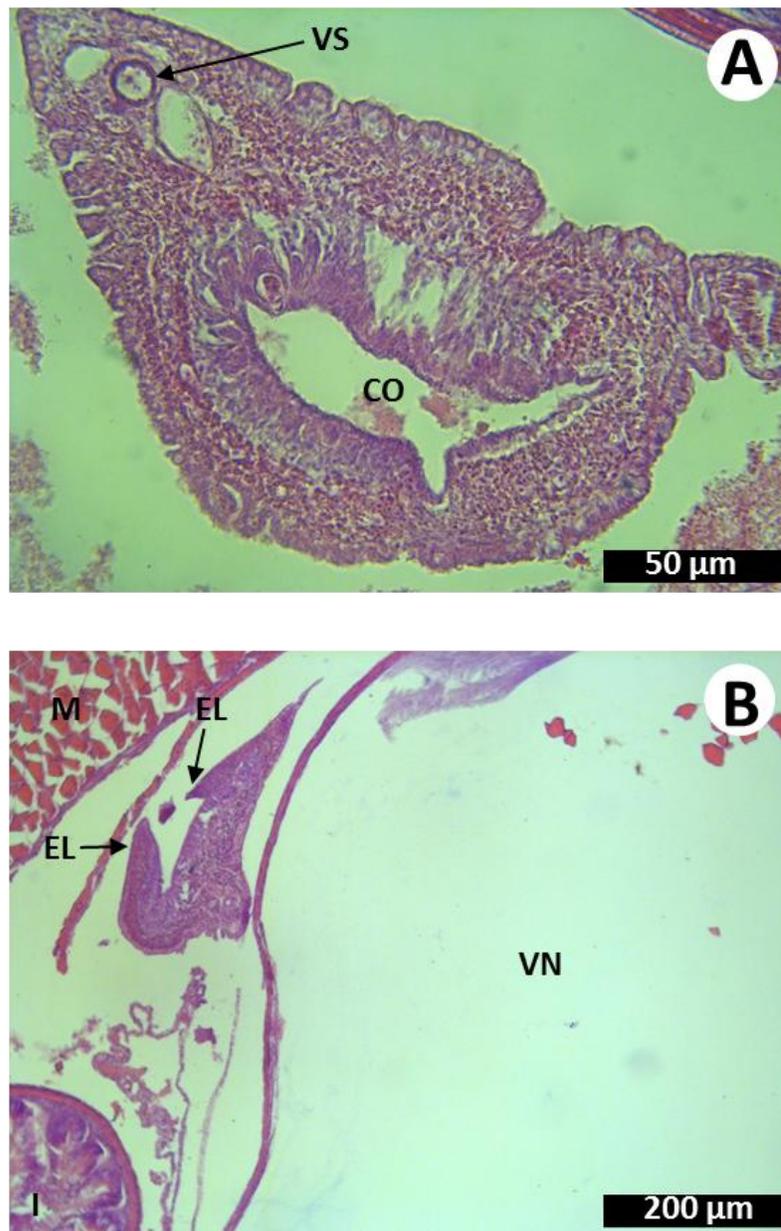


Figura 17. Corte transversal (sección b) de las gónadas de *Totoaba macdonaldi* a los 69 DDE con 9.5 cm de longitud total. A. Detalle de la gónada en la que se ha formado la cavidad ovárica. **B.** Detalle de la gónada en donde las elongaciones de tejido somático aún no se han fusionado. **CO:** cavidad ovárica, **EL:** elongación, **M:** músculo, **VN:** vejiga natatoria, **VS:** vaso sanguíneo.

La organización de los elementos somáticos de la gónada se mantiene, las células que rodean la cavidad ovárica se aprecian más compactas que en el resto de la gónada donde las células están más separadas entre sí. No se observaron células germinales diferenciadas.

3.1.7 85 DDE (Longitud total de 10.4 a 13 cm)

Uno de los organismos analizado a los 85 DDE mostraron el patrón de desarrollo característico para la formación de la cavidad ovárica, por lo tanto, se identificó como hembra. En la figura 18 se puede apreciar que el tejido gonadal es más elongado que en etapas anteriores; este corte corresponde a una sección muy posterior (cercano a la sección C) donde las elongaciones aún no se encuentran fusionadas. También, se analizaron secciones anteriores de la gónada, pero debido al tamaño y desorganización de los órganos no se pudieron identificar.

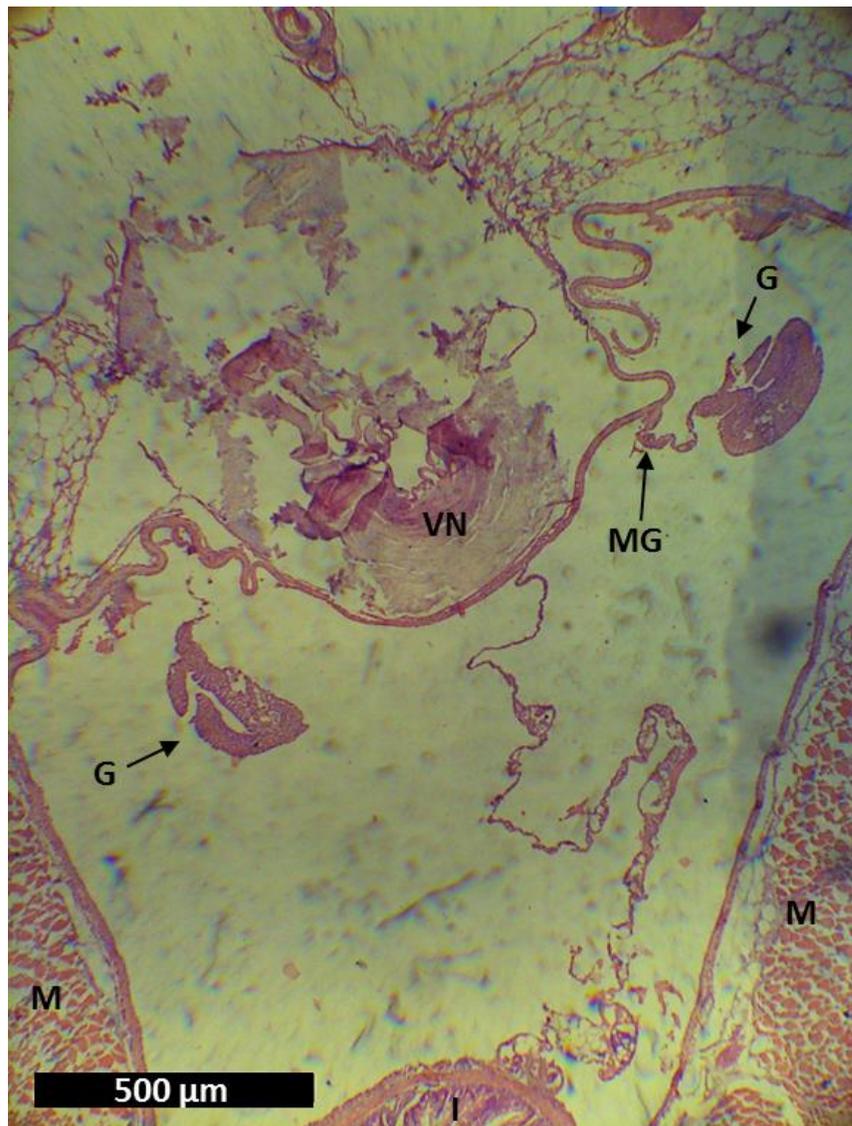


Figura 18. Corte transversal (sección b) de *Totoaba macdonaldi* a los 85 DDE con 13 cm de longitud total. Se observa el patrón de desarrollo correspondiente a la formación de la cavidad ovárica. **G:** gónada, **I:** intestino, **M:** músculo, **MG:** mesogonio, **VN:** vejiga natatoria.

En etapas anteriores no se había identificado un patrón de desarrollo diferente al descrito para las hembras. Fue en un ejemplar de 85 DDE, de 12.3 cm de longitud total, que se observaron las gónadas sin elongaciones, ni cavidad ovárica. Las células somáticas que se encuentran en el borde de la gónada son redondeadas y de gran tamaño, el núcleo se localiza en la periferia (similares a las observadas en el extremo distal de la gónada a los 41 DDE), mientras que las células somáticas que se localizan en el centro de la gónada son más pequeñas y de forma irregular. No se tiene la certeza si este patrón corresponde a la diferenciación testicular ya que al analizar diversas secciones de la gónada, no fue posible identificar la formación del conducto eferente ni la presencia de espermatogonias.

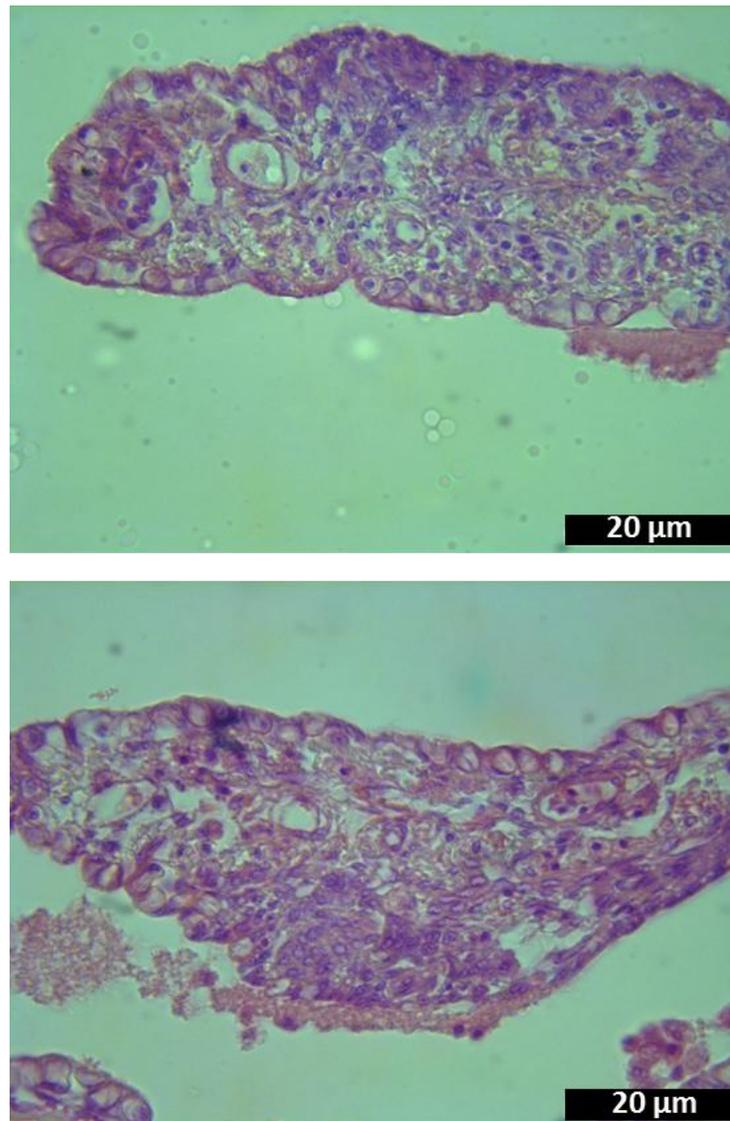


Figura 19. Corte transversal (sección b) de las gónadas de *Totoaba macdonaldi* a los 85 DDE con 12.3 cm de longitud total. El patrón de desarrollo no se había observado anteriormente, probablemente corresponde a la diferenciación testicular.

