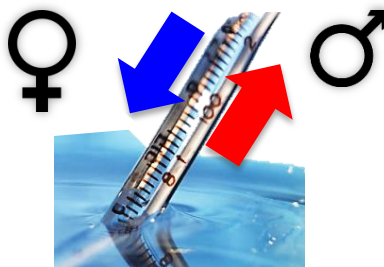
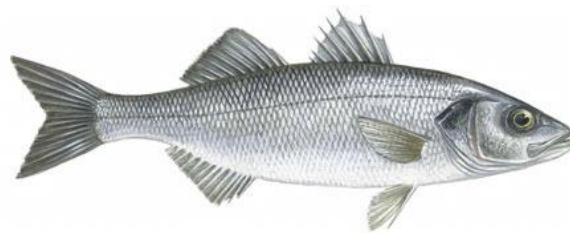


**EPIGENÉTICA DE LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN LOS
PECES: CÓMO LA TEMPERATURA DURANTE LAS FASES
LARVARIAS DETERMINA LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN LA
LUBINA Y SU APLICACIÓN A LA ACUICULTURA PARA
LA OBTENCIÓN DE UN MAYOR NÚMERO DE HEMBRAS**

Francesc Piferrer

Instituto de Ciencias del Mar
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Paseo Marítimo de la Barceloneta, 37–49
08003 Barcelona

Tel. 932309567, Fax 932309555, c/e: piferrer@icm.csic.es



RESUMEN

Este trabajo es un resumen de nuestras investigaciones sobre el efecto de la temperatura en la proporción de sexos en los peces. Explicamos como nuestra investigación nos ha permitido en último término el desarrollo de un método innovador y patentado, el primero de su tipo en el mundo, para maximizar en este caso el número de hembras en los cultivos de lubina. La industria ha participado en todo momento con apoyo y suministro de material biológico, primero a nuestros proyectos de investigación básica y luego con la realización de proyectos de transferencia de tecnología. La industria ha mostrado un gran interés por este método no invasivo, no farmacológico, que no implica el uso de hormonas puesto que requiere sólo del control de la temperatura del agua a nivel de hatchery y que, por lo tanto, está en línea con el concepto de acuicultura sostenible. De forma significativa, este método ya se está aplicando de forma práctica en algunas empresas de acuicultura.

Para el desarrollo de este método práctico ha sido necesario el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes. Cabe destacar que este trabajo representa el descubrimiento, por primera vez en cualquier animal, de un mecanismo epigenético que conecta un factor externo como la temperatura con la determinación del sexo, resolviendo un enigma científico que había dado lugar a mucho debate. El trabajo fue publicado en la prestigiosa revista *PLoS Genetics* (índice de impacto >9) y tuvo una gran repercusión tanto en la prensa científica (véase nota de Editor's Choice de *Science*, entre otros) como en los medios de comunicación (prensa, radio y TV) de todo el mundo, incluyendo la revista *Time Magazine*. Un resumen divulgativo del significado de nuestras investigaciones puede verse también en el número de Agosto de 2013 de *Investigación y Ciencia* (se adjunta todo el material citado).

PALABRAS CLAVE: Aromatasa, Metilación del ADN, Diferenciación sexual

INTRODUCCIÓN

La proporción de sexos es un parámetro demográfico crucial para la viabilidad de las poblaciones y resulta de los procesos de determinación y diferenciación sexual. Los vertebrados tienen dos tipos principales de determinación del sexo: genética (GSD) y dependiente de la temperatura (TSD). En TSD, la temperatura experimentada durante un tiempo particular durante desarrollo temprano, referido a como el periodo termosensible (TSP), determina el sexo gonadal. TSD está presente en reptiles y peces [1]. En vertebrados no mamíferos la proporción relativa de andrógenos y estrógenos determina si una gónada indiferenciada se desarrollará como testículo o como ovario. Esta proporción depende de la actividad de la enzima aromatasa, Cyp19a, el producto del gen *cyp19a*, la cual convierte los andrógenos en estrógenos. En todas las especies de peces examinadas, altas temperaturas dan más machos [2]. El efecto masculinizante de la temperatura alta está invariablemente causado por una inhibición de la expresión de *cyp19a* y la subsiguiente actividad enzimática [3–5]. Por tanto, *cyp19a* tiene un papel clave en la respuesta de la proporción de los sexos a la temperatura en vertebrados. Desafortunadamente, el mecanismo molecular por el cual la temperatura afecta *cyp19a* es desconocido [1,6,7]

En un estudio teórico, Gorelick [8] postuló la implicación de los mecanismos epigenéticos en la modulación de la proporción de sexos en especies con TSD. Estudios recientes [9] han mostrado control epigenético no sólo en las enzimas esteroidogénicas sino que también en factores de transcripción, así como los receptores nucleares relacionados.

La lubina, *Dicentrarchus labrax*, es una especie gonocorista del tipo GSD+TE, lo que significa que la determinación de sexo resulta de una combinación de factores genéticos (GSD) con influencias ambientales por temperatura (TE). Así, la temperatura y la genética contribuyen aproximadamente de forma igual a la determinación de sexo en la lubina [10–12]. Por tanto, la lubina es un modelo perfectamente válido y de hecho uno de los peces más documentados en cuanto a los cambios de proporción del sexo en respuesta a la temperatura

[12–17]. Exposición a temperaturas altas ($>17^{\circ}\text{C}$) durante el TSP, el cual cubre el periodo entre fertilización hasta aproximadamente los 60 días post-fertilización (dpf), resultan en una proporción de sexos con preponderancia de machos (**Fig. 1**) [12]. Estudios anteriores demostraron que los efectos de temperatura en la lubina son más pronunciados durante la primera mitad del TSP, cuándo el animal tiene unos 30 mm [12]. Curiosamente, esto no sólo ocurre antes de diferenciación del sexo morfológico (>150 dpf; 120 mm) sino incluso antes de la formación de los primordios gonadales a los 35 dpf [18]. Esto demuestra que el tiempo durante el cual la influencia de temperatura tiene lugar es mucho antes del periodo de diferenciación real de las gónadas. Cómo es entonces posible que la temperatura afecte al destino de un órgano que aún no existe? Por ello, pensamos en la posibilidad de un mecanismo epigenético. La epigenética trata de los cambios de expresión génica perdurables (es decir, tanto de una generación celular a la siguiente por mitosis como incluso a la descendencia por meiosis) que son independientes de los cambios en la secuencia nucleotídica [19]. Por tanto, permiten “recordar” a los organismos en forma de alteración de la expresión génica los efectos de un estímulo que ha tenido lugar mucho antes. En nuestro caso, pensamos en un mecanismo epigenético activado por temperatura que podría resultar en niveles diferentes de metilación del ADN en la región promotora del gen *cyp19a*, lo cual a su vez afectaría a la expresión del gen, la síntesis de estrógenos, la diferenciación sexual y por extensión a la proporción de sexos observada.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y protocolos de cría

Huevos de lubina recién fertilizados se obtuvieron del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (Castellón) o de una empresa privada colaboradora en el proyecto (Base Viva, St. Pere Pescador, Girona) y fueron transportados a nuestras instalaciones experimentales en el Instituto de Ciencias Marinas en Barcelona. La incubación de los huevos y larvas se hizo acorde a protocolos estándar [20], excepto por los tratamientos de temperatura (ve sección próxima).

