

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**



**“EXPRESIÓN DIFERENCIAL DIMÓRFICA EN RESPUESTA A LA
EXPOSICIÓN DE ESTEROIDES SEXUALES DURANTE LA
DIFERENCIACIÓN TEMPRANA DE SEXOS DE *Arapaima gigas*”**

Presentada por:

RONALD FERNANDO ZELADA MÁZMELA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA ANIMAL**

Lima - Perú

2023

Tesis

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

- | | | |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | Submitted to Universidad Jorge Tadeo Lozano
Trabajo del estudiante | <1 % |
| 2 | Submitted to Universidad Nacional de Colombia
Trabajo del estudiante | <1 % |
| 3 | mobiroderic.uv.es
Fuente de Internet | <1 % |
| 4 | journals.plos.org
Fuente de Internet | <1 % |
| 5 | J. G. Robertson. " SEX DIFFERENTIATION IN THE PACIFIC SALMON (WALBAUM) ",
Canadian Journal of Zoology, 1953
Publicación | <1 % |
| 6 | Marcos Caballero Molada. "Estudio de efectos protectores y mecanismos de acción frente a estrés abiótico de bioestimulantes de fertilizantes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ",
Universitat Politecnica de Valencia, 2016
Publicación | <1 % |
-

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**

**“EXPRESIÓN DIFERENCIAL DIMÓRFICA EN RESPUESTA A
LA EXPOSICIÓN DE ESTEROIDES SEXUALES DURANTE LA
DIFERENCIACIÓN TEMPRANA DE SEXOS DE *Arapaima gigas*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

RONALD FERNANDO ZELADA MÁZMELA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph.D. José Alberto Barrón López
PRESIDENTE

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynosos
ASESOR

Dra. Maria Elena Villanueva Espinoza
MIEMBRO

Dra. Patricia Gil Kodaka
MIEMBRO

Dr. Edgar Alfonso López Landavery
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A familiares y amigos que siempre estuvieron presentes y con cuyo soporte logré superar algunos de los momentos más difíciles que tuve que vivir en los pasados años.

AGRADECIMIENTO

A la empresa AMAZON FISH PRODUCTS SA de la ciudad de Pucallpa, por proporcionar el material biológico utilizado en esta tesis.

Al LABORATORIO DE FISIOLOGÍA, GENÉTICA y REPRODUCCIÓN, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, por proporcionar el uso de sus instalaciones para la realización de la fase de laboratorio de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Objetivo general	6
1.2.	Objetivos específicos	6
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1.	<i>Arapaima gigas</i>	7
2.2.	Histología de peces	8
2.3.	Inversión sexual en peces	9
2.4.	La transcriptómica y el estudio de los peces	10
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	Descripción histológica del desarrollo gonadal temprano	13
3.1.1.	Muestreo	13
3.1.2.	Histología	13
3.2.	Análisis Transcriptómico	15
3.2.1.	Tratamiento hormonal	15
3.2.2.	Extracción de ARN	18
3.2.3.	Eliminación de ADN genómico de preparación de ARN	18
3.2.4.	Preparación de librerías para secuenciamiento de transcriptoma	18
3.2.5.	Ensamble y anotación del transcriptoma	19
3.2.6.	Abundancia de transcritos, expresión diferencial y enriquecimiento funcional	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1.	Descripción histológica del desarrollo gonadal temprano	22

4.2.	Análisis transcriptómico	33
4.2.1.	Extracción y calidad del ARN	33
4.2.2.	Análisis transcriptómico y control de calidad	34
4.2.3.	Anotación funcional del transcriptoma completo.....	36
4.2.4.	Análisis de expresión diferencial.....	39
4.2.5.	Enriquecimiento funcional.....	44
4.2.6.	Histología de hembras y machos invertidos.....	45
4.3.	Expresión sexual dimórfica	46
4.3.1.	Expresión diferencial de los genes <i>hsp83</i> , <i>risc1</i> y <i>naca</i>	48
V.	CONCLUSIONES	58
VI.	RECOMENDACIONES	59
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
VIII.	ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Extracción y calidad de ARN de muestras de alevines expuestos a tratamiento hormonal de <i>A. gigas</i>	33
Tabla 2. Número de lecturas obtenidas antes y después del proceso de control de calidad.	34
Tabla 3. Resumen estadístico para el ensamble de novo del transcriptoma de alevines de <i>Arapaima gigas</i> expuestos a 17α -metil testosterona y 17β -estradiol durante 30 días	35
Tabla 4. Número de genes expresados diferencialmente para cada una de las comparaciones pareadas en alevines de <i>Arapaima gigas</i> expuestos a 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol.	41
Tabla 5. Procesos biológicos enriquecidos relacionados con la reproducción en juveniles de <i>Arapaima gigas</i> expuestos a 17α -metiltestosterona (T) y 17β -estradiol (E) durante 30 días. FE: Fold-enrichment, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal. La comparación es con respecto al control.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Proceso de deshidratación: (a) notar el corte a la altura de la aleta anal en los alevines más pequeños (b) en los alevines más grandes solo se tomó la sección abdominal entre la aleta anal y la pectoral (c, d) disposición de las muestras en las canastillas y (e, f) deshidratación en un deshidratador automático de tejidos Thermo SCIENTIFIC - Microm STP120..... 14
- Figura 2.** (a y b): imbibición de muestras en bloques de parafina, (c y d) conteo y almacenamiento de bloques de parafina..... 14
- Figura 3.** (a, b, c, d): corte de los bloques de parafina en el Micrótopo de rotación Thermo SCIENTIFIC – Micrón HM 325 y montaje en láminas porta objeto (e y f) batería y proceso de tinción con hematoxilina-eosina..... 15
- Figura 4.** Diagrama de proceso de tratamiento hormonal por inmersión aplicado a los alevines de *Arapaima gigas* 17
- Figura 5.** Flujo de trabajo para el ensamble de lecturas cortas utilizado en Trinity y basado en las gráficas de Bruijn. Fuente: Corona-Herrera, (2017) 20
- Figura 6.** Diagrama mostrando el flujo de trabajo posterior al ensamble De Novo. Izquierda: Anotación de transcritos con Trinotate basado en BLAST y las bases de datos SwissProt/UniProt y Pfam. Derecha: Estimación de la abundancia de transcritos basado en RSEM y edgeR. Fuente: Modificado de Corona-Herrera, (2017)..... 21
- Figura 7.** Corte histológico de alevín de 2.7 cm, al 5 dpl (21 dpe): (a) vista panorámica donde se observa una gran concentración celular, con el detalle de que esta es mayor en el lado izquierdo del alevín b: y d: y menor en el lado derecho (c). No hay presencia de crestas ni primordios gonadales. Notar en D), la forma de las células con puntas, sugiriendo la migración de éstas por el tejido mesodérmico por medio de movimientos ameboides. Coloración: HE 22

Figura 8. (a) Corte histológico transversal de un alevín de 3.0 cm de longitud total y al 6 dpl (22 dpe) en el que se aprecia (flechas), la aparición de presuntas crestas gonadales (CG) en la cavidad abdominal dorsal. (b) Corte histológico transversal de un alevín de 3.0 cm de longitud total y al 7 dpl (23 dpe) en el que se aprecian los primordios gonadales (PG) indicados con flechas. Coloración: HE.....23

Figura 9. Descripción histológica transversal de un alevín de 3.1 cm de longitud total al 7 dpl (23 dpe) desde la parte posterior del primordio hacia la anterior (a → k): Nótese la aparición gradual del primordio gonadal izquierdo desde la parte posterior hacia la anterior, en e) se nota la presencia de un segundo primordio derecho menos basófilo el cual va desapareciendo y perdiéndose por completo en i) mientras que el izquierdo se mantiene hasta l). Coloración: HE.....24

Figura 10. Descripción histológica de la sección transversal de un alevín de 3.1 cm de longitud total a los 7 dpl (23 phd) desde la parte posterior del abdomen hasta la parte anterior (a → i): tener en cuenta la aparición gradual del primordio gonadal izquierdo (PGI) desde la parte posterior (a y b) hasta la parte media (c, d, e, f, g) y la parte anterior del abdomen (h e i). Tener en cuenta que ambos, PGI y PGD están en el lado izquierdo del abdomen. La vejiga gaseosa (VN) se ve pequeña de (a) a (e), pero aumenta su tamaño en la parte anterior del abdomen (g, h e i). Coloración: HE25

Figura 11. Descripción histológica transversal de un alevín de 3.2 cm de longitud total al 8 dpl (24 dpe), desde la parte media de los primordios hacia la parte anterior (a → f): Nótese la desaparición gradual del primordio gonadal derecho. Coloración: HE26

Figura 12. (a): Corte transversal de primordio gonadal indiferenciado (b): de un alevín de 4.9 cm de longitud total (14 dpl o 30 dpe). b: de un alevín de 4.9 cm de longitud total (15 dpl o 31 dpe). (c) de un alevín de 4.9 cm de longitud total (15 dpl o 31 dpe). Nótese la presencia clara de una gonía (flecha roja) tanto en a, en b y en c (d): de un alevín de 5.0 cm de longitud total (12 dpl o 32 dpe). (e): de un alevín de 5.7 cm de longitud total (19 dpl o 35 dpe). Nótese el alargamiento que sufre la gónada indiferenciada tanto en (d) como en (e). (f): Microfotografía de gónada indiferenciada de esturión a los 80 dpe en la que la flecha blanca señala una capa de células positivas a Vasa, las células germinales primordiales (PGCs) tardías localizadas bajo el epitelio columnar. Fuente: Rzepkowska & Ostaszewska (2013).

Coloración: HE27

Figura 13. Corte de gónadas presumiblemente hembras. (a): de un alevín de 6.3 cm de longitud total (23 dpl o 39 dpe); (b): un alevín de 6.9 cm de longitud total (25 dpl o 41 dpe); (c): de un alevín de 8.0 cm de longitud total (29 dpl o 45 dpe); (d): de un alevín de 10.5 cm de longitud total (35 dpl o 51 dpe); (e): de un alevín de 11.6 cm de longitud total (39 dpl o 55 dpe) y (f): de un alevín de 9.8 cm de longitud total (41 dpl o 57 dpe). Observar la parte dorsal con bordes regulares (flecha negra) y la barde abdominal con bordes totalmente irregulares con invaginación(es) (flecha azul) sugiriendo posibles hembras (ovarios presuntivos). Coloración: HE28

Figura 14. Corte de gónadas presumiblemente machos. (a): de un alevín de 7.4 cm de longitud total (27 dpl o 43 dpe); (b): de un alevín de 9.3 cm de longitud total (31 dpl o 47 dpe); (c): de un alevín de 11.5 cm de longitud total (43 dpl o 59 dpe); (d): del mismo alevín que en (c), pero hacia la parte anterior del primordio. Nótese la presencia de canales en el interior del primordio que parecen conductos espermáticos sugiriendo un posible macho (testículo presuntivo). Coloración: HE29

Figura 15. Representación esquemática temporal del desarrollo de las larvas, post larvas y alevines de *Arapaima gigas*, paiche especificando el tiempo de cría, primer muestreo y aparición de primordios gonadales (GP).....30

Figura 16. Integridad del transcriptoma ensamblado *de novo* de alevines de *Arapaima gigas* expuestos a tratamiento hormonal con 17 α -metil testosterona y 17 β -estradiol. Transcriptoma ensamblado con Trinity y evaluado con Transrate36

Figura 17. Distribución de los términos de la ontología de genes (GO) para el transcriptoma completo de los juveniles de *Arapaima gigas* bajo tratamiento hormonal con 17 α -metil testosterona y 17 β -estradiol.....37

Figura 18. Distribución del cluster de grupos ortólogos con base en la respuesta transcriptómica de los juveniles de *Arapaima gigas* bajo tratamiento hormonal con 17 α -metiltestosterona y 17 β -estradiol.....38

Figura 19. Homología de los transcritos de los juveniles de *Arapaima gigas* bajo tratamiento hormonal con 17 α -metiltestosterona y 17 β -estradiol generada con Trinotate durante el proceso de anotación.....39

Figura 20. Agrupación de los transcritos expresados diferencialmente en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17 α -metiltestosterona (T) y 17 β -estradiol (E) durante 30 días. FDR: False Discovery Rate, FC: Fold-change, CPM: Counts per million, Rojo: Sobre-expresado, Azul: Sub-expresado, 1-3: Réplicas biológicas, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal40

Figura 21. Diagrama de Venn para el número de transcritos sobre-expresados diferencialmente en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17 α -metiltestosterona (T) y 17 β -estradiol (E) durante 30 días. 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal, UP: Indica transcritos sobre expresados. Las comparaciones fueron hechas contra el tratamiento control (sin hormonas)41

Figura 22. Volcano plots para cada una de las comparaciones pareadas realizadas durante el análisis de expresión diferencial en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17 α -metiltestosterona (T) y 17 β -estradiol (E) durante 30 días. FDR: False Discovery Rate, FC: Fold-change, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal, Up: Sobre expresado, Down: Sub expresado, NS: No significativo42

Figura 23. Corte transversal de primordios gonadales de alevines de *A. gigas* (a) a los 30 días de exposición a 17 β -estradiol y (b) a los 30 días de exposición a 17 α - metiltestosterona. Coloración: HE45

Figura 24. Plegamiento proteico asistido por hsp. Fuente: Coronato et al., (1999)51

Figura 25. Efectos genómicos y no genómicos de los receptores citoplasmáticos (RE) y de membrana (REm) del estrógeno, que activa diversas cascadas de señalización que pueden estimular indirectamente mecanismos genómicos, entre los que destaca la activación de la proteína quinasa C (PKC). Fuente: Marquez, (2010)52

Figura 26. Modelo propuesto para la importación nuclear de BR-C, tras la interacción entre

BR-C y Rack1. Fuente: Cheng et al., (2014).....54

Figura 27. Vía de señalización ERK y la participación del gen *naca* y el 17 β -estradiol.

Fuente: Modificado de Patel and Shvartsman, (2018).....57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa con la ubicación geográfica de la localidad de muestreo de <i>Arapaima gigas</i> . A: Ubicación de la ciudad de Pucallpa. B: Instalaciones ubicadas en el kilómetro 10 de la carretera Jorge Basadre, lugar de muestreo de alevines utilizados para la parte histológica de esta tesis. C: Instalaciones ubicadas en el kilómetro 25 de la carretera Jorge Basadre, lugar donde se realizó el proceso de inversión sexual de esta tesis.....	74
Anexo 2: Protocolo de extracción de ARN con el método de Trizol.	74
Anexo 3: Protocolo de purificación del ARN.	76
Anexo 4: Protocolo utilizado en la preparación de las librerías para secuenciamiento establecidos en la Guía de Referencia de TruSeq Stranded mRNA (2017) y la Guía de Denaturación y Dilución NextSeq System (2016) proporcionados por Illumina.....	77
Anexo 5: Denaturación y dilución de librerías.	87
Anexo 6: Denaturación y dilución del phix control.	88
Anexo 7: Listado de genes con expresión significativamente diferenciales en los procesos biológicos enriquecidos relacionados con la reproducción en juveniles de <i>Arapaima gigas</i> expuestos a 17 α -metiltestosterona (T) y 17 β -estradiol (E) durante 30 días. FE: Fold-enrichment, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal. La comparación es con respecto al control.	90
Anexo 8: Identidad de los genes <i>gblp</i> (<i>risk1</i>), <i>naca</i> , <i>hsp83</i>	92

LISTADO DE ABREVIATURAS

Pb	Pares de bases
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Blastn	Blast de nucleótidos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DPE	Días post eclosión
DPL	Días post levante
Cm	Centímetro
M	Metro
GO	Ontología de genes
G	Gramos
Min	Minuto
Seg	Segundo
T.A.	Temperatura ambiente
HT1	Buffer de hibridación
BBB	Bead Buffer Binding (Enlace buffer de perlas)
BWB	Bead Washing Buffer (Buffer de lavado de perlas)
ELB	Elution Buffer (Buffer de elución)
FPF	Fragment, Prime, Finish Mix (Mezcla de fragmento, imprimación y acabado)
RPB	RNA Purification Beads (Perlas de purificación de ARN)
RSB	Resuspension Buffer (Buffer de resuspensión)

RBP	RNA Bead Plate (Placa de perlas de ARN)
FSA	First Strand Synthesis Act D Mix (Mezcla Act D de síntesis de primera hebra)
SMM	Second Strand Marking Master Mix (Mezcla maestra de marcador de segunda hebra)
CTE	End Repair Control (Control de reparación final)
ATL	A-Tailing Mix (Mezcla de cola A)
CTA	A-Tailing Control (Control de cola A)
LIG	Ligation Mix (Mezcla de ligadura)
ALP	Adapter Ligation Plate (Adaptador de placa de ligadura)
STL	Stop Ligation Buffer (Buffer de detención de ligadura)
PPM	PCR Master Mix (Mezcla maestra de PCR)
PPC	PCR Primer Cocktail (Coctel de imprimación de PCR)
DCT	Diluted Cluster Template (Plantilla de racimo diluido)
PDP	Pooled DCT Plate (Pooled placa DCT)
Min	Minuto

RESUMEN

Arapaima gigas, paiche, es la especie de pez de agua dulce más grande de la Amazonía sudamericana del cual no se tiene una comprensión precisa de los mecanismos de diferenciación sexual gonadal de la especie, el proceso de gonadogénesis aún no está bien estudiado. Este trabajo tuvo como objetivo principal determinar la expresión diferencial dimórfica en respuesta a la exposición de esteroides sexuales durante la diferenciación temprana de sexos de *A. gigas*. Para tal fin se determinaron las características histológicas del desarrollo gonadal temprano de alevines de paiche, y el análisis transcriptómico de alevines expuestos a tratamientos hormonales con 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol. Para determinar las características histológicas del desarrollo gonadal temprano de *A. gigas*, se utilizaron alevines pertenecientes al mismo “levante”. Las crestas gonadales aparecieron a los 22 dpe y los primordios gonadales aparecieron a los 23 dpe. Los dos primordios gonadales se observaron con diferentes tamaños, donde el primordio izquierdo era más grande y basófilo que el primordio derecho. Finalmente, se observó diferenciación gonadal entre presuntas hembras y machos con alguna diferenciación estructural entre ambos desde el día 43 posterior a la eclosión. Con respecto al análisis transcriptómico, el secuenciamiento realizado mediante RNA seq, generó un total de 1,050'994,085 lecturas pareadas (pair-end), de las cuales se obtuvieron 903'932,354 lecturas limpias pareadas (86.01 % por ciento). Después de la remoción de los transcritos de baja calidad con base en los parámetros de Transrate se obtuvieron 331,974 genes y 362,851 transcritos. El análisis en la base de datos de DAVID, cuando se confrontaron ambos tratamientos en el día 30, es decir, 17α -metiltestosterona versus el 17β -estradiol, con estradiol al alta; es decir E30 vs T30, el único proceso metabólico destacado relacionado a la diferenciación sexual de las gónadas fue el de la oogénesis, (GO:0048477) y los genes que se encuentran sobre expresados en este proceso de ovogénesis al día 30, son los genes *hsp83*, *risc1* y *naca*, genes que hasta el momento no se habían reportado como importantes en la diferenciación sexual en peces y que se encuentran sobre expresados en un momento del desarrollo gonadal extremadamente temprano del paiche donde solo se observa la disposición dorso ventral en ovarios y la permanencia de la indiferenciación de los testículos.

Palabras claves: desarrollo gonadal temprano, primordio gonadal, RNA seq, análisis transcriptómico, *Arapaima gigas*.

ABSTRACT

Arapaima gigas, paiche, is the largest freshwater fish species in the South American Amazon of which there is no precise understanding of the mechanisms of gonadal sexual differentiation of the species, the process of gonadogenesis is still not well studied. The principal objective of this work was to determine the differential dimorphic expression in response to exposure to sex steroids during early sex differentiation of *A. gigas* was determined. For this purpose, the histological characteristics of early gonadal development of paiche fingerlings were determined, as well as the transcriptomic analysis of fingerlings exposed to hormonal treatments with 17α -methyltestosterone and 17β -estradiol. To determine the histological characteristics of early gonadal development of *A. gigas*, fingerlings belonging to the same "raised" were used. The gonadal crests appeared at 22 dap and the gonadal primordia appeared at 23 dap. The two gonadal primordia were observed to be of different sizes, with the left primordia being larger and basophilic than the right primordia. Finally, gonadal differentiation was observed between presumed females and males with some structural differentiation between them from day 43 after hatching. Regarding the transcriptomic analysis, the sequencing performed using RNA seq generated a total of 1,050,994,085 paired readings (pair-end), of which 903,932,354 clean paired readings (86.01 percent) were obtained. After removal of low-quality transcripts based on Transrate parameters, 331,974 genes and 362,851 transcripts were obtained. The analysis in the DAVID database, when both treatments were compared on day 30, that is, 17α -methyltestosterone versus 17β -estradiol, with estradiol at discharge; that is to say E30 vs T30, the only outstanding metabolic process related to the sexual differentiation of the gonads was that of oogenesis, (GO:0048477) and the genes that are overexpressed in this process of oogenesis on day 30, are the genes *hsp83*, *risc1* and *naca*, genes that until now had not been reported as important in sexual differentiation in fish and that are overexpressed at a time of extremely early gonadal development of the paiche where only the dorsoventral arrangement is observed in ovaries and the permanence of the indifferentiation of the testicles.

Keywords: early gonadal development, gonadal primordia, RNA seq, transcriptomic analysis, *Arapaima gigas*.

I. INTRODUCCIÓN

En la Cuenca Amazónica, uno de los mayores peces de escama de agua dulce conocidos es el *Arapaima gigas* también conocido como paiche en Perú, warapaima en Guyana, dechi en Colombia y pirarucú en Brasil, siendo el nombre en este país de origen indígena, formada por la unión de la expresión pira = pez y urucu = rojo, denominación atribuida a la coloración roja que adquiere el borde posterior de las escamas en determinadas regiones del cuerpo (Dutra 2007).

En su ambiente natural vive en los lagos, lagunas y otros ambientes menores de la planicie inundable, con abundante vegetación acuática flotante, que en ocasiones llega a cubrir totalmente el espejo de agua (Lima 2009), aunque también se les ha encontrado en ríos y canales durante los niveles bajos de agua (Castello y Stewart 2010).

El paiche pertenece al Orden Osteoglossiformes, uno de los grupos más antiguos de peces vivientes que surgieron durante el Jurásico. El orden incluye seis familias, 29 géneros y cerca de 217 especies. En América del Sur son encontrados los géneros *Arapaima* (*A. gigas*) y *Osteoglossum* (*O. bicirrhosum* y *O. ferreirai*) (Lima 2009).

De hábito alimentario carnívoro, el paiche se alimenta preferentemente de peces, caracoles e insectos acuáticos (Val y Honczaryk 1995; Imbiriba 2001 en Lima 2009). Además de eso, es un pez de respiración aérea obligatoria, valiéndose de su vejiga gaseosa modificada que permite la hematosis con oxígeno atmosférico, precisando emerger a intervalos de 4 a 5 minutos para respirar, lo que lo hace vulnerable a ser capturado, pues en esos momentos los pescadores, muñidos de un arpón consiguen capturar a los especímenes.

Sandoval (2007) reporta que es una especie gonocórica, de maduración asincrónica que presenta caracteres sexuales secundarios sólo durante el período de madurez máxima. En cuanto a la morfología de los caracteres sexuales internos, la hembra de paiche posee sólo el ovario izquierdo, que es desarrollado y fusiforme, de morfología gymnoaria, está situado en la pared de la cavidad celómica, estando firmemente adherido próximo a la vejiga gaseosa, es más largo en la porción anterior y afilado en la parte caudal. Su tamaño se modifica durante el ciclo reproductivo, observándose oocitos en su interior en diversas fases de desarrollo (Dutra 2007). La morfología de los caracteres sexuales internos del macho es caracterizada por la presencia de un único testículo funcional, localizado en el lado izquierdo, próximo a la vejiga gaseosa, adherido a la cavidad celómica. Es alargado, con diámetro relativamente pequeño, variando entre 1 y 1,5 cm, permaneciendo del mismo tamaño durante todo el ciclo reproductivo. Su parte caudal se continúa con el ducto espermático que se abre en la papila urogenital (Dutra 2007).

La actividad reproductiva en esta especie está controlada por el aumento de la disponibilidad de alimento en el período de aguas bajas y posteriormente con la llegada del período de lluvias, el aumento del nivel pluviométrico, las variaciones en la conductividad, el fotoperiodo y la temperatura. El periodo del desove para la Amazonía peruana tiene su máxima intensidad de septiembre a diciembre, con un pico notable en el mes de noviembre, pero se observan reproducciones hasta abril. Para la Amazonía brasilera el periodo de lluvia y por ende de reproducción del paiche, se presenta durante los meses de diciembre a junio.

Respecto a la fecundidad, según Baca (2001), en Dutra (2007) una hembra madura de 2.45 m presentó una fecundidad de 636,475 óvulos en diversas fases de desarrollo; en tanto que Sandoval (2007) reporta que el número de crías obtenidas por reproducción varía entre los 250-2,000 alevinos colectados al momento del levante. Trabajos conducidos en Brasil por Oliveira en 1944, reportados por Sandoval (2007) reportan que el número de larvas por desove fue de aproximadamente 4,000 individuos.

Existen estudios conducidos con esta especie, orientados principalmente a los aspectos biológicos y fisiológicos de su sistema respiratorio y excretor (Sandoval 2007). Lima (2009) indica que, en las últimas décadas, *A. gigas* se convirtió en el foco de muchos estudios que involucran diversas áreas, tales como: cultivo en cautiverio, fisiología y bioquímica, variabilidad genética y filogenia.

Después que ocurre la eclosión de los huevos, las larvas permanecen durante 5 días en el nido, y durante ese tiempo ocurre la absorción del saco vitelino. Estas observaciones pioneras fueron efectuadas por Fontenelle en 1959 citado por Sandoval (2007), quien describe que los huevos son de color verde y miden de 2.8 x 4.2 mm, y las larvas recién eclosionadas miden 11.4 mm. Asimismo, el autor indica que, durante los primeros meses de vida, los alevinos son de color negro y nadan en cardumen (sobre la cabeza) protegidos por el padre.

Es muy apreciado por su carne, pero también se aprovechan las escamas, para artesanías, y la lengua, de característica ósea, es usada en Brasil para rayar las barras de la guaraná. Los hábitos de esta especie y la excelente calidad de su carne están determinando sin embargo una captura cada vez más intensa y, a pesar de los programas de protección que se llevan a cabo en los países de la Cuenca Amazónica, existen evidencias que indican la disminución drástica de las poblaciones naturales y el tamaño de captura de los individuos, siendo muy difícil hoy en día, capturar animales de tamaños superiores a 1.50 m (UNCTAD 2006; Prado 2009; Rebaza *et al.* 1999; Elespuru *et al.* 2007), tanto que ha sido listado en el AnexoII para su protección por The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) (UNCTAD 2006).