3.1.8 100 DDE (Longitud total de 12.5 a 15.5 cm) y 161 DDE (Longitud total de 16.1 a 18.5)

En un organismo de 100 DDE, de 15 cm de longitud total, solo en una de las gónadas se observó una cavidad en el centro, en la otra gónada no se observó ningún intersticio. Por otra parte, un ejemplar de 161 DDE y 16.5 cm de longitud total, ambas gónadas carecían de intersticios, similares lo observado en un organismo de 85 DDE y 12.3 cm de longitud total. En esta etapa no se logró identificar el posible sexo de los organismos debido a que no se pudieron observar las características de las células que se encontraban en el tejido germinal, posiblemente el proceso de descalcificación deterioró el tejido y causó alguna interferencia con la tinción de las células. Aunado a esto, debido al tamaño de los organismos fue difícil obtener cortes histológicos de una calidad adecuada, ya que la mayoría se rompía, lo que impidió una clara definición de las estructuras.

3.1.9 Ovarios

Los ovarios diferenciados se identificaron en una hembra de aproximadamente 15 meses de edad. Se identificaron como órganos alargados pares, delgados, ubicados dentro de la cavidad peritoneal, unidos a la pared peritoneal por el mesovario, en la comisura formada entre el peritoneo y la vejiga natatoria, su coloración era ligeramente rosada (Figura 20).

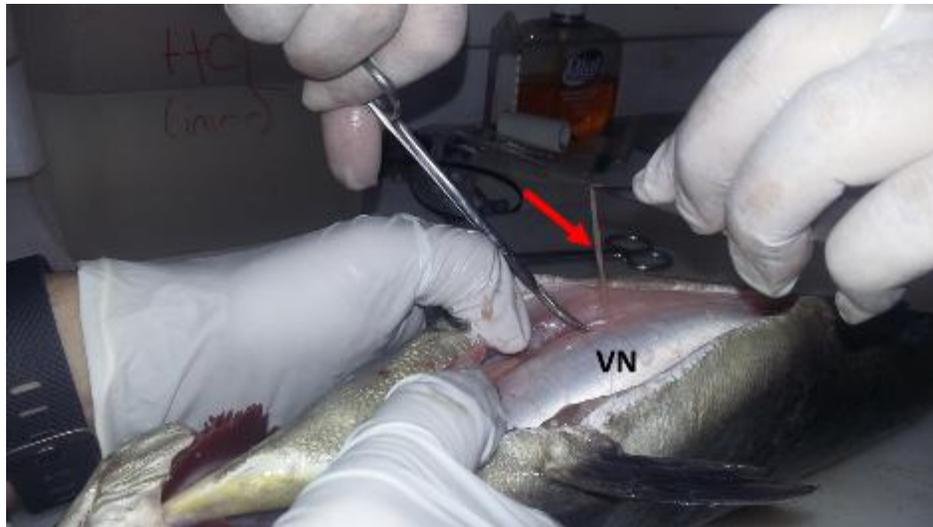


Figura 20. Ubicación de las gónadas (flecha roja) de *Totoaba macdonaldi* en la cavidad peritoneal, adyacentes a la vejiga natatoria. **VN:** vejiga natatoria

En los cortes sagitales de la gónada, se identificó la pared del ovario y el estroma ovárico que se extiende hacia el interior del órgano, en este último se encuentran alojadas las células germinales, ovogonias, ovocitos y algunas células somáticas que posteriormente se diferenciarán en células la teca y de la granulosa (Figura 21 A). En el estroma ovárico se observaron ovogonias, estas células se dividirán por mitosis y posteriormente entran en meiosis. Además, se encontraron ovocitos previtelogénicos con abundante citoplasma basófilo. Los ovocitos primarios (estadio I) presentan un nucléolo grande, mientras que los ovocitos perinucleolares (estadio II), presentan un núcleo redondo y numerosos nucléolos pequeños cercanos a la membrana nuclear (Figura 21 B).

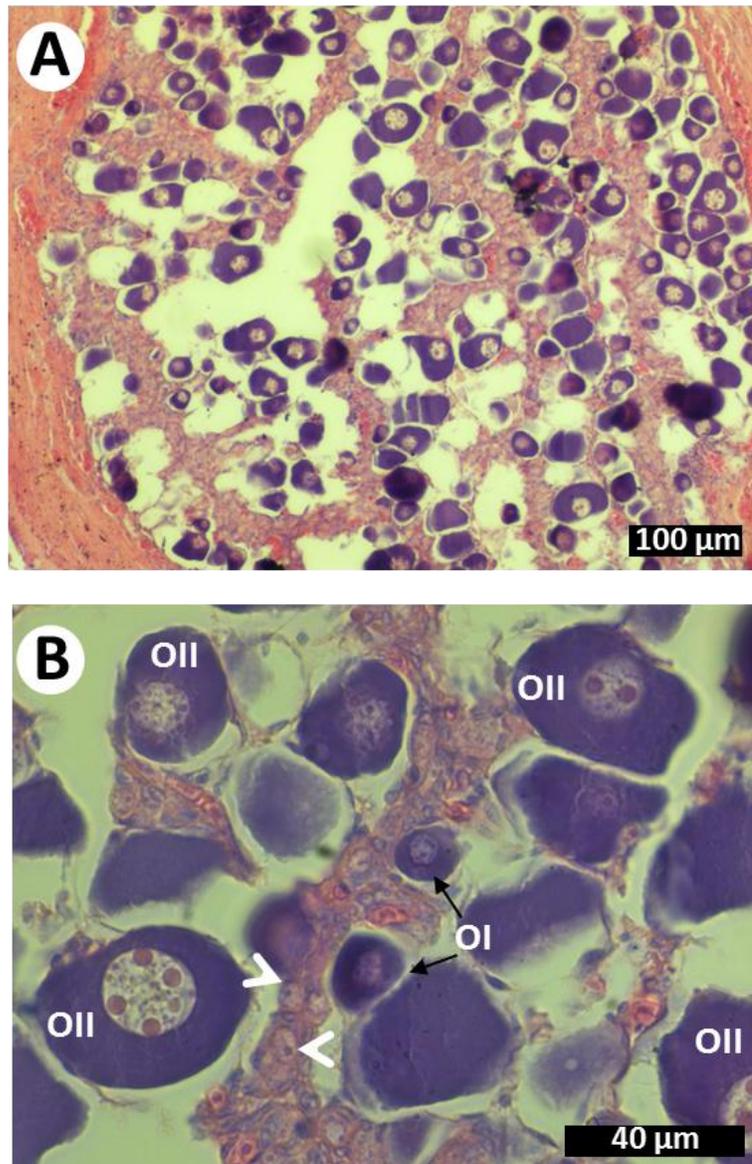


Figura 21. Ovario de *Totoaba macdonaldi* de aproximadamente 15 meses de edad. A. Corte sagital de un ovario, se observan la pared y el estroma ovárico. **B.** Detalle del estroma ovárico compuesto por células germinales y ovocitos en distintas fases de desarrollo. **Flechas blancas:** ovogonias, **OI:** ovocitos primarios (estadio I), **OII:** ovocitos perinucleolares (estadio II).

3.1.10 Testículos

Los testículos diferenciados se identificaron en un macho de aproximadamente 15 meses de edad. Son órganos alargados pares, delgados, ubicados dentro de la cavidad peritoneal, unidos a la pared peritoneal por el mesorquio, adyacentes a la vejiga natatoria, con una coloración blanquecina. A nivel histológico presentan un arreglo de tipo lobular y no se observó el conducto eferente (Figura 22 A).

En el interior del testículo, se encontraron células germinales y lóbulos o cistos conformados por espermatogonias, similares a las células germinales, que poseen un núcleo grande y un nucléolo, estas células se dividirán de forma sincrónica. Alrededor de los lóbulos se encuentran células somáticas de forma irregular que probablemente se diferenciarán en las células de Sertoli. Los lóbulos se encuentran bien definidos y rodeados por trabéculas de tejido conectivo (Figura 22 B).

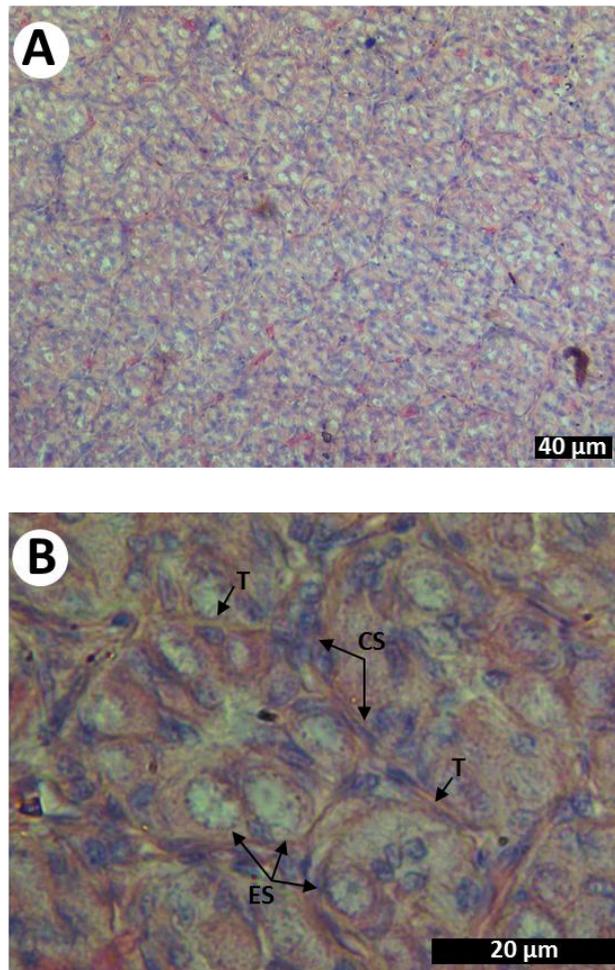


Figura 22. Testículo de *Totoaba macdonaldi* de aproximadamente 15 meses de edad. A. Corte sagital de un testículo. **B.** Detalle del testículo, se observan lóbulos compuestos por espermatogonias rodeadas de células somáticas y separados por trabéculas. **CS:** células somáticas, **ES:** espermatogonias, **T:** trabéculas.

3.2 Obtención de secuencias del gen *cyp19a* y genes de referencia de *Totoaba macdonaldi*

3.2.1 Aislamiento y secuenciación del cDNA de *cyp19a* y genes de referencia de *T. macdonaldi*

3.2.1.1 Cantidad y calidad de RNA total de organismos adultos

El RNA total extraído de las muestras de bazo, hígado y gónadas (ovario y testículo) de adultos de *T. macdonaldi* (15 meses de edad) en general fue de buena calidad. La concentración promedio de RNA total extraído fue de $2542.25 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 2200.36 \text{ ng}/\mu\text{L}$, la concentración mínima fue de $639.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y la máxima fue de $5535.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$. El valor mínimo de la relación de absorbancia $A_{260/280}$ (presencia de proteínas) fue de 1.84 y el máximo de 1.94. Los valores máximo y mínimo de la relación $A_{260/230}$ (presencia de solventes) fue de 0.29 y 1.15., respectivamente.

3.2.1.2 Obtención de secuencias de *cyp19a* y genes de referencia de *T. macdonaldi*

Los iniciadores para la obtención de secuencias de los genes de referencia se probaron con cDNA de bazo, hígado y testículo. En la figura 23 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR de *cyp19a* y de los siete genes de referencia, utilizando cDNA de la gónada de hembra y de bazo, respectivamente. En todos los casos se logró amplificar un único producto del tamaño esperado.