2. Tratamientos de Temperatura

Los huevos se incubaron a 14–15°C, la temperatura natural para la lubina en la época de puesta durante invierno y primavera temprana en el Mediterráneo occidental. Para este estudio se utilizaron varias familias distintas. Durante el periodo termosensible se hicieron dos tratamientos térmicos, uno a 15°C hasta los 60 dpf (“temperatura baja”, LT o grupo de control). Luego la temperatura se aumentó a 21°C a razón de 0.5C/ día. El otro grupo de peces se crio a 15°C hasta los 10 dpf y luego a 21°C (**Fig. 2**). Veintiún grados Celsius es la temperatura estándar para asegurar crecimiento adecuado en la lubina juvenil. Así, los peces en este grupo estuvieron expuestos a una temperatura más alta (HT) esencialmente durante el todo el TSP. Este régimen térmico es el típicamente utilizado en las hatcheries y por ello promueve el desarrollo de machos. Cada tratamiento de temperatura fue llevado a cabo por duplicado. En resumen, el grupo LT imita las condiciones naturales en el mar, mientras que el HT resulta en la masculinización de aproximadamente la mitad de las hembras genotípicas [11,12].

3. Muestreo e histología gonadal.

Los animales se sacrificaron a 330 dpf, i.e., bastante tiempo después del fin de los regímenes térmicos y se obtuvieron muestras de gónadas y cerebro (n = 40 pez por tratamiento). De cada pez (159 cm y 73 g, en promedio), una gónada se procesó para la identificación histológica del sexo por técnicas de histología convencional. Los peces sexualmente indiferenciados (94.8±0.08 mm; n = 20 peces por grupo), se sexaron mediante el análisis de la expresión de *cyp19a*.

4. Niveles de metilación del ADN por secuenciación por bisulfito

Se identificaron los nucleótidos CpG en el promotor de *cyp19a* [21] y β - actina [22]. El DNA se obtuvo de las gónadas de 815 peces y el cerebro de 35 peces. Las muestras de ADN de cada animal eran individualmente procesados y sometidas a secuenciación tras tratamiento con bisulfito según Widschwendter y colaboradores (2000) [23]. Los cebadores utilizados fueron para el promotor de *cyp19a*: externo delantero (ED): ATTGGTAGTTTAATGGAGGAATTT; externo trasero (ET): AATCCCACTACAATAACATTTAAAAAC; Interno delantero (ID): GAGGAATTTGGGAGGAATTATAAATAT; Interno trasero (IT).

Para el promotor de β -actina: ED: CCAAATCTACCACTATAATATCCAAAC;
AATTTATAATTTTGGTTGGTAGTAA, ET:
CAAAATCTTACCTTAAAAATATATCTAC, ID;
CATTCACAAACCTCAACACTAACC, IT. Los detalles de las condiciones de
amplificación (nº de ciclos, etc., pueden verse en la publicación original
adjunta). Los productos de PCR se separaron gel electroforesis y las bandas
purificadas con Purelink Gel Extracción (Invitrogen). Las bandas se clonaron en
el vector pCR4-TOPO células E. coli Topo10 se transformaron en el caso del
promotor de cyp19a o células E. coli JM109 (Invitrogen) en el caso del
promotor de β -actina. Se secuenciaron 10 clones por cada pez. El número total
de clones secuenciados en este trabajo fue de 1100.

5. Medida de la expresión de cyp19a por PCR en tiempo real

La expresión de cyp19a en hembras sujetas a alta y baja temperatura se
realizó por qPCR según protocolos estándar de nuestro laboratorio utilizando 1
 μ g de ARN para la transcripción inversa.

6. Metilación in vitro y transfección de células

Los plásmidos PGL3-cyp19aos se metilaron in vitro utilizando la enzima Sssl
metilasa según las instrucciones del fabricante (NE Biolabs). Después los
plásmidos se purificaron y la reacción se comprobó con tratamiento de geles
con McrBC, el cual digiere AND metilado. Para las transfecciones se utilizaron
células de riñón embrionario humano 293T (HEK 293T) utilizando el método de
coprecipitación de fosfato de calcio. Los factores de transcripción SF1 y Foxl2
fueron cotransfectados junto con el vector conteniendo el promotor metilado o
no de cyp19a y se midió la actividad luciferasa, que fue medida 48 h después
de la transfección tras el lavado de las células con PBS y análisis en un
luminómetro de microplacas (Berthold).

7. Análisis estadísticos.

Los datos en forma de porcentajes como el porcentaje de metilación o de
machos fueron transformados por el arcoseno de la raíz cuadrada antes del
análisis. Asimismo, los datos de expresión fueron sometidos a la
transformación logarítmica para asegurar la normalidad.

Se utilizó ANOVA de dos factores para analizar la influencia del sexo y de la temperatura en la metilación del promotor de *cyp10a* y β -actina. El análisis post hoc se llevó a cabo con el test de Tukey con software Statgraphics v16 o SPSS v19.

El test t de Student se utilizó para analizar las diferencias de expresión de *cyp19a* entre hembras sujetas a alta vs baja temperatura, así como en los niveles de expresión en los ensayos de transfección de células. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Diferencias en la metilación del promotor de cyp19a dependen tanto de la temperatura como del sexo.

La ANOVA de dos factores indicó diferencias significativas la metilación del ADN del promotor en lubinas de un año de edad (160 mm longitud; 73 peso de g) según sexo ($F = 118.2$; $P = 0.001$) y tratamiento de temperatura ($F = 14.6$; $P = 0.000$), pero sin interacción entre las dos variables ($P = 0.703$). Los resultados mostraron que, en general, los machos tenían el doble de metilación que las hembras (machos \pm S.E.M.: $81.15 \pm 2.54\%$ vs. $45.5 \pm 3.47\%$; hembras; $t = -9.591$, $P = 0.000$; **Fig. 3**). Además, las diferencias eran también claramente evidentes por distribuciones de frecuencia distintas, con valores en la gama 12.9–72.8% para las hembras y 71.4–97.1% para los machos, con un valor de umbral de 67%. El hallazgo más importante fue que la exposición a temperatura alta aumentó la los niveles de metilación en hembras de 37.1 ± 3.45 a $53.9 \pm 3.49\%$ ($t = 3.186$, $P = 0.005$), y de 77.0 ± 1.81 a $85.3 \pm 3.28\%$ en machos ($t = 2.056$, $P = 0.062$; **Fig. 3**).