Ante la situación delicada de la especie, y la alta aceptación y demanda de su carne, la piscicultura del paiche ofrece varias ventajas y se constituye en una evidente solución a la disminución de las poblaciones naturales permitiendo su recuperación, satisfaciendo la demanda local, regional e internacional por su carne; y permitiendo además desarrollar nuevas empresas en base a una especie nativa de la Amazonía, permitiendo la intensificación del uso de la tierra en las zonas ya ocupadas y desboscadas (Rebaza *et al.* 1999; Chu-Koo *et al.* 2009). La especie ofrece características para una piscicultura promisoría en régimen

intensivo pues soporta altas densidades de siembra, rápido crecimiento, alcanzando hasta diez kilos en el primer año de crianza, llegando en la fase adulta, a tres metros de longitud y más de 200 kg de peso (Imbiriba 2001; Hrbek *et al.* 2005 en Lima 2009).

Sin embargo, una de las limitantes anecdóticas para la cría en cautividad que se ha observado en el Perú y en los países como Brasil y Bolivia donde se ensaya su cultivo, es el hecho de que los piscicultores no tienen un sistema de identificación de reproductores, lo cual impide hacer un seguimiento exacto de los animales y determinar las características de comportamiento reproductivo, conforme se hace con las especies domésticas. Otro aspecto que se ha observado en crianzas en cautiverio en el Perú es que en muchas de ellas no se reporta una reproducción sostenida del paiche; esto se puede deber a que estos animales pueden estar sometidos a estrés o perturbaciones que retrasan la madurez sexual (Luling 1971 en Sandoval 2007).

De todas maneras, para que el proceso de cultivo sea llevado sin limitantes, se hace necesario el aprovisionamiento sostenido de semilla. En este aspecto, *Arapaima gigas* presenta problemas para su reproducción en cautiverio. En cautividad, la reproducción ocurre generalmente en grandes estanques de tierra, donde stocks de unos pocos reproductores, son mantenidos juntos desde el comienzo de la estación de lluvia que es de diciembre a marzo en la Amazonía peruana. La liberación de alevines ocurre después de la espontánea formación de parejas de machos y hembras, los que construyen un nido, delimitan su territorio y cuidan a la progenie al menos durante 20 días del ataque de los depredadores (Chu-Koo *et al.* 2009; Rebaza *et al.* 2003 en Silva 2009).

La determinación del sexo en el cultivo de especies es un pre requisito para la constitución del plantel de reproductores, siendo la identificación individual de los reproductores, necesaria para mantener la proporción sexual que permita producir un número importante de alevines, además de permitir el desarrollo de cultivos mono sexados que aproveche el potencial desarrollo de uno de los sexos. En muchas especies, la identificación del sexo fenotípico es más o menos fácil durante la pubertad de machos o hembras por la aparición de caracteres externos específicos. En algunos casos, la biopsia intraovárica o endoscopías a animales anestesiados, permiten diagnosticar sexo en animales inmaduros (Kynard y

Kieffer 2002; Hurvitz *et al.* 2007; Bryan *et al.* 2007; Swenson *et al.* 2007 en Chu-Koo *et al.* 2009). En otros casos, tal como ocurre con *Paralichthys adspersus*, la presencia en los individuos machos de sólo dos orificios (anal y urogenital) y de tres en las hembras, permite realizar dicha distinción (Angeles y Mendo 2005).

Sin embargo, la identificación de sexo por criterios morfológicos en animales inmaduros de *A. gigas* no es posible; sólo cuando los animales han alcanzado la madurez sexual se distinguen los sexos por la aparición de una coloración naranja-rojiza fuerte de la cola al opérculo en los machos, mientras que esa coloración nunca se presenta en el opérculo en las hembras. (Chu-Koo *et al.* 2009). Así mismo, en la etapa reproductora, la papila genital de machos y hembras adultos difiere levemente, en la hembra tiene forma de roseta con pliegues y en el macho guarda una disposición lineal (Sandoval 2007). Dadas estas características, no es posible aplicar estos dimorfismos cuando se trata de establecer un plantel de reproductores desde las primeras etapas de vida, situación que obliga a la búsqueda de otras tecnologías basadas en la fisiología reproductiva de los teleósteos.

En lo referente a su reproducción, aún no se tienen datos procedentes de estudios experimentales que reporten con certeza la edad a la primera madurez sexual en ambientes naturales (Sandoval 2007). Sin embargo, investigadores como Luling en 1964; Fontenelle en 1948 e Imbiriba en 1993 citados por Sandoval (2007); y Lima (2009); han reportado que el paiche se reproduce entre los 4-5 años de edad, cuando alcanza un peso de 40-45 kg y una longitud aproximada entre 1.60 y 1.70 m. Diferentes grupos de investigadores han reportado que el paiche en edad reproductiva construye nidos en tierra arcillosa sin vegetación, de una forma circular, de 50 cm de diámetro y 15-16 cm de profundidad, pudiendo producir una hembra unos 11,000 alevinos por desove (Bard e Imbiriba 1986 citados por Sandoval 2007; Castello y Stewart 2010).

1.1. Objetivo general

Determinar la expresión diferencial dimórfica en respuesta a la exposición de esteroides sexuales, durante la diferenciación temprana de gónadas de *Arapaima gigas*.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar a través de cortes histológicos, el desarrollo gonadal de alevines de *A. gigas* paiche.
- Determinar el momento de aparición de los primordios gonadales.
- Obtener ARNm de gónadas de alevines de *A. gigas* paiche, expuestos a esteroides sexuales 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol.
- Identificar a través de secuenciado los genes expresados diferencialmente y su identidad en respuesta al tratamiento con esteroides sexuales.
- Identificar a través de secuenciado la identidad de los genes expresados diferencialmente involucrados en el desarrollo y diferenciación gonadal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Arapaima gigas*, PAICHE. CUVIER 1829.

El paiche siguiendo el sistema taxonómico adoptado por Berg (1937) se ubica en la siguiente forma:

Súper orden Osteoglossomorpha

Orden Clupeiformes (Osteoglossiformes)

Superfamilia Osteoglossidae (Arapaimidae)

Familia Arapaimidae

Nombre vulgar: paiche, pirarucu.

Gen. Esp. *Arapaima gigas* (cuvier)

El paiche o Pirarucú como lo llaman en Brasil, es un pez de escamas, de agua dulce perteneciente a la familia de los Arapaimidae (Osteoglossidae) y al super orden Osteoglossomorpha, grupo de peces primitivos que con la excepción de la familia Hiodontidae son tropicales. Los Osteoglossomorpha comprenden seis familias existentes y 206 especies. Ellos han existido desde el periodo cretáceo (Hace 65 a 136 millones de años) y se cree que han descendido de los primitivos peces óseos. Es uno de los mayores peces de agua dulce, llegando a tener hasta 3 m de longitud total y un promedio de 200 kg de peso total. Su cabeza es pequeña con relación al cuerpo. Su coloración es ceniza oscura (pardo y acero) con el borde de las escamas amarillas o color rojizo como el achiote. Sus aletas pequeñas están orientadas hacia atrás. Su lengua es una porción ósea de 25 cm de longitud total y 5 cm de ancho. Tiene dientes filiformes (Campos Baca 2001).

Es considerado el pez amazónico con la mejor carne, pero también se aprovechan las escamas, para artesanías, y la lengua en Brasil para preparar la guaraná. Los hábitos de esta especie y la excelente calidad de su carne están determinando una captura cada vez más intensa y a pesar de los programas de protección que se llevan a cabo en los países de la

cuenca, existen evidencias que indican la disminución drástica de las poblaciones naturales y el tamaño de captura de los individuos, siendo muy difícil hoy en día capturar animales de tamaños superiores a 1.5 m. En toda la cuenca el paiche es considerado una especie de alta demanda y en etapa e ingreso a la lista de especies en peligro de extinción por la alta presión de pesca, especialmente en las cercanías de las grandes ciudades (Tratado de cooperación amazónica 1999).

2.2. HISTOLOGÍA DE PECES

La histología en los animales es la ciencia que estudia los tejidos relacionando el nivel celular con el macroscópico, sirviendo de base para diferentes disciplinas como Fisiología o Patología, proporcionando técnicas que aclaran aspectos biológicos como los parámetros reproductivos (Tamayo 2000). Específicamente en peces, la histología ha permitido análisis precisos sobre el desarrollo gonadal ya que permite apreciar a nivel microscópico el desarrollo de órganos y tejidos (Young *et al.* 2014). Es una herramienta que proporciona información sobre los procesos fisiológicos que interactúan entre sí durante el desarrollo de las gónadas (Valdebenito *et al.* 2011).

La histología en los peces se utilizó y se utiliza intensivamente en los estudios de diferenciación, desarrollo y maduración de las gónadas. Así, por ejemplo, Gupta en 1975, estudió el tiempo de maduración de hembras y machos de *Cyprinus carpio* en cambios histológicos. Munkittsick y Leatherland (1984), realizaron un estudio histológico en *Carassius auratus* clasificando el desarrollo ovárico en cinco etapas, mientras que Aytekin y Yuce (2008) realizaron un análisis histológico sobre el desarrollo gonadal en pez cebra (*Danio rerio*) determinando que los ovocitos muestran un desarrollo gonadal de tipo asincrónico; y así, son numerosos los ejemplos de esta clase de trabajos.

Actualmente, la histología ha pasado de ser una ciencia que permite estudiar, en primer lugar, la estructura microscópica de tejidos celulares y orgánulos celulares para describir su morfología y posible función; a convertirse en una ciencia que puede llegar a describir a nivel molecular, y llegar a conocer con resolución espacial la composición y reactividad químicas (histoquímica) del sistema biológico (Acuña y Elguero 2012). Ortiz-Delgado *et*

al. (2008) describen y caracterizan mediante esta técnica ovocitos en desarrollo del pez espada *Xiphias gladius*, logrando estudiar la presencia y distribución de carbohidratos, proteínas, lípidos, calcio, hierro, vitelogenina, proteína radiada, metaloproteína y hormonas tiroideas durante la ovogénesis. Otro ejemplo lo constituye el trabajo realizado por Núñez *et al.* (2016), quienes aplicando técnicas histológicas de rutina y técnicas histoquímicas de Picro - Fucsina de Van Gieson y Periodic Acid Schiff (P.A.S), hicieron un estudio citomorfológico de la maduración de gónadas de hembras de *Seriola lalandi* en un Sistema Acuícola de Recirculación (SAR).

2.3. INVERSIÓN SEXUAL EN PECES

El avance de la acuicultura en el mundo se vio favorecida por una serie de biotecnologías consideradas clásicas como el control de la madurez reproductiva, el control de la fertilidad, el control del sexo genético y el control de la proporción de sexos de las progenies; entre las que destaca precisamente esta última cuya importancia radica en el hecho de que permite favorecer el manejo del sexo que presente mejores características para el cultivo como mayor crecimiento, maduración tardía y la calidad de la carne. Para tal fin, se desarrollaron procedimientos para la producción directa de progenies mono sexo siendo la más extendida la reversión hormonal del sexo fisiológico utilizando para el caso de la producción de progenies mono sexo machos hormonas naturales como la testosterona, y otros o sintéticos entre los que destaca la 17α -metiltestosterona, la que se caracteriza por su gran estabilidad química sin ser necesariamente la más potente; o la feminización mediante el tratamiento hormonal con un estrógeno, siendo el más usado el 17β -estradiol, que es de fácil obtención y gran estabilidad química (Díaz y Neira 2005).

Ejemplos de investigaciones sobre el tema existen muchos en el mundo. Así tenemos, la producción de poblaciones mono sexo de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), utilizando 17α -metiltestosterona (Rosales. 2008) debido a su condición protogónica, que viene a ser un hermafroditismo incompleto en el que las gónadas femeninas son las primeras en alcanzar la madurez (Navarro-Flores *et al.* 2019); o la aplicación de la hormona 17α - metil testosterona en el guppy (*Poecilia reticulata*) para obtener una mayor producción de machos (Díaz e Infante 2019), pero la práctica más extendida en el uso de esta hormona es en la reversión sexual de Tilapia (Arredondo-Figueroa 2000). Por otro lado,

en peces como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) las hembras crecen más y maduran después que los machos haciendo que los stocks de hembras sean económicamente más ventajosos. Por tal motivo, está muy extendido el uso del estrógeno sintético ethynylestradiol-17 α (EE2) para obtener poblaciones mono sexo todas hembras (Razmi *et al.* 2011).

Estas hormonas masculinizantes o feminizantes no solo se utilizan para la obtención de poblaciones mono sexo según las características del género que se desee cultivar, sino que también son muy utilizadas en estudios de expresión de genes; sobre todo, en expresión diferencial de genes entre hembras y machos, en especies en las que no es posible hacer un dimorfismo evidente en las primeras etapas de desarrollo. Por ejemplo, el estudio de la expresión genética de la aromatasa *cyp19a1a* en el cíclido joya, *Hemichromis guttatus* (Luna 2017); o el estudio de la expresión dimórfica de *dmrt1* y *cyp19a1* (aromatasa ovárica) en el Pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Fernandino *et al.* 2008). En ambos trabajos de investigación se utilizaron alimentos enriquecidos con las hormonas 17 β -estradiol como feminizante y Fadrozole (un inhibidor de la aromatasa) como masculinizante.

2.4. LA TRANSCRIPTÓMICA Y EL ESTUDIO DE LOS PECES

Actualmente, las tecnologías han avanzado de modo tal que es posible abordar diferentes aspectos hasta niveles moleculares. De modo general, los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN e informática utilizadas para generar y procesar grandes conjuntos de datos biológicos (datos ómicos) están promoviendo un cambio crítico en el estudio de las ciencias (Manzoni *et al.* 2018). Específicamente, entre las tecnologías moleculares que más difusión está teniendo está la de la secuenciación de ARN (RNA-Seq), que ha comenzado a revelar la compleja dinámica del transcriptoma desde la levadura al ser humano a un nivel de sensibilidad y precisión sin precedentes (Ozsolak, & Milos 2010 y Wilhelm & Landry 2009). La transcriptómica es un área de investigación que caracteriza el ARN transcrito a partir de un genoma en particular que se investiga. Aunque los transcriptomas son más dinámicos que la genómica del ADN, estas moléculas proporcionan acceso directo a la regulación de genes y la información de las proteínas (Trapnell *et al.* 2009). Las nuevas tecnologías de análisis genéticos como las técnicas de secuenciación masiva, *Next Generation Sequencing* o NGS se caracterizan por su capacidad para secuenciar de forma

simultánea millones de fragmentos al azar del genoma o transcriptoma con la capacidad de lectura *in situ* a medida que los nucleótidos se incorporan, son diversas aplicaciones como la cuantificación del transcriptoma y caracterización de RNA-Seq (Glenn 2011).

Varios desarrollos en los métodos de RNA-Seq han proporcionado una caracterización aún más completa de las transcripciones de RNA que incluyen mejoras en el mapeo del sitio de inicio de la transcripción, mediciones específicas de cadena, detección de fusión génica, caracterización de ARN pequeño y detección de eventos de empalme alternativos (Ozsolak & Milos 2010). Los estudios que utilizan este método ya han alterado nuestra visión del alcance y la complejidad de los transcriptomas eucariotas. RNA-Seq también proporciona una medición mucho más precisa de los niveles de transcripciones y sus isoformas que otros métodos (Wang *et al.* 2009).

En peces, el estudio de la genómica, transcriptómica y proteómica de muchas especies utilizadas como modelo, han logrado un mayor aprovechamiento de las tecnologías desarrolladas con tanto esfuerzo, en el estudio de enfermedades genéticas humanas, como detectores de contaminación, como bio factorías de productos farmacéuticos, etc. (Rocha *et al.* 2001). RNA-seq permite avances significativos en el estudio de la fisiología de los peces; por ejemplo, la secuenciación y ensamblado de varios transcriptomas branquiales de *Odontesthes argentinensis*, representan los primeros pasos para hacer de esta especie un nuevo modelo para estudiar la osmorregulación (Calvelo 2017). En el jurel *Seriola rivoliana*, el transcriptoma obtenido representa el primer registro bioinformático en extenso para esta especie y permitirá realizar estudios de biología comparativa, expresión de genes seleccionados bajo contextos experimentales diversos (nutrición, metabolismo, inmunología), y se constituye como una base para la exploración de marcadores genético-poblacionales (SNPs, microsátélites). Por otro lado, se presentan datos preliminares del uso de fito bióticos solos o combinados con probióticos, la presencia de toxinas marinas y su efecto en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune (Tovar-Ramírez *et al.* 2017).

Para estudios de diferenciación de sexos en peces, RNA-Seq es usado sobre todo en la búsqueda de marcadores moleculares que permitan diferenciar un sexo de otro, o la identificación de genes candidatos (o maestros) en la determinación sexual (Ezaz *et al.*

2006). Por ejemplo, la búsqueda de marcadores de la diferenciación ovárica (Martínez 2013) o la caracterización molecular de la diferenciación testicular en el esturión siberiano *Acipenser baerii*; en el que se logró la identificación y caracterización de tramos significativos de secuencias de tres potenciales marcadores masculinos de la diferenciación sexual de esta especie (*dmrt1*, *cyp17a1*, y *ar*) (Berbejillo 2013).

En esta misma especie, ya se describen los datos del transcriptoma RNA-Seq de veinte gónadas de esturión siberiano en diferentes etapas de desarrollo: diez gónadas indiferenciadas, seis gónadas de machos inmaduros y cuatro gónadas de hembras inmaduras; los datos presentados permiten realizar estudios fundamentales sobre los mecanismos reguladores del desarrollo de las gónadas de esturión, que se pueden aplicar tanto en la acuicultura como en la investigación fundamental (Klopp *et al.* 2020).

Con respecto al paiche, no existen muchas experiencias en el uso de tecnologías ómicas en investigaciones de esta especie. Entre ellas, Prado (2009) analizó la expresión génica diferencial en la hipófisis de pirarucu en fase reproductiva y no reproductiva. Después, se publicó el genoma completo del paiche con especial énfasis en estudios filogenéticos y de divergencia evolutiva (Vialle *et al.* 2018) y más recientemente, el transcriptoma *De Novo* basado en el secuenciamiento de próxima generación reveló genes candidatos con expresión sexual específica (Watanabe *et al.* 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL DESARROLLO GONADAL TEMPRANO

3.1.1. Muestreo

Se colectaron un total de 99 alevines de paiche desde los 05 días post levante (dpl) con una talla mínima de 2.7 cm, hasta el 51 dpl con una talla máxima de 16 cm del Hatchery de la Empresa Amazon Fish Products S.A., ubicada en el kilómetro 10 de la carretera Jorge Basadre, Pucallpa-Ucayali-Perú. Durante los primeros 15 días, el muestreo fue diario, a partir del cual se realizó un muestreo inter diario de 03 alevines por día en los que se registró la talla de cada individuo muestreado. Los alevines fueron fijados y conservados en solución de formalina al 10 por ciento hasta su posterior transporte al Laboratorio de Fisiología, Genética y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa-Ancash-Perú.

3.1.2. Histología

Se tomó una sección transversal del cuerpo de cada alevín ubicada entre la aleta dorsal y la zona proximal de la aleta caudal, las cuales fueron; según las técnicas rutinarias, deshidratadas en un deshidratador automático de tejidos Thermo SCIENTIFIC - Microm STP120 en una serie ascendente de etanol (Figura 1), mientras que para la preparación de los "bloques" de parafina, se utilizó un centro de inclusión integrada Thermo Scientific – Microm EC 350-2 (Figura 2).

Se realizaron cortes de 6 micrones en un Micrótopo de rotación Thermo SCIENTIFIC – Micrón HM 325 y montados en láminas porta objetos para la tinción de hematoxilina-eosina (HE) (Figura 3).

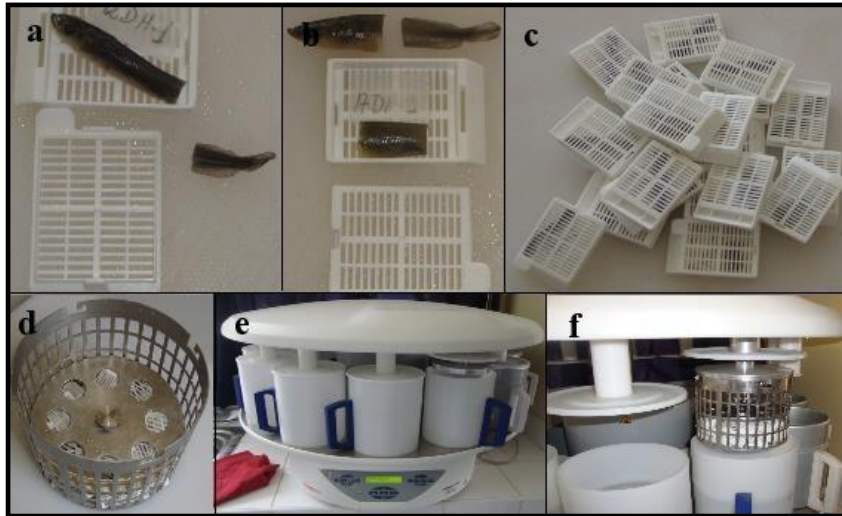


Figura 1. Proceso de deshidratación: (a) notar el corte a la altura de la aleta anal en los alevines más pequeños (b) en los alevines más grandes solo se tomó la sección abdominal entre la aleta anal y la pectoral (c, d) disposición de las muestras en las canastillas y (e, f) deshidratación en un deshidratador automático de tejidos Thermo SCIENTIFIC - Microm STP120

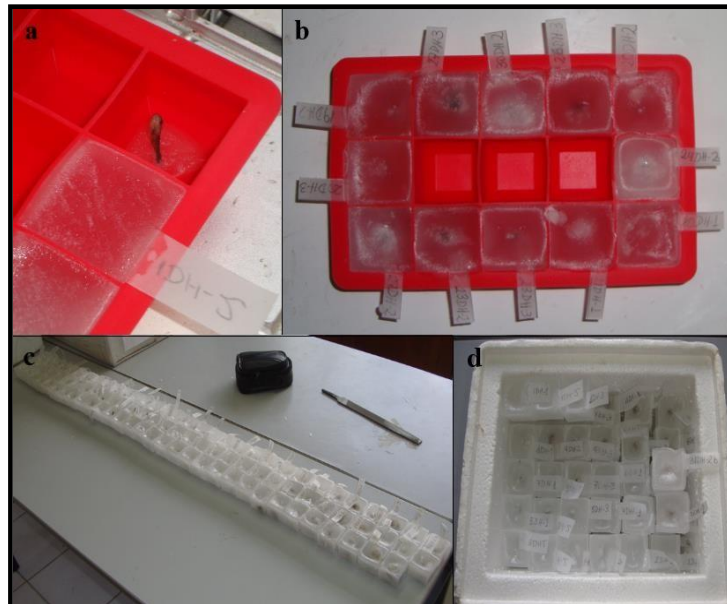


Figura 2. (a y b): imbibición de muestras en bloques de parafina, (c y d) conteo y almacenamiento de bloques de parafina



Figura 3. (a, b, c, d): corte de los bloques de parafina en el Micrótopo de rotación ThermoSCIENTIFIC – Micrón HM 325 y montaje en láminas porta objeto (e y f) batería y proceso de tinción con hematoxilina-eosina

Cabe mencionar que todos los organismos fueron manejados y sacrificados de acuerdo con el state-of-the-art humane killing (American Veterinary Medical Association, Canadian Council of Animal Care in Science). Los experimentos fueron realizados de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética para el uso de animales en Investigación en el Perú del Instituto Nacional de Salud. Garantizando en todo momento el bienestar animal de los organismos experimentales.

3.2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

3.2.1. Tratamiento hormonal

Se utilizaron 07 recipientes de plástico de 55 litros de capacidad, aforadas a 40 litros; con flujo de ingreso y salida de agua constante. Los recipientes fueron

marcadas para el tratamiento hormonal respectivo. Los recipientes que recibieron el tratamiento con 17α -metiltestosterona se marcaron como T1, T2 y T3; mientras que los que recibieron el tratamiento hormonal con 17β -estradiol, se marcaron como E1, E2, E3. En ambos tratamientos, se bajó el nivel del agua de los recipientes hasta los 20 cm y se aplicó la hormona. La concentración utilizada fue de 400 $\mu\text{g/L}$ para ambas hormonas (Razmi *et al.* 2010 ; Mejía y Román 2009). El recipiente número 7 no recibió tratamiento hormonal alguno por lo que fue utilizada como blanco y se marcó como B. En cada una de los recipientes descritos se colocaron 100 alevines de paiche con un promedio general de longitud total de 2,5 cm. Los alevines se alimentaron *ad-livitum* con larvas/nauplios de *Artemia salina* (Figura 4).

El tratamiento hormonal se aplicó de la siguiente manera:

La 17α -metiltestosterona se aplicó utilizando el protocolo de inmersión descrito por Mejía y Román (2009), modificado.

T1 recibió tratamiento con 17α -metiltestosterona el día 0 durante 01 hora.

T2 recibió tratamiento con 17α -metiltestosterona los días 0 y 5 durante 01 hora.

T3 recibió tratamiento con 17α -metiltestosterona los días 0, 5 y 10 durante 01 hora.

El 17β -estradiol se aplicó utilizando el protocolo de inmersión descrito por Razmi *et al.* (2010), modificado.

E1 recibió tratamiento con 17β -estradiol el día 0 durante 01 hora.

E2 recibió tratamiento con 17β -estradiol el día 0 durante 02 horas.

E3 recibió tratamiento con 17β -estradiol el día 0 durante 03 horas.

B no recibió ningún tratamiento

El recipiente 3 de cada tratamiento (T3 y E3) se muestreó tres veces: 3 individuos el día 1, 3 individuos en el día 10 y 6 individuos en el día 30. Los 03 alevines muestreados el día 1 y 10, y 03 alevines muestreados el día 30, fueron almacenados en RNA-later y conservados a 4°C hasta su posterior transporte al Laboratorio de Fisiología, Genética y Reproducción de la Universidad Nacional del Santa, donde se almacenaron a -80°C hasta el momento en que se les realizó la extracción de ARN. De los 06 muestreados el día 30, los 03 alevines restantes se almacenaron en solución de formalina al 10 por ciento y a partir de ellos se realizó el análisis histológico con la metodología descrita anteriormente.