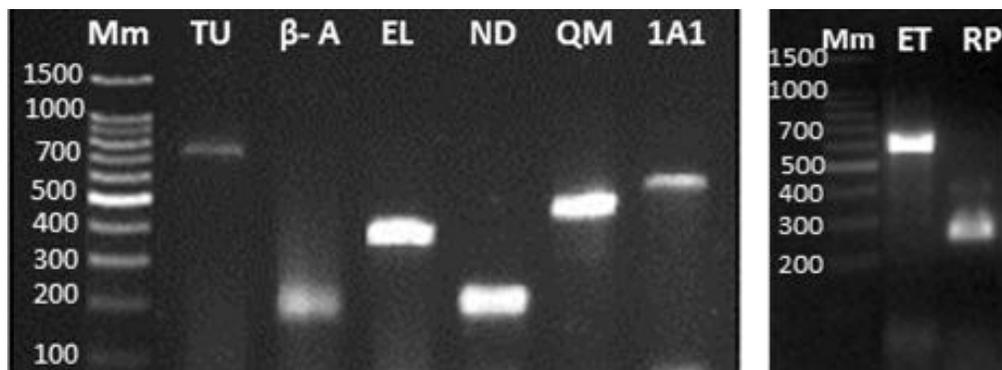


Figura 23. Productos de PCR del gen *cyp19a* y siete genes de referencia, obtenidos a partir de cDNA de la gónada de hembra y de bazo, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 70 min en solución amortiguadora TBE 1X. TU: *tubb*, beta-A: *actb*, EL: *EF1A*, ND: *ND1*, QM: *QM-like*, ET: *eTIF3g*, RP: *RPS35*, 1A1: *cyp19a*, Mm: marcador molecular de 100 pb.

Estos productos de PCR se purificaron y enviaron a secuenciar. En todos los casos se recuperó el segmento de cDNA donde había un 100% de coincidencia entre los nucleótidos de las secuencias sentido (forward) y antisentido (reverse) por lo que el tamaño de las secuencias reportadas son de menor tamaño que el fragmento de cDNA aislado. Las secuencias obtenidas se registraron en GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson *et al.*, 2013). A continuación se presentan las secuencias de *T. macdonaldi*, se describen y resumen los resultados de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) respecto a su identidad con secuencias homólogas de otros teleósteos y para los genes de referencia se incluye una breve descripción de su función biológica.

Aromatasa gonadal (*cyp19a*):

La secuencia parcial de cDNA de la aromatasa gonadal de *T. macdonaldi* fue de 401 pb (Figura 24) y estaría ubicada en la parte terminal de la región codificante del gen. *Tmcy19a* comparte 98 a 96% de identidad con las cuatro secuencias de aromatasa de peces de la familia Sciaenidae reportadas en GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson *et al.*, 2013): *Larimichthys crocea* (acceso a GenBank NM 001303347.1), *Micropogonias undulatus* (acceso GenBank DQ184486.1), *Pennahia argentata* (acceso GenBank LC317123.1) y *Nibea mitsukurii* (acceso GenBank LC317122.1).

```

1      CAGAAGAGGAGAGATATGGAGCAGGCTGATAAACTGGACAACATCAACTTCACAGCAGAG
61     CTCATATTCGCACAGAACCATGGCGAGCTGTCTGCAGAGAATGTGAGGCAGTGTGTGTTG
121    GAGATGGTGATCGCAGCACCAGACACTCTGTCCATCAGCCTCTTCTTCATGCTGCTGCTC
181    CTAAAGCAGCATCCAGATGTGGAGCTGCAGCTGCTGGAGGAGATAGACACAGTTGTAGGT
241    GAGAGACAGCTTCAGAACGGGGACCTTCAGAAGTTGCAGGTGCTGGAGAGTTTCATCAAC
301    GAATGCTTGCGTTTCCACCCTGTGGTGGACTTCACCATGCGTCGAGCCCTGTCTGATGAC
361    ATCATTGACGGCTACAGGTTACCGAAGGGCACAAATATCAT

```

Figura 24. Secuencia parcial del cDNA del gen *cyp19a* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG944245).

tubb

La β -tubulina, codificada por el gen *tubb*, es una proteína globular que forma un heterodímero con la α -tubulina uniéndose longitudinalmente para formar protofilamentos que a su vez se polimerizan y forman microtúbulos. Estos tienen numerosas funciones: forman parte del citoesqueleto de todas las células eucariotas controlando su morfología y motilidad, intervienen en el tránsito de vesículas y de otros componentes celulares, forman el huso mitótico para la segregación equitativa de las cromátidas y son componentes esenciales de la estructura y función de cilios y flagelos (Cleveland y Sullivan, 1985; Fanarraga *et al.*, 2008; Alberts *et al.*, 2009).

La secuencia parcial de cDNA de β -tubulina de *T. macdonaldi* fue de 300 pb (Figura 25) y está ubicado hacia el final de la región codificante del gen. Esta secuencia de nucleótidos tiene un 98% de identidad con las dos únicas secuencias de β -tubulina de sciaenidos en GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson *et al.*, 2013): *Sciaenops ocellatus* (acceso a GenBank JX002672.1), *Larimichthys crocea* (acceso GenBank XM 019264431.1). La identidad con secuencias de otros teleósteos es $\leq 93\%$.

```

1      CGGTGACCTCAACCACTTGGTCTCTGCCACCATGAGCGGTGTCACTACCTGCCTCAGGTT
61     CCCTGGACAGCTCAACGCTGATCTGAGGAAGCTGGCTGTAAACATGGTGCCATTCCCCCG
121    TCTGCACTTCTTCATGCCAGGATTTGCTCCACTCACAAGCAGGGGCAGCCAGCAGTACAG
181    ATCACTCACCGTGCCAGAGCTCACCCAGCAGATGTTGACTCAAAGAACATGATGGCCGC
241    CTGCGACCCACGTCACGGCCGTTACCTGACAGTGGCTGCCATCTTCCGAGGACGCATGTC

```

Figura 25. Secuencia parcial del cDNA del gen *tubb* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG944246).

actb

La β -actina es una proteína globular citoplasmática altamente conservada que se encuentra en la mayoría de las células eucariotas no musculares y cuya polimerización forma microfilamentos, elemento crítico del citoesqueleto. Los microfilamentos pueden ensamblarse y desensamblarse rápidamente según necesidades de la célula y median la adhesión y la motilidad celular (Cleveland *et al.*, 1980; Tondeleir *et al.*, 2009).

La secuencia parcial de cDNA de β -actina de *T. macdonaldi* fue de 114 pb (Figura 26). Se encontró un 100%

de identidad con la β -actina de 16 teleósteos pertenecientes a diversas familias y 99-98% con otras 75 especies. Las seis primeras especies de esta lista corresponden a: *Larimichthys crocea* (acceso GenBank FJ436084.1), *Sciaenops ocellatus* (acceso GenBank KC795558.1), *Argyrosomus regius* (acceso GenBank KM402038.1), *Scomberomorus niphonius* (acceso GenBank KT009015.1), *Scatophagus argus* (acceso GenBank KF649214.1), y *Thunnus maccoyii* (acceso GenBank JX157141.1).

```

1   CCATGAAGATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCT
61  CCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGT

```

Figura 26. Secuencia parcial del cDNA del gen *actb* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG966521).

EF1A

El gen *EF1A* codifica una proteína perteneciente a la familia de las GTPasas, son de las proteínas más abundantes en las células eucariotas y tiene numerosas funciones. EF1A es una subunidad del factor de elongación 1 (EF1) el cual durante la biosíntesis de proteínas promueve la unión dependiente de GTP-aminoacil-tRNA con el sitio A de la subunidad 80S del ribosoma. Además, EF1A participa en la organización del citoesqueleto, formación del aparato mitótico y transducción de señales (Riis *et al.*, 1990; Negrutskii y Elskay, 1998; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9YIC0>).

La secuencia parcial de cDNA del gen *EF1A* de *T. macdonaldi* fue de 212 pb (Figura 27) y comparte un 96% de identidad con *Argyrosomus regius* (acceso GenBank MF186586.1) y *Sciaenops ocellatus* (acceso GenBank KJ958539.1), 95 % con *Larimichthys crocea* (acceso GenBank JX002674.1) y 94% con *Lutjanus guttatus* (acceso GenBank KJ908186.1).

```

1   CGCTCAGGTCATCATCCTGAACCACCCTGGCCAGATCTCCCAGGGTTACGCTCCCGTGCT
61  GGATTGCCACACAGCTCACATTGCCTGCAAGTTCAGCGAGCTCATCGAGAAGATCGACCG
121 TCGTTCTGGCAAGAAGCTTGAGGACGCACCCAAATTCGTCAAGTCTGGTGATGCTGCCAT
181 TGTCAAACCTCATTCCACAGAAGCCCATGGTTG

```

Figura 27. Secuencia parcial del cDNA del gen *EF1A* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG966522).

ND1

ND1 es un gen mitocondrial y forma parte del complejo enzimático NADH deshidrogenasa (complejo 1), el cual opera la membrana interna de la mitocondria y cataliza el primer paso en la cadena transportadora de electrones (Dupuis *et al.*, 2001; Hirst, 2013).

La secuencia parcial del cDNA del gen *ND1* de *T. macdonaldi* fue de 143 pb (Figura 28) comparte un 99% de identidad con el gen *ND1* de *Sciaenops ocellatus* (acceso GenBank JX002676.1), 95% con el de *Larimichthys crocea* (acceso GenBank XM 010738333.2) y un 93% con el de *Epinephelus bruneus* (acceso GenBank JN216992.1).

```

1    ACAGCTACCGGCTACAGTTGTGGATGTACACCATGAGGCTGCTCCAGTACGCTGACGCCA
61   TCGAACACCTGCTCACCACAGGCCAAGGTGTGGTGTGGAGCGTTCTCCCTTCAGCGACA
121  TGGTCTTCCTGGAGGCCATGTTA

```

Figura 28. Secuencia parcial del cDNA del gen *ND1* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG966524).

QM-like

Este gen pertenece a la familia L10 de proteínas ribosomales y es necesaria para la unión de las subunidades 40S y 60S. Su secuencia está muy conservada; entre levaduras y humanos hay una diferencia de solo de solo 33%, lo cual es indicativo de la importancia estructural y funcional de esta proteína en el ensamblaje y función del ribosoma (Klauck *et al.*, 2006).

La secuencia parcial del cDNA del gen *QM-like* de *T. macdonaldi* fue de 308 pb (Figura 29) y comparte 99% de identidad con *Sciaenops ocellatus* (acceso GenBank FJ455762.1) y *Larimichthys crocea* (acceso GenBank NM 001303391.1) y 97% con *Seriola dumerili* (acceso GenBank XM 022765962.1).

```

1    TGGAGGCTGCCCCGTATCTGTGCTAACAAAGTACATGGTGAAGACCTGCGGTAAGGATGGTT
61   TCCACATCCGCATGCGTCTGCATCCCTTCCACGTCATCCGCATCAACAAAATGTTATCCT
121  GTGCTGGAGCTGATAGGCTCCAGACTGGAATGCGTGGTGTCTTTTGGTAAACCCCAGGGCA
181  CCGTGGCCCGTGTGCACATTGGTCAGGTGATCATGTCCGGTCCGTACCAAGGCCCAGAACA
241  AGGAGCATGTGGTTCGAGGCTCTGCGCACAGCCAAGTTCAAGTTCCTGGACGCCAGAAGA
301  TCCATATT

```

Figura 29. Secuencia parcial de cDNA del gen *QM-like* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG966523).