De los 128 patrones teóricamente posibles de metilación con 7 loci CpG, es decir 2^7 , se observaron 58 con distribuciones distintas según el tratamiento. La **Fig. 4** muestra diferencias entre macho y hembras según la temperatura en los 4 patrones más representativos, con claras diferencias entre grupos en la mayoría de los casos

2. Las diferencias de metilación del promotor de cyp19 no son debidas a un efecto generalizado de la temperatura y son específicas de las gónadas

Para comprobar si los efectos observados eran debidos a un efecto generalizado de la temperatura, la metilación del cyp19a se midió en el cerebro, un lugar donde este gen no se expresa (se expresa una isoforma específica del cerebro). Como puede observarse en la **Fig. 5A** no se observaron diferencias significativas.

Por otro lado, se utilizó el promotor de β -actina, un gen constitutivo que se expresa siempre y se analizó los niveles de metilación tanto en gónadas (**Fig. 5B**) como en cerebro (**Fig. 5C**), observándose igualmente la ausencia de diferencias significativas. Además, los niveles de metilación fueron muy bajos de acorde a un gen altamente expresado y por lo tanto poco inhibido por la metilación.

En conjunto, estos resultados muestran que las diferencias de metilación entre el promotor de cyp19a son específicos de gónadas y que no son debidos a un efector generalizado de la temperatura.

3. Las temperaturas altas experimentadas durante el desarrollo temprano masculinizan a las poblaciones de lubina y disminuyen el nivel de expresión de cyp19a de las hembras

El porcentaje de hembras en el grupo control (LT) fue de $71.0 \pm 3.5\%$ ($n = 40$), un valor significativamente diferente comparado al $56.0 \pm 11.3\%$ ($n = 40$) del grupo HT (Chi-cuadrado = 7.28; $P = 0.01$). Por otro lado, los resultados mostraron que la expresión de cyp19a en las hembras HT era significativamente más baja que las hembras LT ($F = 0.024$; $P = 0.003$; **Fig. 6A**). Además, se observó una relación inversa entre los niveles de metilación y la expresión génica ($r^2 = 0.29$; $F = 7.84$; $P = 0.01$) (**Fig. 6B**). Además, cuando se examinan los siete loci individuales del promotor de cyp19a en machos y hembras se observó que el efecto de la temperatura en términos de metilación es específico de dos loci y exclusivamente observado en las hembras (**Figs. 6**

C y D). De forma muy significativa, estos loci están muy cerca de los sitios de unión de factores de transcripción importantes para la expresión de aromatasa.

4. La metilación del promotor de cyp19a impide la activación transcripcional por los factores SF1 y Foxl2 in vitro

SF1 y Foxl2 son dos factores de transcripción que están implicados en la activación transcripcional de la aromatasa, desde peces hasta mamíferos. Con los estudios in vitro se pretendía demostrar si la metilación del promotor podía inhibir esta activación transcripcional. Como puede observarse en la **Fig. 7**, la metilación del promotor bloqueó la activación transcripcional de SF1 y Foxl2 tanto administrados en forma aislada como en combinación ($P < 0.01$) o en combinación ($P < 0.05$), lo que demuestra que los grupos metilo en el carbono 5 de los nucleótido CpG son capaces de impedir la unión de estos factores de transcripción..

DISCUSIÓN

El presente estudio claramente demuestra que los niveles de metilación del promotor de cyp19a son significativamente más altos en machos que en hembras en las gónadas de animales de un año de edad. Las diferencias de metilación entre tejidos son resultado de los procesos de metilación de novo y de mantenimiento [19]. La metilación de promotores suprime la transcripción, contribuyendo a aumentar las diferencias entre sexos [8]. Así, la diferenciación de l sexo de las gónadas podría ser regulada a través de la metilación de genes clave de una manera similar a lo observado en otros tejidos. SRY, el gen que determina sexo en mamíferos, es normalmente silenciado epigenéticamente, activado durante una ventana específica del desarrollo, y silenciado otra vez [24]. La maquinaria necesitada para estos cambios es presentes en peces, donde hasta ocho distintas metiltransferases (Dnmts), las enzimas responsables de transferir grupos de metilo a ADN, han sido identificadas [25]. En medaka (*Oryzias latipes*) y embriones de *Xiphophorus*, la expresión de dnmt1 está temporalmente y espacialmente regulada, sugiriendo que puede jugar una función importante durante desarrollo. Cambios en metilación de los niveles de cyp19a y otros promotores de genes son

probablemente necesarios en el curso de la diferenciación sexual de los pees y otros animales..

Las temperaturas altas experimentados durante la vida temprana en la lubina son capaces de masculinizar a las poblaciones por metilación del promotor de *cyp19a*, un gen clave para el desarrollo de las hembras. La metilación del promotor de este gen impide su expresión y la ausencia de estrógenos hace que animales que de otra manera se hubiesen desarrollado como hembras lo hagan como machos. Ejemplos del efecto de la temperatura sobre la metilación de genes son abundantes en plantas [26] y animales [27], incluyendo la determinación de casta en las abejas [28], en las que las tasas de crecimiento están implicadas y reguladas por factores específicos [29]. Curiosamente, en muchos peces. Incluyendo a la lubina, hay una asociación entre un mayor crecimiento y el desarrollo hacia hembras durante la diferenciación del sexo [30,31].

La lubina tiene un sistema poligénico de determinación de sexo [10] con una influencia medioambiental fuerte [2]. El hallazgo principal de este estudio es que exposición a la temperatura alta durante desarrollo temprano aumentó 1.5 veces los niveles de metilación del promotor de *cyp19a*. En contraste, la temperatura alta no aumentó dichos niveles en los machos, los cuales ya eran inicialmente altos (80%). En este estudio se demuestra también una relación entre el aumento de la metilación del citado promotor y el aumento del número de machos (o disminución de hembras). Así, este estudio demuestra que las temperaturas altas experimentadas durante la vida temprana masculinizan a las hembras por silenciamiento del gen *cyp19a* debido a la metilación de su promotor

Los cambios observados son específicos del promotor *cyp19a* en las gónadas puesto que en el cerebro no hay efecto de la temperatura. Además, no es un cambio generalizado debido a la temperatura puesto que el promotor de β -actina no fue alterado. Existen sin embargo dos posibilidades: que la alta temperatura metila el promotor de *cyp19a* o bien que éste se encuentre metilado en ambos sexos y no pueda desmetilarse en futuras hembras

transcurrido un cierto tiempo durante el desarrollo. Actualmente, estamos investigando entre estas dos posibilidades.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra pues, por primera vez en cualquier animal, una conexión entre un factor ambiental importante como es la temperatura y la determinación del sexo. El mecanismo último no es del todo conocido pero nuestros resultados apuntan de forma muy convincente a que la metilación del promotor *cyp19a* inducida por la alta temperatura tiene como consecuencia la inhibición de la activación transcripcional por los factores de transcripción SF1 y Foxl2.

