

A diferència dels mamífers, que tenim un únic gen màster (SRY) responsable del sexe d'un embrió, el destí del sexe de molts peixos es basa en un sistema en què l'ambient pot tenir un paper molt rellevant. El procés de determinació sexual en peixos pot incloure la influència de factors genètics (un o diversos gens) i factors ambientals, que interaccionen en el desenvolupament i la diferenciació d'una gònada perquè origini un ovari o un testicle. Malgrat els grans avenços que hi ha hagut al respecte, no es coneixen amb certesa com els factors ambientals generen canvis en el fenotip sexual. El descobriment de mecanismes (epi)genètics íntimament lligats al desenvolupament gonadal és de gran interès per a l'aqüicultura per entendre millor la reproducció de les espècies de cultiu.

El control del sexe és una de les àrees més importants de l'aqüicultura perquè la productivitat d'aquesta depèn d'un bon control del cicle vital de les espècies cultivades. Un dels principals problemes relacionats amb la reproducció és el dimorfisme sexual que presenten algunes espècies de peixos cultivats, com per exemple, el llobarro (*Dicentrarchus labrax*) o el turbot (*Scophthalmus maximus*), dues espècies d'alta producció a Europa. En el llobarro, les femelles creixen aproximadament un 30% més que els mascles, i en el turbot aquest augment pot arribar fins al 50%. Així doncs, l'aqüicultura està interessada a generar poblacions d'un sol sexe en què la majoria dels individus de la població pertanyin al sexe que presenta una mida més gran per tal d'augmentar la productivitat. No obstant això, i lluny d'aquest control, el problema en les piscifactories de tot el món esdevé quan es produeix una masculinització no desitjada degut al paper que juguen els factors ambientals en el desenvolupament gonadal dels peixos. Aquest és el cas del llobarro, en què un augment de la temperatura en estadis inicials del desenvolupament pot generar poblacions d'entre el 80-100% de mascles, amb la

qual cosa en disminueix significativament la producció. La influència de la temperatura sobre la diferenciació sexual dels peixos és el factor ambiental més ben estudiat; tot i així, altres factors, com la densitat o la hipòxia, són també factors influents en la determinació del sexe d'un peix.

Els últims anys han sigut fructífers en l'avançament del coneixement del procés de diferenciació sexual en el peix zebra (*Danio rerio*), un model àmpliament usat en molts camps de recerca, incloent la recerca en aqüicultura (Ribas & Piferrer, 2014). Malgrat haver estat emprat com a model de laboratori durant més de quaranta anys, sorprenentment, els mecanismes de determinació i diferenciació sexual d'aquest animal no són encara ben coneguts. Després d'anys d'estudis i controvèrsies, actualment se sap que el peix zebra salvatge té un sistema cromosòmic de determinació sexual (ZZ/ZW) amb una regió on es localitza el gen sexual, tot i que encara se'n desconeix la identitat (Wilson *et al.*, 2014). Aquesta regió, situada al telòmer del cromosoma 4, s'hauria perdut en les soques de laboratori, durant la seva domesticació, fruit d'anys de continuats creuaments aplicats en la recerca (Wilson *et al.*, 2014). Així doncs, el peix zebra domesticat presenta un sistema poligènec en què diversos gens poden estar sotmesos alhora a la influència de factors ambientals i seran els responsables de determinar el sexe d'un individu (Ospina & Piferrer, 2008). Estudis previs havien descrit l'efecte masculinitzant de la temperatura en el peix zebra domesticat, tot i que també s'hi havia descrit un efecte feminitzant. En el laboratori de Biologia de la Reproducció (GBR) de l'Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), s'ha corroborat que la temperatura masculinitza el peix zebra domesticat. Per primera vegada s'ha demostrat que hi ha una interacció genètica-ambiental on la sensibilitat a la temperatura és dependent de cada família (variació interfamiliar) (Ribas *et al.*, 2017a). Això vol dir que hi ha famílies molt sensibles a la temperatura i que es generen poblacions d'entre el 80-100% de mascles, mentre que en d'altres la masculinització no és tan severa. En analitzar-se els mecanismes moleculars adjacents a la resposta

tèrmica, s'ha identificat una nova forma de plasticitat sexual en peixos. S'ha observat unes femelles resistents a la temperatura (denominades pseudofemelles) que presenten uns ovaris amb un transcriptoma semblant al dels mascles. Els ovaris de les pseudofemelles mostren una alteració en el 65% dels gens on els mecanismes típics per a la diferenciació testicular estan activats. Tot i així, i malgrat l'alteració gènica, les gònades es desenvolupen fenotípicament com a ovaris. Aquest resultat trenca un dels dogmes clàssics en biologia, ja que s'hi descriu, per primera vegada, una discordança entre la forma (ovarís) i la seva funció (testicular) (Ribas *et al.*, 2017a).

Un dels altres factors capaços d'alterar la proporció de sexes en peixos és la densitat de cultiu, però els seus efectes s'han descrit només en unes poques espècies; en el peix paradís (*Macropodus opercularis*), on es troben més mascles a menys densitat, en l'anguila americana (*Anguilla rostrata*), on es descriu el contrari, o en el peix zebra, amb resultats no prou conclouents (Liew & Orban, 2014). Al GBR vam trobar que la densitat és un factor masculinitzant en el peix zebra domesticat (Figura 1; Ribas *et al.*, 2017b) i que, tal com passa amb la temperatura, la sensibilitat als efectes masculinitzants de la densitat varien segons la família (Ribas *et al.*, 2017c). Una situació d'estrès ocasionada per altes densitats pot tenir repercussions irreversibles en els peixos. Per tant, si l'estabulació dels peixos, tant a les granges de cultiu com al laboratori, no es fa de manera controlada pot alterar el benestar dels animals i ocasionar un augment del cortisol plasmàtic, l'indicador per excel·lència de l'estrès. El GBR també ha descrit el nombre de peixos zebra per tanc que s'han d'estabular durant el procés de diferenciació sexual per tal d'evitar les conseqüències de l'estrès ocasionat per l'alta densitat. Aquests animals, que eren més petits, no presenten cap augment significatiu del cortisol plasmàtic. Tot i així, en el mateix estudi s'ha demostrat que el cortisol hi té un paper rellevant, ja que després de la ingesta de dietes tractades amb cortisol sintètic resulten poblacions 100% masculines (Ribas *et al.*, 2017b). A més, també hem sigut capaços d'identificar l'altera-