RSP35

La proteína codificada por este gen es parte integral de los ribosomas que actúan dentro de las mitocondrias. Los ribosomas mitocondriales están formados por las subunidades 28S y 39S y los RNA mitocondriales 12S y 16S. *RPS35* está asociada a la subunidad 28S (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MRPS35>).

La secuencia parcial del cDNA del gen *RPS35* de *T. macdonaldi* fue de 118 pb (Figura 30) y comparte un 100% de identidad con las secuencias de *Sciaenops ocellatus* (acceso GenBank JX002673.1), 97% con la de *Larimichthys crocea* (acceso GenBank XM 019265791.1) y 93% con la de *Lates calcarifer* (acceso GenBank XM 018675952.1).

```

1   CCCTTCAGACAGGGCTCCATCCCCCTACCTGTGAGGATGGGCTACCCTGTGAAGGGAGGC
61  GTTCCTCCAGAGAAGAAGGGCAACTTGGAGCTGATCAAGATACCTAATTTTCTGCATT

```

Figura 30. Secuencia parcial del cDNA del gen *RPS35* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG966525).

eTIF3g

La proteína eTIF3g es una de las 13 subunidades que conforman el complejo eTIF3 o factor de iniciación de la traducción en eucariotas 3 (eTIF3). Este complejo, junto con otros factores de iniciación, forman un complejo con la subunidad 40S ribosomal y del complejo ternario eIF2: GTP: metionil-tRNA^{Met}, denominado factor de pre iniciación 43S cuya función es el escaneo del mRNA en búsqueda del codón de inicio AUG. Esto también evita la unión de las subunidades ribosómicas 40S y 60S antes de que se inicie la traducción. Además eTIF3 se requiere para desensamblar y reciclar los complejos ribosómicos post-traduccionales (Choudhuri *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Masutani *et al.*, 2007; <http://www.uniprot.org/unirule/UR000106208>).

La secuencia parcial del cDNA del gen *eTIF3g* de *T. macdonaldi* fue de 312 pb (Figura 31), comparte un 97% de identidad con *Larimichthys crocea* (acceso GenBank XM 010730343.2), con *Sciaenops ocellatus* (acceso GenBank JX002675.1) y 94% con *Acanthochromis polyacanthus* (acceso GenBank XM 022214656).

1 GAGGACTTGAATGCCCAAGACCAGGATGAGGATCCAATGAACAAACTAAAAGGGCAGAAG
61 ATCGTGTCTTGTTCGTATTTGCAAAGGCGACCATTGGACCACCCGCTGTCCGTACAAGGAC
121 ACCCTGGGCCCCATGCAGAAGGAGTTGGCTGAACAGCTTGGGCTTTCCACTGCAGACAAG
181 GAGAAGCCTGCTGGCTCTGCGGAACCAGAGCCTGCACAGCCTGCGCAGAGCAAGACTGGA
241 AAGTATGTGCCCCCGAGCCTGAGGGATGGAGGCACCCGAAGAGGGGAGTCCATGCAGCCC
301 AACCGCAGAGGT

Figura 31. Secuencia parcial del cDNA del gen *eTIF3g* de *Totoaba macdonaldi* (acceso GenBank MG966526).

Con las secuencias de cDNA de la totoaba se diseñaron los iniciadores específicos (Tabla 2). En la figura 32 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR de *cyp19a* y de los genes de referencia, excepto *actb*, usando cDNA de la gónada de hembra de *T. macdonaldi*.

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores específicos de *Totoaba macdonaldi* para la amplificación del gen *cyp19a* y de los genes de referencia.

Gen	Secuencias (5' → 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño esperado (pb)
<i>cyp19a</i>	F: AGGAGAGATATGGAGCAGGCT R: AGCAGCATGAAGAAGAGGCT	64.4	170
<i>tubb</i>	F: CATGAGCGGTGTCACCT R: GCACCATGTTTACAGCCAGC	64.4	80
<i>actb</i>	F: AGATCATTGCCCCACCTGAG R: ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	64.4	102
<i>EF1A</i>	F: AGATCTCCAGGGTTACGCT R: ACAATGGCAGCATCACCAGA	64.4	151
<i>ND1</i>	F: CCGGCTACAGTTGTGGATGT R: GACCATGTGCTGAAGGG	64.4	118
<i>QM-like</i>	F: CTGCATCCCTTCCACGTCAT R: CTCGACCACATGCTCCTTGT	64.4	180
<i>RPS35</i>	F: CCTTCAGACAGGGCTCCATC R: ATCTTGATCAGCTCCAAGTTGC	64.4	100
<i>eTIF3g</i>	F: CCATGCAGAAGGAGTTGGCT R: CTTTCCAGTCTTGCTCTGCG	64.4	113

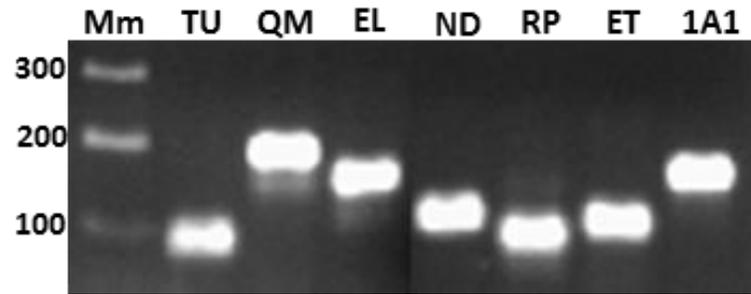


Figura 32. Productos de PCR del gen *cyp19a* y seis genes de referencia específicos de *Totoaba macdonaldi*, obtenidos a partir de cDNA de la gónada de hembra. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 75 min en solución amortiguadora TBE 1X. **TU:** *tubb*, **QM:** *QM-like*, **EL:** *EF1A*, **ND:** *ND1*, **RP:** *RPS35*, **ET:** *eTIF3g*, **1A1:** *cyp19a*. **Mm:** marcador molecular 100 pb.

3.3 Expresión del gen *cyp19a* en larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi*

3.3.1 Cantidad y calidad del RNA total de larvas y de juveniles

Las larvas y juveniles de *T. macdonaldi* poseen gónadas muy pequeñas lo que hace muy difícil disecarlas. Por esta razón, las extracciones de RNA total se hicieron de la región abdominal de los organismos. La concentración media del RNA total extraído fue de 2701.85 ng/ μ L \pm 1506.94 ng/ μ L, la concentración mínima de 488.1 ng/ μ L y la máxima de 5550.5 ng/ μ L. El valor mínimo de la relación de absorbancia $A_{260/280}$ (presencia de proteínas) fue de 1.84 y el máximo 1.99. El valor mínimo obtenido para la relación $A_{260/230}$ (presencia de solventes) fue 0.93 y el máximo 1.74.

3.3.2 Amplificación con los iniciadores específicos

Los iniciadores específicos se utilizaron para amplificar los fragmentos parciales del gen *cyp19a* y los genes de referencia. Para ello se utilizó una mezcla de cDNA de larvas y juveniles de todas las edades (29, 32, 36, 38, 41, 44, 47, 50 y 51 DDE). En la figura 33 se observa la amplificación con los tamaños esperados, donde para los genes *cyp19a*, *RPS35* y *eIF3g*, la cantidad de producto amplificado fue menor, a pesar que se empeló la misma cantidad de cDNA para todas las reacciones.

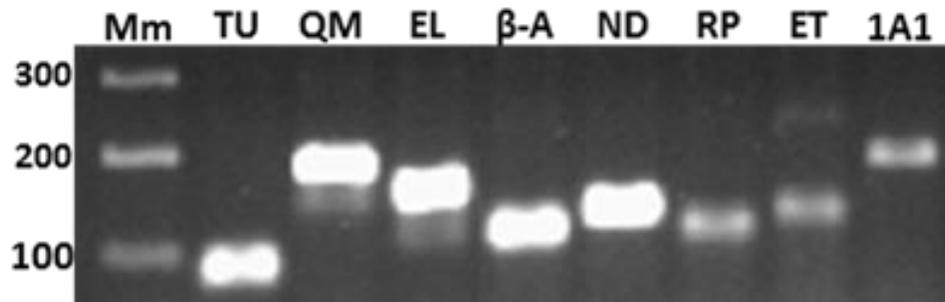


Figura 33. Productos de PCR del gen *cyp19a* y siete genes de referencia específicos de *Totoaba macdonaldi*, obtenidos a partir de la mezcla de cDNA de larvas y juveniles de todas las edades. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 75 min en solución amortiguadora TBE 1X. TU: *tubb*, QM: *QM-like*, EL: *EF1A*, β-A: *actb*, ND: *ND1*, RP: *RPS35*, ET: *eTIF3g*, 1A1: *cyp19a*. Mm: marcador molecular 100 pb.

3.3.3 Expresión del gen *cyp19a*

Para el estudio de la expresión relativa de la aromatasa gonadal (*Tmcyp19a*), mediante PCR, se seleccionó como gen de referencia interna la β-Tubulina (*Tmtubb*). En la figura 34 se observa el producto de las amplificaciones de ambos genes, realizadas con el cDNA individual de las larvas y juveniles.

El gen *Tmcyp19a* se expresó durante todos los estadios de desarrollo muestreados excepto en los juveniles identificados con los número 10 (38 DDE), 15 (41 DDE), 16 (44 DDE), 25 y 27 (51 DDE), mientras que el gen *Tmtubb* se expresó en todos los organismos. Respecto a las bandas inespecíficas que se observaron solo en las larvas y juveniles, obtenidas con los iniciadores del gen *Tmcyp19a*, principalmente en organismos menores a 38 DDE, es importante destacar que se hicieron pruebas de amplificación con diferentes condiciones de corrida, concentraciones de reactivos y gradientes de temperatura, pero no fue posible eliminarlas. Independientemente de esto, es claro que se logró amplificar el producto del tamaño esperado (170 pb) y que el nivel de expresión en los organismos fue diferente.

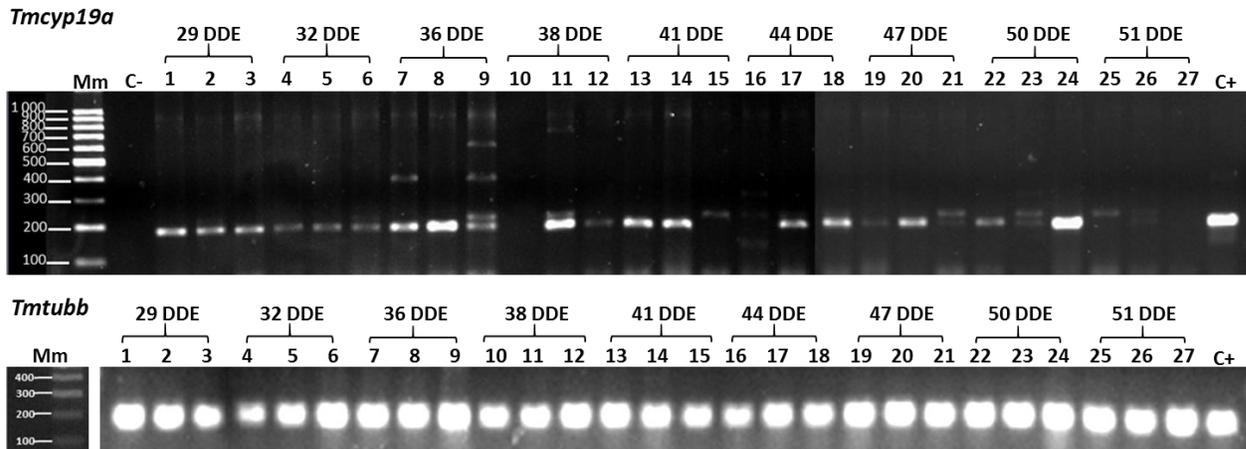


Figura 34. Expresión, en términos relativos, del gen *Tmcyp19a* (170 pb) en larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi* determinado mediante PCR, como referencia se utilizó el gen *Tmtubb* (80 pb). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 70 min en solución amortiguadora TBE 1X. Mm: marcador molecular 100 pb, C-: control negativo, C+: control positivo (cDNA de gónada de hembra), DDE: días después de la eclosión.