Los niveles más altos de metilación del *cyp19a* en machos sometido a temperaturas naturales están de acuerdo con el hecho ampliamente probado de una menor expresión de aromatasa en machos comparado con los valores observados en hembras. Estos resultados obtenidos en una especie como la lubina, una especie de pez donde la determinación de sexo depende de la interacción entre genotipo y entorno, muestran que una exposición a temperaturas anormalmente altas durante el TSP es capaz de inducir hipermetilación del promotor de *cyp19a*, sobrepasando un cierto umbral y masculinizando a una parte de los animales que de otra forma hubiesen sido hembras (**Fig. 8**).

De esta forma se da respuesta al largo enigma de cual era el mecanismo molecular que conectaba la temperatura con la proporción de sexos. Los sistemas TSD son aún más comunes en reptiles que en peces y de forma significativa el reto era ver si un mecanismo similar al descrito aquí podía operar en reptiles. Estudios recientes en la tortuga escurridiza (*Trachemys picta*), una especie con TSD confirman nuestros hallazgos en la lubina.

INTERÉS PARA EL SECTOR

Poder controlar las proporciones de sexos y producir lotes del sexo que más crece es de un indudable interés para el sector. Hay que tener en cuenta que en los peces es muy habitual el mayor crecimiento de las hembras respecto a los machos. En la lubina las hembras crecen hasta un 30% más que los machos y en el rodaballo esta cifra puede llegar hasta e 50%. Por tanto, un cultivo monosexo está plenamente justificado para optimizar el rendimiento de los cultivos. Así, algunos cultivos, como el del salmón del Pacífico en Canadá y el del Fletán del Pacífico en Japón son viables gracias al cultivo de sólo hembras. El esclarecimiento de cómo la temperatura afecta a la proporción de sexos ha permitido a nuestro grupo entender las limitaciones y oportunidades que confiere la manipulación de la temperatura del agua durante las fases iniciales del desarrollo, lo que ha resultado en la obtención de una patente, la primera de este tipo en el mundo.

VIABILIDAD DE SU APLICACIÓN EN EMPRESAS

Nuestro método de control de las proporciones de sexos se basa en la manipulación de forma precisa de la temperatura del agua en las hatcheries de lubina durante los primeros 60 días de vida del animal. El resultado es que en cada población se permite obtener el mayor número de hembras, el sexo de mayor crecimiento en la lubina. Este método no es farmacológico, puesto que no implica el uso de hormonas, por lo que está perfectamente de acuerdo con la filosofía de una acuicultura sostenible, como debería ser, y permite optimizar los cultivos a aquellas empresas que lo adoptan, como ya ocurre en España y Turquía.

AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a los Dres. S. Zanuy (Instituto de Acuicultura, Castellón, España) y A. Mateos (Base Viva, S.L.) por proporcionar los huevos; a E.

Martínez y M. Delgado por su ayuda con el mantenimiento de los animales; a S. Joly por su soporte técnico; y a los Dres. Y. Nagahama y D. Wang por proporcionar los plásmidos de expresión de SF-1 y Foxl2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valenzuela N, Lance V (2004) Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Washington: Smithsonian Books.
2. Ospina-Álvarez N, Piferrer F (2008) Temperature-dependent sex determination in Fish. Prevalence, existence of a single sex ratio response pattern, and possible effects on climate change. Public Library of Science One 3: e2837.
3. Van Nes S, Andersen O (2006) Temperature effects on sex determination and ontogenetic gene expression of the aromatases *cyp19a* and *cyp19b*, and the estrogen receptors *esr1* and *esr2* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Molecular Reproduction and Development 73: 1481-1490.
4. Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF (2009) Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. General and Comparative Endocrinology 165: 352-366
5. D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF (2001) Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of Tilapia *Oreochromis niloticus*. Molecular Reproduction and Development 59: 265-276.
6. Lance VA (2009) Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological Genetics and Physiology 311: 314-322.
7. Sultan SE (2007) Development in context: the timely emergence of eco-devo. Trends in Ecology & Evolution 22: 575-582
8. Gorelick R (2003) Evolution of dioecy and sex chromosomes via methylation driving Muller's ratchet. Biological Journal of the Linnean Society 80: 353.
9. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V (2010) Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. Steroids 75: 467-476.

10. Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Chavanne H, Chatain B (2007) A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics* 176: 1049-1057.
11. Piferrer F, Blázquez M, Navarro L, González A (2005) Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology* 142: 102-110.
12. Navarro-Martín L, Blázquez M, Viñas J, Joly S, Piferrer F (2009) Balancing the effects of rearing at low temperature during early development on sex ratios, growth and maturation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Limitations and opportunities for the production of highly female-biased stocks. *Aquaculture* 296: 347-358.
- 13.. Blázquez M, Zanuy S, Carillo M, Piferrer F (1998) Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Zoology* 281: 207-216.
14. Pavlidis M, Koumoundouros G, Steriote A, Somarakis S, Divanach P, et al. (2000) Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Zoology* 287: 225-232.
15. Koumoundouros G, Pavlidis M, Anezaki L, Kokkari C, Steriote K, et al. (2002) Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenetic phase. *Journal of Experimental Zoology* 292: 573-579.
16. Saillant E, Fostier A, Haffray P, Menu B, Thimonier J, et al. (2002) Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Zoology* 292: 494-505.
17. Mylonas CC, Anezaki L, Divanach P, Zanuy S, Piferrer F, et al. (2005) Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Biology* 67: 652-668.
18. Roblin C, Brusle J (1983) Gonadal ontogenesis and sex differentiation in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, under fish-farming conditions. *Reproduction Nutrition Development* 23: 115-127.