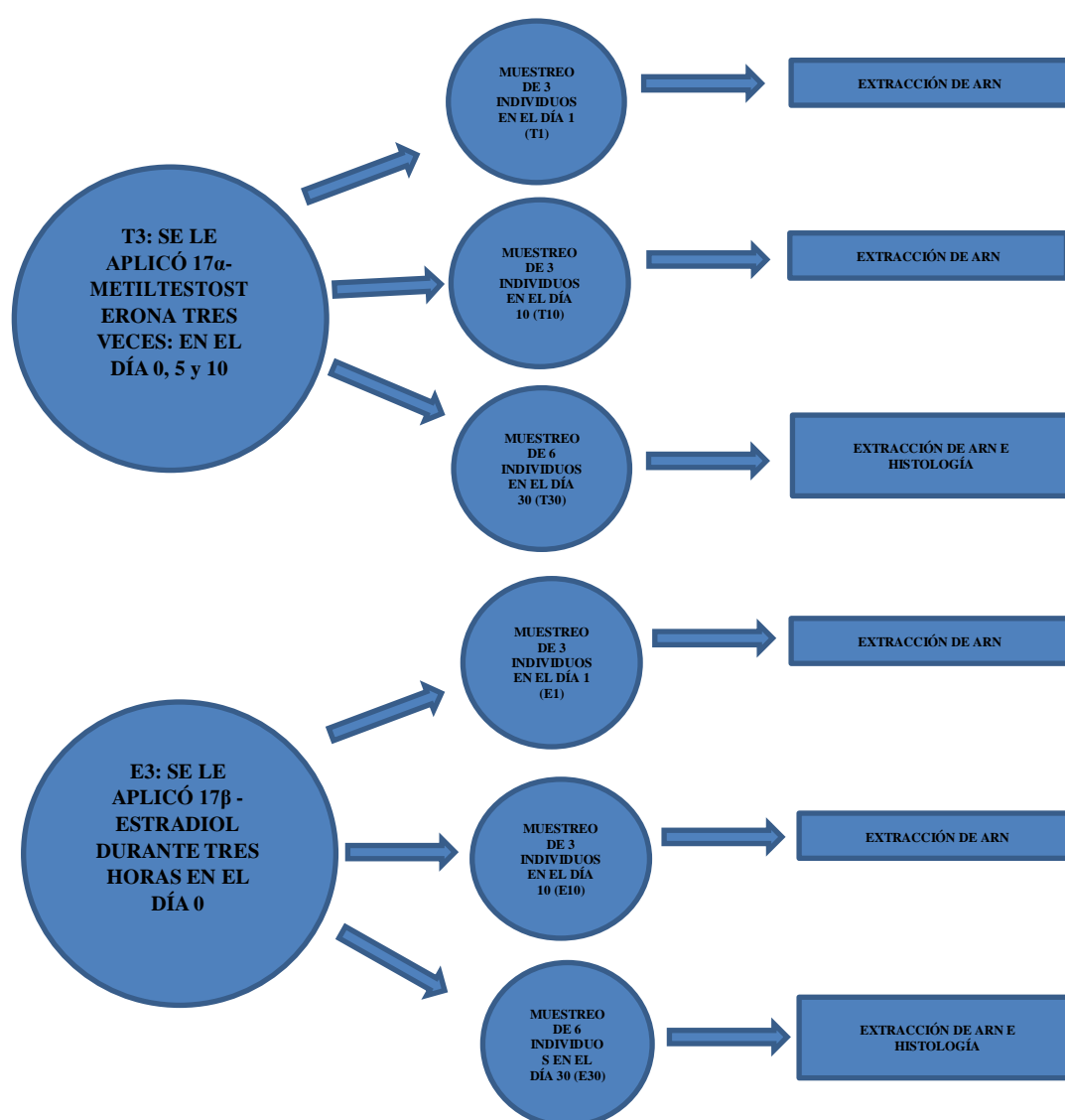


Figura 4. Diagrama del proceso de tratamiento hormonal por inmersión aplicado a los alevines de *Arapaima gigas*

El muestreo de los recipientes marcados 1 y 2 para ambos tratamientos fue preventivo ya que ante la ausencia de experiencias previas de sometimiento del paiche a hormonas masculinizantes y feminizantes de cualquier tipo (por alimentación o por inmersión), se desconocía la capacidad del paiche para soportar el tratamiento hormonal, por tal motivo solo se utilizaron para la histología y extracción de ARN para el transcriptoma los alevines muestreados de los recipientes marcados con el número 3 (T3 y E3) ya que estos fueron los que se expusieron por más tiempo al tratamiento hormonal.

3.2.2. Extracción de ARN

Se extrajo el ARN a los alevines muestreados de las tinas T3 y E3 ya que fueron los alevines que se expusieron al tratamiento durante más tiempo y de la tina B. El método utilizado fue el método de trizol; uno de los métodos de extracción de ARN de uso común en el Laboratorio de Fisiología, Genética y Reproducción de la Universidad del Santa (Anexo 2).

La cantidad e integridad del RNA fue determinado por fluorimetría usando un equipo QUBIT y un equipo Fragment Analyzer, respectivamente.

3.2.3. Eliminación de ADN genómico de preparación de ARN

Se realizó la purificación del ARN total siguiendo protocolo descrito en el kit de purificación de ARN (Anexo 3).

3.2.4. Preparación de librerías para secuenciamiento de transcriptoma

La preparación de las librerías para secuenciamiento se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos en la Guía de Referencia de TruSeq Stranded mRNA (2017) y la Guía de Denaturación y Dilución NextSeq System (2016) proporcionados por Illumina (Anexo 4).

El secuenciamiento de los fragmentos de cDNA de *A. gigas* obtenidos se realizó en un equipo NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USAc), y los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.2.5. Ensamble y anotación del transcriptoma

La calidad de las lecturas crudas obtenidas del secuenciador NextSeq 500 fue verificada con el programa FastQC V.011.7 (Andrews 2010). El preprocesamiento de las lecturas fue realizado con el programa Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.* 2014). Durante la fase de preprocesamiento, se eliminaron los adaptadores de secuenciación, bases no identificadas “N” y aquellas con un valor de calidad < 30, además de las lecturas menores a 36 bases. Previo al ensamble, las lecturas huérfanas (no pareadas) fueron eliminadas.

El ensamble *De Novo* se realizó utilizando el programa bioinformático Trinity v.2.8.1 (Grabherr *et al.* 2011; Hass *et al.* 2013) con parámetros por default. Este programa funciona a partir de 3 algoritmos conocidos como: a) Inchworm (el cual construye secuencias lineales “contigs” a partir de las lecturas fastq-RF, con la finalidad de aumentar el tamaño de palabra “Kmer”); b) Chrysalis (que sobre lapa las secuencias lineales “Cluster de contigs” Kmer-1 para construir componentes gráficos); c) Butterfly (que construye y compacta la información en gráficos de Bruijn K=5 para ensamblar las isoformas de los transcriptos). Al final de los 3 algoritmos de Trinity se obtuvieron las secuencias ensambladas en archivos con formato fasta (Figura 5). La calidad del transcriptoma ensamblado fue valorada con Transrate v1.0.3 (Smith-Unna *et al.* 2016) y las utilidades de Trinity, mientras su completitud con BUSCO v4.0.2 (Simao *et al.* 2015) usando la base de datos actinopterygii_odb10.

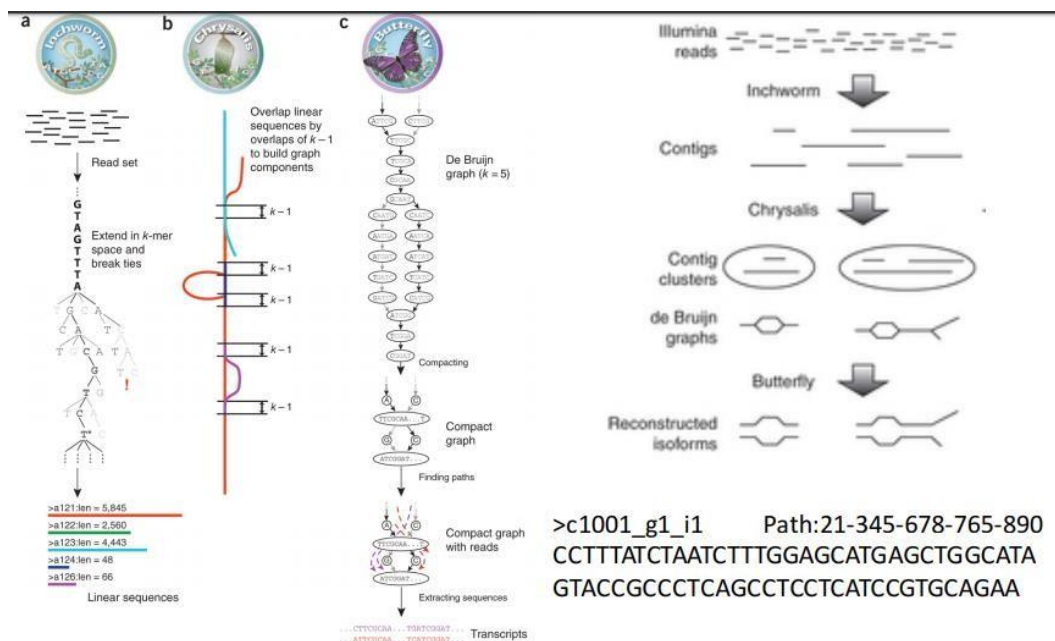


Figura 5. Flujo de trabajo para el ensamblaje de lecturas cortas utilizado en Trinity y basado en las gráficas de Bruijn

Fuente: Corona-Herrera (2017)

La anotación funcional de todos los transcritos se realizó a través de un BLAST local con el programa NCBI-BLAST-2.4.0 (Altschul *et al.* 1990) y la base de datos Swissprot/Uniprot (Apweiler *et al.* 2004) liberada en 2020_2. Asimismo, el programa Trinotate v3.0.1 (Haas *et al.* 2013) fue utilizado para el mejor resultado de BLAST para cada una de las proteínas contra la base de datos SwissProt/UniProt y los dominios de predicción PFAM (Figura 6).

3.2.6. Abundancia de transcritos, expresión diferencial y enriquecimiento funcional

El transcriptoma *de novo* evaluado con transrate y las lecturas preprocesadas con Trimmomatic fueron usados para calcular la abundancia de los transcritos para cada una de las réplicas biológicas. Todas las lecturas fueron alineadas contra el transcriptoma indexado usando Bowtie v2.3.5 (Langmead y Salzberg 2012). La abundancia fue calculada con el programa RSEM incluido en Trinity (Li y Dewey 2011). El análisis de expresión diferencial estuvo basado en las lecturas de cada una de las réplicas biológicas y se usó el paquete edgeR v3.28.1 (Robinson *et al.* 2010).

Los transcritos de baja abundancia fueron removidos (Counts Per Million, CPM < 0.9). Posteriormente, se aplicó una prueba de corrección múltiple para controlar la tasa de falso descubrimiento (FDR, por sus siglas en inglés) a través del método Benajmini-Hochberg (Benjamini y Hochberg 1995). Los transcritos con un valor P ajustado o FDR (False discovery rate) < 0.05 y al menos dos magnitudes de cambio (Fold-change, FC > |2|) fueron considerados como diferencialmente expresados. Con base en la anotación funcional y la expresión diferencial, se realizó el enriquecimiento funcional de los transcritos. Para la comparación de la ontología génica entre la lista de los transcritos expresados diferencialmente, los procesos biológicos más importantes fueron identificados con DAVID en su página web v6.8 (Huang *et al.* 2007). Finalmente, las vías metabólicas enriquecidas fueron detectadas usando la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

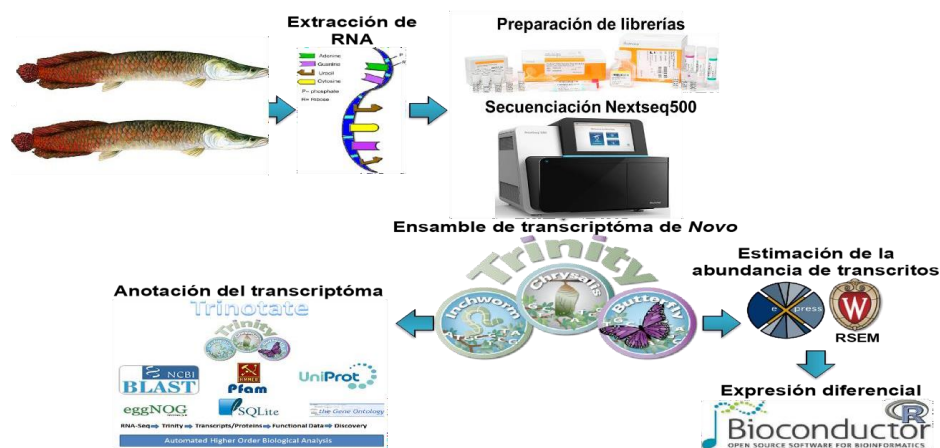


Figura 6. Diagrama mostrando el flujo de trabajo posterior al ensamblaje De Novo. Izquierda: Anotación de transcritos con Trinotate basado en BLAST y las bases de datos SwissProt/UniProt y Pfam. Derecha: Estimación de la abundancia de transcritos basado en RSEM y edgeR

Fuente: Modificado de Corona-Herrera (2017)

Se realizó una representación gráfica para comparar la expresión diferencial de los genes expresados en cada uno de los grupos experimentales conocido como *heatmap* o mapa de calor; el cual se elaboró mediante un algoritmo de seriación en la función *heatmap* del *software R* y *Cluster 3.0* (Eisen *et al.* 1998).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DEL DESARROLLO GONADAL TEMPRANO

De acuerdo con el análisis realizado a los cortes histológicos, se pudo observar ya desde el primer día de muestreo (en el 5 dpl o 21 dpe), una gran aglomeración de células en la parte dorsal del abdomen, a nivel de los riñones (Figura 7) con especial énfasis en la parte izquierda del alevín. En el 6 dpl o 22 dpe, se puede observar unas protuberancias a manera de crestas genitales (CG) en la parte dorsal del abdomen (Figura 8-a), mientras que en individuos al 7 dpl o 23 dpe y con un promedio en talla de 3.1 cm de longitud total, ya se observa la presencia de primordios gonadales pares, pero con un posicionamiento hacia el lado izquierdo de la parte dorsal de la cavidad abdominal (Figura 8-b).

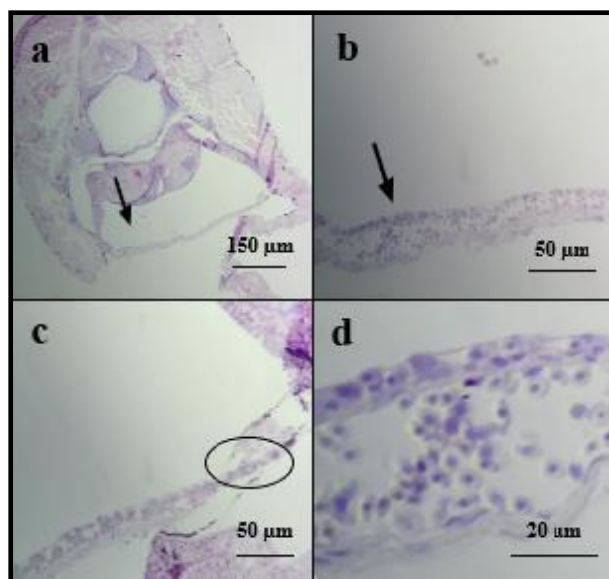


Figura 7. Corte histológico de alevín de 2.7 cm, al 5 dpl (21 dpe): (a) vista panorámica donde se observa una gran concentración celular, con el detalle de que esta es mayor en el lado izquierdo del alevín b: y d: y menor en el lado derecho (c). No hay presencia de crestas ni primordios gonadales. Notar en D), la forma de las células con puntas, sugiriendo la migración de éstas por el tejido mesodérmico por medio de movimientos ameboides. Coloración: HE

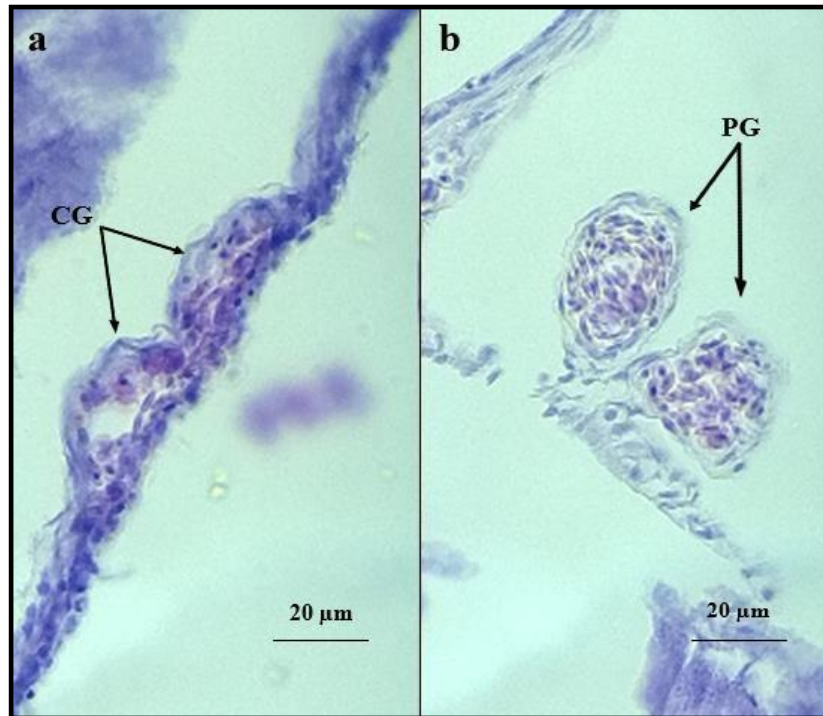


Figura 8. (a) Corte histológico transversal de un alevín de 3.0 cm de longitud total y al 6 dpl (22 dpe) en el que se aprecia (flechas), la aparición de presuntas crestas gonadales (CG) en la cavidad abdominal dorsal. (b) Corte histológico transversal de un alevín de 3.0 cm de longitud total y al 7 dpl (23 dpe) en el que se aprecia los primordios gonadales (PG) indicados con flechas. Coloración: HE

En cortes seriados de la parte posterior a la anterior de la gónada en individuos con presencia de primordios gonadales pares (Figura 9), se determinó que el primordio gonadal izquierdo hace su aparición desde la parte más dorsal del individuo y va aumentando de tamaño conforme avanza a la parte anterior de éste. En cortes donde el tamaño del primordio gonadal izquierdo alcanza su máximo, aparece además el primordio gonadal derecho, menos basófilo, y con un posicionamiento de ambos hacia el lado izquierdo del alevín; a la vez que se nota un incremento en el tamaño de la vejiga gaseosa. Ya hacia la parte anterior de los primordios, el primordio gonadal derecho desaparece, mientras que el izquierdo va reduciéndose de tamaño conforme se acerca a su parte anterior, con un fuerte posicionamiento hacia la

izquierda de la cavidad abdominal, en una posición en la que parece “arrinconado” por la vejiga natatoria (Figura 10). El proceso gradual de desaparición del primordio gonadal derecho se puede notar con mayor claridad en un individuo con 24 horas más de edad (8 dpl o 24 dpe) (Figura 11), cuyos cortes corresponden a la parte medial del primordio gonadal izquierdo.

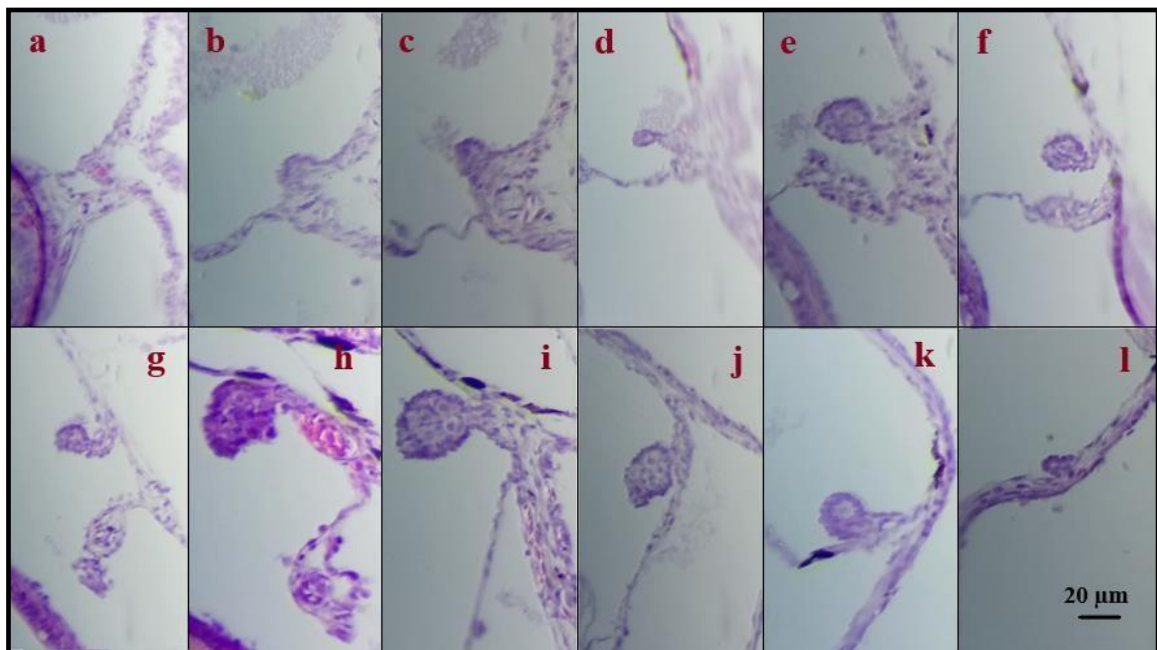


Figura 9. Descripción histológica transversal de un alevín de 3.1 cm de longitud total al 7 dpl (23 dpe) desde la parte posterior del primordio hacia la anterior (a → k): Nótese la aparición gradual del primordio gonadal izquierdo desde la parte posterior hacia la anterior, en e) se nota la presencia de un segundo primordio derecho menos basófilo el cual va desapareciendo y perdiéndose por completo en i) mientras que el izquierdo se mantiene hasta l). Coloración: HE

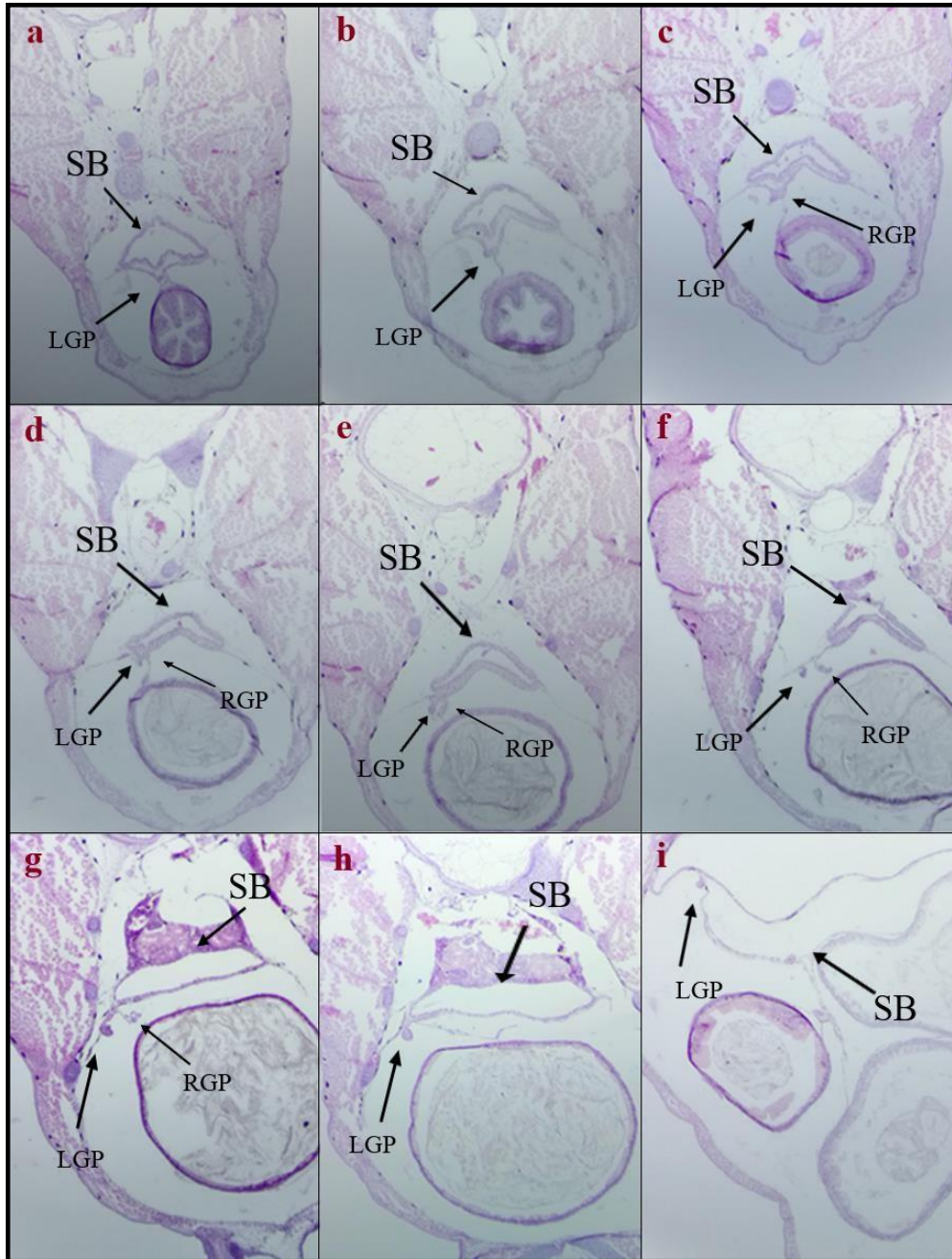


Figura 10. Descripción histológica de la sección transversal de un alevín de 3.1 cm de longitud total a los 7 dpl (23 phd) desde la parte posterior del abdomen hasta la parte anterior (a → i): tenga en cuenta la aparición gradual del primordio gonadal izquierdo (PGI) desde la parte posterior (a y b) hasta la parte media (c, d, e, f, g) y la parte anterior del abdomen (h e i). Tenga en cuenta que ambos, PGI y PGD están en el lado izquierdo del abdomen. La vejiga gaseosa (VN) se ve pequeña de (a) a (e), pero aumenta su tamaño en la parte anterior del abdomen (g, h e i). Coloración: HE

Se pueden observar gónadas indiferenciadas las que hasta el 31 dpe mantienen una forma ovalada. Después, las gónadas indiferenciadas crecen, pero sufren un alargamiento hasta el 41 dpe (Figura 12 a,b,c,d y e). Sin embargo, no todas las gónadas mantienen esa condición de indiferenciación, ya que a partir del 39 dpe en algunas gónadas, se pueden observar una disposición dorso ventral con la presencia de un invaginamiento (dando la apariencia de formación de lamelas), lo que correspondería a presumibles hembras. Esta condición se hace más evidente a partir del 45 dpe, donde se observa claramente una parte dorsal lisa que contrasta con la parte ventral bastante irregular y con invaginaciones, que corresponderían a futuras lamelas ováricas (Figura 13). En tanto que en lo que se refiere a los presumibles machos, no es posible diferenciar el lado dorsal del ventral, presentando más bien bordes bastante regulares y forma de “pera de boxeador alargada” con un extremo delgado adherido a la pared abdominal y el otro extremo redondeado. Esto es posible observarlo a partir del 43 dpe (Figura 14).