En los productos de PCR punto final las bandas de amplificación de *Tmcyp19a* en las que se detectó la mayor intensidad fueron de la gónada de hembra y del juvenil identificado en el gel de agarosa con el número 24 de 50 DDE, seguido de los juveniles etiquetados con los números 8, 11, 13, y 14 con edades de 36, 38 y 41 DDE.

En la figura 35 se observan los niveles de expresión, en términos relativos, del gen *Tmcyp19a* en larvas y juveniles, estimada como la razón *Tmcyp19a/Tmtubb* (D'Cotta *et al.*, 2001; Karube *et al.*, 2007). Previamente se normalizaron ambos valores con respecto a la intensidad determinada en la gónada de la hembra adulta (C+). Los niveles de intensidad de las bandas de amplificación de todos los organismos pueden dividirse en dos grupos, un grupo con intensidades ≤ 0.5 y otro grupo con intensidades ≥ 0.52

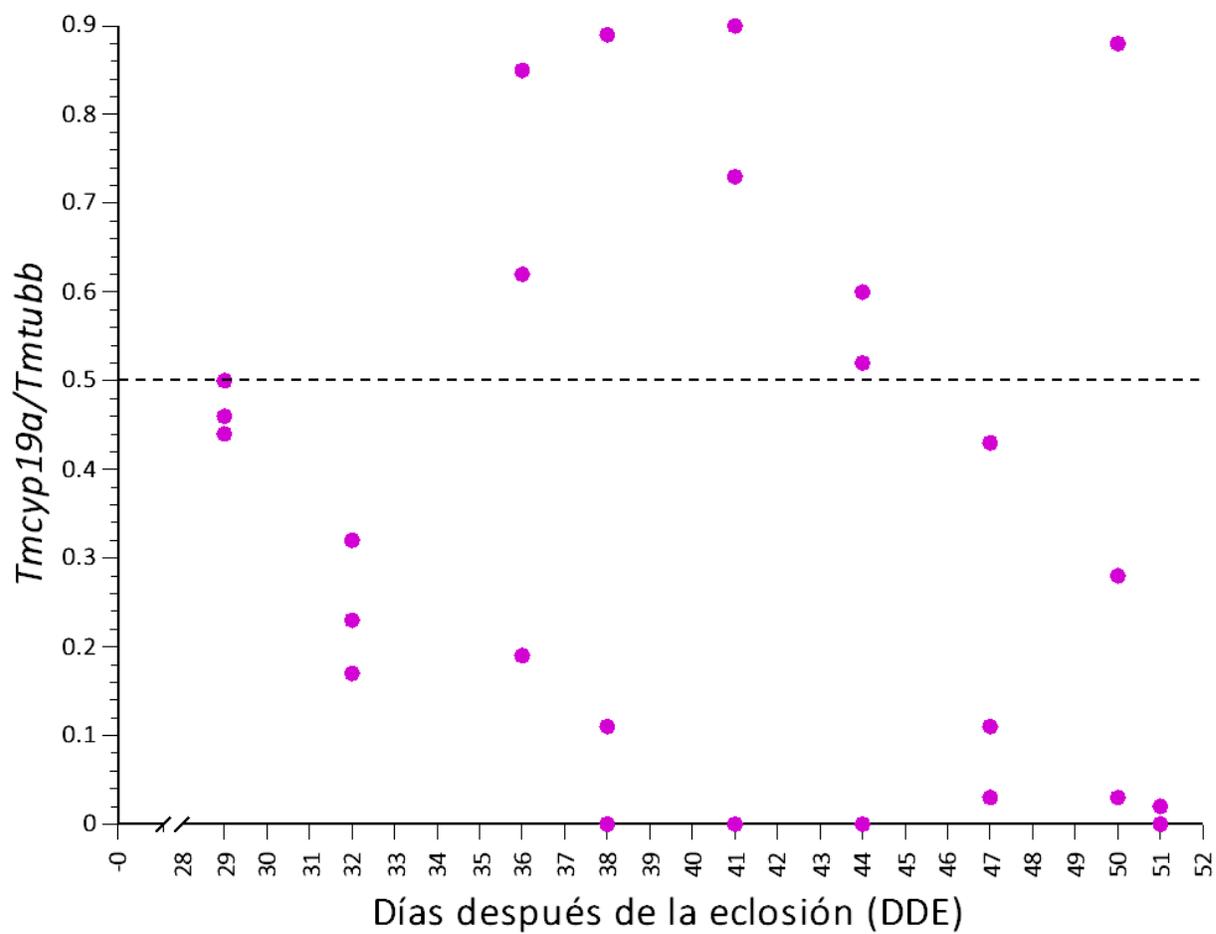


Figura 35. Expresión, en términos relativos, de la aromatasa gonadal (*Tmcyp19a*) en larvas y juveniles de *T. macdonaldi*.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Descripción del proceso de gonadogénesis

El interés en el cultivo de los peces marinos se ha incrementado en las últimas décadas, tal es el caso de la totoaba, por lo que es necesario generar información básica sobre la gonadogénesis, que incluye aspectos como la formación del primordio gonadal y el periodo en que ocurre la diferenciación de la gónada (Nakamura *et al.*, 1998; Komatsu *et al.*, 2006). Sin embargo, son pocos los estudios histológicos que describen el proceso de diferenciación sexual en los peces marinos (Chang *et al.*, 1995; Corona-Herrera *et al.*, 2016; Komatsu *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2008; Piferrer *et al.*, 2005) la mayoría de estos análisis se han realizado en peces de agua dulce (Nakamura y Takahashi, 1973; Patiño *et al.*, 1996; Strüssmann *et al.*, 1996; van Aerle *et al.*, 2004) principalmente debido a la facilidad del manejo y disponibilidad de los peces (Komatsu *et al.*, 2006).

En este trabajo se hizo una descripción del proceso de gonadogénesis de *Totoaba macdonaldi* mediante histología con la finalidad de identificar el período en el que ocurre la diferenciación sexual.

La formación de las gónadas inicia con la diferenciación de las células germinales primordiales, la formación de las crestas germinales y la migración de las células germinales primordiales hacia el interior de las crestas germinales formando así los primordios gonadales (Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002; Piferrer, 2009;). Escudero-Vielba (comunicación personal, CICESE, 2018), mediante la expresión del gen *Vasa* en larvas de 6 días después de la eclosión (DDE) de *T. macdonaldi* observó algunas células germinales primordiales en la parte dorsal de la cavidad peritoneal. Además, mediante el análisis histológico de cortes sagitales de larvas de 9 DDE (longitud promedio de 0.45 cm) observó en el primordio gonadal de 2 a 7 células germinales y en larvas de 11 DDE el engrosamiento del primordio gonadal, atribuible a la asociación de las células germinales con células somáticas provenientes del peritoneo ya que en los peces teleósteos, al igual que en otros vertebrados, las células germinales interactúan con las células somáticas durante el proceso de diferenciación sexual (Nakamura *et al.*, 1998). Una vez que se han formado los primordios gonadales, comenzará la diferenciación morfológica de la gónada, que puede juzgarse por criterios histológicos o citológicos (Devlin y Nagahama, 2002; Piferrer, 2009).

Las gónadas de *T. macdonaldi* son estructuras pareadas dentro de la cavidad peritoneal, entre la vejiga natatoria y el intestino. En este estudio, en las secciones transversales y sagitales de las gónadas de larvas colectadas desde 29 DDE (longitud total de 1.2 a 1.5 cm) y hasta 44 DDE (longitud total de 3.7 a 4.6 cm),

se identificaron de una a dos células germinales rodeadas de células somáticas. Durante este período las gónadas crecieron en longitud y ancho debido a la actividad mitótica de ambos tipos celulares. La intensa proliferación de células germinales y células somáticas, es un criterio para identificar el inicio de la diferenciación gonadal (Guraya, 1994; Strüssmann y Nakamura, 2002). Se ha observado que el número de células germinales en los primordios que se desarrollarán como ovarios es mayor que en aquellos que se desarrollarán como testículos, además las células germinales de los futuros ovarios, inician primero la mitosis y meiosis (Nakamura *et al.*, 1998). Por otra parte, van Aerle *et al.* (2004) mencionan que existen diferencias en la distribución de los elementos somáticos y germinales entre los futuros ovarios y testículos. En los futuros ovarios las células germinales se distribuyen en el centro de la gónada mientras que las células somáticas permanecen en la periferia, mientras que en los futuros testículos, las células somáticas se encuentran distribuidas en toda la gónada. En esta etapa del desarrollo no se reconocen signos de diferenciación sexual en las células germinales de *T. macdonaldi*, estas células son bipotenciales y permanecerán indiferenciadas hasta que se expongan a las hormonas que influirán en su diferenciación, para desarrollarse como espermatogonias u ovogonias (Devlin y Nagahama, 2002).

Uno de los principales criterios histológicos para identificar el sexo de la gónada en la mayoría de los peces teleósteos es el arreglo de las células somáticas, esta característica es específica del sexo, en las hembras las células somáticas forman la cavidad ovárica y en los machos forman el conducto eferente (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002).

La cavidad ovárica se forma por diferentes procesos morfogenéticos (Strüssmann y Nakamura, 2002). En las gónadas de *T. macdonaldi* esta estructura se observó por primera vez a los 51 DDE (6.3 a 8 cm de longitud total), su formación inició con la elongación de agrupaciones de células somáticas en los extremos dorsal y ventral del primordio de la gónada, frente a la pared peritoneal, posteriormente estas elongaciones se fusionan entre sí y forman la cavidad ovárica en el centro de la gónada. Estas elongaciones estuvieron presentes y más desarrolladas en las gónadas de los ejemplares analizados hasta los 85 DDE (longitud total de 10.4 a 13 cm). En *T. macdonaldi* la formación de la cavidad ovárica transcurre en dirección céfalo caudal, al igual que en *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann *et al.*, 1996), pero contrario a *Dicentrarchus labrax* en la cual la dirección es caudo-cefálica (Piferrer *et al.*, 2005). En organismos de 69 DDE (longitud total de 8.4 a 9.7 cm) se hizo evidente que el proceso no ocurre de manera simultánea en ambas gónadas.