ció en l'expressió gènica d'ovaris de femelles establades en altes densitats i comparar-les amb aquells ovaris de femelles establades a altes temperatures (Valdivieso *et al.*, 2019).

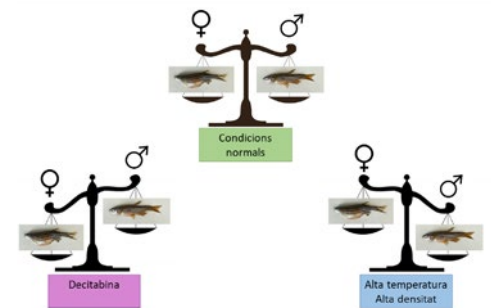
Finalment, però no menys important, el GBR ha descrit un model *in vivo* capaç de feminitzar les poblacions de peix zebra mitjançant un fàrmac que s'utilitza en els tractaments de càncer, la decitabina (5-aza-dC) (Ribas *et al.*, 2017d). Aquest fàrmac és un inhibidor de les DNA metiltransferases (DNMT), uns enzims molt importants en el procés de metilació del DNA. La metilació de l'ADN és una de les principals modificacions epigenètiques implicades en la regulació de l'expressió gènica. Es coneix que darrere del procés de masculinització ocasionat per increments de temperatura a l'inici del desenvolupament gonadal hi ha mecanismes de metilació del DNA capaços d'alterar la diferenciació gonadal (Navarro-Martin *et al.*, 2011; Piferrer *et al.*, 2019). Els ovaris de peixos zebres tractats amb decitabina durant el desenvolupament gonadal han mostrat una inhibició del transcriptoma ovàric allà on gens



implicats en mecanismes epigenètics i del desenvolupament ovàric es troben alterats (Ribas *et al.*, 2017d). La comprensió de la relació dels mecanismes moleculars amb la feminització ocasionada pel fàrmac és encara objecte d'estudi.

Recentment, hem descrit la presència d'un clar dimorfisme sexual entre ovaris i testicles en els nivells de metilació de gens relacionats en el sistema immunitari (Caballero-Huertas *et al.*, 2020) i actualment estem investigant la relació entre els sistemes immunitari i reproductiu i la seva influència en el desenvolupament gonadal.

◀ Figura 1. Peixos zebra domesticats establats a altes densitats durant el període de diferenciació sexual resultant una masculinització de la població.



† Figura 2. Influència dels factors ambientals sobre el destí del sexe de les gònades del peix zebra domesticat.

Bibliografia

- CABALLERO-HUERTAS, M. [et al.] (2020). «Immune genes, IL1 beta and Casp9, show sexual dimorphic methylation patterns in zebrafish gonads». *Fish Shellfish Immunol.*, 97, 648–655.
- LIEW, W. C.; ORBAN, L. (2014). «Zebrafish sex: a complicated affair». *Brief Funct Genomics*, 13(2): 172–187.
- NAVARRO-MARTIN, L. [et al.] (2011). «DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass». *PLoS Genet.*, 7.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. (2008). «Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change». *PLoS One*, 3(7): e2837.
- PIFERRER, F. [et al.] (2019). «The model of the conserved epigenetic regulation of sex». *Front. Genet.*, 10.
- RIBAS, L.; PIFERRER, F. (2014). «The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research». *Rev. Aquacult.*, 6(4): 209–240.
- RIBAS, L. [et al.] (2017a). «Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes». *PNAS*, 114(6): E941–E950.
- RIBAS, L. [et al.] (2017b). «Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response». *J. Exp. Biol.*, 220(6): 1056–1064.
- RIBAS, L. [et al.] (2017c). Response to «The importance of controlling genetic variation remarks on 'Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response'». *J. Exp. Biol.*, 220(21): 4079–4080.
- RIBAS, L. [et al.] (2017d). «Treatment with a DNA methyltransferase inhibitor feminizes zebrafish and induces long-term expression changes in the gonads». *Epigenet. Chromatin*, 10.
- VALDIVIESO, A. [et al.] (2019). «Ovarian transcriptomic signatures of zebrafish females resistant to different environmental perturbations». *J. Exp. Zool. Part B*, 332(3–4): 55–68.
- WILSON, C. [et al.] (2014). «Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains». *Genetics*, 198(3): 1291–1308.



Laia Ribas (Terrassa, 1979) va llicenciar-se en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) el 2001 i va obtenir el grau de doctor per la UAB el 2006. Va fer un postdoc a l'Imperial College of London (Regne Unit) i des del 2009 treballa a l'Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC) de Barcelona. Des del 2017 lidera els seus propis projectes i recentment se li ha atorgat una ajuda Ramón y Cajal i ha guanyat una plaça permanent d'Investigador Distingit. El seu camp de recerca es basa en l'estudi de les interaccions dels sistemes reproductiu i immune en peixos. El seu interès és estudiar els efectes dels factors ambientals sobre la relació fenotip-sexe centrant-se en les alteracions epigenètiques i, entre d'altres, utilitza metodologies òmiques com a eines d'anàlisi.