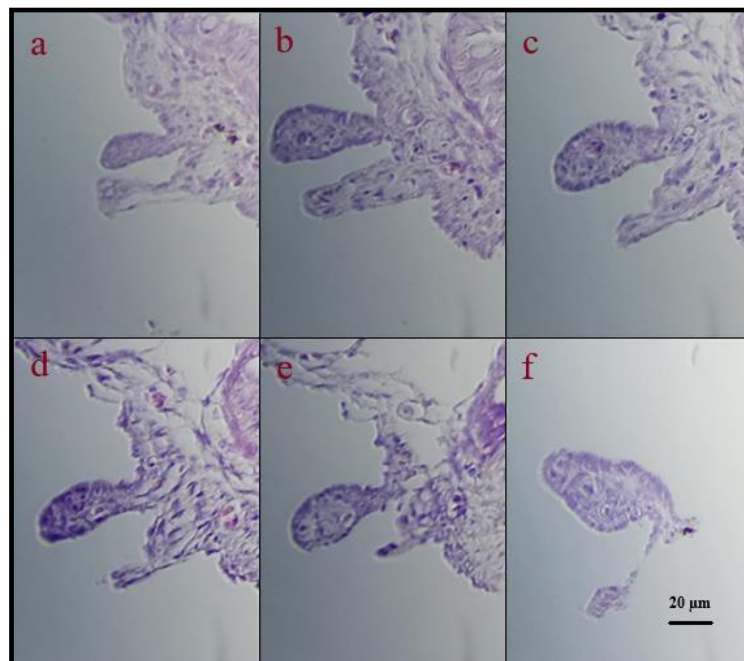


Figura 11. Descripción histológica transversal de un alevín de 3.2 cm de longitud total al 8 dpl (24 dpe), desde la parte media de los primordios hacia la parte anterior (a → f): Nótese la desaparición gradual del primordio gonadal derecho. Coloración: HE

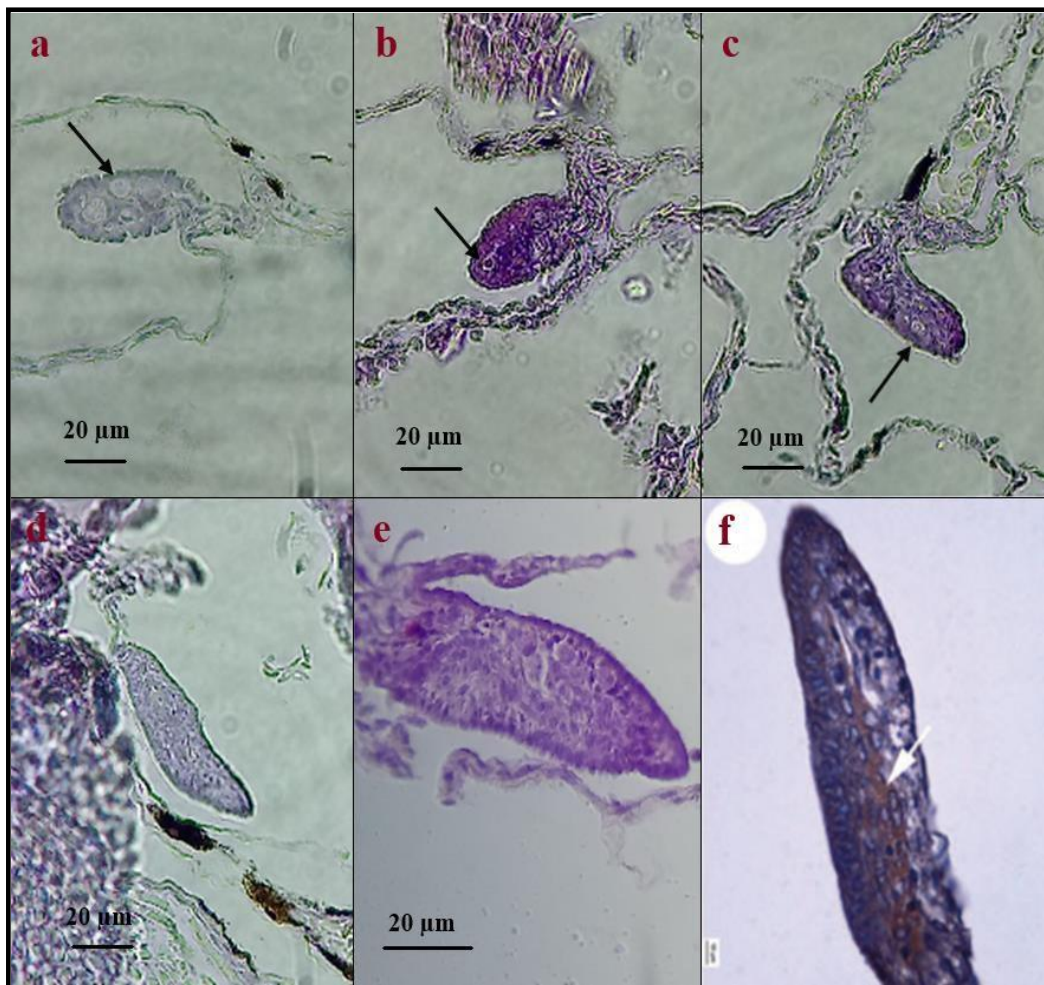


Figura 12. (a): Corte transversal de primordio gonadal indiferenciado **(b):** de un alevín de 4.9 cm de longitud total (14 dpl o 30 dpe). **b:** de un alevín de 4.9 cm de longitud total (15 dpl o 31 dpe). **(c)** de un alevín de 4.9 cm de longitud total (15 dpl o 31 dpe). Nótese la presencia clara de una gonia (flecha roja) tanto en a, en b y en c **(d):** de un alevín de 5.0cm de longitud total (12 dpl o 32 dpe). **(e):** de un alevín de 5.7 cm de longitud total (19 dpl o 35 dpe). Nótese el alargamiento que sufre la gónada indiferenciada tanto en (d) como en (e). **(f):** Microfotografía de gónada indiferenciada de esturión a los 80 dpe en la que la flecha blanca señala una capa de células positivas a Vasa, las células germinales primordiales (PGCs) tardías localizadas bajo el epitelio columnar. (Fuente: de Rzepkowska & Ostaszewska (2013)). Coloración: HE

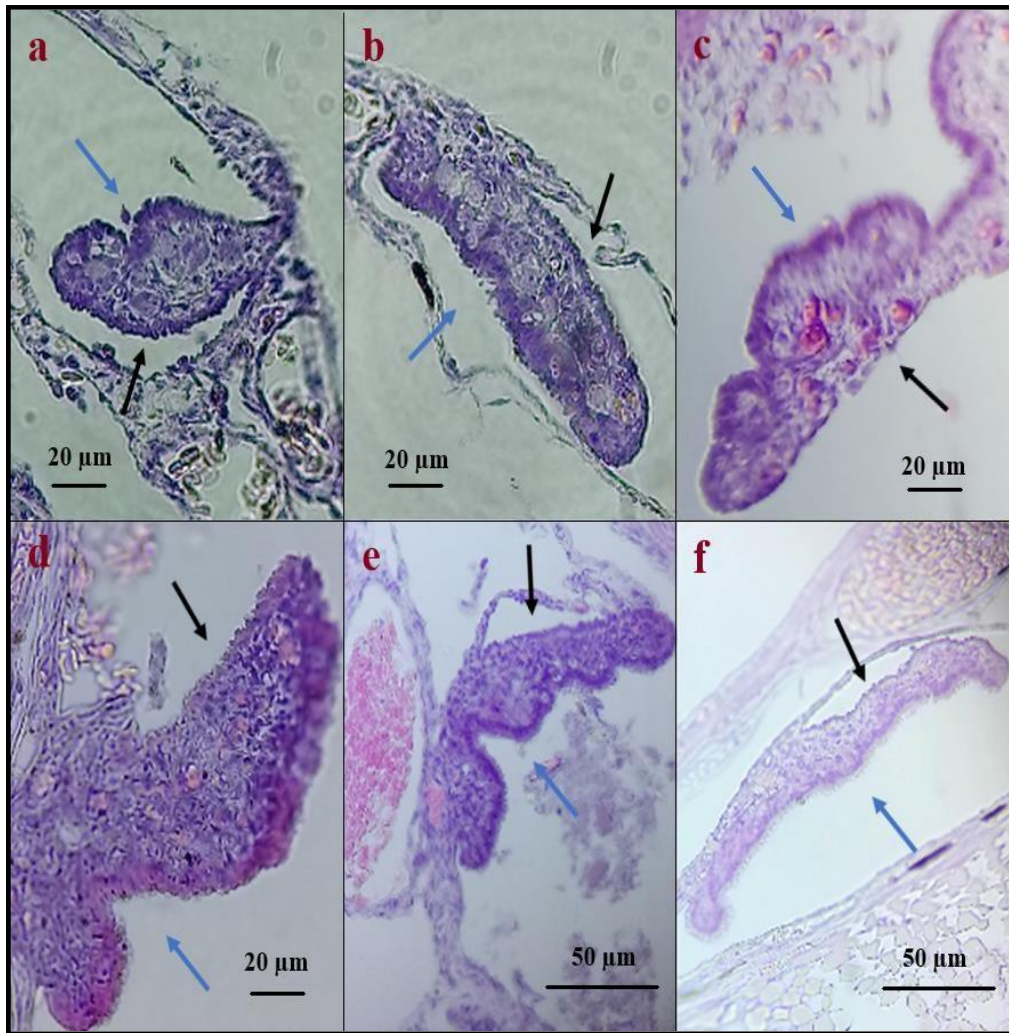


Figura 13. Corte de gónadas presumiblemente hembras. (a): de un alevín de 6.3 cm de longitud total (23 dpl o 39 dpe); (b): de 6.9 cm de longitud total (25 dpl o 41 dpe); (c): de 8.0 cm de longitud total (29 dpl o 45 dpe); (d): de 10.5 cm de longitud total (35 dpl o 51 dpe); (e): de 11.6 cm de longitud total (39 dpl o 55 dpe) y (f): de 9.8 cm de longitud total (41 dpl o 57 dpe). Observarla parte dorsal con bordes regulares (flecha negra) y la parte abdominal con bordes totalmente irregulares con invaginación(es) (flecha azul) sugiriendo posibles hembras (ovarios presuntivos). Coloración: HE

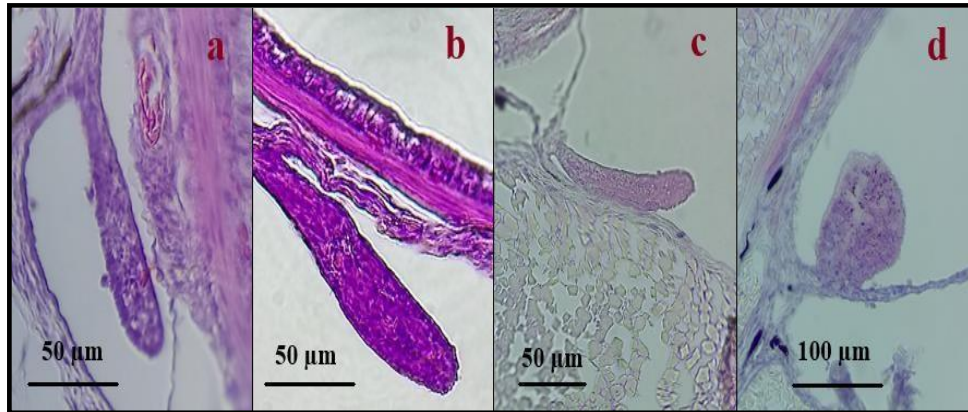


Figura 14. Corte de gónadas presumiblemente machos. (a): de un alevín de 7.4 cm de longitud total (27 dpl o 43 dpe); (b): de 9.3 cm de longitud total (31 dpl o 47 dpe); (c): de 11.5 cm de longitud total (43 dpl o 59 dpe); (d): del mismo alevín en (c), pero hacia la parte anterior del primordio. Nótese la presencia de canales en el interior del primordio que parecen conductos espermáticos sugiriendo un posible macho. Coloración: HE

Por las características propias de la reproducción de la especie, los alevines utilizados para este estudio no fueron colectados el día en que eclosionaron, sino que el levante se realizó un período de tiempo posterior no determinado, por lo que no se puede asegurar con certeza la edad de los alevines en la que aparecen los primordios gonadales. Sin embargo, según FONDEPES (2016), dependiendo de la temperatura del agua, del manejo y la alimentación, los paiches pasan por una etapa de “larvas” que comprende desde el momento de la eclosión hasta el momento en que el saco vitelino es absorbido, lo que ocurre a los 06 dpe con una talla promedio de 1,8 cm de longitud total, momento a partir del cual pasan a considerarse como “post-larvas”. Sin especificar el tiempo de duración de esta etapa, ya se menciona “alevines” a los 16 dpe, cuando los paiches alcanzan una talla de 2.5 cm (Figura 15).

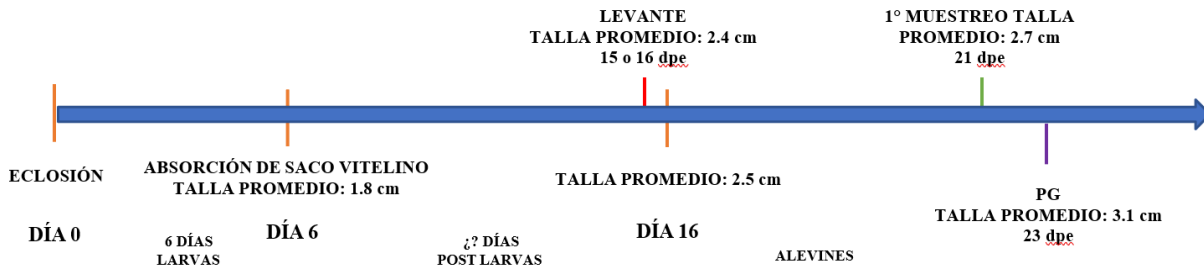


Figura 15. Representación esquemática temporal de las larvas, post larvas y alevines de *Arapaima gigas*, paiche especificando el tiempo de cria, primer muestreo y aparición de primordios gonadales (PG)

Tomando en cuenta estos criterios, se puede establecer que los individuos utilizados en este estudio, con un promedio de talla de 2.7 cm en el primer día de muestreo (5 días después del levante), ya se encontraban en etapa de “alevines”; y considerando además que el levante se realizó cuando los individuos tenían 2.4 cm de talla (terminando la etapa de post-larva), ya tenían una edad aproximada de 15 a 16 dpe al momento del levante y de 20 a 21 dpe al inicio del muestreo; es decir, a una edad de 03 semanas post eclosión (spe). Por lo tanto, se puede establecer que la edad aproximada de aparición de los primordios gonadales en paiche, con un promedio de talla de 3.1 cm de longitud total, es de 23 dpe; es decir, con tres semanas cumplidas de edad y al inicio de la 4 semana post eclosión (4 spe) (Figura 8b).

Si consideramos este dato en la aparición de los primordios gonadales en el paiche, el cual además madura entre los 4 y 5 años (Campos - Baca 2001), notamos que es similar a las diferentes especies de esturión, un aptinopterigio primitivo que ha existido desde al menos 200 millones de años (Bemis *et al.* 1996), cuyos machos maduran a los cuatro años de edad y las hembras entre seis y doce años (Doroshov *et al.* 1997). El primordio aparece a los 14 dpe en el esturión siberiano, *Acipenser baerii*, 18 dpe en el esturión ruso, *Acipenser guldenstaedtii* (Rzepakowska & Ostaszewska 2013), 26 dpe en el esturión de

nariz corta, *Acipenser brevirostrum* (Flynn & Benfex 2007) y 16 dpe en el esturión adriático *Acipenser naccarii* (Grandi & Chicca 2008).

Sólo existe un reporte de primordio gonadal en paiche en un alevín con 2.7 cm de longitud total (Da Costa, *et al.* 2020); es decir, con un tamaño menor al reportado por este trabajo. Sin embargo, no es posible determinar la edad con esta talla ya que se desconocen detalles importantes como tamaño al momento del "levante", tiempo transcurrido desde el "levante" y el momento del muestreo, así como el manejo dado a los alevines en las diferentes granjas brasileñas de las que se obtuvieron los especímenes utilizados en ese estudio.

Con respecto a la desaparición del primordio derecho (Figuras 9 y 10), ello podría ser consecuencia de la evolución del paiche hacia la dependencia del oxígeno atmosférico. Sánchez (1961). Luling (1969); Fontenele (1942) y Campos-Baca (2001), mencionan que han encontrado ejemplares de paiche (hembras y machos) que no solo tienen la gónada izquierda, sino que además se les han encontrado vestigios de la gónada derecha. Los mismos autores describen el caso de un macho de 1.9 m de longitud con un testículo izquierdo de 24 cm y el derecho de 2 cm; es decir, con un testículo derecho de aproximadamente 1/10 del izquierdo, lo que podría significar un pasado con dos gónadas iguales y funcionales.

El paiche es un osteoglósido teleósteo que ha modificado su vejiga gaseosa en un órgano encargado de respiración aérea (air-breathing organs ABO) estando entre los peces más dependientes de oxígeno atmosférico (Val & Almeida-Val 1995; Brauner *et al.* 2004). Las larvas son respiradoras acuáticas, aunque dentro de los 8-9 días post eclosión (cerca de 18 mm) se convierten en respiradores aéreos (Brauner, *et al.* 2004). Al mismo tiempo que va ocurriendo el cambio de respiración, va ocurriendo la aparición de los primordios gonadales, lo que permite proponer que la evolución del paiche hacia la respiración casi totalmente aeróbica con la modificación de su vejiga natatoria agrandándose, es lo que estaría provocando un estrechamiento de la cavidad celómica y la atrofia de la gónada derecha.

En cuanto al desarrollo gonadal temprano de las gónadas de *A. gigas*, si bien existe coincidencia en la aparición de los primordios gonadales con las diferentes especies de esturión, no es lo mismo con respecto a su diferenciación sexual, al menos en su apariencia al corte, ya que las gónadas del esturión permanecen totalmente indiferenciadas a los 80 dpe, mientras que las de *A. gigas* permanece indiferenciadas sólo hasta los 41 dpe (Figura 12 e,f). Con respecto a la diferenciación entre hembras y machos, las hembras presumibles aparecen antes (39 dpe) manteniéndose un grupo de individuos indiferenciados a los cuales no se les puede catalogar de machos presumibles ya que se podrían tratar de hembras cuyo desarrollo ovárico se haya visto retrasado por factores extrínsecos y/o intrínsecos. Esta distinción entre sexos; al menos en cuanto a su apariencia al corte, ya es posible a partir del 43 dpe (Figuras 13 y 14) aun cuando no se observen células que estén entrando en meiosis, lo que indicaría en definitiva una diferenciación histológica hacia ovario.

4.2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

4.2.1. Extracción y calidad del ARN

Tabla 1. Extracción y calidad de ARN de muestras de alevines expuestos a tratamiento hormonal de *A. gigas*

Muestra	Qubit (µg/ml)	ng/µl ADN	Concentración nM	Biblioteca 4nM (20 µl)		Calidad
				muestra (µl)	RSB (µl)	
T1-1	91.5	102	594.4	0.7	99.3	Bueno
T1-2	5.8	6.37	37.1	2.2	17.8	Bueno
T1-3	18.9	21.3	124.1	1.6	48.4	Bueno
T10-1	61.9	70.2	409.1	1.0	99.0	Bueno
T10-2	2.08	2.51	14.6	5.5	14.5	Bueno
T10-3	37	40.8	237.8	1.7	98.3	Bueno
T30-1	1.83	2.24	13.1	6.1	13.9	Bueno
T30-2	10.1	11.3	65.9	1.2	18.8	Bueno
T30-3	10.2	11.6	67.6	1.2	18.8	Bueno
E1-1	< 1.0	UN	0.0	12.0	0.0	Insuficiente
E1-2	<1.0	UN	0.0	12.0	0.0	Insuficiente
E1-3	41.3	44.6	259.9	1.5	98.5	Bueno
E10-1	132	142	827.5	0.5	99.5	Bueno
E10-2	38.7	41.3	240.7	1.7	98.3	Bueno
E10-3	40.4	44.7	260.5	1.5	98.5	Bueno
E30-1	1.87	2.08	12.1	6.6	13.4	Bueno
E30-2	3.12	3.44	20.0	4.0	16.0	Bueno
E30-3	2.22	2.52	14.7	5.4	14.6	Bueno
B1-1	2.17	2.43	14.2	5.6	14.4	Bueno
B1-2	11	12	69.9	1.1	18.9	Bueno
B1-3	19.1	20.4	118.9	1.7	48.3	Bueno
B10-1	50.8	54.7	318.8	1.3	98.7	Bueno
B10-2	71.5	76.8	447.6	0.9	99.1	Bueno
B10-3	111	118	687.6	0.6	99.4	Bueno
B30-1	1.96	2.05	11.9	6.7	13.3	Insuficiente*
B30-2	2.03	2.1	12.2	6.5	13.5	Insuficiente*

NU: NO UTIL PARA UN ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

* Aparentemente bueno, pero no pasó prueba cualitativa denotando degradación

4.2.2. Control de calidad análisis transcriptómico

La secuenciación con NextSeq500 generó un total de 1,050'994,085 lecturas pareadas (pair-end). Después de la remoción y filtrado de los adaptadores de secuenciación, lecturas de mala calidad ($Q < 30$) y lecturas no identificadas ('N'), se obtuvieron 903'932,354 lecturas limpias pareadas (86.01 por ciento), las que fueron usadas en el proceso de ensamble inicial (Tabla 2).

Tabla 2. Número de lecturas obtenidas antes y después del proceso de control de calidad

Biblioteca_ID	Lecturas antes del control de calidad	Lecturas después del control de calidad	Porcentaje de lecturas retenidas
B10-1	42'501,134	37'498,344	88.23
B10-2	54'221,794	47'993,136	88.51
B10-3	60'843,908	54'220,630	89.11
E10-1	53'812'728	48'868,572	90.81
E10-2	41'497,344	37'712,876	90.88
E10-3	46'023,014	42'294,492	91.90
E30-1	44'011'436	37'988,406	86.31
E30-2	37'950,910	31'015,482	81.73
E30-3	48'019'726	39'158,748	81.55
T1-1	59'801,550	49'276,477	82.40
T1-2	130'151,230	110'628,545	85.00
T1-3	182'345,958	153'170,604	84.00
T10-1	42'147,297	39'170,884	92.94
T10-2	22'695,484	19'439,460	85.65
T10-3	52'737,668	46'791,504	88.73
T30-1	43'474,424	31'376,272	72.17
T30-2	38'547,176	32'910,162	85.38
T30-3	50'211,304	44'417,760	88.46
Total	1,050'994,085	903'932,354	86.01

Tabla 3. Resumen estadístico para el ensamble de novo del transcriptoma de alevines de *Arapaima gigas* expuestos a 17 α -metil testosterona y 17 β -estradiol durante 30 días

Montaje final	
Genes Trinitarios totales	331,974
Transcripciones totales de Trinity	362,851
GC (porcentaje)	44.53
<i>Estadísticas basadas en todos los contigs de transcripción:</i>	
Contig N50 (pb)	908
Mediana de longitud de contig (pb)	348
Contig promedio (pb)	618
Bases totales ensambladas	224'247,924
<i>Estadística basada sólo en la isoforma más larga por gen:</i>	
Contig N50 (pb)	750
Mediana de longitud de contig (pb)	330
Contig promedio (bp)	560
Bases totales ensambladas	186'812,837
Evaluación de la calidad del ensamblaje	
Transcripciones recuperadas con Transrate (porcentaje)	86.5
Compleitud BUSCO (porcentaje)	> 85
Tasa de alineación general Bowtie2 (porcentaje)	90
Anotación	
Transcripciones con región de codificación	88,924
Transcripciones con BLAST hit (BLASTX)	95,859
Transcripciones con BLAST hit (BLASTP)	66,811
Transcripciones con grupos ortólogos (ENOG y COG)	607
Transcripciones con la vía KEGG	86,065
Transcripciones con términos GO	94,117
Transcripciones pertenecientes a familias de proteínas (pfam)	55,207

Resultados de la Evaluación Busco

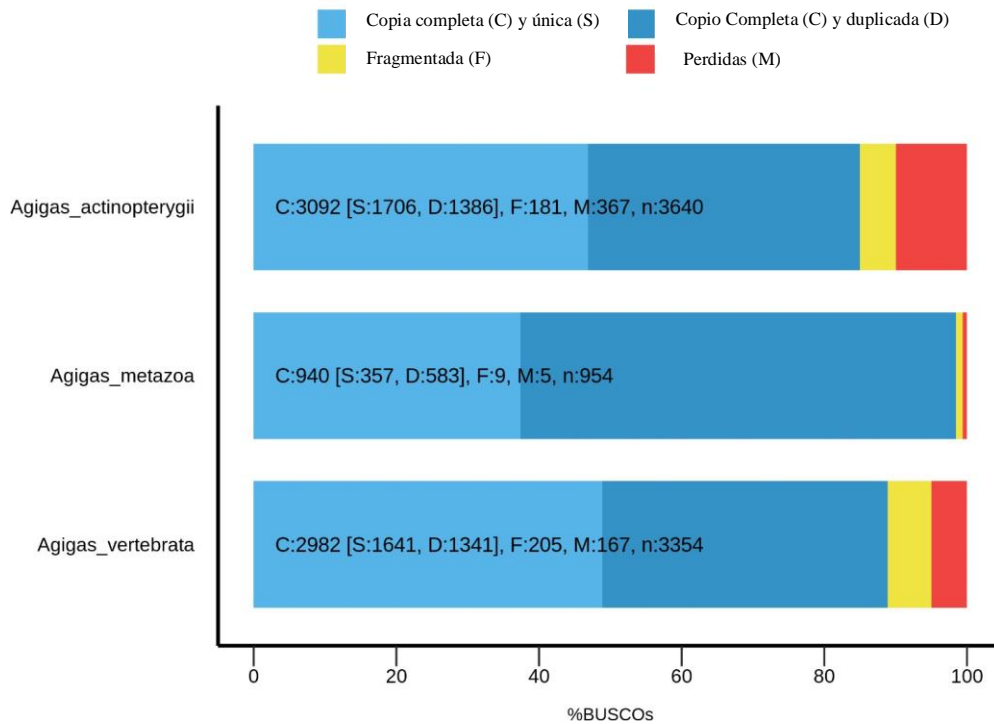


Figura 16. Integridad del transcriptoma ensamblado *de novo* de alevines de *Arapaima gigas* expuestos a tratamiento hormonal con 17α -metil testosterona y 17β -estradiol. Transcriptoma ensamblado con Trinity y evaluado con Transrate

El ensamble inicial del transcriptoma generó un total de 337,008 genes y 419,556 transcritos con un porcentaje GC de 45.50. Después de la remoción de los transcritos de baja calidad con base en los parámetros de Transrate se obtuvieron 331,974 genes y 362,851 transcritos, con un porcentaje de GC de 44.53. El valor de los contigs N50 fue de 908, con una longitud promedio de secuencias de 618 pb. Considerando la isoforma más larga para cada uno de los genes el tamaño de los contigs N50 fue de 740, con una longitud promedio de 560. Asimismo, la evaluación de la calidad del ensamble con BUSCO usando las bases de datos actinopterygii, metazoa y vertebrata mostró una alta completitud del transcriptoma (> 85 por ciento), indicando una buena integridad de los transcritos (Tabla 3) (Figura 16).