Estos cambios en la gónada y el desarrollo del tejido somático es similar al observado durante la diferenciación sexual de los ovarios de otros peces teleósteos, pero la duración del periodo de la

diferenciación ovárica, desde que inicia la formación de la cavidad ovárica hasta la formación de ovocitos, varía entre especies (Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002) puede iniciarse a pocos días de la eclosión o después de varios meses. En especies gonocoristas como *Ictalurus punctatus* inicia a los 19 días después de la fertilización (longitud total de 1.6 a 1.8 cm de longitud total) y termina a los 90 días después de la fertilización (longitud total de 6.3 cm) (Patiño *et al.*, 1996), en *Pimephales promelas* inicia entre los 10 y 25 DDE (longitud total de 0.8 a 1.1 cm) (van Aerle *et al.*, 2004), en *Chirostoma estor* abarca desde los 28 DDE hasta los 56 DDE (Corona-Herrera *et al.*, 2016), en *Clarias gariepinus* ocurre entre los 40 y los 75 DDE (Raghuveer *et al.*, 2005), en *Odontesthes bonariensis* inicia entre los 49 y 63 DDE (longitud total de 1.82 mm) y termina entre los 91 y 112 DDE (longitud total de 2.75 a 3.75 cm) (Strüssmann *et al.*, 1996), en *Dicentrarchus labrax* inicia a los 168 días después de la fertilización (longitud estándar de 8.3 cm) y finaliza a los 419 días después de la fertilización (longitud estándar de 12.3 a 18.5 cm) (Piferrer *et al.*, 2005) y en *Mugil cephalus* inicia entre los 15 y 17 meses y termina entre los 18 y 24 meses (Chang *et al.*, 1995). En gonocoristas indiferenciados como *Amphiprion clarkii* inicia a los 60 DDE y termina a los 90 DDE (Miura *et al.*, 2008) y en *Epinephelus malabaricus* inicia a los 47 DDE y termina alrededor de los 144 DDE (Murata *et al.*, 2009). Otra diferencia entre especies es la posición de la cavidad ovárica, en *T. macdonaldi* se ubica en el centro de la gónada al igual que en *Mugil cephalus* (Chang *et al.*, 1995) *Epinephelus malabaricus* (Murata *et al.*, 2009), *Chirostoma estor* (Corona-Herrera *et al.*, 2016), *Siganus guttatus* (Komatsu *et al.*, 2006) y en *Amphiprion clarkii* (Miura *et al.*, 2008). Pero en *Tilapia mossambica* (Nakamura y Takahashi, 1973), *Oreochromis niloticus* (Nakamura y Nagahama, 1985) *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann *et al.*, 1996), *Ictalurus punctatus* (Patiño *et al.*, 1996), *Pimephales promelas* (van Aerle *et al.*, 2004) y *Clarias gariepinus* (Raghuveer *et al.*, 2005) la cavidad ovárica se ubica en la región lateral de la gónada.

Con base en los resultados obtenidos, en este estudio se postula que el periodo lábil para la diferenciación sexual de *T. macdonaldi* es menor o igual a los 36 DDE (cuando la gónada esta indiferenciada) y se extiende hasta los 51 DDE (cuando se observa la formación de la cavidad ovárica).

A diferencia de la formación de la cavidad ovárica, el conducto eferente de los teleósteos se forma mediante un solo patrón de desarrollo durante el cual primero se observa un espacio similar a una hendidura que se extiende desde la región proximal de la gónada hacia el tejido estromal del centro de la gónada (Nakamura y Takahashi, 1973; Nakamura *et al.*, 1998;). Fue hasta los 85 DDE (longitud total de 12.3 cm) que se observó un patrón desarrollo diferente al de las hembras, las gónadas no presentaban elongaciones en los extremos, ni cavidad ovárica. Aunque no se identificó la formación del conducto eferente, en las gónadas se observan cistos que contienen lo que pudieran ser espermatozoides primarios.

En la mayoría de los teleósteos gonocoristas estudiados hasta ahora, la diferenciación sexual comienza primero en las hembras. En los primordios de los testículos, las células germinales y somáticas se mantienen sin cambios aparentes durante largo tiempo (Nakamura y Takahashi, 1973; Nakamura *et al.*, 1998; Strüssmann y Nakamura, 2002). El período de formación del conducto eferente también varía entre especies, así en *Pimephales promelas* se observó a los 60 DDE (longitud total de 1.5 a 2.6) (van Aerle *et al.*, 2004), en *Odontesthes bonariensis* a los 98 DDE (longitud total de 3.04 cm) (Strüssmann *et al.*, 1996), en *Ictalurus punctatus* entre los 90 y 102 días después de la fertilización (Patiño *et al.*, 1996). En algunos teleósteos la diferenciación testicular puede ser variable, por ejemplo en *Dicentrarchus labrax*, algunos organismos son precoces y se diferencian a los 168 días después de la fertilización (longitud estándar de 8.3 a 9.5 cm) y otros hasta los 250 días después de la fertilización (Piferrer *et al.*, 2005). Se recomienda que en futuros estudios se incremente el número de muestras a partir de los 51 DDE para comprobar si los machos tienen un patrón de diferenciación directo como el de las hembras o se trata de una especie gonocórica indiferenciada.

Hay especies en las que la diferenciación sexual puede ocurrir a la misma edad en machos y hembras, en *Tilapia mossambica* se registró entre los 16 y 20 DDE (0.8 y 1.1 cm de longitud total) (Nakamura y Takahashi, 1973), en *Oreochromis niloticus* acontece entre los 23 y 26 DDE (Nakamura y Nagahama, 1985; Nakamura y Nagahama, 1989) y en *Siganus guttatus* (Komatsu *et al.*, 2006) a los 31 DDE. A la fecha, no se ha reportado la diferenciación testicular antes que la ovárica.

El análisis histológico de los ejemplares de totoaba de 100 y 161 DDE indicó que el desarrollo de la gónada se mantiene sin cambios notables durante este período. En contraste con los cambios de las células somáticas que son más visibles, no se identificaron procesos de división mitótica, ni la entrada en meiosis de los elementos germinales. Tampoco se logró identificar el lugar que ocupan las células germinales en la gónada, pero es posible que se encuentren intercaladas en el tejido que rodea la cavidad ovárica.

4.2 Expresión del gen *cyp19a* en larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi*

La enzima aromatasa gonadal está codificada por el gen *cyp19a* y es la responsable de mantener el balance entre las hormonas esteroideas (andrógenos y estrógenos) en las gónadas. La proporción de estas hormonas es importante durante la diferenciación gonadal, los andrógenos inducen la masculinización

mientras que los estrógenos la feminización de la gónada indiferenciada (Yamamoto, 1969; Blázquez y Piferrer, 2004; Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Jeng *et al.*, 2005).

A pesar de que los peces teleósteos poseen una gran diversidad en los procesos de diferenciación sexual, los estrógenos, principalmente 17 β -Estradiol (E2), son los principales inductores de la diferenciación ovárica (Yamamoto, 1969; Nakamura *et al.*, 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Piferrer y Guiguen, 2008;). La enzima P450arom es un elemento esencial para la diferenciación ovárica pero no para la diferenciación testicular, por lo tanto los niveles de expresión del gen *cyp19a* pueden ser utilizados para inferir el sexo de la gónada en desarrollo (Nakamura *et al.*, 1998).

En este estudio se reporta por primera vez la secuencia parcial de la aromatasa gonadal de *T. macdonaldi*, de 401 pb, la cual en todos los vertebrados se ubica al final del exón 6 hasta el final del exón 8 del gen *cyp19a*. También se reporta por primera vez la secuencia parcial del cDNA de siete genes de referencia de *T. macdonaldi*, los cuales podrían utilizarse en futuros estudios de expresión semicuantitativa o mediante RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) de la aromatasa gonadal o de otros genes de interés para diversos estudios básicos o aplicados sobre la totoaba. Las secuencias parciales de cDNA obtenidas pertenecen a los siguientes genes de referencia: β -tubulina (*tubb*) (acceso GenBank MG944246), β -actina (*actb*) (acceso GenBank MG966521), factor de elongación 1 α (*EF1A*) (acceso GenBank MG966522), subunidad 1 del complejo NADH deshidrogenasa (*ND1*) (acceso GenBank MG966524), subunidad L10 ribosomal (*QM-like*) (acceso GenBank MG966523), proteína ribosomal mitocondrial 35S (*RPS35*) (acceso GenBank MG966525), subunidad g del factor de iniciación de la traducción en eucariotas 3 (*eTIF3g*) (acceso GenBank MG966526).

Con base en las secuencias obtenidas de *cyp19a* y genes de referencia de *T. macdonaldi* se diseñaron los iniciadores específicos para PCR con los cuales, sin excepción, se logró amplificar productos del tamaño esperado a partir de cDNA de la gónada de hembra y de la mezcla de cDNA de larvas y juveniles de diferentes edades.

Para el estudio de expresión relativa de la aromatasa gonadal de *T. macdonaldi* como gen de referencia se utilizó la β -tubulina cuyos productos de amplificación mediante PCR en larvas y juveniles en general fue alta y bastante uniforme. En contraste, los productos de las amplificaciones de la aromatasa fueron de intensidades variables aunque se detectaron en especímenes de todas las edades. Es importante mencionar que en teleósteos se ha reportado que *cyp19a* también se expresa en el cerebro, testículos, riñón, hígado, tejido adiposo y tracto digestivo, aunque en niveles más bajos que en los ovarios (Blázquez & Piferrer, 2004; Luckenbach *et al.*, 2005). Debido a esto se esperaba que el gen *cyp19a* de *T. macdonaldi*

se expresara en todas las etapas de desarrollo muestreadas ya que el mRNA extraído no provenía solo de las gónadas sino de toda la región abdominal de las larvas y juveniles colectados.

Para varios teleósteos se ha reportado que la expresión de *cyp19a*, en la gónada en desarrollo, se incrementa durante la diferenciación ovárica. Kitano *et al.* (1999), en un estudio de reversión sexual mediante inducción térmica en *Paralichthys olivaceus*, determinaron que los niveles de expresión semicuantitativa de la aromatasa gonadal se incrementan en las gónadas de las hembras después del inicio de la diferenciación sexual (60 DDE), mientras que en las gónadas de los machos permanece a nivel basal o disminuye. Luckenbach *et al.* (2005) estudiaron la ontogenia de *Paralichthys lethostigma* y mediante el aumento en los niveles de expresión de *cyp19a* determinados por RT-qPCR identificaron hembras a partir de los 0.65 cm de longitud total. Adicionalmente, mediante el análisis histológico de las gónadas corroboraron que los altos niveles de mRNA de *cyp19a* estaban relacionados con la formación de la cavidad ovárica y la presencia de ovocitos, mientras que los bajos niveles de expresión estaban relacionados con la formación de los lóbulos seminales y la espermatogénesis.