19. Hsieh CL (2000) Dynamics of DNA methylation pattern. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 224-228.
21. Galay-Burgos M, Gealy C, Navarro-Martín L, Piferrer F, Zanuy S, et al. (2006) Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology* 145: 47-53.
22. Kuhl H, Tine M, Beck A, Timmermann B, Kodira C, et al. (2011) Directed sequencing and annotation of three *Dicentrarchus labrax* L. chromosomes by applying Sanger- and pyrosequencing technologies on pooled DNA of comparatively mapped BAC clones. *Genomics*: doi:10.1016/j.ygeno.2011.1006.1004
23. Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller HM, Amberger A, et al. (2000) Methylation and silencing of the retinoic acid receptor- β 2 gene in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 826-832.
24. Nishino K, Hattori N, Tanaka S, Shiota K (2004) DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *Journal of Biological Chemistry* 279: 22306-22313.
25. Mhanni AA, Yoder JA, Dubesky C, McGowan RA (2001) Cloning and sequence analysis of a zebrafish cDNA encoding DNA(cytosine-5)-methyltransferase-1. *Genesis* 30: 213-219.
26. Hashida SN, Kitamura K, Mikami T, Kishima Y (2003) Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam3 in *Antirrhinum majus*. *Plant Physiology* 132: 1207-1216.
27. Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33 Suppl: 245-254.
28. Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science* 319: 1827.
29. Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473: 478–483.
30. Saillant E, Fostier A, Haffray P, Menu B, Laureau S, et al. (2003) Effects of rearing density, size grading and parental factors on sex ratios of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in intensive aquaculture. *Aquaculture* 221: 183-206.

FIGURAS

Figura 1. Porporción de sexos en la lubina adulta en función de la temperatura experimentada durante las fases larvarias. Obsérvese que temperaturas en el rango natural (13–17°C) dan proporciones de sexos equilibradas, mientras que temperaturas >17°C dan lugar a una disminución del número de hembras. En particular, las temperaturas de 21°C, como las usadas en algunas hatcheries, producen un fuerte efecto masculinizante.

Figura 2. Eventos de la diferenciación sexual de la lubina según la edad. Superpuestos se encuentran los regimenes térmicos utilizados de baja (LT) y alta (HT) temperatura. TSP: periodo termosensible.

Figura 3. Niveles de metilación del promotor de *cyp19a* en lubinas de un año de edad según el sexo y la temperatura a la que estuvieron expuestas durante las fases larvarias. Los círculos blancos y negros denotan ausencia o presencia de metilación en loci determinados del promotor, respectivamente. El número dentro de la barra indica el tamaño muestral. Valores como media \pm SEM. Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.01$).

Figura 4. Patrones de metilación comunmente más observados según el sexo y la temperatura. A, B, C y D indican distintos patrones según la metilación de cada loci dentro del promotor (círculos blancos o negros). FLT y FHT indican hembras a baja alta temperatura, mientras que MLT y MHT indican machos a baja y alta temperatura.

Figura 5. Especificidad de los efectos de la temperatura según el promotor y el órgano considerado. A) Metilación del promotor de *cyp19a* en el cerebro; B) Metilación del promotor de *β -actina* en las gónadas; C) Metilación del promotor de *β -actina* en el cerebro. Los círculos blancos y negros denotan ausencia o presencia de metilación en loci determinados del promotor, respectivamente. El número dentro de la barra indica el tamaño muestral. Valores como media \pm SEM. Obsérvese la ausencia de diferencias significativas, en claro contraste

con lo observado en el promotor de *cyp19a* en las gónadas (Fig. 4), lo que indica que los efectos de la temperatura sobre el promotor de *cyp19a* son específicos (no es un efecto generalizado de la temperatura) y se dan sólo en las gónadas.

Figura 6. Efectos de temperatura sobre el promotor de *cyp19a*, sus niveles de metilación y transcripción. A) expresión de *cyp19a* en hembras en función de la temperatura; B) correlación inversa entre los niveles de metilación y los niveles de expresión; Metilación de loci específicos entre hembras (C) y machos (D) expuestos a baja o alta temperatura. Datos como media \pm SEM.

Figura 7. Efectos de la metilación del promotor de *cyp19a* de lubina in vitro. Células HEK 293 se transfectaron con con vectores conteniendo el promotor metilado o no metilado. Las células se transfectaron adicionalmente con vectores conteniendo SF1 y Foxl2, dos conocidos factores de transcripción que activan la transcripción de aromatasa. Obsérvese que cuando el promotor de *cyp19a* está metilado la transcripción inducida por SF1, Foxl2 o ambos está completamente bloqueada.

Figura 8. Diagrama que muestra las frecuencias de metilación del promotor de *cyp19a* en gónadas de lubina según el sexo y la temperatura. Temperaturas altas (HT) en comparación con las bajas o naturales (LT) provocan un corrimiento de los niveles de metilación, lo que da como resultado que muchas hembras genéticas terminen masculinizándose y desarrollando como machos (area sombreada).