4.2.3. Anotación funcional del transcriptoma completo

La anotación funcional con Trinotate (Figura 17) mostró que el 23.81 por ciento de los transcritos fueron anotados con la base de datos

Uniprot/SwissProt, 1.5 por ciento con EggNog, 21.38 por ciento con KEGG y 23.39 por ciento con la base de datos la ontología de genes (GO). Considerando GO, los procesos biológicos más abundantes estuvieron asociados con la regulación de la transcripción por la RNA Polimerasa II, transducción de señales y diferenciación celular. En contraste, las funciones moleculares más abundantes estuvieron asociadas con la unión a iones metálicos, unión a proteínas y unión a DNA. Considerando el cluster de grupos ortólogos (COG, Figura 18), las categorías más abundantes fueron traducción, estructura ribosomal y biogénesis (J), producción de energía y conversión (C) y replicación, recombinación y reparación (L). Por otro lado, y tomando como referencia sólo la base de datos Uniprot/Swissprot, los transcriptos de los alevines de *A. gigas* tuvieron homología con los géneros *Oncorhynchus*, *Takifugu*, *Salmo*, *Carassius* e *Ictalurus* (Figura 19).

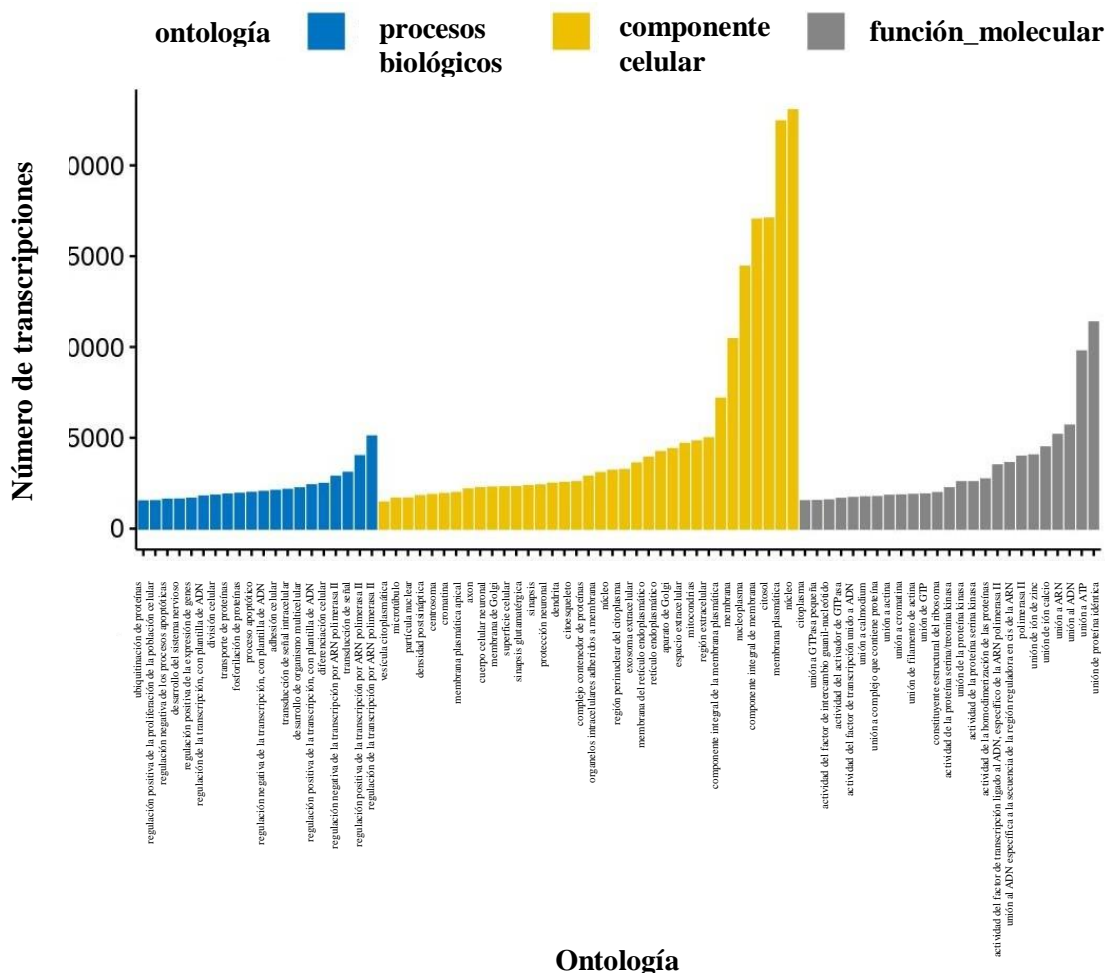


Figura 17. Distribución de los términos de la ontología de genes (GO) para el transcriptoma completo de los alevines de *Arapaima gigas* bajo tratamiento hormonal con 17α -metil testosterona y 17β -estradiol

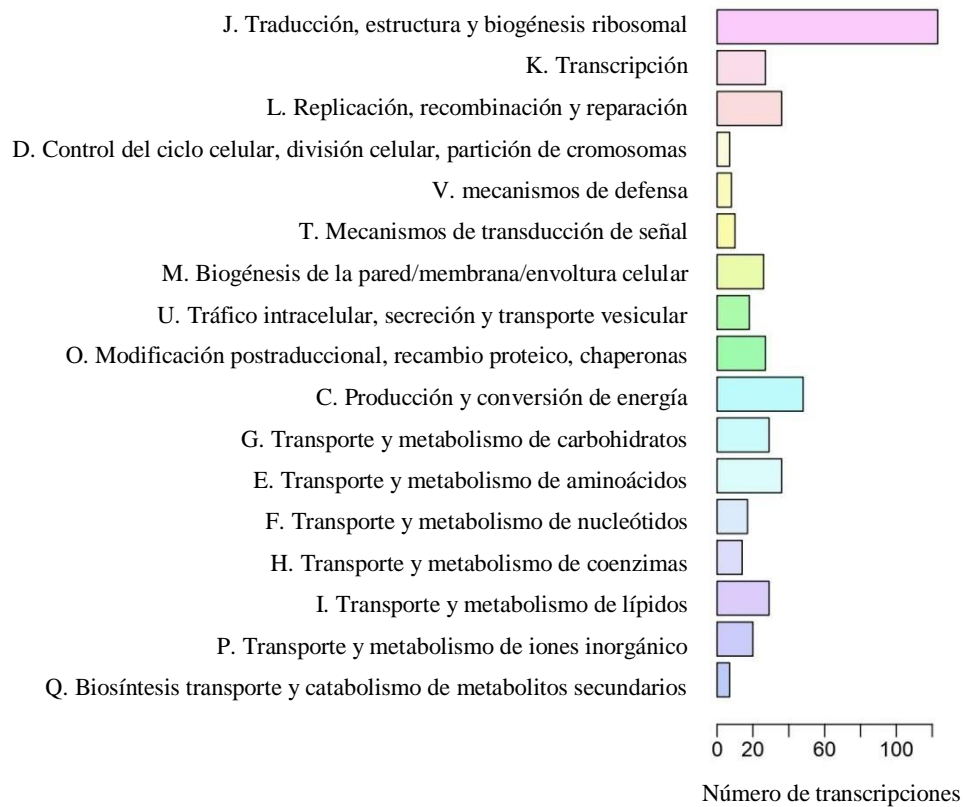


Figura 18. Distribución del cluster de grupos ortólogos con base en la respuesta transcriptómica de los juveniles de *Arapaima gigas* bajo tratamiento hormonal con 17α - metiltestosterona y 17β -estradiol

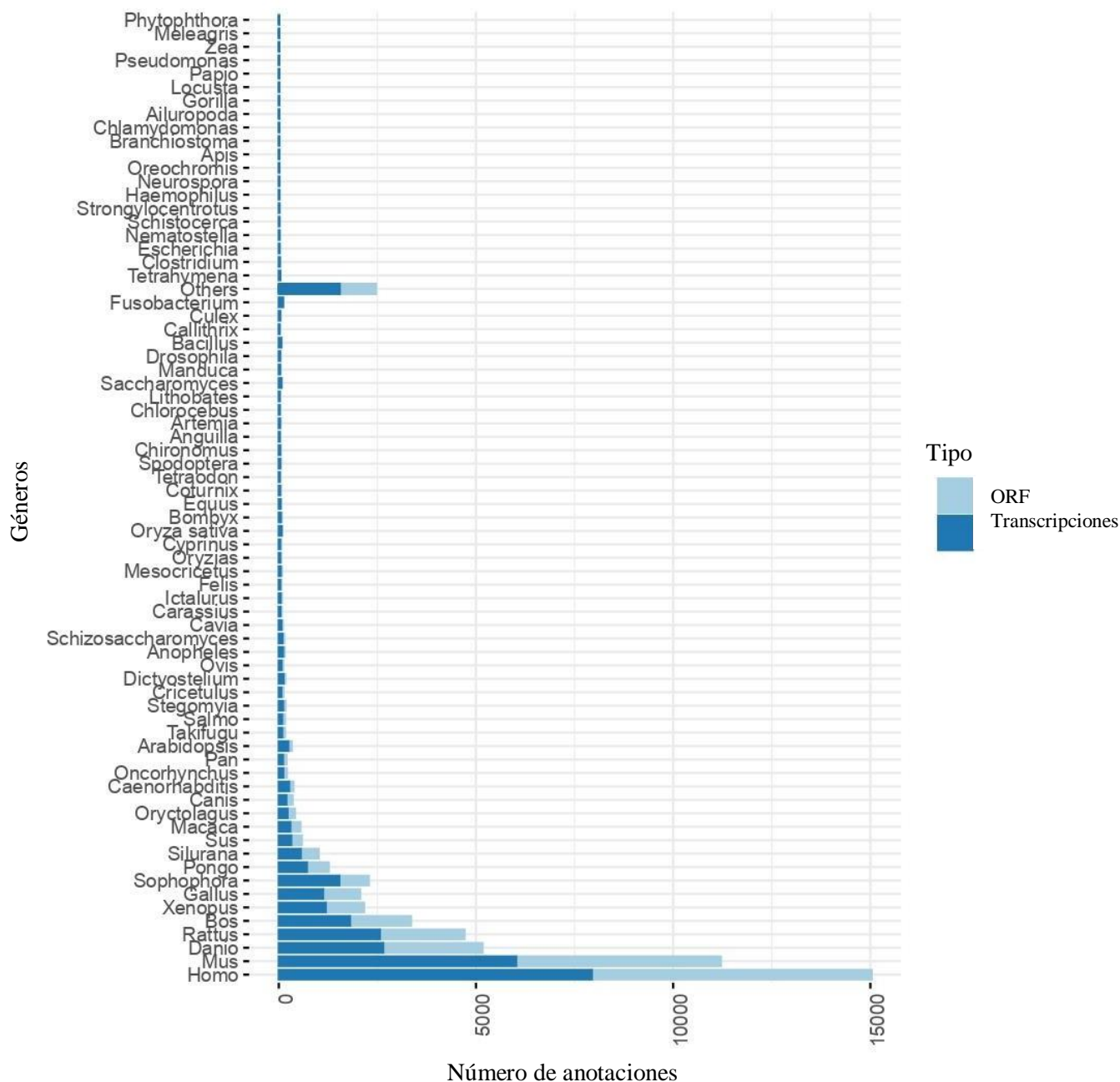


Figura 19. Homología de los transcritos de los alevines de *Arapaima gigas* bajo tratamiento hormonal con 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol generada con Trinotate durante el proceso de anotación

4.2.4. Análisis de expresión diferencial

El mapa de calor de los transcritos con base en su nivel de expresión (Figura 18) mostró que la exposición de los alevines de *A. gigas* a 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol moduló la sobreexpresión de transcritos en

los tratamientos experimentales respecto al control. Se puede observar que se generaron dos clusters, con los tratamientos de 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol a los 30 días separándose del resto de tratamientos. En general, el análisis de expresión diferencial identificó 21,474 transcritos sobre expresados, con un mayor número de transcritos en los alevines expuestos durante 30 días a 17α -metiltestosterona (T30 = 9,675) y 17β -estradiol (E30 = 7,634) (Figura 20). En la Tabla 4 se presentan el número de genes expresados diferencialmente para cada una de las comparaciones pareadas, mientras que en la Figura 22 se presentan los Volcano plots para cada comparación.

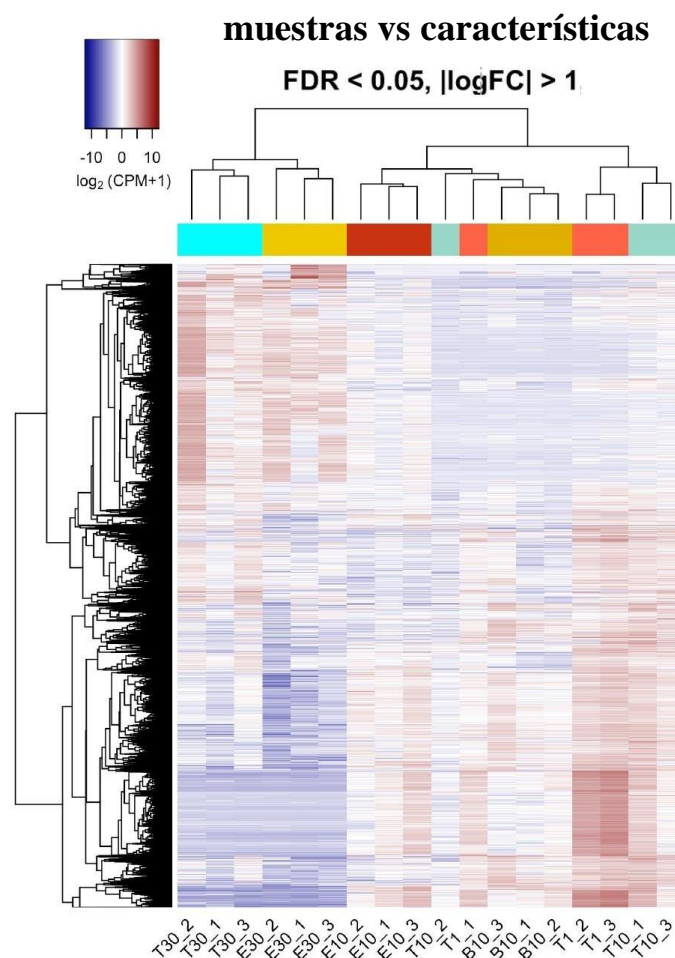


Figura 20. Agrupación de los transcritos expresados diferencialmente en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17α -metiltestosterona (T) y 17β -estradiol (E) durante 30 días. FDR: False Discovery Rate, FC: Fold-change, CPM: Counts per million, Rojo: Sobre expresado, Azul: Sub expresado, 1-3: Réplicas biológicas, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal

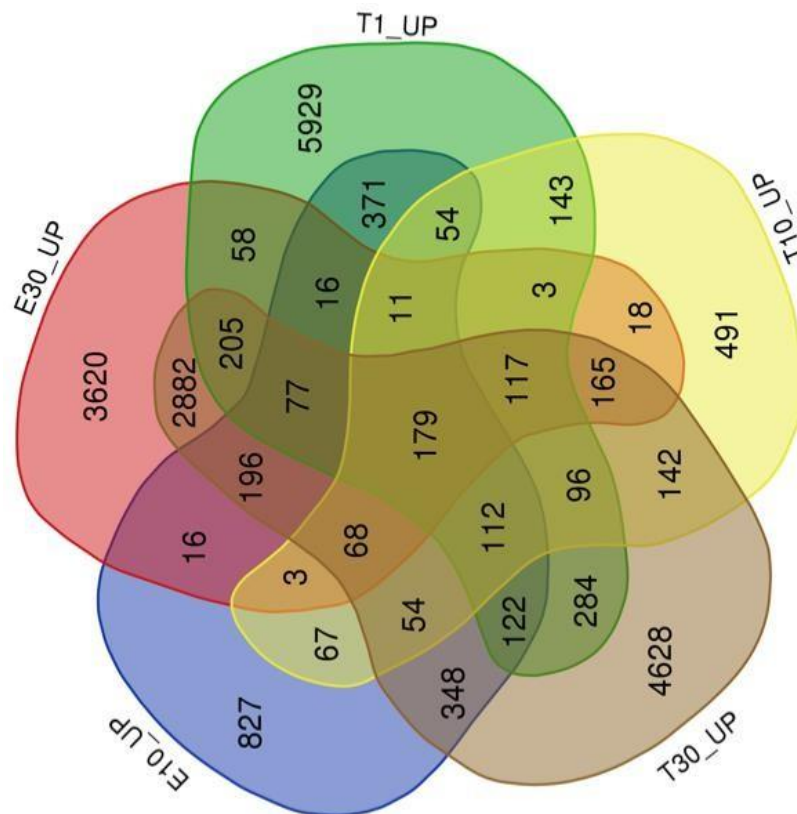


Figura 21. Diagrama de Venn para el número de transcritos sobre expresados diferencialmente en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17α -metiltestosterona (T) y 17β -estradiol (E) durante 30 días. 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal, UP: Indica transcritos sobre expresados. Las comparaciones fueron hechas contra el tratamiento control (sin hormonas)

Tabla 4. Número de genes expresados diferencialmente para cada una de las comparaciones pareadas en alevines de *Arapaima gigas* expuestos a 17α -metiltestosterona y 17β -estradiol

	B	E10	E30	T10	T30
B	0	7539	12703	3046	17228
E10	7539	0	11372	3349	14061
E30	12703	11372	0	9606	387
T10	3046	3349	9606	0	10976
T30	17228	14061	387	10976	0

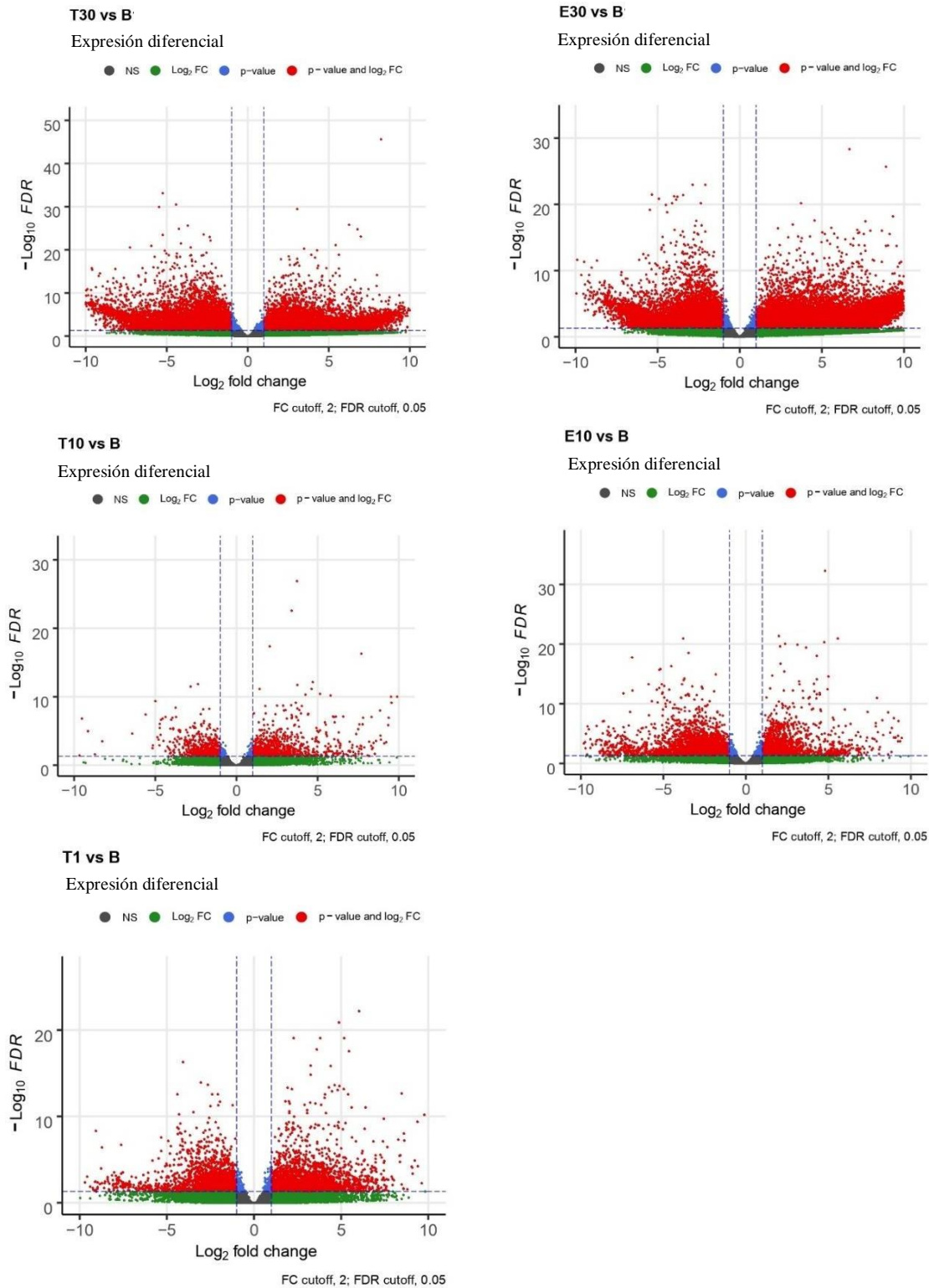


Figura 22. Volcano plots para cada una de las comparaciones pareadas realizadas durante el análisis de expresión diferencial en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17α -metiltestosterona (T) y 17β -estradiol (E) durante 30 días. FDR: False Discovery Rate, FC: Fold-change, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal, Up: Sobre expresado, Down: Sub expresado, NS: No significativo

4.2.5. Enriquecimiento funcional

El análisis en la base de datos de DAVID, y considerando el aspecto reproductivo (Tabla 5), mostró que los principales procesos biológicos enriquecidos con respecto al control estuvieron asociados con el desarrollo del folículo ovárico (GO:0030707), especificación de los ejes del ovocito (GO:0007310 y GO:0007314) y la formación de la línea germinal (GO:0048134) en los alevines expuestos a 17α -metiltestosterona durante un día. Para los alevines expuestos a la misma hormona durante diez días destacaron los procesos metabólicos de los andrógenos (GO:0008209) y el transporte de la hormona tiroidea (GO:0070327). Para el caso de los alevines expuestos a la 17α -metiltestosterona durante 30 días, el único proceso biológico enriquecido estuvo relacionado con la vía de señalización a andrógenos (GO:0030521). Cuando los alevines fueron expuestos a 17β - estradiol, los procesos biológicos enriquecidos para los 10 días fueron la morfogénesis del epitelio de la glándula de la próstata (GO:0060740) y la ovulación (GO:0030728), mientras que para los 30 días sobresalió la respuesta celular al estímulo de glucocorticoides (GO:0071385). Cuando se contrastó el 17β -estradiol contra la 17α - metiltestosterona, los procesos biológicos enriquecidos fueron la respuesta celular al estímulo de la hormona luteinizante (GO:0071373) y la ovogénesis (GO:0048477).

El análisis de enriquecimiento de las vías metabólicas usando la base de datos de KEGG y la lista de los transcritos expresados diferencialmente para la comparación entre los tratamientos finales de 17β -estradiol y 17α -metiltestosterona con respecto al control a los 10 días y entre ellos mostró que para la comparación E30_vs_B la vía metabólica más enriquecida fue la señal de la hormona tiroidea (P-value = $1.83E-03$) con una magnitud de enriquecimiento de 2.98. Para la comparación T30_vs_B, las vías metabólicas más enriquecidas estuvieron relacionadas con la señalización de la hormona tiroidea, oxitocina, estrógeno, hormona liberadora de gonadotropinas, maduración del ovocito mediada por progesterona y señalización del receptor de

andrógenos (P-value < 0.05) con magnitudes de enriquecimientos entre 2 y 2.80. Cuando se comparó 17 β -estradiol contra 17 α -metiltestosterona, las vías metabólicas enriquecidas a los 10 días de exposición fue la señalización de prolactina (P-value = 0.038) con una magnitud de cambio de 52.43.