Considerando los cambios histológicos en las gónadas de *T. macdonaldi*, se esperaba encontrar niveles altos de expresión de la aromatasa gonadal antes de los 51 DDE cuando se observó la formación de la cavidad ovárica. Con base en los niveles de expresión de *cyp19a* es probable que las gónadas de algunos juveniles de 36, 38, 41 y 50 DDE (identificados en el gel de agarosa con los números 8, 11, 13, 14 y 24) estuvieran destinadas a diferenciarse como ovarios ya que sus niveles de expresión estuvieron cercanos al nivel estimado para la gónada de la hembra adulta. Establecer con mayor precisión el período de inicio y término de la diferenciación ovárica requiere del análisis de un mayor número de organismos de cada edad y ampliar el periodo de muestreo y estudiar la expresión mediante un análisis semicuantitativo o mediante RT-qPCR. Aunque la expresión semicuantitativa tiene sus limitantes, en estudios ontogénicos de diversos teleósteos los resultados obtenidos con este método han sido corroborados con el análisis de expresión cuantitativa de *cyp19a* mediante RT-qPCR. Por ejemplo, en la trucha *Oncorhynchus mykiss* mediante RT-PCR semicuantitativo Guiguen *et al.* (1999) concluyeron que la expresión de *cyp19a* aumenta solamente durante la diferenciación ovárica, esta conclusión fue corroborada por Vizziano *et al.* (2007) mediante RT-qPCR. También durante la diferenciación sexual de hembras de *Oreochromis niloticus*, mediante un estudio semicuantitativo, se detectó el incremento en los niveles de expresión de la aromatasa gonadal (D' Cotta *et al.*, 2001) posteriormente fue corroborado mediante análisis de RT-qPCR (Chang *et al.*, 2005; Ijiri *et al.*, 2008) y RT-PCR semicuantitativo (D'Cotta *et al.*, 2001).

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

- 5.1 En especímenes de *T. macdonaldi* de 29 a 44 DDE (días después de la eclosión) la gónada estuvo sexualmente indiferenciada
- 5.2 La primera evidencia de la formación de la cavidad ovárica se observó en organismos de 51 DDE.
- 5.3 La formación de la cavidad ovárica procedió en dirección céfalo caudal.
- 5.4 En organismos de 15 meses de edad se identificaron ovarios y testículos diferenciados.
- 5.5 Todos los iniciadores diseñados para aislar fragmentos del gen de la aromatasa gonadal (*cyp19a*) de *T. macdonaldi* y de siete genes de mantenimiento (*tubb*, *actb*, *EF1A*, *QM-like*, *ND1*, *RPS25*, *eTIF3g*) tiene potencial para ser empelados en estudios de expresión genética ya que amplificaron las secuencias de interés con tamaños no mayores a los 200 pb. Las secuencias parciales de estos genes fueron registrados en GenBank, lo que contribuye con información para esta especie.
- 5.6 La aromatasa gonadal (*Tmcyp19a*) con respecto a β -tubulina (*Tmtubb*) se expresó, en términos relativos, en todos los estadios de desarrollo analizados (29 a 51 DDE), sin embargo fueron significativamente mayores en algunas larvas y juveniles de 36, 38, 41 y 50 DDE.
- 5.7 El incremento en la expresión de la aromatasa gonadal en algunos especímenes de 36 DDE y mayores a esa edad, sugiere que en *T. macdonaldi* el periodo lábil para la feminización de la gónada se inicia alrededor de los 36 DDE y se extiende hasta los 51 DDE. Esto sugiere que al igual que en otros teleósteos, en *T. macdonaldi* la expresión de la aromatasa gonadal precede a la diferenciación fenotípica de la gónada.

Se recomienda:

- ❖ Realizar modificaciones en los protocolos de fijación, descalcificación y tinción para mejorar la calidad de los cortes histológicos de larvas y juveniles de *T. macdonaldi*.

- ❖ Ampliar el número de muestras para el análisis histológico de las gónadas a partir de los 51 DDE para definir si los machos de *T. macdonaldi* tienen un patrón de diferenciación directo como las hembras o se trata de una especie gonocórica indiferenciada.
- ❖ Definir a partir de qué edad posterior a la eclosión de las larvas se inicia la expresión basal de la aromatasa gonadal (*Tmcp19a*) y cuando se re establece dicho nivel. Para tal propósito se recomienda que en estudios futuros se aumente el número de individuos de cada edad y se extiendan los periodos de muestreo tanto de larvas como de juveniles.
- ❖ Para establecer con mayor precisión el período en el cuál inicia y termina la diferenciación ovárica es necesario realizar estudios de expresión mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) con un mayor número de especímenes de cada edad.

Literatura citada

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., y Walter, P. (2009). *Essential cell biology* (3rd ed.). Estados Unidos de América: Garland Science.
- Aoki, Y., Nakamura, S., Ishikawa, Y., y Tanaka, M. (2009). Expression and Syntenic Analyses of Four *nanos* Genes in Medaka. *Zoological Science*, 26(2), 112–118. <https://doi.org/10.2108/zsj.26.112>
- Arezo, M. J., Papa, N., Guttierrez, V., García, G., y Berois, N. (2014). Sex determination in annual fishes : Searching for the master sex-determining gene in *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes , Rivulidae). *Genetics and Molecular Biology*, 37(2), 364–374.
- Arvizu, J., y Chávez, H. (1972). Sinopsis sobre la biología de la totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, Gilbert 1890. *FAO Fish. Synops*, 108.
- Barney, M. L., Patil, J. G., Gunasekera, R. M., y Carter, C. G. (2008). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): Sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. *General and Comparative Endocrinology*, 156(3), 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.03.013>
- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y., y Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(7), 910. <https://doi.org/10.1007/s000180050344>
- Barrera-Guevara, J. C. (1990). The conservation of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert), (Pisces:Sciaenidae), in the Gulf of California, Mexico. *J. Fish Biol.*, 37 (Supple), 201–202.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(November), 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Blázquez, M., y Piferrer, F. (2004). Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 219(1–2), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.01.006>
- Bogart, M. H. (1987). Sex determination: A hypothesis based on esteroid ratios. *J. Theor. Biol*, 128, 349–357.
- Brykov, V. A. (2014). Mechanisms of sex determination in fish: Evolutionary and practical aspects. *Russian Journal of Marine Biology*, 40(6), 407–417. <https://doi.org/10.1134/S1063074014060145>
- Cárdenas, S. (2012). Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. *AquaTIC*, 37, 1–13.
- Chang, C.-F., Lan, S.-C., y Chou, H.-Y. (1995). Gonadal Histology and Plasma Sex Steroids During Sex Differentiation in Grey Mullet , *Mugil cephalus*. *The Journal of Experimental Zoology*, 272, 395–406.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C. C., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.020>
- Chávez, H. (1973). Descripción de los ejemplares juveniles de totaba, *Cynoscion macdonald* Gilbert. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 34, 293–300.

- Cisneros-Mata, M. A., Botsford, L. W., y Quinn, J. F. (1997). Projecting viability of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecological Applications*, 7(3), 968–980. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0968:PVOTMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0968:PVOTMA]2.0.CO;2)
- Cisneros-Mata, M. A., Montemayor-López, G., y Román-Rodríguez, M. J. (1995). Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*, 9 No. 4, 806–814. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/2386990?seq=1#page_scan_tab_contents
- Cleveland, D. W., Lopata, M. A., Macdonald, R. J., Cowan, N. J., Rutter, W. J., y Kirschner, M. W. (1980). Number and Evolutionary Conservation of α - and β -Tubulin and Cytoplasmic β - and γ -Actin Genes Using Specific Cloned cDNA Probes. *Cell*, 20, 95–105.
- Corona-Herrera, G. A., Tello-Ballinas, J. A., Hattori, R. S., Martínez-Palacios, C. A., Strüssmann, C. A., Cárdenas-Reygadas, R. R., y Martínez-Chávez, C. C. (2016). Gonadal differentiation and temperature effects on sex determination in the freshwater pike silverside *Chirostoma estor* Jordan 1880. *Environ Biol Fish*, 99, 463–471. <https://doi.org/10.1007/s10641-016-0491-z>
- Cotta, H. D., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., y 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.
- De Anda-Montañez, J. A., García-De León, F. J., Zenteno-Savín, T., Balart-Páez, E., Méndez-Rodríguez, L. C., Bocanegra-Castillo, N., y Martínez-Delgado, M. E. (2013). *Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (Totoaba macdonaldi) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción*. La Paz, Baja California Sur, México.
- Devlin, R. H., y Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3–4), 191–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- Dupuis, A., Prieur, I., y Lunardi, J. (2001). Toward a Characterization of the Connecting Module of Complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(3), 159–168.
- Extavour, C. G., y Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans : epigenesis and preformation. *Development*, 130, 5869–5884. <https://doi.org/10.1242/dev.00804>
- Fanarraga, M. L., Villegas, J. C., Carranza, G., Castaño, R., y Zabala, J. C. (2008). Tubulin cofactor B regulates microtubule densities during microglia transition to the reactive states. *Experimental Cell Research*, 315(3), 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.10.045>
- Flanagan, C. A., y Hendrickson, J. R. (1976). Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 4(3), 531–544.
- García-López, Á., Martínez-Rodríguez, G., y Sarasquete, C. (2005). Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histology and Histopathology*, 20(4), 1179–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136501>
- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental Biology* (9th ed.). Massachusetts, EUA: Sinauer Associates, Inc.
- Ginsburg, M., Snow, M. H., y McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during

- gastrulation. *Development*, 110(2), 521–528.
- Gómez-Chang, E., Larrea, F., y Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol*, 15(1), 24–36.
- Goto-Kazeto, R., Kight, K. E., Zohar, Y., Place, A. R., y Trant, J. M. (2004). Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 139(1), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.003>
- Guerrero-Estévez, S., y Moreno-Mendoza, N. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101–121. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9123-4>
- Guiguen, Y., Baroiller, J.-F., Ricordel, M.-J., Iseki, K., McMeel, O. M., Martin, S. A. M., y Fostier, A. (1999). Involvement of Estrogens in the Process of Sex Differentiation in Two Fish Species : The Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Biology and Evolution*, 54, 154–162.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002>
- Guraya, S. S. (1994). Gonadal development and production of gametes in fish. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad*, B60(1), 15–32.
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., y Strussmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), 2955–2959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018392109>
- Hay, B., Jan, L. Y., y Jan, Y. N. (1988). A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell*, 55, 577–587. Retrieved from [vasa/hay et al 1988 droso cell.pdf](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90100-9)
- Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 373–99. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<373::AID-JEZ4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<373::AID-JEZ4>3.0.CO;2-L)
- Hird, S. N., Paulsen, J. E., y Strome, S. (1996). Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development (Cambridge, England)*, 122, 1303–1312.
- Hirst, J. (2013). Mitochondrial Complex I. *Reviews in Advance*, 19(57), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>
- Houston, D. W., y King, M. L. (2000). Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Curr Topics Dev Biol*, 50, 155–181. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(00\)50008-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(00)50008-8)
- Howard, D. W., Lewis, E. J., Keller, B. J., y Smith, C. S. (2004). *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5 (2nd ed.). NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D., Sakai, F., Paul-prasanth, B., y Nagahama, Y. (2008). Sexual

Dimorphic Expression of Genes in Gonads During Early Differentiation of a Teleost Fish , the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* 1. *Biology of Reproduction*, 78, 333–341. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>