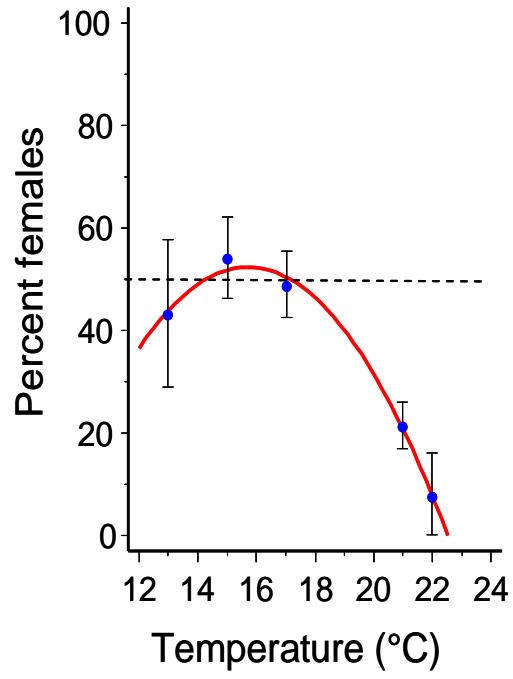


Figura 1

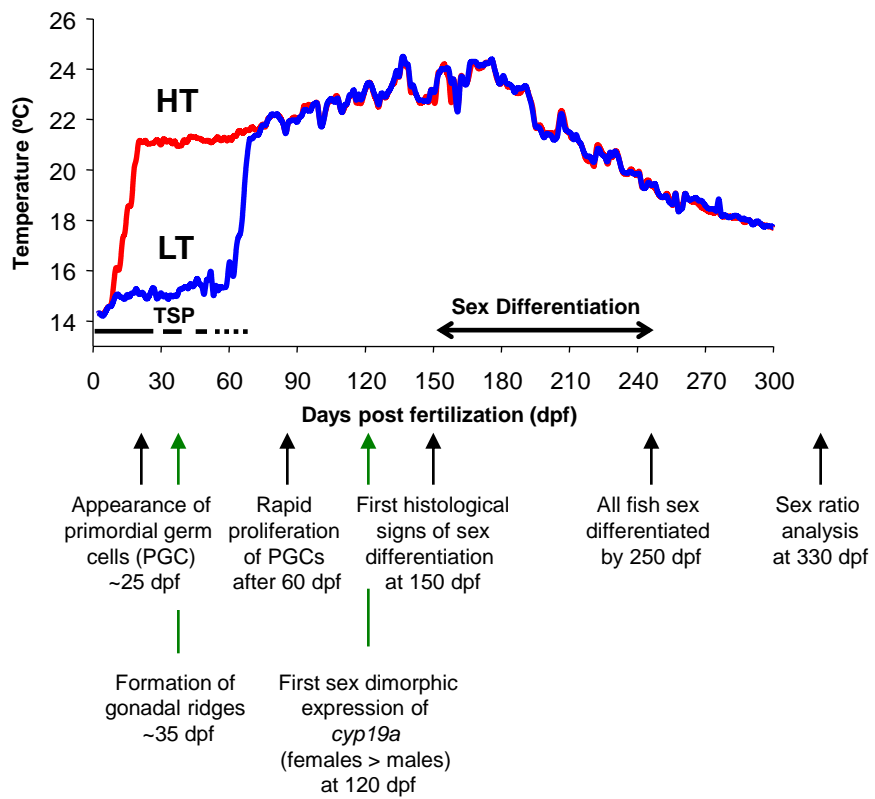


Figura 2

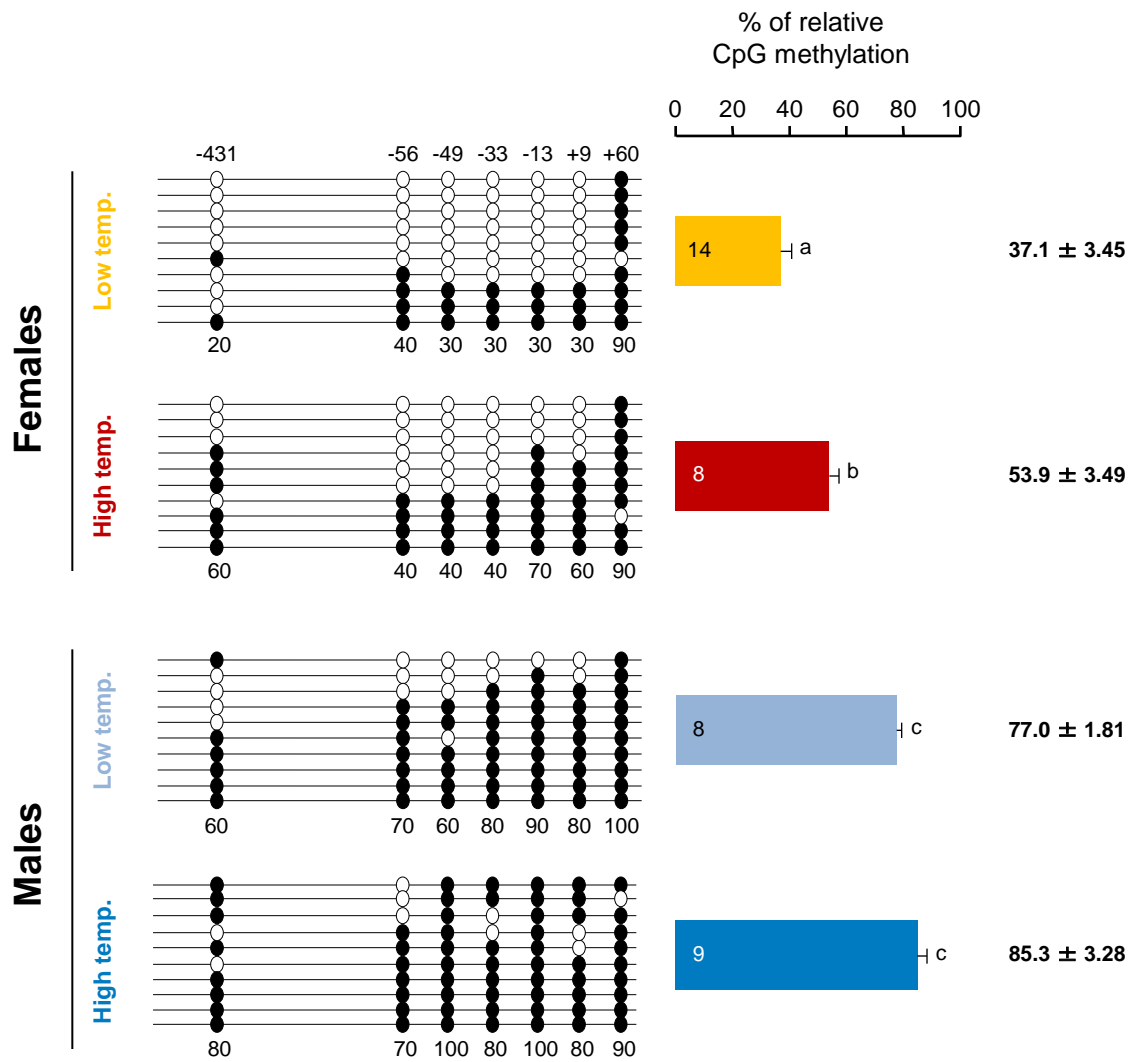


Figura 3