Tabla 5. Procesos biológicos enriquecidos relacionados con la reproducción en juveniles de *Arapaima gigas* expuestos a 17 α -metiltestosterona (T) y 17 β -estradiol (E) durante 30 días. FE: Fold-enrichment, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal. La comparación es con respecto al control

Term	P-value	FE
<u><i>T1 vs B</i></u>		
GO:0030707~desarrollo de células del folículo ovárico	2.05E-03	2.78
GO:0007298~migración de células foliculares fronterizas	4.83E-03	2.53
GO:0007310~especificación del eje dorsal/ventral del ovocito	2.33E-03	5.22
GO:0007294~determinación del destino de los ovocitos derivados del germario	4.63E-03	4.64
GO:0007314~especificación del eje anterior/posterior del ovocito	1.32E-02	3.80
GO:0007293~formación de cámara de huevo derivada de germario	1.92E-02	3.04
GO:0048134~formación de quistes en la línea germinal	2.36E-02	5.57
<u><i>T10 vs B</i></u>		
GO:0008209~proceso metabólico de los andrógenos	2.38E-02	6.35
GO:0090277~regulación positiva de la secreción de hormonas peptídicas	4.12E-02	9.09
GO:0070327~transporte de hormonas tiroideas	4.12E-02	9.09
GO:0006694~proceso de biosíntesis de esteroides	5.87E-02	3.40
<u><i>T30 vs B</i></u>		
GO:0030521~vía de señalización del receptor de andrógenos	4.61E-02	2.80
<u><i>E10 vs B</i></u>		
GO:0060740~morfogénesis del epitelio de la próstata	2.91E-02	10.90
GO:0030728~ovulación	4.67E-02	7.01
<u><i>E30 vs B</i></u>		
GO:0035162~hemopoyesis embrionaria	3.31E-02	2.85
GO:0071385~respuesta celular al estímulo de glucocorticoides	4.91E-02	2.88
<u><i>E10 vs T10</i></u>		
GO:0071373~respuesta celular al estímulo de la hormona luteinizante	3.64E-02	54.31
<u><i>E30 vs T30</i></u>		
GO:0048477~ovogénesis	2.40E-02	12.26

4.2.6. Histología de hembras y machos invertidos

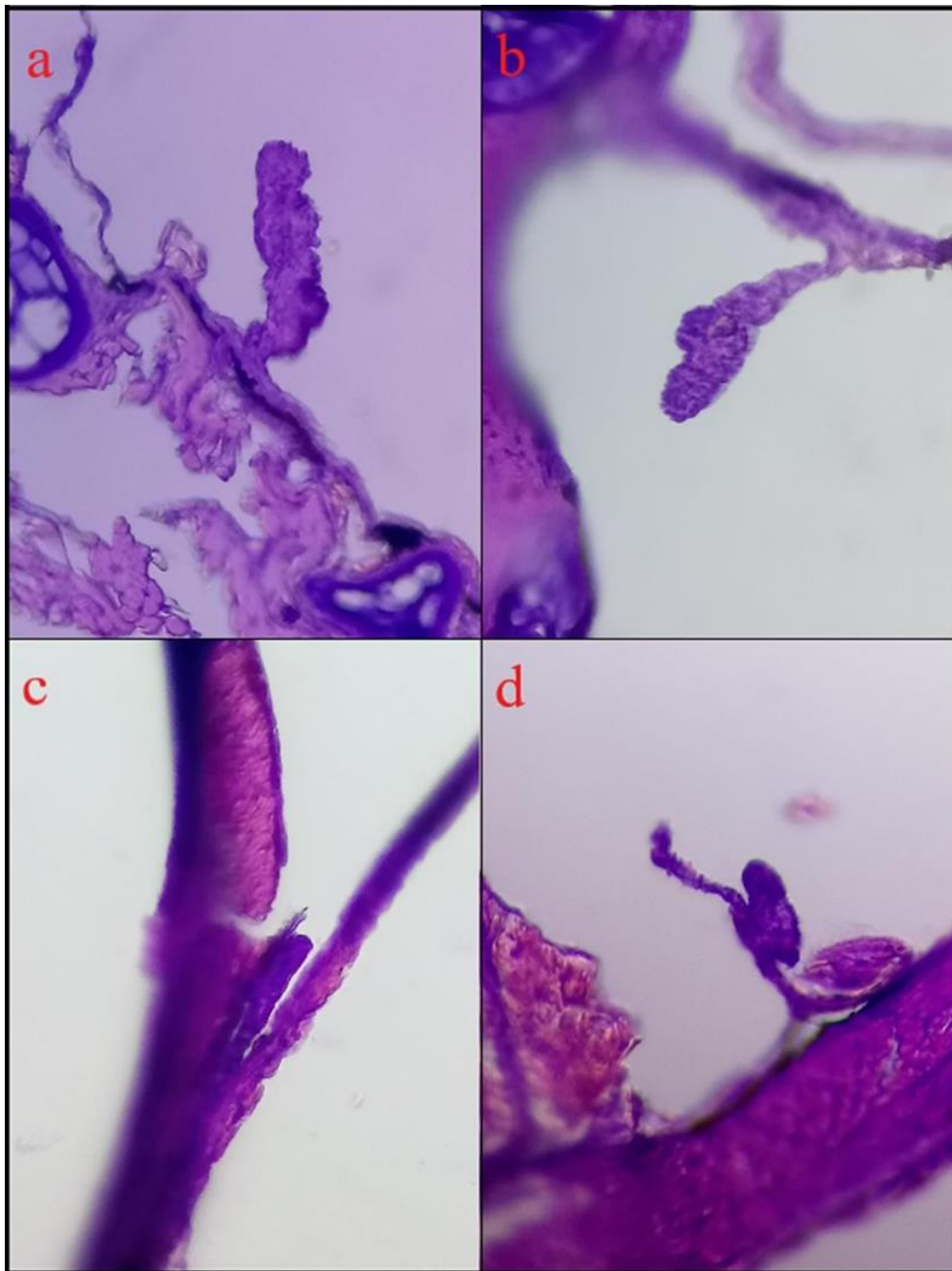


Figura 23. Corte transversal de primordios gonadales de alevines de *A. gigas* (a y b) a los 30 días de exposición a 17β -estradiol y (c y d) a los 30 días de exposición a 17α -metiltestosterona. Coloración: HE

4.3. EXPRESIÓN SEXUAL DIMÓRFICA

El secuenciamiento de transcriptomas es un método eficiente para el descubrimiento de genes y el análisis de expresión diferencial de genes en organismos no modelos lo que permite elucidar cuestiones tan importantes en la biología evolutiva y organizacional sirviendo como plataforma para guiar estudios genómicos funcionales futuros (Flores-Herrera *et al.* 2019), que pueden ser aplicados a diferentes cuestiones como a la diferenciación sexual, respuesta a estrés y la identificación de genes relacionados al crecimiento y metabolismo (Farconi *et al.* 2013 y Prado-Lima 2016).

En los peces se han realizado diversidad de estudios de transcriptomas en una serie de tejidos como por ejemplo en *Cyprinus carpio* en el que se realizó un análisis transcriptómico en hígado en el que se obtuvieron 239,155 secuencias y cuya observación y análisis permitió crear un nuevo balance energético, activando o reprimiendo diferentes vías y ramas metabólicas para poder compensar las variables ambientales que enfrenta la carpa (Ramos 2017); o el realizado en Pejerrey cuyo ensamblado conjunto generó 226,995 contigs, lo que permitió establecer los primeros pasos para hacer de esta especie un nuevo modelo para estudiar la osmorregulación de los peces Actinoptergios (Calvelo 2017).

En *Arapaima gigas* solo se han realizado dos investigaciones basadas en transcriptomas previos a este trabajo. Watanabe *et al.* (2018) encontraron 20,219 genes incluyendo isoformas. Cuando analizaron los transcritos ensamblados de *A. gigas*, usando el Gene Ontology (GO) identificaron tres categorías principales: procesos biológicos, funciones moleculares, y componentes celulares. Cabe destacar que los tejidos de los que se extrajo el ARN fueron piel e hígado de individuos juveniles, pero totalmente diferenciados sexualmente. Los genes que destacaron al realizar la expresión diferencial por sexos en ambos tejidos relacionados con la reproducción fueron *ubiq*, (Ubiquitina), *carl* (Calreticulina) y *zp3* (una proteína tipo proteína de ligamiento 3 de la zona pelúcida espermática). Por otro lado, Martins *et al.* (2020) identificaron un total de 383 genes con sesgo femenino, la mayoría de ellos altamente expresados en ovario y cerebro y entre los más abundantes se encontraban las proteínas de unión a espermatozoides de la zona pelúcida (LOC114911227, OC108929618, LOC108938882). Otros genes sesgados

femeninos notables incluyeron *Figla*, y las transcripciones de *Gdf9* que también se sobre expresaron en el ovario. Con sesgo masculino putativo se identificaron 224 genes especialmente en cerebro y testículos y entre los más abundantes incluyen *hp*, *rrad*, *cldn11*, *anxa2*, sobre expresados en los testículos. Otro gen masculino notable es *dmrta1*, que se sobre expresa en la hipófisis masculina. Sin especificar tamaño y edad de los peces a partir de los cuales se extrajeron los tejidos para el transcriptoma, se entiende que se trataba de individuos totalmente diferenciados sexualmente.

En este transcriptoma utilizamos individuos indiferenciados sexualmente, los que se expusieron a esteroides sexuales por inmersión a partir del momento de aparición de los primordios gonadales a una talla promedio de 3 cm. Si bien la utilización de esteroides sexuales en el manejo y crianza de los peces es una práctica bastante extendida, tienen un aspecto que puede llegar a ser muy negativo ya que los cambios fisiológicos que producen es el debilitamiento del sistema inmunológica produciendo modificaciones sobre todo en la epidermis incrementando la susceptibilidad de los peces a sufrir de infecciones por hongos acuáticos (Vega-Ramírez *et al.* 2010); motivo por el cual la realización de la exposición de los tratamientos en tres tiempos diferentes con el fin de prevenir una mortalidad que imposibilite la toma de muestras durante el tiempo estipulado.

Al analizar los procesos biológicos enriquecidos GO de los individuos expuestos a 17α -metiltestosterona con respecto al blanco se nota claramente que en el día cero no encontramos procesos que pudieran ser resultado de la influencia de la hormona; muy por el contrario, lo que se observó fueron procesos metabólicos típicos de hembras como los asociados con el desarrollo del folículo ovárico (GO:0030707), especificación de los ejes del ovocito (GO:0007310 y GO:0007314) y la formación de la línea germinal (GO:0048134); en el día 10 ya destacaron los procesos metabólicos de los andrógenos (GO:0008209) mientras que en el día 30 el único proceso biológico enriquecido estuvo relacionado con la vía de señalización a andrógenos (GO:0030521). Con respecto de los alevines expuestos a 17β - estradiol, a los 10 días destacaron procesos biológicos relacionados tanto a hembras como a machos como la morfogénesis del epitelio de la glándula de la próstata (GO:0060740) y la ovulación (GO:0030728), mientras que para

los 30 días sobresalió la respuesta celular al estímulo de glucocorticoides (GO:0071385).

Sin embargo, cuando se confrontaron ambos tratamientos en el día 30, es decir, 17α -metiltestosterona versus el 17β -estradiol, con estradiol al alta; es decir E30 vs T30 (Tabla 5), el único proceso metabólico destacado relacionado a la diferenciación sexual de las gónadas fue el de la ovogénesis (GO:0048477). Esto es consistente con lo observado en la histología realizada previamente (Figura 13), donde claramente se puede observar que son las hembras las que inician un proceso de diferenciación sexual, al menos en cuanto a la disposición dorso ventral del ovario, lo que no es posible en machos quienes básicamente permanecen indiferenciados.

Los genes que se encuentran sobre expresados en este proceso de ovogénesis al día 30, E30 vs T30, son los genes *hsp83*, *risc1* y *naca*, genes muy estudiados en el desarrollo y diferenciación gonadal en insectos y ratones pero que hasta el momento no se habían reportado como importantes en la diferenciación sexual en peces. Es necesario reiterar que estos genes se encuentran sobre expresados en un momento del desarrollo gonadal extremadamente temprano del paiche donde solo se observa la disposición dorso ventral en ovarios y la permanencia de la indiferenciación de los testículos.

4.3.1. Expresión diferencial de los genes *hsp83*, *risc1* y *naca*

El 17β -estradiol es capaz de producir dos clases de efectos en las células diana: efectos genómicos y efectos no genómicos. Los primeros; es decir, los efectos genómicos involucran la presencia de receptores citoplasmáticos de 17β -estradiol (RE), los cuales se encuentran libres en el citoplasma y que son activados al unirse el ligando; es decir, el 17β -estradiol, actuando, los receptores como factores transcripcionales al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes. Sin embargo, el RE es una proteína que tiene que pasar por un proceso de maduración el cual es mediado por una proteína chaperona, la cual le va a permitir adquirir la configuración terciaria necesaria para poder cumplir con su rol de reconocimiento del ligando que en este caso es

el 17 β -estradiol (Marquez 2010).

Se conocen dos clases de RE, el RE- α y el RE- β . El primero en ser descubierto y el más estudiado es el RE- α , el cual consta de seis dominios denominados por letras, desde la “A” a la “F”. Los dos primeros dominios A y B son de los menos conservados entre los receptores esteroideos y su función es la activación de la transcripción génica. El dominio C es muy conservado y su característica principal es la presencia de dos dedos de zink (Z^{2+}) que le permiten al receptor unirse específicamente al ADN. El dominio D es conocido como bisagra ya que en él se une la proteína chaperona de calor Hsp90 (por sus siglas en inglés de heat shock protein 90). Finalmente, los dominios E y F que son los dominios de unión al ligando, es decir a la hormona 17 β -estradiol. Estos últimos, que se encuentran en el extremo carboxilo de la proteína, son muy conservados entre los receptores esteroideos lo que no impide su alta especificidad ya que el receptor de estrógeno se une al estrógeno con alta afinidad evitando otras hormonas esteroideas (Marquez 2010).

Las Hsp_s son un grupo de proteínas chaperonas descritas como moléculas que participan en el ensamblaje y transporte de proteínas y polipéptidos tanto en condiciones normales como luego de estímulos estresantes (Fiorentino *et al.* 2007), pero que no formarán parte de la estructura final de la proteína (Coronato *et al.* 1999) (Figura 24); organizadas en familias y cuya expresión se ve inducida por diferentes clases de estrés como el estrés al calor, al frío, la anoxia, etc (Aparna *et al.* 2010). Está demostrado, por ejemplo, que la termo tolerancia de un organismo requiere de mecanismos moleculares alternativos como Hsp40 y Hsp70 (Ulmasov *et al.* 1992).

La caracterización de Hsp90, entre otras, fue realizada por Aparna *et al.* (2010) en experimentos de exposición al calor de diferentes líneas tropicales de gusanos de seda (*Bombix mori*), quien además demostró que las únicas Hsp_s expresadas durante las fases larvales de este gusano eran las Hsp90 y Hsp83 y debido a la interferencia en la identificación molecular de ambas en ese trabajo y previos realizados por el mismo autor sugirió que ambas se tratan de la misma

Hsp. Según Pisa *et al.* (2009), la Hsp90, no es otra que la chaperona evolutivamente conservada Hsp83, producto del gen *hsp83*; por lo tanto, según ambos autores las dos ambas Hsp 90 y 83 son la misma sustancia.

Además, Pisa *et al.* (2009), demuestran en sus experimentos *in vitro*, que alelos mutantes del gen *hsp83* desarrollan una serie de defectos ováricos durante la ovogénesis en *Drosophilla*, alelos que pueden ser letales en estado homocigoto pero que, en estado trans heterocigoto, pueden causar esterilidad o baja fertilidad. Por ejemplo, los alelos mutantes *hsp83e6a* / *hsp8319f2* generan bloqueos en la mayoría de las cámaras de huevos en las primeras 9 etapas de desarrollo, y las restantes muestran un defecto pronunciado durante la transferencia del citoplasma de la célula nodriza al ovocito en desarrollo, un proceso llamado descarga y que comienza alrededor de la etapa 10B de la ovogénesis. Además, los núcleos de las células nodrizas no se degeneran al final del proceso de descarga, como ocurre normalmente, sino que persisten hasta las últimas etapas de la ovogénesis, resultados que refuerzan la importancia de la *hsp83* en el desarrollo de la línea germinal femenina en *Drosophilla*. Sin embargo, también juega un papel muy importante en la espermatogénesis, papel que, a diferencia de la ovogénesis, ha sido extensamente estudiado (Yue *et al.* 1999; Castrillón *et al.* 1993). Este y otros trabajos como el de Kokolakis *et al.* (2008) han demostrado que las chaperonas Hsp, más allá de lo que significan sus siglas en inglés, se expresan durante el desarrollo de las células no estresadas de los insectos estudiados tanto en ovarios como en testículos, lo que parece ser el caso de *Arapaima gigas*.

De acuerdo con la histología realizada previamente al experimento de inversión sexual, las presumibles hembras comienzan a diferenciarse antes que los presumibles machos; manteniendo estos últimos como característica, la indiferenciación por más tiempo sin observarse en ellos estructuras muy notorias de diferenciación hacia testículos. Esto explicaría el hecho de la mayor expresión de *hsp83* en ovarios que en testículos en el grupo E30 con respecto al T30 ya que en estos últimos probablemente aún no se han desencadenado las vías de señalización moleculares de desarrollo gonadal o están en etapas más

atrasadas que en las hembras. Es probable que, si el experimento se condujera por mayor tiempo, las expresiones de *hsp83* en ovarios y en testículos se equilibren o que quizás en algún momento de su desarrollo, éste pueda superar al de los ovarios de *A. gigas*.

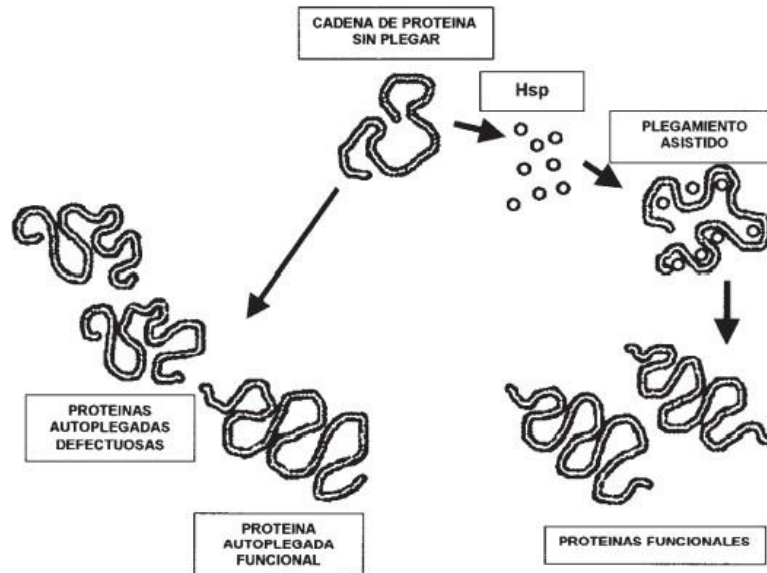


Figura 24. Plegamiento proteico asistido por Hsp

Fuente: Coronato *et al.* (1999)

Los efectos genómicos del 17β -estradiol suelen ser un proceso que puede tomar horas. Si se requiere de una respuesta más rápida entonces el estrógeno y en general todas las hormonas esteroideas entran en modo “no genómico”, el cual puede tomar unos segundos o minutos y requiere de un receptor acoplado a la membrana citoplasmática (REM). Entre estos efectos se encuentra la producción de AMP cíclico (cAMP) (Szego y Davis 1967), estimulación en la producción de corrientes de calcio con la consecuente producción de óxido nítrico (NO) en tejido coronario (Stefano *et al.* 1999), mientras que en el músculo liso vascular produce la estimulación del óxido nítrico sintasa e inhibición de canales de calcio (Nakajima *et al.* 1995). En general, activa una serie de cascadas de señalización entre las que destacaremos a la activación de la proteína kinasa C (PKC) (Figura 25).

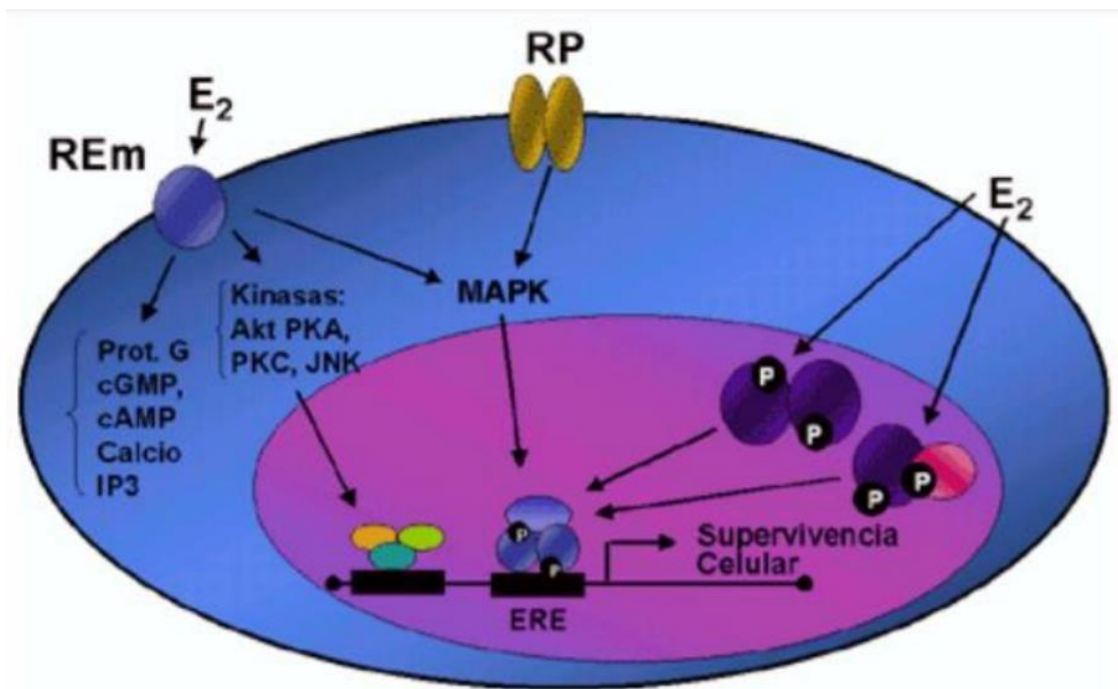


Figura 25. Efectos genómicos y no genómicos de los receptores citoplasmáticos (RE) y de membrana (REm) del estrógeno, que activa diversas cascadas de señalización que pueden estimular indirectamente mecanismos genómicos, entre los que destaca la activación de la proteína quinasa C (PKC)

Fuente: Marquez (2010)

Las proteínas kinasas son enzimas que catalizan transferencias de grupos fosforilo en las que se utiliza el ATP como dador (Nelson y Cox 2013). Las PKC pertenecen a una familia de proteínas kinasas que fosforilan grupos hidroxilo de residuos de aminoácidos controlándolas; y se activan mediante señales como aumentos en la concentración de diacilglicerol o iones de calcio jugando así un papel muy importante en varias cascadas de transducción de señales (Caudevilla 1993).

La PKC activada tiene un receptor citoplasmático; la proteína Rack1 (por sus siglas en inglés Receptor for Activated C Kinase 1) (Kadmas *et al.* 2007), también conocida como subunidad beta-like 1 de la proteína de unión a nucleótidos de guanina o GBLP (por sus siglas en inglés Guanine nucleotide-

binding protein subunit beta-like protein), homólogo de la subunidad β de la proteína G (Chang *et al.* 1998). Este receptor Rack1 es un receptor altamente conservado ya que está reportado que en humanos y en *Drosophila* conservan un 87 por ciento de similitud, y es target de muchas proteínas de ligamiento involucradas en vías de señalización claves, lo que sugiere un papel de Rack1 en la integración de señales. (Kadrams *et al.* 2007).

Kadrams *et al.* (2007) demostraron que *rack1* está expresado en todas las etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster* y en muchos tejidos, pero con especial enriquecimiento en el ovario. En una línea de tiempo, demuestran que *rack1* se expresa lo largo de la embriogénesis y las etapas larvianas tempranas con una disminución gradual de la expresión en larvas, pupas y adultos del tercer estadio. En lo que respecta a animales adultos, la expresión de *rack1* es mucho mayor en hembras que en machos y esto quedó totalmente demostrado analizando la expresión de este gen en machos, hembras intactas, hembras ovariectomizadas y en ovarios aislados demostrando que el ovario representa el sitio principal de expresión de *rack1* en hembras adultas.

Sin embargo, la activación de PKC y su posterior interacción con su receptor es solo la respuesta no genómica rápida provocada por 17β -estradiol, después de lo cual, PKC y su receptor Risk1, interactúan con el factor de transcripción de Complejo Amplio (BR-C: por sus siglas en inglés de Broad-Complex) activándolo por fosforilación. Una vez activado, BR-C ingresa al núcleo para actuar como factor de transcripción de genes diana. BR-C tiene dos sitios activos: uno C terminal formado por un par de dedos de zinc, y uno N terminal denominado Dominio de Complejo amplio Bric-a-brack/Tramtrack (BTB). Se sugiere que el dominio BTB y Rack1 contribuyen principalmente a reclutar PKC y luego la fosforilación se da en los dominios de zinc de BR-C (Cheng *et al.* 2014).

Se sabe que, en insectos, BR-C participa principalmente en las vías de señalización de la hormona ecdisona (La ecdisona es una prohormona esteroide de la 20-hidroxiecdisona, es una de las principales hormonas de la muda,

que es secretada en las glándulas protorácicas) y la hormona juvenil, dos hormonas endocrinas clave que orquestan el crecimiento y desarrollo de los insectos (Dubrovsky 2005). La evidencia ha demostrado que BR-C de insectos posee roles críticos en numerosos procesos de desarrollo, incluida la embriogénesis, la metamorfosis, la muerte celular, diferenciación de células madre, morfogénesis del ala, desarrollo ocular, inserción muscular, remodelación metamórfica del sistema nervioso central y ovogénesis (Cheng *et al.* 2014).

Tzolovsky *et al.* (1999) concluyen que los genes diana del BR-C en la ovogénesis incluye una proteína esencial para la endorreplicación y la amplificación del gen del corion, proporcionando así un vínculo entre las hormonas esteroides y el control de la replicación del ADN durante la ovogénesis. De esta manera los efectos no genómicos del 17β - estradiol tiene como respuesta rápida la activación de PKC, el cual junto a RISK1 fosforila a un factor de transcripción como BR-C pasando así de un efecto no genómico inicial a uno genómico (Figura 26).

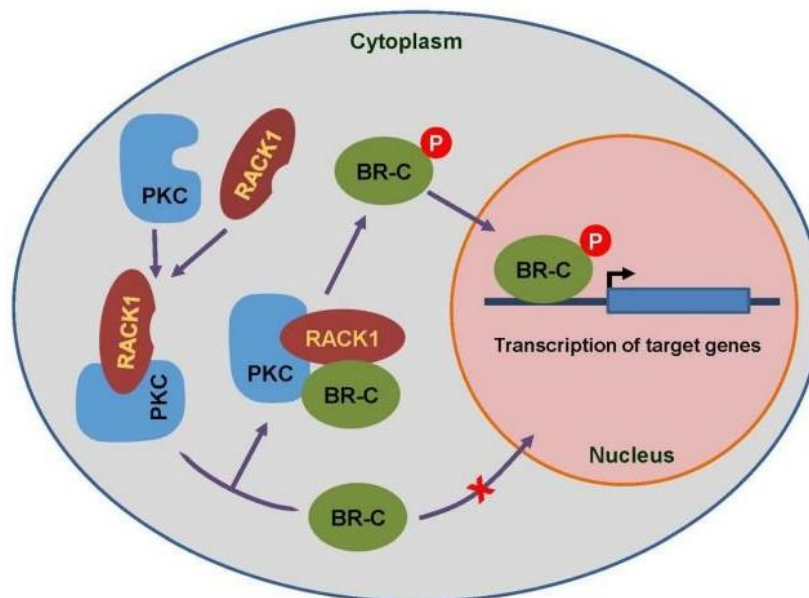


Figura 26. Modelo propuesto para la importación nuclear de BR-C, tras la interacción entre BR-C y Rack1

Fuente: Cheng *et al.* (2014)

Se debe tomar en cuenta que los estudios realizados en insectos poseen particularidades que no necesariamente pueden tener correspondencia con el paiche, ya que estos organismos son de ciclo de vida muy corto que puede durar horas o días mientras que el paiche alcanza su madurez sexual a los 3 o 4 años, por lo que los genes diana del 17β - estradiol en insectos no necesariamente van a ser los mismos que los del paiche. Sin embargo, podemos afirmar que esta hormona utiliza ambos efectos en las que se encuentran involucrados los genes *hsp83* (en la de los efectos genómicos) y *risk1* (en la de los efectos no genómicos) por lo que el análisis de estas dos vías de señalización del 17β -estradiol nos ayuda a entender la expresión diferencial encontrada en este trabajo el cual se presenta en incremento en el grupo de E30 con respecto al grupo T30.

El gen *naca*, del inglés nascent polypeptide-associated complex Alpha es otro de los genes que se encontraron sobre expresados en E30. Según Li *et al.* (2015), es un gen que se encuentra constitutivamente expresado en una gran cantidad de tejidos tales como intestino, músculo, piel, corazón, cerebro, riñón, branquias, sangre y bazo en orden descendente en el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*; así como en células inmunitarias enriquecidas HKM y PBL; sin embargo, mostró una expresión dominante en hepatopáncreas y gónadas sin especificar de que gónada se trataba o ambas; es decir ovario y testículos, señalando además que esta alta expresión indicaría que puede estar involucrado en la síntesis de proteínas en estos tejidos sin aclarar el significado biológico exacto.