- Jeng, S.-R., Dufour, S., y Chang, C.-F. (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. <https://doi.org/10.1002/jez.a.194>. AROMATASE
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., y Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002798>
- Karube, M., Fernandino, J. I., Strobl-mazzulla, P., Strüssmann, C., Yoshizaki, G., Somoza, G., y Patiño, R. (2007). Characterization and Expression Profile of the Ovarian Cytochrome P-450 Aromatase (cyp19A1) Gene During Thermolabile Sex Determination in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Journal of Experimental Zoology*, 307, 625–636. <https://doi.org/10.1002/jez>
- Kikuchi, K., y Hamaguchi, S. (2013). Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, 242(4), 339–353. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23927>
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., y Abe, S. (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, 167–176.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., y Abe, S. (2000). Aromatase Inhibitor and 17 α - Methyltestosterone Cause Sex-Reversal From Genetical Females to Phenotypic Males and Suppression of P450 Aromatase Gene Expression in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 56, 1–5.
- Klauck, S. M., Felder, B., Kolb-Kokocinski, A., Schuster, C., Chiocchetti, A., Schupp, I., y Poustka, A. (2006). Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Molecular Psychiatry*, 11, 1073–1084. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001883>
- Komatsu, T., Nakamura, S., y Nakamura, M. (2006). A sex cord-like structure and some remarkable features in early gonadal sex differentiation in the marine teleost *Siganus guttatus* (Bloch). *Journal of Fish Biology*, 68(1), 236–250. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.00897.x>
- Kopiejewska, W. (2003). Determination of frequency distribution of oocytes at different maturity phases in the ovaries of roach, *Rutilus rutilus* (L.). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 33(1), 47–55.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lee, A. S. Y., Kranzusch, P. J., y Cate, J. H. D. (2015). eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature*, 522, 111–114. <https://doi.org/10.1038/nature14267>
- Li, M., Hong, N., Xu, H., Yi, M., Li, C., Gui, J., y Hong, Y. (2009). Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 126(5–6), 366–381. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.02.004>

- Lo Nostro, F. L., Grier, H., Meijide, F. J., y Guerrero, G. A. (2003). Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): The germinal compartment. *Tissue and Cell*, 35(2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(03)00011-9)
- Luckenbach, J. A., Early, L. W., Rowe, A. H., Borski, R. J., Daniels, H. V, y Godwin, J. (2005). Aromatase Cytochrome P450 : Cloning , Intron Variation , and Ontogeny of Gene Expression in Southern Flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Experimental Zoology*, 303(A), 643–656. <https://doi.org/10.1002/jez.a.198.644>
- Maack, G., y Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 62(4), 895–906. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00074.x>
- Maruyama, T., Nara, K., Yoshikawa, H., y Suzuki, N. (2007). Txk , a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family , forms a complex with poly (ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1 a and regulates interferon- g gene transcription in Th 1 cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 147, 164–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03249.x>
- Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., y Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *European Molecular Biology Organization*, 26(14), 3373–3383. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601765>
- Mata-Sotres, J. A., Lazo, J. P., y Baron-Sevilla, B. (2015). Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture*, 437, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.037>
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., y Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature751>
- Miura, S., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Piferrer, F., y Nakamura, M. (2008). Differentiation of ambisexual gonads and immunohistochemical localization of P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme during gonadal sex differentiation in the protandrous anemonefish , *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 149, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.08.002>
- Murata, R., Karimata, H., Ashraful, M., y Nakamura, M. (2009). Gonadal sex differentiation in the Malabar grouper , *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 293, 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.031>
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., y Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1), 163–170. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137497>
- Nakamura, M. (1978). *Morphological and experimental studies on sex differentiation of the gonad in several teleost fishes*. Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. T., y Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M)
- Nakamura, M., y Nagahama, Y. (1985). Steroid Producing Cells during Ovarian Differentiation of the Tilapia, *Sarotherodon niloticus*. *Develop. Growth and Differ*, 27(6), 701–708.

- Nakamura, M., y Takahashi, H. (1973). Sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 24(1), 1–13. Retrieved from <http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/23486>
- Nakamura, M., y Nagahama, Y. (1989). Differentiation and development of Leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology*, 7, 211–219.
- Negrutskii, B. S., y Elskay, A. V. (1998). *Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 α : Structure, Expression, Functions, and Possible Role in Aminoacyl-tRNA Channeling*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 60). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60889-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60889-2)
- O'Malley, B. W., y Strott, C. A. (1999). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. In S. Yen, R. Jaffe, y R. Barbieri (Eds.), *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico* (4th ed., pp. 118–143). Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Ospina-Álvarez, N., y Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE*, 3(7), 2–4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837>
- Patino, R., Davis, K. B., Schoore, J. E., Uguz, C., Strüssmann, C. A., Parker, N. C., y Goudie, C. A. (1996). Sex Differentiation of Channel Catfish Gonads: Normal Development and Effects of Temperature. *The Journal of Experimental Zoology*, 276, 209–218.
- Penman, D. J., y Piferrer, F. (2008). Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 16–34. <https://doi.org/10.1080/10641260802324610>
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 229–281.
- Piferrer, F. (2009). Determinación y Diferenciación Sexual en los Peces. In *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (p. 719). Madrid, España: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., y González, A. (2005). Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 142, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.011>
- Piferrer, F., y Guiguen, Y. (2008). Fish Gonadogenesis. Part II: Molecular Biology and Genomics of Sex Differentiation. *Fish. Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 35–55. <https://doi.org/10.1080/10641260802324644>
- Presslauer, C., Nagasawa, K., Fernandes, J. M. O., y Babiak, I. (2012). Expression of *vasa* and *nanos3* during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Theriogenology*, 78(6), 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.022>
- Raghuveer, K., Garhwal, R., Wang, D. S., Bogerd, J., Kirubakaran, R., Rasheeda, M. K., 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 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(2–3), 143–147. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-0016-3>
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics*, 4(9), 690–700. <https://doi.org/10.1038/nrg1154>
- Roy, M. S., Pal, P., Majumder, S., Mallick, B., Gupta, S., Guha, P., y Mukherjee, D. (2016). Gonadotropin and sf-1 regulation of *cyp19a1a* gene and aromatase activity during oocyte development in the rohu, *L. rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 196, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.004>
- Rozen, S., y Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*, 132, 365–386. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>
- Sambrook, J., y Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manua* (3ra ed.). Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawyer, S. J., Gerstner, K. A., y Callard, G. V. (2006). Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.010>
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., y Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- Seydoux, G., & Braun, R. E. (2006). Pathway to Totipotency: Lessons from Germ Cells. *Cell*, 127(5), 891–904. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.016>
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, J., Griffiths, A., Smith, M., y Goodfellow, P. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240–244.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., y Sinclair, A. H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261), 267–271. <https://doi.org/10.1038/nature08298>
- Strüssmann, C. A., y Nakamura, M. (2002). Morphology , endocrinology , and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 13–29.
- Strüssmann, C. A., Takashima, F., y Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139(1–2), 31–45. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01161-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01161-7)
- Sun, B., y Hu, Y. (2015). Evaluation of potential internal references for quantitative real-time RT-PCR normalization of gene expression in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 695–704. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0039-8>
- Tang, B., Hu, W., Hao, J., y Zhu, Z. (2010). Developmental expression of steroidogenic factor-1, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* from common carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology*, 167(3),

408–416. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.017>

- Tondeleir, D., Vandamme, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C., y Lambrechts, A. (2009). Actin Isoform Expression Patterns During Mammalian Development and in Pathology: Insights From Mouse Models. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66, 798–815. <https://doi.org/10.1002/cm.20350>
- True, D. C. (2012). *Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba macdonaldi*. Universidas Autónoma de Baja California. Retrieved from http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/oceanografia_costera/doctorado/Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba.pdf
- Uribe, M. C., Grier, H. J., y Mejía-Roa, V. (2014). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4(3), e983400. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.983400>
- Valenzuela- Quiñonez, F., García-de-León, F. J., De-Anda-Montañez, J. A., y Balart, E. (2011). La Totoaba del Golfo de California ¿una especie en peligro de extinción? *Interciencia*, 36, 664–671.
- van Aerle, R., Runnalls, J. T., y Tyler, R. C. (2004). Ontogeny of gonadal sex development relative to growth in fathead minnow. *Journal of Fish Biology*, 64, 355–369. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00296.x>
- Vandekerckhove, J., y Weber, K. (1978). At Least Six Different Actins are Expressed in a Higher Mammal : An Analysis Based on the Amino Acid Sequence of the Tryptic Peptide. *J. Mol. Biol.*, 126, 783–802.
- Vizziano, D., Baron, D., Cauty, C., y Guiguen, Y. (2007). Characterization of Early Molecular Sex Differentiation in Rainbow Trout , *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, 236, 2198–2206. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21212>
- Whittington, P. M., y Dixon, K. E. (1975). Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 33(1), 57–74. Retrieved from <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1151270>
- Williamson, A., y Lehmann, R. (1996). Germ Cell Development in Drosophila. *Cell*.
- Yamamoto, T. (1969). Sex Differentiation. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 3, pp. 117–175). London, UK: Academic Press.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.045>
- Ying, Y., Qi, X., y Zhao, G. (2001). Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14), 7858–7862. <https://doi.org/10.1073/pnas.151242798>
- Yoon, C., Kawakami, K., y Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development (Cambridge, England)*, 124(16), 3157–3165. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=9272956
- Zanuy, S., y Carrillo, M. (1987). La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. In J. Espinosa

de los Monteros y U. Labarta (Eds.), *Reproducción en Acuicultura* (pp. 1–102). Madrid, España: Formación de Técnicos superiores en Acuicultura.

Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., y Molés, G. (2009). Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. En M. A. Carrillo Estévez (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (p. 719). Madrid, España: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura.

Zhang, Y., Zhang, S., Lu, H., Zhang, L., y Zhang, W. (2014). Genes encoding aromatases in teleosts: Evolution and expression regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 205(SEPTEMBER 2014), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.05.008>

Anexo 1

Solución fijadora Davidson

Tabla 1. Preparación de 1 litro de solución fijadora Davidson

Reactivo	Volumen (ml)
Glicerina	100
Formaldehído 37%	200
Etanol 96%	300
Ácido Acético	10
Agua de mar filtrada	300

Agitar antes de usarse

Anexo 2

Solución descalcificadora de ácido fórmico-formalina

Tabla 2. Preparación de 100 ml de solución descalcificadora ácido fórmico-formalina

Reactivo	Volumen (ml)
Solución stock de ácido fórmico 90%	5-10
Formaldehído 37%	5

Anexo 3

Tabla 3. Técnica de deshidratación

Reactivo	Tiempo (h)
Etanol 70%	1
Etanol 96%-I	2
Etanol 96%-II	2
Etanol 100%-I	2
Etanol 100% -II	2
Etanol 100 %- Benceno	3
Benceno I	2
Benceno II	2
Benceno-Parafina	3
Parafina I	2
Parafina II	2
Tiempo total	23

Posteriormente las muestras se incluyeron en parafina

Anexo 4

Tinción de Hematoxilina-Eosina

Previo a la tinción las muestras deben ser desparafinadas e hidratadas en agua

Tabla. 4. Desparafinación e hidratación

Reactivo	Tiempo
Xileno I	5 minutos
Xileno II	5 minutos
Etanol 100%	15 inmersiones
Etanol 95%	15 inmersiones
Etanol 70%	15 inmersiones
Etanol 50 %	15 inmersiones
Etanol 30%	15 inmersiones

Lavar en agua corriente por 3 minutos, hasta que el xileno no flote en el agua

Tabla 5. Tinción Hematoxilina-Eosina

Reactivo	Tiempo
Hematoxilina de Harris	5 minutos (efectuar agitación)
Lavar en agua corriente	2 minutos
Alcohol ácido (0.3 ml HCl/200 ml Etanol 70%)	1.5 minutos (efectuar agitación)
Lavar en agua corriente	5 minutos
Carbonato de Litio	2 minutos
Lavar en agua corriente	3 minutos
Enjuagar con agua destilada	
Etanol 96%	10 inmersiones
Eosina "Y"	2.5 minutos (efectuar agitación)
Etanol 95%- I	6 inmersiones
Etanol 95%- II	6 inmersiones
Etanol 100%- I	10 inmersiones
Etanol 100%- II	10 inmersiones
Xileno I	5 minutos
Xileno II	5 minutos