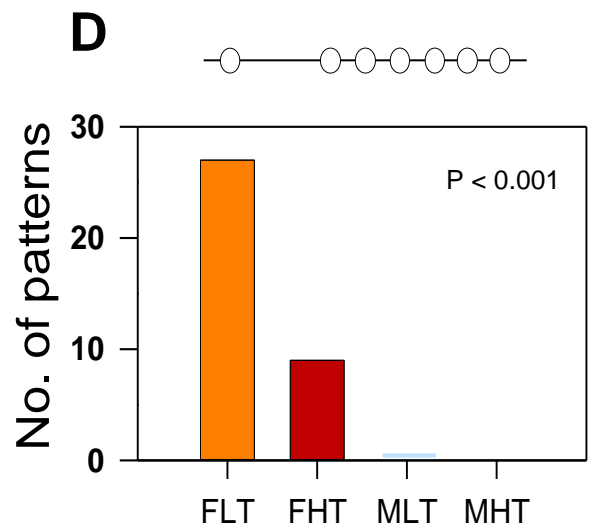
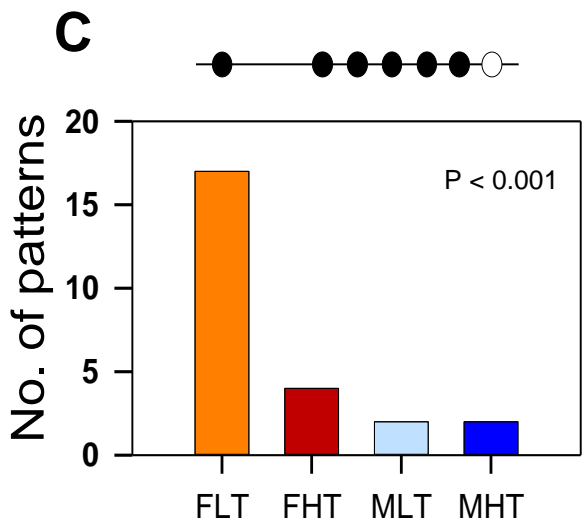
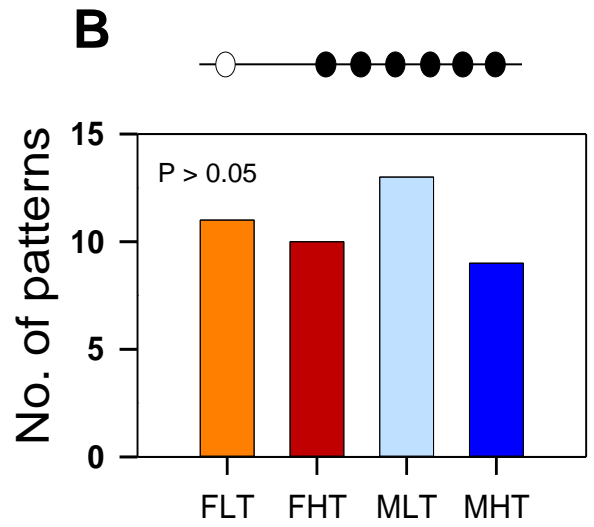
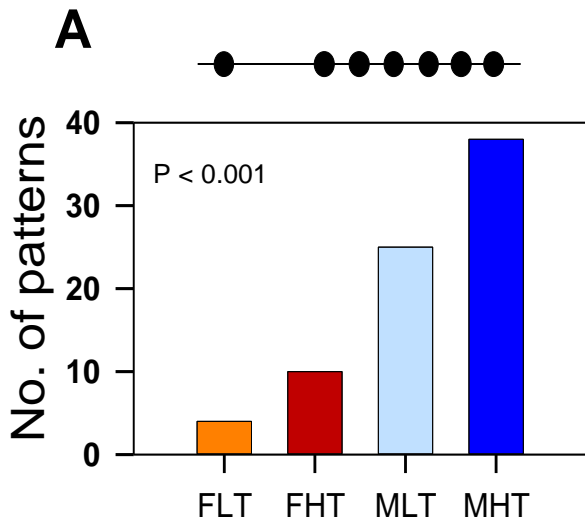