La proteína codificada por el gen *naca* se asocia con el Factor de Transcripción Básico 3 (BTF por sus siglas en inglés de basic transcription factor 3), para formar un complejo asociado a polipéptidos nacientes NAC (del inglés nascent polypeptide-associated complex). Este complejo NAC se une a proteínas nacientes; es decir, a proteínas que están siendo sintetizadas en el ribosoma pero que carecen de la péptido señal y bloqueando su interacción con la partícula de reconocimiento de la señal (SRP del inglés signal recognition particle)

previniendo así una incorrecta traslocación de esta proteína naciente hacia el lumen del retículo endoplasmático. Según Braat *et al.* (2004), una proteína naciente que es “interceptada” por NAC es la proteína Osk, también llamada Oskar.

Oskar es responsable de la síntesis de la Proteína de efecto maternal Oskar. En *Drosophila*, *oskar (osk)* es inusual porque no solo tiene funciones codificantes, es decir, la síntesis de la proteína, sino que también posee funciones no codificantes. Como ARNm, *osk* codifica una proteína requerida para el patrón embrionario y la formación de células germinales. Independientemente de esa función, la ausencia de ARNm de *osk* interrumpe la formación del cariosoma y bloquea la progresión a través de la ovogénesis. La pérdida de ARNm de *osk* también afecta la distribución de proteínas reguladoras, relajando su asociación con ribo nucleoproteínas (RNP) grandes dentro de la línea germinal y permitiéndoles acumularse en las células del folículo somático. Esta y otras funciones no codificantes del ARNm de *osk* están mediadas por múltiples elementos de secuencia con distintas funciones. Una función, proporcionada por numerosos sitios de unión en dos regiones distintas de *osk* 3'UTR, es secuestrar el regulador de traducción Bruno (Bru), que a su vez controla la traducción del ARNm de *osk* (Kanke *et al.* 2015). En *Danio rerio* (zebra fish), se ha encontrado un gen homólogo de *oskar (bucky ball)* que cumple funciones muy similares ya que está involucrado en la especificación del eje del oocito animal. Actúa previo o dentro de la morfogénesis del epitelio folicular y el ensamblaje del plasma polar. Ubicado en gránulo P y nube mitocondrial. Se expresa en blastómeros; organismo femenino; y células de la línea germinal (Krishnakumar *et al.* 2018 y Perera *et al.* 2021).

Entre las vías de señalización relacionadas con el gen *naca* está la vía de señalización de la kinasa regulada por señal extracelular (ERK del inglés extracellular signal-regulated kinase). Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad del coactivador de la transcripción y la unión a proteínas de clase TBP (TATA binding proteins). La vía de señalización de ERK es una vía altamente conservada desde células

procariotas inferiores hasta células de mamíferos superiores. Esta vía puede transducir señales de estimulación extracelular en las células y su núcleo pudiendo provocar una serie de reacciones biológicas, como la proliferación, diferenciación, transformación y apoptosis celular. Esta vía puede ser activada por una serie de hormonas, factores de crecimiento y diferenciación y sustancias promotoras de tumores (Guo *et al.*2020).

Entre las hormonas capaces de activar esta vía de señalización ERK está el 17 β -estradiol, y lo hace a través del receptor de membrana ER α 36, una variante del ER α citoplasmático responsable de la vía genómica del 17 β -estradiol (Zhang *et al.* 2014). ERK tiene entre sus funciones más importantes la de controlar la expresión génica alterando las actividades de los factores de transcripción y la maquinaria de transcripción basal por medio de la fosforilación (Patel and Shvartsman 2018), es decir los factores basales de transcripción entre los que se encuentran los TBP, los cuales pueden tener como coactivador la proteína producida por el gen *naca* (Figura 28).

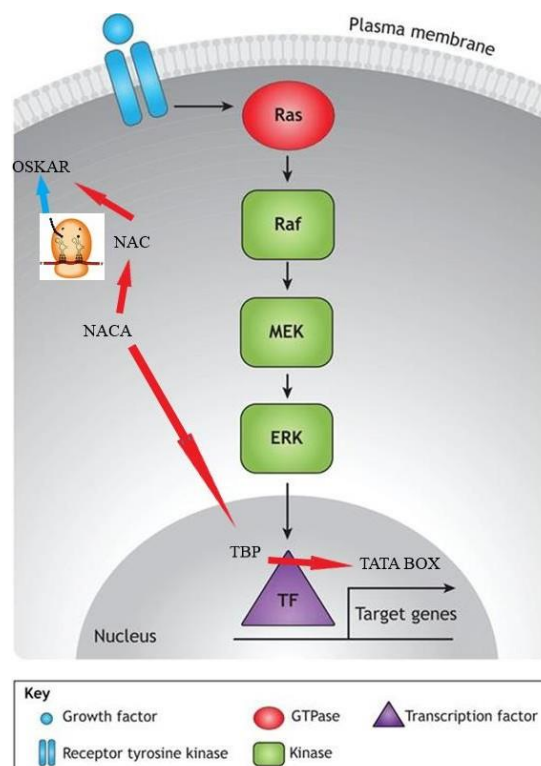


Figura 27. Vía de señalización ERK y la participación del gen *naca* y el 17 β -estradiol

Fuente: Modificado de Patel and Shvartsman (2018)

V. CONCLUSIONES

1. Los primordios gonadales en paiche aparecen a los 23 dpe, siendo el izquierdo más grande y basófilo que el derecho por lo que la gónada derecha está destinada a la atrofia desde el momento de su aparición, lo cual podría ser el producto de la evolución del paiche hacia la respiración casi totalmente aeróbica gracias a las modificaciones sufridas por su vejiga gaseosa.
2. Las gónadas de paiche permanecen totalmente indiferenciadas hasta los 41 dpe, y posteriormente se distinguen dos grupos de gónadas que lucen muy diferentes al corte; siendo las presumibles hembras las que presentan una disposición dorso ventral bastante clara mientras que los presumibles machos carecen de ella luciendo con forma de “perade boxeador alargada”.
3. Los 21,474 transcritos sobre expresados, presentan mayor número de transcritos en los alevines muestreados a los 30 días de 17α -metiltestosterona (T30 = 9,675) y 17β - estradiol (E30 = 7,634).
4. Los genes identificados por secuenciamiento relacionados más directamente con el desarrollo y diferenciación gonadal se presentaron en el grupo E30_vs_T30, relacionados con la oogénesis (GO: 0048477) son los genes *hsp83*, *risc1* y *naca*, con longitudes de 1054 pb, 604 pb y 569 pb respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar la histología del desarrollo gonadal utilizando métodos de inmunohistoquímica con el fin de identificar las células gonadales mediante la expresión de algunos genes propios del desarrollo gonadal.
2. Corroborar la talla y edad encontrada de aparición de los primordios gonadales repitiendo el mismo estudio con más de un levante o camada de hermanos que permita la obtención ajustada del dato.
3. Obtener el ARNm de alevines genéticamente machos y genéticamente hembras utilizando las partes del alevín que no son utilizados para tal fin y con el que se pueda determinar el sexo genético por prueba qPCR; como la parte caudal del individuo.
4. Identificar a través de secuenciación la identidad de los genes expresados diferencialmente involucrados en el desarrollo y diferenciación gonadal de los individuos con sexo identificado molecularmente.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, U.; Elguero, J. 2012. Histoquímica. An. Quim. 108 (2): 114 – 118.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology. 215(3): 403-410.

Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponible en línea en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Angeles, B.; Mendo, J. 2005. Crecimiento, fecundidad y proporción sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner) de la Costa Central del Perú. Ecología Aplicada. Universidad Nacional Agraria La Molina 4(1,2): 105-112.

Apweiler, R.; Bairoch, A.; Wu, C. H.; Barker, W. C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; Yeh, L. S. L. 2004. UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic acids research, 32(suppl_1):115-119.

Arredondo-Figueroa, J.L. 2000. Manual técnico para la reversión sexual de tilapia. Technical manual of tilapia sexual reversion. 35 p.

Aytekin, Y.; Yüce, R. 2008. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). Brazilian Archives of Biology and Technology, 51, 513-522.

Belsare, D.K. 1966. Development of the Gonads in *Channa punctatus* Bloch (Osteichthyes: Channidae). J. MORPH., 119: 467-476.

Bemis, W.E.; Findeis, E.K.; Grande, L. 1996. An overview of Acipensiformes. Sturgeon Biodiversity and Conservation. Birstein V.J, Bemis W.E. Parte 1, páginas 25-71.

Berbejillo, J.P. 2013. Caracterización molecular de la diferenciación testicular del esturión siberiano, *Acipenser baerii*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. 110 p.

Berg, L. S. 1937. A classification of fish-like vertebrates. – Bull. Acad. Sci. URSS, Cl. Sci. Math. Natur. 1937: 1277-1280. [English and Russian]

Braat, A.K.; Yan, N.; Arn, E.; Harrison, D.; MacDonald, P.M. 2004. Localization-Dependent Oskar Short Article Protein Accumulation: Control after the Initiation of Translation. *Developmental Cell*, Vol. 7, 125–131.

Calvelo, J. 2017. Ensamblado de transcriptoma braquial del Pejerrey y búsqueda de selección positiva a nivel molecular en Actinopterygios: aportes al estudio de la osmorregulación en peces. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Opción Zoología. 87 p.

Campos Baca, L. 2001. Historia Biológica del Paiche o Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) y Bases para su Cultivo en la Amazonía Iquitos – Peru. Instituto Peruano de la Amazonía Peruana. Programa de Biodiversidad.

Castello, L.; Stewart, D. 2010. Assessing cites non.detriment findings procedures for *Arapaima* in Brazil. *J. Appl. Ichthyol* 26: 49–56.

Castrillon, D.H.; Gonczy, P.; Alexander, S.; Rawson, R.; Eberhart, C.G.; Viswanathan, S.; Dinardo, S.; Wasserman, S.A. 1993. Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P-element mutagenesis. *Genetics* 135, 489–505.

Caudevilla, C.H. 1993. Estudio del papel de la proteína kinasa c y del estrés oxidativo en la fisiopatología de la neuropatía diabética experimental. Memoria para optar el Grado de Doctor en Medicina y Cirujía. Universidad de Valencia. España. 120 p.

Cheng, D.; Qian, W.; Wang, Y.; Meng, M.; Wei, Ling; Li, Z.; Kang, L.; Peng, J.; Xia, Q.; Zhou, X. 2014. Nuclear Import of Transcription Factor BR-C Is Mediated by Its Interaction with RACK1. *PLoS ONE*, 9(10), e109111. doi: 10.1371/journal.pone.0109111

Chu-Koo, F.; Dugué, R.; Alván, M.; Casanova, A.; Alcántara, F.; Chávez, C.; Duponchelle, F.; Renno, J.; Tello, S.; Núñez, J. 2009. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35(1):125-136.

Coronato, S.; Di Girolamo, W., Salas, M., Spinelli, O., Laguens, G. 1999. *Biología de las proteínas del shock térmico*. Artículo Especial Medicina.50: 477-486.

Da Costa Amaral, A.; Adriana, F.; Lima, A.F.; Ganeco - Kirschnik, L.N.; De Almeida, F.L. 2020. Morphological characterization of pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) gonadal differentiation. *Journal of Morphology*, 1-9.

Díaz, N.F.; Neira, R. 2005. *Biología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas*. *Cien. Inv. Agr.* 32(1): 45-59.

Doroshov, S.I., Moberg, G.P., Vaneennaam, J. 1997. Observations on the reproductive cycle of the culture white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environ. Biol. Fishes 48: 256-278.

Dutra, M. 2007. Avaliação dos procedimentos de introdução do pirarucu (*Arapaima gigas*) na região nordeste: retrospectiva histórica, situação atual e perspectivas futuras. Universidade Federal do Ceará: 62 p.

Elespuru, N.; Sandoval, M.; Alcántara, F. 2007. Datos preliminares de los efectos del medio ambiente en la expresión de genes asociados al estrés, producción y reproducción en paiches *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), criados en cautiverio. Iquitos: IIAP -BIODAMAZ. Serie Artículo Científico. 12 p.

Ezaz, T.; Stiglec, R.; Veyrunes, Y.; Graves, J. 2006. Relationship between vertebrate. ZW and XY chromosome systems. Curr. Biol. 16: R736 – R743.

Fernandino, J.I.; Hattori, R.S.; Shinoda, T.; Kimura, H.; Strobl- Mazzulla, P.H.; Strüssmann, C.A.; Somoza, G.M. 2008. Dimorphic Expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (Ovarian Aromatase) during Early Gonadal Development in *Pejerrey, Odontesthes bonariensis*. Sex Dev 2008; 2:316–324.

Fiorentino, S.; Barreto, A.; Asea, A. 2007. Proteínas de choque térmico, muerte celular y respuesta antitumoral. UNIVERSITAS SCIENTIARUM Revista de la Facultad de Ciencias Vol. 12. N° 2, 5-22.

Flores-Herrera, P.; Farlora, R.; González, R.; Brokordt, K.; Schmitt, P. 2019. De novo assembly, characterization of tissue-specific transcriptomes and identification of immune related genes from the scallop *Argopecten purpuratus*. Fish & Shellfish Immunol. 89, 505-515.

Flynn, S.R.; Benfey, T.J. 2007. Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueur. *Journal of Fish Biology* 70: 1027–1044.

Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES). 2016. Protocolo de Manejo de semilla del Paiche (*Arapaima gigas*). Dirección General de Capacitación y Desarrollo Técnico en Acuicultura. Perú. 28 pp.

Fontenele, O. 1942. Contribuição para o conhecimento da biologia de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier), em cativeiro: (Actinopterygii, Osteoglossidae). DNOCS. Coletânea de trabalhos Técnicos. Série I-C.

Foyle, T.P. 1993. A histological description of gonadal development and sex differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and oestradiol immersed fry. *Journal of Fish Biology* 42: 699-712.

García-Dávila, C.; Renno, J.F. 2016. Manejo genético de reproductores de paiche *Arapaima gigas* para reproducción en cautiverio. *Folia Amazónica*. IIAP VOL. 25 (2): 179 – 182.

Glenn, T. C. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*. 11: 759-769.

Godinho, H.P; Santos, J.E; Paulo S. Formagio, and Guimarães- Cruz, R.J. 2005. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zoologica (Stockholm)* 86: 289–294.

Goulding, M. 1980. Fishes and the Forest. University of California press, Los Angeles, CA, Oakland, 280pp.

Grabherr, M.G.; Haas, B.J.; Yassour, M.; et al. 2011. Trinity: Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat biotech. 29(7):644-652. doi:10.1038/nbt.1883

Grandi, G.; Chicca, M. 2008. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, *Acipenseriformes*, Chondrostei). Journal of Morphology 269: 1238– 1262.

Haas, B.J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; et al. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. Nat prot.8(8):10.1038/nprot.2013.084. doi:10.1038/nprot.2013.084

Hunter, G.A.; Donaldson, E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. FISH PHYSIOLOGY, VOL. IXB: 223-302.

Kadmas, J.L.; Smith, M.A.; Pronovost, S.M.; Beckerle, M.C. 2007. Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development., 236(8), 2207– 2215.

Klopp, C., Lasalle, A., Di Landro, S., Vizziano-Cantonnet, D. 2020. RNA-Seq transcriptome data of undifferentiated and differentiated gonads of Siberian sturgeon, Data in Brief. 31. 105741. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105741>

Kokolakis, G.; Tatari, M.; Zacharopoulou, A.; Mintzas, A. C. 2008. The hsp27 gene of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*: Structural characterization, regulation and developmental expression. Insect Mol Biol. 17: 699–710.

Krishnakumar, P.; Riemer, S.; Perera, R.; Lingner, T.; Goloborodko, A.; Khalifa, H.; Bontems, F.; Kaufholz, F.; El-Brolosy, M.A.; Dosch, R. 2018. Functional equivalence of germ plasm organizers. *PLoS Genet.* Nov 6;14(11): e1007696. doi: 10.1371/journal.pgen.1007696. PMID: 30399145; PMCID: PMC6219760.

Langmead, B.; Salzberg, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4): 357-359.

Li, S; Chen, X; Geng, X; Zhan, W; Sun, J. 2015. Identification and expression analysis of nascent polypeptide-associated complex alpha gene in response to immune challenges in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), 261–267.

Lima, M. 2009. Análise da expressão gênica diferencial na hipófise de pirarucu (*Arapaima gigas*). Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas de Pesquisas da Amazônia – INPA. 108 p.

López-Landavery, E.A.; Corona-Herrera, G.A.; Santos-Rojas, L.S.; Herrera-Castillo, N.M.; Delgadín, T.H.; Tapia-Morales, S.; González-Martínez, S.; Reyes-Flores, L.E.; Marín, A.; Yzásiga-Barrera, C.G.; Juan I. Fernandino, J.I.; Zelada-Mázmela, E. 2021. Non-invasive sex genotyping of paiche *Arapaima gigas* by qPCR: An applied bioinformatic approach to identify sex differences. *bioRxiv*. 15 p.

Luling, K.H., 1969. Das laichverhalten der vewetreter der familie Osteoglossidae (Versuch einer Übersicht). *Bonn. Zool. Beitr.*, 20(1/3): 228–243.

Luna Peña, S.A. 2017. Expresión genética de la aromatasasa *cyp19a1a* durante la reversión sexual en el cíclido joya, *Hemichromis guttatus*. Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México. 61 p.

Maack, G.; Segner, H. 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* 62: 895–906.

Manzoni, C.; Kia, D.A.; Vandrovcova, J.; Hardy, J.; Wood, N.W.; Lewis, P.A.; Ferrari, R. 2018. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences *Briefings in Bioinformatics*, 19(2), 286–302

Márquez, D. C. 2010. Receptor de estrógenos: bases moleculares aplicadas a medicina. Los Angeles. 13 p.

Martinez, A.L. 2013. Búsqueda de marcadores de la diferenciación ovárica en el esturión siberiano *Acipenser baerii*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. 90 p.

Martins, D.L.; Campos, L.R.S.; Ribeiro-Dos-Santos, A.M.; Coelho, A.C.M.F.; Dantas, R.L.; Sobrinho, P.A.A.; Sakamoto, T.; Vidal, A.F.; Vinasco-Sandoval, G.T.; Assumpção, P.P.; Ândrea K. C. R. Santos, A.K.C.R.; Dalmolin, R.J.S.; De Souza, S.J.; Santos, S.; De Souza, J.E.S. 2020. Characterization and analysis of the transcriptome in *Arapaima gigas* using multi-tissue RNA-sequencing. *bioRxiv*. 25 p.

Mejía-Aristizábal, P.; Román-Londoño, A.M. 2009. Porcentajes de reversión sexual en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) para la obtención de neomachos mediante la aplicación de la hormona masculinizante 17 α - metil testosterona por el método de ingestión (larvas) e inmersión (ovas y larvas). Trabajo de grado presentado como

requisito para optar el título de: MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA. UNIVERSIDAD CES. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. MEDELLIN. 46 p.

Nakajima, T.; Kitazawa, T.; Hamada, E.; Hazama, H.; Omata, M.; Kurachi, Y. 1995. 17β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells., 294(2-3), 0–635.

Nakamura, M; Kobayashi, T; Chang, X-T; and Nagahama, Y. 1998. Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY 281:362–372.

Navarro-Flores, J.; Ibarra-Castro, L.; Martinez-Brown, J.M.; Zavala-Leal, O.I. 2019. Hermafroditismo en peces teleósteos y sus implicaciones en la acuicultura comercial. Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 54, N°1: 1-10.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2013. Lehninger. Principios de bioquímica. Sexta Edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1196 p.

Nelson, J. S. 1994. Fishes of the World, 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 624 pp.

Núñez, H.; Arriaza, B.; Garrido, N.; Vilaxa, A. 2016. Estudio citomorfológico de la maduración de gónadas de hembras de *Seriola lalandi* en un Sistema Acuícola de Recirculación (SAR). IDESIA (Chile). Volumen 34, N° 6: 79-83.

Ortiz-Delgado, J.B., Porcelloni, S., Fossi, C., and Sarasquete, C. (2008). Histochemical characterisation of oocytes of the swordfish *Xiphias gladius*. Scientia Marina 72(3): 549-564.

Ozsolak, F.; Milos, P. M. 2010. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 87–98. doi:10.1038/nrg2934

Parmentier, H.K. and Timmermans, L.P.M. 1985. The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *Embryol. exp. Morph.* 90: 13-32.

Perera, R.P.; Shaikhqasem, A.; Rostam, N.; Dickmanns, A.; Ficner, R.; Tittmann, K.; Dosch, R. 2021. Bucky Ball Is a Novel Zebrafish Vasa ATPase Activator. *Biomolecules*, 11, 1507. <https://doi.org/10.3390/biom11101507>

Pisa, V.; Cozzolino, M.; Gargiulo, S.; Ottone, C.; Piccioni, F.; Monti, M.; Gigliotti, S.; Talamo, F.; Graziani, F.; Pucci, P.; Verrotti, A.C. 2009. The molecular chaperone Hsp90 is a component of the cap-binding complex and interacts with the translational repressor Cup during *Drosophila* oogenesis. *432(1-2)*, 0–74.

Prado, M. 2009. Análise da expressão gênica diferencial na hipófise de pirarucu (*Arapaima gigas*) em fase reprodutiva e não reprodutiva. Dissertação (mestrado) -- INPA/UFAM, Manaus. Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. 107 p.

Ramos, I. 2017. Análisis transcriptómico de hígado de *Cyprinus carpio* en el proceso de aclimatización estacional. Tesis presentada en la Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en Biotecnología. 73p.

Razmi, K.; Naji, T.; Alizadeh, M.; Hoseinzadeh Sahafi, H. 2011. Hormonal sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by ethynylestradiol-17 α (EE2). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 10(2) 304-315.

Rocha, A.; Ruiz, S.; Estepa, A.; Coll, J.M. 2001. Biología molecular de los peces: Interés y aplicaciones. Revista AquaTIC n° 5. 10 p.

Rosales Velázquez, M.O. 2008. Efecto de la 17 α -metiltestosterona en la diferenciación sexual de juveniles de *Paralabrax maculatofasciatus* (STEINDACHNER, 1868) (TELEOSTEI: SERRANIDAE). Tesis para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. La Paz. 126 p.

Rzepakowska, M. and Ostaszewska, T. 2013. Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. Reviews in Aquaculture. 5: 1–14.

Sanchez, J., 1961. El paiche. Aspectos de su historia natural, ecología y aprovechamiento. Servicio de Pesquería del Ministerio de Pesquería. Lima, Peru. 48 pp.

Sandoval, M. 2007. Aspectos de manejo, reproducción y alimentación del paiche (*Arapaima gigas*) en la Amazonía Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana-BIODAMAZ. Documento Técnico 8.

Simao, F.A.; Waterhouse, R.M.; Ioannidis, P.; Kriventseva, E.V.; Zdobnov, E.M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics, 31(19): 3210–3212.

Smith-Unna, R.; Bournnell, C.; Patro, R.; Hibberd, J.M.; Kelly, S. 2016. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Res.* 26(8): 1134-1144.

Sosalegowda, A.H.; Kundapur, R.R.; Boregowda, M.H. 2010. Molecular characterization of heat shock proteins 90 (α HSP83?) and 70 in tropical strains of *Bombyx mori*, 10(15), 2734–2745.

Stefano, G. B.; Prevot, V.; Beauvillain, J. C.; Fimiani, C.; Welters, I.; Cadet, P.; Breton, C.; Pestel, J.; Salzet, M.; Bilfinger, T. V. 1999. Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. *J Immunol* 163(7), 3758-63.

Strüssmann, C.A.; Fumio Takashima, F. and Toda, K. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 139: 31-45.

Szego, C. M.; Davis, J. S. 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 58(4), 1711–1718.

Tovar-Ramírez, D.; Teles, A.; Salas-Leiva, J.S.; Hernández-Contreras, A.; Asencio-Alcudia, G.G.; Le Du, J.; Burgoin-Cota, M.; Alvarez-González, C.A.; Llera-Herrera, R.; Gisbert, E.; Fernández, I.; Pérez-Urbiola, J.C.; Ibarra-Castro, L.; Mazón-Suástegui, J.M.; Núñez-Vázquez, E.J.; Guzmán-Villanueva, L.T.; Reyes-Becerril, M. 2017. Enfoques transcriptómicos en el jurel *Seriola rivoliana*. En: Cruz-Suárez, L.E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Nieto- López, M.G.; VillarrealCavazos, D. A.; Gamboa-Delgado, J.; López Acuña, L.M. y Galaviz-Espinoza, M. (Eds), *Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 390-407. ISBN 978-607-27-0822-8.

Trapnell, C.; Pachter, L.; Salzberg, S. 2009. Tophat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 25: 1105-1111.

Tratado De Cooperación Amazónica. 1999. Manual de piscicultura del paiche (*Arapaima gigas* Cuvier). Secretaría Pro Tempore de Venezuela. IIAP.FAO. Caracas, Venezuela. 84p.

Ulmasov, K. A., Shammakov, S., Karaev, K., Evgen'ev, M. B. 1992. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 1666–1670.

Unctad. 2006. United Nations Conference on Trade and Development. Geneva.

Val, A. L. and Almeida-Val, V. M. F. 1995. Fishes of the Amazon and their Environment: Physiological and Biochemical Aspects. Berlin: SpringerVerlag.

Val, A., Honczaryk, A. 1995. Criando peixes na Amazonia, (pp.85-90).Manaus, Brasil: INPA.

Valdebenito, I.; Paiva, L.; Berland, M. 2011. Atresia folicular en peces Teleósteos: una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43 (1), 11 – 25.

Vega-Ramírez, M.T.; Moreno-Lafont, M.C.; García-Flores, V.; López-Santiago, R. 2010. Respuesta inmune en peces. *Inmunología Veterinaria*. Capítulo 24. ResearchGate. 6 p.

Wang, Z.; Gerstein, M., & Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. doi:10.1038/nrg2484

Watanabe, L.; Gomes, F.; Vianez, J., Nunes, M.; Cardoso, J.; Lima, C.; Schneider, H.; Sampaio, I. 2018. De novo transcriptome based on next generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), an ancient Amazonian freshwater fish. PLoS ONE 13(10): e0206379. 22 p.

Wilhelm, B.T.; Landry, J-R. 2009. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. Methods 48: 249–257.

Young, B., Woodford, P., and O’ Dowd, G. 2014. Wheater’s Functional Histology: A text and Colour Atlas. 6th. Edition. Elsevier editorial. United States of America (EUA). 435 p.

Yue, L.; Karr, T.L.; Nathan, D.F.; Swift, H.; Srinivasan, S.; Lindquist, S. 1999. Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in *Drosophila* spermatogenesis. Genetics 151, 1065–1079

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Mapa con la ubicación geográfica de la localidad de muestreo de *Arapaima gigas*. A: Ubicación de la Ciudad de Pucallpa. B: Instalaciones ubicadas en el kilómetro 10 de la Carretera Jorge Basadre, lugar de muestreo de alevines utilizados para la parte histológica de esta tesis. C: Instalaciones ubicadas en el kilómetro 25 de la carretera Jorge Basadre, lugar donde se realizó el proceso de inversión sexual de esta tesis.



Anexo 2: Protocolo de extracción de ARN con el método de Trizol.

1. Homogenización

- 1.1. Agregar 700 μ l de TRIZOL a los tubos de 1.5 ml que se emplearán.
- 1.2. Agregar 30 mg aproximadamente de tejido, quitar exceso de RNA later en el papel toalla.
- 1.3. Con el bisturí pulverizar el tejido y agregar al tubo de 1.5 ml que contiene el TRIZOL.

- 1.4. Homogenizar con las baquetas.
- 1.5. Mezclar por pipeteo suavemente con micropipeta.

2. Separación

- 2.1. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- 2.2. Agregar 200 μ l de cloroformo.
- 2.3. Mezclar vigorosamente por 15 seg (vortex) e incubar por 2-3 min a temperatura ambiente.
- 2.4. Centrifugar las muestras de 14000 rpm por 10 min a 4°C.

3. Precipitación

- 3.1. Transferir la fase acuosa superior (200 μ l) a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- 3.2. Agregar 500 μ l de isopropanol, invertir suavemente el tubo.
- 3.3. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
- 3.4. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min a 4°C.
- 3.5. El ARN debe visualizarse como un pellet parecido a un gel.

4. Fase de lavado

- 4.1. Remover el sobrenadante cuidadosamente y eliminarlo.
- 4.2. Adicionar 1 ml de etanol al 75%.
- 4.3. Mezclar suavemente por agitación.
- 4.4. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4°C.
- 4.5. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.

5. Fase de dilución

- 5.1. Secar a temperatura ambiente, colocando el eppendorf con el ARN sobre unatoalla estéril (secar termomixer a 55°C por pocos segundos).
- 5.2. Adicionar 30 µl de agua libre de RNAsas o Agua DEPC.
- 5.3. Disolver el ARN por pipeteo suave, opcionalmente puede incubarse por 10min a 55-60°C para lograr una completa dilución.
- 5.4. Almacenar a -70 a -80.

Anexo 3: Protocolo de purificación del ARN.

1. Agregar a un tubo libre de RNasa: ARN..... 1 µg
 2. Reacción Buffer 10X con MgCl₂ 1 µL
 3. DNasa I, RNasa-free (#EN0521) 1 µL (1U)
 4. Aforar a 12 µL
- * No usar más de 1 U de DNasa I, sin RNasa por 1 µg de

ARN.

5. Incubar a 37°C por 30 min.
6. Añadir 1 µL de EDTA 50 mM e incubar a 65 ° C durante 10 minutos. El ARN se hidroliza durante el calentamiento con cationes divalentes en ausencia de un agente quelante (1). Alternativamente, usar la extracción de fenol/ cloroformo.

Utilizar el ARN preparado como plantilla para transcriptasa inversa.

Anexo 4: Protocolo utilizado en la preparación de las librerías para secuenciamiento establecidos en la Guía de Referencia de TruSeq Stranded mRNA (2017) y la Guía de Denaturación y Dilución NextSeq System (2016) proporcionados por Illumina.

1. Purificación y fragmentación del ARNm

1.1. Purificación de ARNm

1. Diluir el ARN total en agua ultra pura libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 ul en cada uno de los pocillos de la placa.
2. Agitar en vortex el RPB hasta que esté bien disperso.
3. Agregar 50 ul de RPB a cada pocillo y mézclalo vigorosamente pipeteándolo hasta por seis veces.
4. Sellar la placa con Microseal B y coloca en el termo ciclador y corre el programa mRNA Denaturacion. (100 ul en c/pocillo)
5. Incubar la placa a T.A. por 5 min.
6. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
7. Colocar la placa en el magneto y espera que el líquido se aclare (5 min.)
8. Retirar y descartar todo el sobrenadante de cada pocillo.
9. Retirar la placa del magneto.
10. Agregar 200 ul de BWB a cada pocillo, y luego agitarlo vigorosamente pipeteándolo hasta por seis veces.
11. Colocar la placa en el magneto y esperar a que el líquido se aclare (5 min.)
12. Retirar y descartar todo el sobrenadante de cada pocillo.
13. Retirar la placa del magneto.

14. Agregar 50 ul de ELB a cada pocillo, y luego agitarlo vigorosamente pipeteándolo hasta por seis veces.
15. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
16. Colocar la placa en el termo ciclador y corre el programa Elution 1. (50 ul en c/pocillo)
17. Colocar en la mesa.

1.2. Fragmentación de ARNm

1. Agregar 50 ul de BBB a cada pocillo, y luego agítalo vigorosamente pipeteándolo hasta por seis veces.
2. Sellar la placa y corre el programa Denaturación de ARNm.
3. Incubar a T.A. por 5 min.
4. Colocar la placa en el magneto y espera hasta que el líquido se aclare (5 min).
5. Retirar y descarta todo el sobrenadante de cada pocillo.
6. Retirar la placa del magneto.
7. Agregar 200 ul de BWB a cada pocillo, y luego agítalo vigorosamente pipeteándolo hasta por seis veces.
8. Colocar la placa en el magneto y espera a que el líquido se aclare (5 min).
9. Retirar y descarta todo el sobrenadante de cada pocillo.
10. Retirar la placa del magneto.
11. Agregar 19,5 ul de FPF a cada pocillo y agítalo vigorosamente pipeteándolo.
12. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
13. Colocar la placa en el termo ciclador y corre el programa Elution 2. (19,5 ul en c/pocillo)

PROGRAMA: Elution 2-Frag-Prime

1. Escoger la opción precalentar la tapa y configúrala a a 100°C.
2. 94°C por 8 min.
3. Mantener a 4°C.

14. Centrifugar brevemente.

2. Síntesis de cDNA

Guarde el siguiente programa Synthesize 1st Strand en el termociclador:

PROGRAMA: Synthesize 1st Strand

1. Elegir la opción de precalentar la tapa y configurar a 100°C
2. 25°C durante 10 min.
3. 42°C durante 15 min.
4. 70°C durante 15 min.
5. Mantener a 4°C.

2.1. Síntesis de la primera cadena de cDNA

1. Colocar la placa en el magneto y espera a que el líquido se aclare. (5 min.)
2. Transferir 17 ul del sobrenadante a una nueva placa.
3. Centrifugar la placa a 600 x g por 5 segundos.
4. Agregar 50 ul de Transcriptasa Reversa SuperScrip II a un tubo de FSA (si no se va a usar todo el FSA, agregar SuperScrip II en una ratio de 1 ul de SuperScrip II a 9 ul de FSA).
5. Agregar 8 ul de la mezcla de 1 a 9 de Superscript II-FSA a cada pocillo y

mezclar vigorosamente pipeteándolo.

6. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
7. Colocar la placa en el termo ciclador y corre el programa Primera cadena de cDNA (Synthesize 1st Strand), (25 ul en cada pocillo).

2.2. Síntesis de la segunda cadena de ADNc

1. Elegir la opción de tapa de precalentamiento del termociclador y configure latapa a 30 °C
2. Precalentar el termociclador a 16 °C.

Agregar SMM

1. Agregar 5 ul de RSB o CTE diluido.
2. Centrifugar el SMM a 600 x g por 5 segundos.
3. Agregar 20 ul de SMM a cada pocillo y mezclarlo vigorosamente pipeteandohasta por seis veces.
4. Centrifugar a 280 x g por 1 minuto.
5. Colocar la placa en el termo ciclador programado e incuba a 16°C por 1 hora.(50 ul en c/pocillo)
6. Colocar la placa sobre la mesa y deja que alcance la T.A.

Purificar el cDNA

1. Agregar 10 ul de solución AMPure XP beads a cada pocillo y mezclar vigorosamente pipeteando hasta por 10 veces.
2. Incubar a T.A. por 15 min.
3. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
4. Colocar la ´placa en el magneto y espera a que el líquido se aclare (5 min.).

5. Retirar y descartar 135 ul de sobrenadante de cada pocillo. Lavar 2 veces como sigue:
 - a. Agregar 200 ul de EtOH al 80% fresco.
 - b. Incubar en el magneto por 30 segundos.
 - c. Retirar y descarta el sobrenadante de cada pocillo.
6. Usar una pipeta de 20 ul para retirar el EtOH residual.
7. Dejar secar al aire en el magneto por 15 min. No sobre secar las perlas.
8. Retirar la placa del magneto.
9. Agregar 17,5 ul de RSB a cada pocillo y mezclar vigorosamente pipeteando hasta por 10 veces.
10. Incubar a T.A. por 2 min.
11. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
12. Colocar la placa en el magneto y esperar que el líquido se aclare (5 min.)
13. Transferir 15 ul del sobrenadante a una nueva placa.

Punto de parada segura (guardar a -20°C)

3. Adenilación de los extremos '3

1. Agregar 2,5 ul de RSB o CTE diluido.
2. Centrifugar la placa a 600 x g por 5 segundos.
3. Agregar 12,5 ul de ATL a cada pocillo y mezcla vigorosamente pipeteando hasta por 10 veces.
4. Sellar la placa y centrifuga a 280 x g por 1 min.
5. Incubar colocando la placa en el termo ciclador y corriendo el programa ATAIL70. (30 ul en c/pocillo)

PROGRAMA: ATAIL 70

1. Escoger la opción precalentar la tapa y configurar a 100°C.
2. 37°C por 30 min.
3. 70°C por 5 min.
4. Mantener a 4°C.

6. Centrifugar a 280 x g por 1 minuto.

4. Ligar adaptadores

4.1. Añadir adaptadores de Índices

1. Centrifugar los tubos de los Adaptadores a 600 x g por 5 segundos.
2. Retirar LIG de su almacén a -20°C.
3. Agregar lo siguiente en el orden indicado:
 - CTL diluido o RSB (2,5 ul)
 - LIG (2,5 ul)
 - Adaptadores de ARN (2,5 ul) (Un índice por muestra)
4. Mezclar vigorosamente pipeteando hasta por diez veces.
5. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
6. Colocar la placa en el termo ciclador y correr el programa LIG (37,5 ul por c/pocillo).

PROGRAMA: LIG

1. Escoger la opción precalentar la tapa y configurar a 100°C.
2. 30°C por 10 min.
3. Mantener a 4°C.

7. Centrifugar STL a 600 x g por 5 segundos.
8. Agregar 5 ul de STL y mezcla vigorosamente pipeteando.
9. Centrifugar a 280 x g por 1 minu.

4.2. Limpiar los Fragmentos ligados

1. Realizar los pasos 2 al 17 usando los volúmenes de la Ronda 1.
2. Agregar solución AMPure XP beads a cada pocillo: Ronda 1: 42 ul - Ronda 2: 50 ul.
3. Mezclar vigorosamente pipeteando.
4. Incubar a T.A. por 15 min.
5. Centrifugar a 280 x h por 1 min.
6. Colocar la placa en el magneto y esperar que el líquido se aclare. (2-5 min)
7. Retirar y descartar todo el sobrenadante de cada pocillo.
8. Lavar 2 veces como sigue:
 - a. Agregar 200 ul de EtOH al 80% fresco.
 - b. Incubar en el magneto por 30 segundos.
 - c. Retirar y descarta el sobrenadante de cada pocillo.

9. Usar una pipeta de 20 ul para retirar el EtOH residual de cada pocillo.
10. Dejar secar al aire en la placa magnética por 15 min. (o hasta que se vean rajaduras).
11. Agregar RSB a cada pocillo: Ronda 1: 52,5 ul - Ronda 2: 22,5 ul.
12. Mezclar vigorosamente pipeteando.
13. Incubar a T.A. por dos min.
14. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
15. Colocar la placa en el magneto y espera a que el líquido se aclare. (2-5 min.)
16. Transferir 50 ul del sobrenadante a una nueva placa.
17. Repetir los pasos de la 2 a la 17 usando los volúmenes de la Ronda 2.
18. Al finalizar la Ronda 2 ya no se transfieren 50 ul si no 29 ul del sobrenadante a una nueva placa.

Punto de parada segura (guardar a -20°C)

5. Enriquecer los fragmentos de ADN

5.1. Amplificar los Fragmentos de ADN

1. Colocar la placa en hielo y agregar 5 ul de PPC en cada pocillo.
2. Agregar 25 ul de PPM a cada pocillo y luego mezclarlo vigorosamente pipeteando hasta por diez veces.
3. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
4. Colocar la placa en el termo ciclador y corre el programa mRNA PCR (50 ul en c/pocillo).

PROGRAMA: mRNA PCR

1. Escoger la opción precalentar la tapa y configurar a 100°C.
2. 98°C por 30 seg.
3. 15 ciclos de:
 - 98°C por 10 seg.
 - 60°C por 30 seg.
 - 72°C por 30 seg.
4. 72°C por 5 min.
5. Mantener a 4°C.

5.2. Limpiar el ADN Amplificado

1. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
2. Agregar 50 ul de solución AMPure XP beads debido a que se usan adaptadores de tubo.
3. Mezclar vigorosamente pipeteando hasta por 10 veces.
4. Incubar a T.A. por 15 min.
5. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
6. Colocar la placa en el magneto y esperar a que el líquido se aclare. (2-5 min.)
7. Retirar y descartar todo el sobrenadante de cada pocillo.
8. Lavar 2 veces como sigue:
 - a. Agregar 200 ul de EtOH al 80% fresco.

- b. Incubar en el magneto por 30 segundos.
 - c. Retirar y descartar el sobrenadante de cada pocillo.
9. Usar una pipeta de 20 ul para retirar el EtOH residual.
 10. Dejar secar en el magneto por 15 min. (o hasta ver rajaduras)
 11. Retirar la placa del magneto.
 12. Agregar 32,5 ul de RSB a cada pocillo y mezclar vigorosamente pipeteando hasta por diez veces.
 13. Incubar a T.A. por 2 min.
 14. Centrifugar a 280 x g por 1 min.
 15. Colocar la placa en el magneto y esperar a que el líquido se aclare. (2-5 min.)
 16. Transferir 30 ul del sobrenadante a una nueva placa.

Punto de parada segura (guardar a -20°C)

6. Normalización y Pool de Librerías

6.1. Normalización

La Normalización se realiza de acuerdo a los datos de concentración proporcionado por el Qupod y se puede realizar llevando la librería a una concentración de 10 nM para después llevarla a 4 nM o directamente a 4 nM.

1. Transferir 10 ul de la librería al correspondiente pocillo en una nueva placa.
2. Normalizar la concentración de la librería agregando RSB (aunque el protocolo indica utilizar Tris-HCl), de acuerdo a los cálculos realizados por las lecturas del Qupod.
3. Mezclar vigorosamente pipeteando hasta por 10 veces. Dependiendo del rendimiento en la cuantificación, el volumen final en cada pocillo puede variar de 10 a 400 ul.

4. Centrifugar a 280 x g por 1 min.

6.2. Pool de Librerías

1. Como son menos de 24 librerías, transferir 10 ul de cada librería normalizada a un único pocillo de una nueva placa.
2. Mezclar vigorosamente pipeteando hasta por 10 veces.
3. Centrifugar a 280 x g por 1 min.

Punto de parada segura (guardar a -20°C)

Anexo 5: Denaturación y dilución de librerías.

1. Denaturación de librerías

Para denaturar las librerías, se utiliza el protocolo A (Método de Normalización Estándar).

1. Debido a que la normalización fue a 4 nM, combina 5 ul del pool de librerías y 5 ul de 0,2 N de NaOH.
2. Agitar con vortex brevemente y luego centrifugar a 280 x g por 1 min.
3. Incubar a T.A. por 5 min.
4. Agregar 5 ul de RSB o como el protocolo lo indica Tris-CHI.
5. Agitar con vortex brevemente y centrifugar a 280 x g por 1 min.

2. Dilución de librerías

1. Agregar 985 ul de HT1 al pool de librerías denaturado. Lo que resulta en un pool de librerías denaturado a 20 pM.
2. Agitar con vortex brevemente y luego centrifuga a 280 x g por 1 min.
3. Colocar las librerías a 20 pM en hielo hasta su dilución final.

3. Dilución final de librerías hasta su concentración de carga

1. Diluir la solución de librerías a 20 pM denaturada a 1,8 pM de la siguiente manera:
2. Separar 117 ul de la solución de librerías denaturada a 20 pM.
3. Agregar 1183 ul de HT1.

El resultado es 1,3 ml de una solución de librerías denaturada diluida a 1,8 pM.

4. Invertir para mezclar y luego pulsar en centrífuga.

Anexo 6: Denaturación y dilución del phix control.

1. Diluir el Phix a 4 nM

1. Descongelar el tubo PhiX de 10 uM.
2. Combinar 2 ul de PhiX de 10 nM con 3 ul de RSB. El volumen total es 5 ul a 4 nM.
3. Agitar con vortex brevemente y pulsar en la centrífuga.

2. Denaturación y dilución de carga del Phix

1. Combinar en un tubo de microcentrífuga 5 ul de PhiX 4 nM con 5 ul de NaOH 0,2 N.
2. Agitar con vortex brevemente y luego pulsar en centrífuga.
3. Incubar a T.A. por 5 min.
4. Agregar 990 ul de HT1 recién descongelado para hacer un volumen final de 1 ml a 20 pM.
5. Diluir el Phix de 20 pM denaturado a 1.8 pM de la siguiente manera:
 - Separa 117 ul del PhiX denatrado.
 - Agregar 1183 ul de HT1 descongelado.

El resultado es 1,3 ml de PhiX a 1,8 pM.

- Invertir para mezclar y luego centrifugar a 280 x g por 1 min.

3. Combinación de Librerías y el Phix control

Para combinar las librerías con el PhiX Control:

1. Retirar el 5% del volumen del tubo de librerías a 1,8 pM; es decir, si el tubo tiene 1,3 ml, entonces se debe retirar 65 ul.
2. Retirar 65 ul del Phix Control a 1,8 pM y agrégalo al tubo de librerías.
3. Guardarla en hielo hasta estar listo para cargarlo en el cartucho y ser llevado a secuenciador

Anexo 7. Listado de genes con expresión significativamente diferenciales en los procesos biológicos enriquecidos relacionados con la reproducción en alevines de *Arapaima gigas* expuestos a 17 α -metiltestosterona (T) y 17 β -estradiol (E) durante 30 días. FE: Fold- enrichment, B: Control (sin adición de hormonas), 1-30: Días de exposición a tratamiento hormonal. La comparación es con respecto al control.

Term	P-value	GENES
<u><i>T1 vs B</i></u>		
GO:0030707~desarrollo de células del folículo ovárico	2.05E-03	<i>rac1_drome, da_drome, rop_drome, pkra_drome, ttkb_drome, dlg1_drome, taf9_drome, arm_drome, tpc_a_drome, spt6h_drome, sptca_drome, notch_drome</i>
GO:0007298~migración de células foliculares fronterizas	4.83E-03	<i>rac1_drome, wdr1_drome, itbx_drome, ttkb_drome, cadf_drome, hrs_drome, rho1_drome, rb27c_drome, dyhc_drome, vir_drome, mysa_drome, notch_drome</i>
GO:0007310~especificación del eje dorsal/ventral del ovocito	2.33E-03	<i>cni_drome, s35b2_drome, spz_drome, rbm8a_drome, fmr1_drome, csn5_drome</i>
GO:0007294~determinación del destino de los ovocitos derivados de germario	4.63E-03	<i>capza_drome, dyhc_drome, vasa1_drome, rbm8a_drome, sptca_drome, fmr1_drome</i>
GO:0007314~especificación del eje anterior/posterior del ovocito	1.32E-02	<i>cni_drome, vasa1_drome, gus_drome, rbm8a_drome, csn5_drome, notch_drome</i>
GO:0007293~formación de cámara de huevo derivada de germario	1.92E-02	<i>inx2_drome, rm35_drome, chmp5_drome, arm_drome, vasa1_drome, sptca_drome, notch_drome</i>
GO:0048134~formación de quistes en la línea germinal	2.36E-02	<i>dyhc_drome, vasa1_drome, sptca_drome, fmr1_drome</i>
<u><i>T10 vs B</i></u>		
GO:0008209~proceso metabólico de los andrógenos	2.38E-02	<i>s5a2_human, prgc1_rat, shh_mouse, parpt_mouse</i>

GO:0090277~regulación positiva de la secreción de hormonas peptídicas	4.12E-02	<i>tfr2_rat, fibb_human, fibg_human</i>
GO:0070327~transporte de hormonas tiroideas	4.12E-02	<i>crym_mouse, mot8_rat, thbg_sheep</i>
GO:0006694~proceso de biosíntesis de esteroides	5.87E-02	<i>dhb12_anapl, gcp60_rat, cp21a_human, 3bhs7_mouse, s5a2_human</i>
<u>T30 vs B</u>		
GO:0030521~vía de señalización del receptor de andrógenos	4.61E-02	<i>ncoa3_human, fkbp4_human, tr150_human, med14_human, med13_human, ube3a_human</i>
<u>E10 vs B</u>		
GO:0060740~morfogénesis del epitelio de la próstata	2.91E-02	<i>tena_human, andr_rabit, notc1_human</i>
GO:0030728~ovulación	4.67E-02	<i>pgdh_bovin, alms1_human, tsg6_mouse</i>
<u>E30 vs B</u>		
GO:0035162~hemopoyesis embrionaria	3.31E-02	<i>myct1_danre, yap1_oryla, hif1a_chick, kmt2a_human, kmt2a_mouse, hem0_danre, yap1_danre</i>
GO:0071385~respuesta celular al estímulo de glucocorticoides	4.91E-02	<i>tisb_human, tisd_xenla, acvr1_rat, tisd_xentr, ssr5_bovin</i>
<u>E10 vs T10</u>		
GO:0071373~respuesta celular al estímulo de la hormona luteinizante	3.64E-02	<i>tpa_rat, ccna2_human</i>
<u>E30 vs T30</u>		
GO:0048477~ovogénesis	2.40E-02	<i>gblp_drome, naca_drome, hsp83_drome</i>

Anexo 8. Identidad de los genes *gblp* (*risk1*), *naca*, *hsp83*.

GEN	ID	TRANSCRITO
<i>gblp</i> (<i>risk1</i>)	>TRINITY_DN288491_c0_ g1_i1 len=604 path=[0:0- 603]	TCGAATCTGAGAGACAATTTTCAATTTTATTAATGCAAAGAAAGATTATGTGTG AATTTAAATATTGTTTTGGGCACATTACACAATACACAATATTGTAAATGTAAT GAAAGTTTACAACAATGCCATCATGTCCCCGCGCAGATGTGAGTAGATAATT TATAAGAATTGAACTGAAAAATTACATCGTCAGCTCCATGATGGCATTGACT ATGTCGTTGTTGTTGTTCTTGAGGGCGCGGATGGCTTTAGCTCGAGGAAC GTTTGCTTGCGACACGACCAAATCAATGTCCTTCTCGTCTACGCCGGTATC ATCAACTTCCTCCTCGTCTTCTTCGGCGATTGGAGCAACGACATTAGCAGA GCTGGCATCGGTCGTTGGAGCGGCTTCTGGTGCCTTGAACCTTCTCGGCA GCTGCAACTTGAGCTTGTTGCGACAAATCTTCGATCTTGGCTTCTCCGAAG ATGATGTAAGTGTGCGCTGTGTGGGTTCTTATACACATCGGGATTGTTGATAA CAAACAAGATGTTCTTTGACTTGCGGATTGTCACGCGAGTCACGCCAGTG ACGGGTTTCAAGCCCAGTTTGGACATGATTTTACGCGCC
<i>naca</i>	>TRINITY_DN4073_c1_ g1_i1 len=569 path=[0:0- 568]	TTTTTTTTTTTTATTTTTCAAATTGTATCCAATAAGCTTTTATTTGGATTCTC TTCGATTACATGGAAATGCTTATCGTGTGCGTGTTTAACGAGCAGTGACTGA GACTTGCCACACACGAATCTTGTTGTCGCTGTAACCAGCGAACAAAGTTTG GCCATCAGTTGACCAAGCGAGTGAGAGACATTGTGGCGGATCGGCCTTTG AGGAGTCAGTTCCGGAAACGCCTGGGCGCAATTCCTCAACCATCTTCTTG CATGCCAAATCCCAGATTTTGATGGATGATCCGTAGGCGACGCACAACCAG TAACGGTTTGGCGAGAAGCACAAAGCGTTGATGATATCGTTGTGGTCCAA GGTGTGCAAATGCTTGCCATCATTCAAGTCCCACAACAAAGCTTTGCAGTC CTTTCCACCGGATGTGCACAAAGATCCATCGGGTGAAACAGTGACGGTGT TCAAGTATCCGTTGTGTCCGTAATGGTTCAACTTCAATTTGCAGTTTGCCAA GTTCCAGACCTTAACGGTGCGATCCCAACCGCAGCTGACGATGATTGGAT TCACTTGA

<p><i>hsp83</i></p>	<pre>>TRINITY_DN36553_c0 _g1_i1 len=1054 path=[0:0-203 2:204- 1053]</pre>	<pre>AACCTCTGCCAGCGGTGATGAATCATGCTCATTGGCTGAATATGTTGGTCCG CATGAAGGAAAATCAAAAATCAATCTACTTCATCACCGGCGAGAGCAGAGA GCAAGTTAGCAACTCTGCATTTCGTTGAGCGTGTCAAGAAGCGTGGCTTCCG AAGTTGTCTACATGACTGAACCAATTGATGAATATGTCATTCAACAATTGAA GGAATATCAGGGCAAACAACCTCGTCTGCGTCACTAAGGAAGGCTTGGAAC TTCCAGAAGATGAGGAGGAGAAGAAGAAGCGCGAGGAAGACAAGGCCAA GTATGAGAATCTCTGCAAAGTCATGAAATCGGTGCTCGACAGCAAGGTTGA GAAAGTCATCGTTTCAAATCGTTTGGTCGAGTCGCCATGCTGCATTGTGAC TTCACAATACGGCTGGTCTGCGAACATGGAGCGCATCATGAAAGCTCAAG CTCTCCGTGACACAACGACCATGGGCTACATGGCTGGCAAGAAGCATCTC GAAATCAATCCTGATCACCCCATCATCGAGACTTTGCGTCAAAGGCCGAG GCTGATAAGAATGATAAGGCTGTCAAGGACTTGTGCATTTTGCTCTTCGAG ACCTCCTTGTTGAGCTCAGGCTTCTCGCTCGATGAGCCACAAGTTCACGC CTGCCGCATTTATCGTATGATTAAGCTCGGATTGGGCATCGACGACGACGA ACCAATGGCAACTGAAGATGCTCCCGCCGCTGCTGCTGCCACAAGCGAC ATGCCACCACTCGTCGACGACGCCGAAGACGCTTCACACATGGAAGAAGT CGATTAACCACCAAACATCTTGAATTCCTTTAAATGCACTTAGAATTTTTG TTTGATTTTTATTTTATACGCTTCAGAGATTAATTTAAAGAAAACGAAAAAT CCTGCAAACCTCACAAACCTTAAGTAAACGTAAGAAGTTCATTAATTAATAT TTTCATGACTTAATTTAAGGGAGGTTTTCTTGCTCTTAGGAAAGGCAAATGA ATAAAAATTCGATGATAAGCTCTAATAAAAAAAAAA</pre>
---------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------