Figura 4

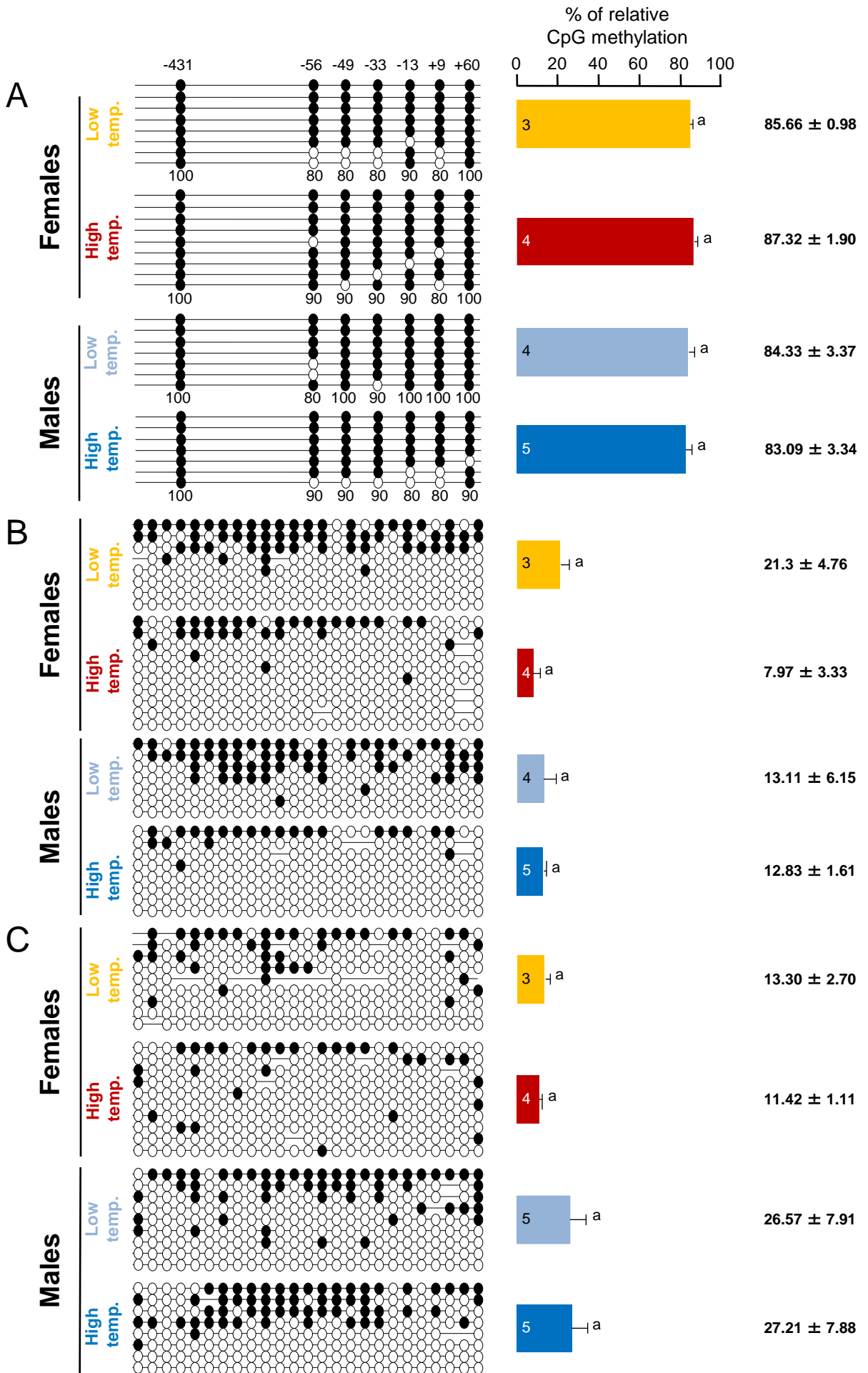


Figura 5

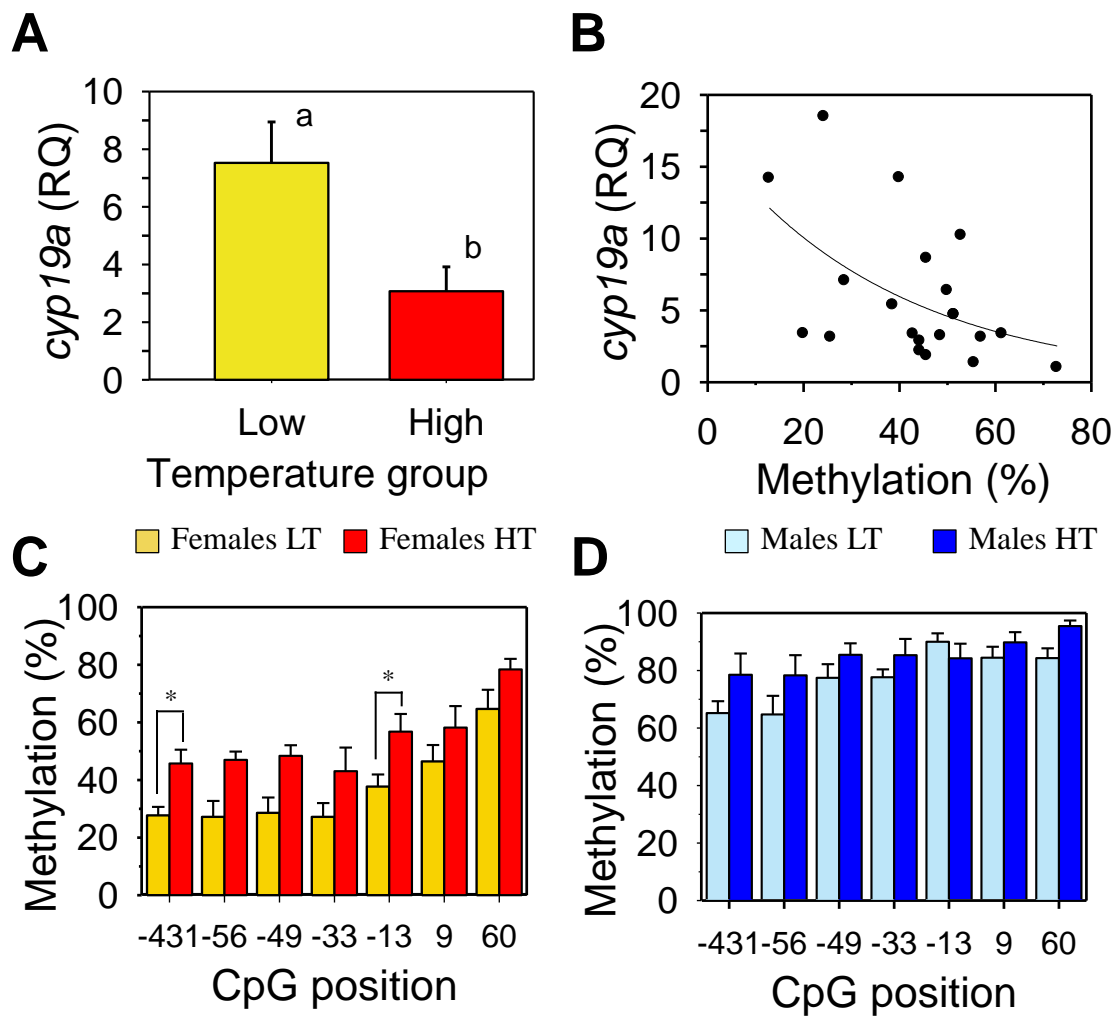


Figura 6

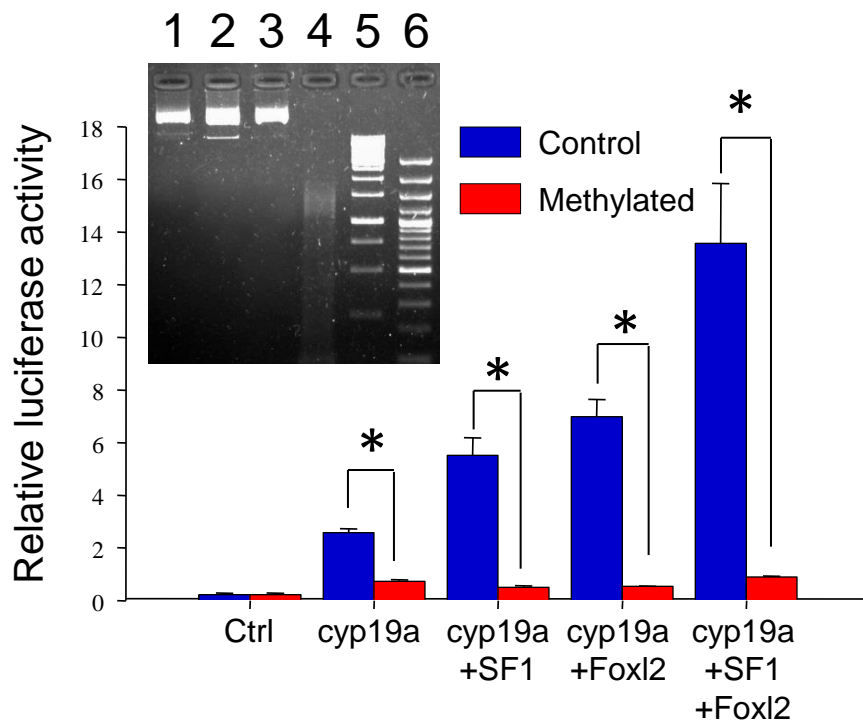


Figura 7

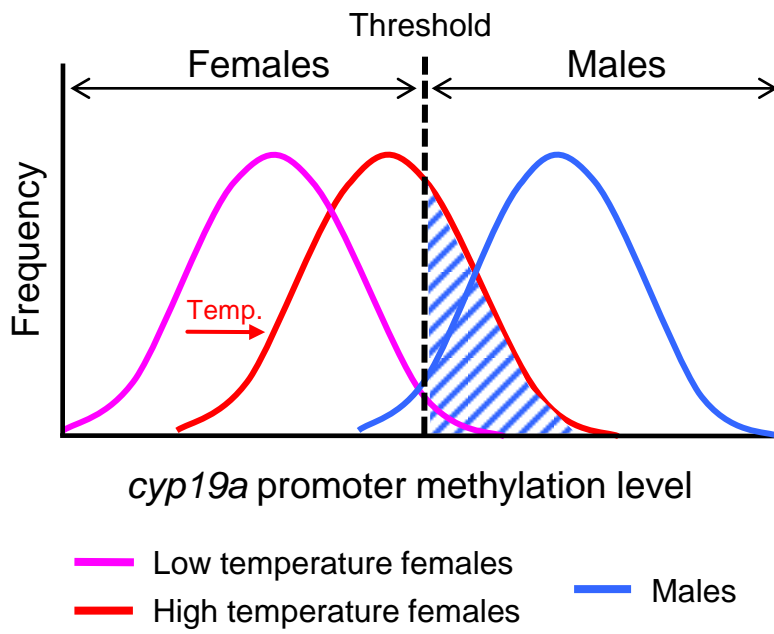


Figura 8