

140



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PATRON DE EXPRESION DEL GEN *Dmrt1* DURANTE EL  
DESARROLLO GONADAL DE LA TORTUGA MARINA  
*Lepidochelys olivacea*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ADALUCIA MEZA MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS



Facultad de Ciencias  
UNAM

MEXICO, D. F.



2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Patrón de expresión del gen *Dmrt1* durante el desarrollo gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*".

realizado por Meza Martínez Adalucía

con número de cuenta 9414116-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Horacio Merchant Larios

Propietario Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Propietario Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Suplente Dra. Concepción Sánchez Gómez

Suplente Dr. Víctor Manuel Valdés López

FACULTAD DE CIENCIAS  
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres Marcela y Gregorio  
por todo su apoyo.**

**A mis abuelos Emilia, Lucio,  
Josefina y Miguel.**

**A mi hermana Corina.**

**Para Alfredo por todo su amor, apoyo  
y comprensión en todos estos años  
y los que faltan.**

**A mis amigos de siempre Eva Aurora,  
Verónica, Selene, Ivonne, Lourdes,  
Juan Carlos, Esther y Jesús Alberto por  
su gran apoyo en los momentos difíciles.**

**A mis compañeros de laboratorio  
Dr. Horacio Merchant, José, Leda, Paula Sofía,  
Isabel Cristina, Alejandro, Norma, Elizabeth,  
Isabel, Valeria y Guillermina.**

**A mi bebecito especial por toda la  
ayuda recibida.**

**A Murphy, Bambi, Chispita, Dorfy,  
Frida y Sofía.**

**Para la Sra. Cirila Sánchez Araiza y Daniel Rangel con mucho cariño donde  
quiera que estén.**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Merchant por su asesoramiento y facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Norma Moreno Mendoza por su apoyo en la microdissección.

Al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por su apoyo en la colecta, manejo de nidios y microdissección de material biológico.

Al Sr. José Guadalupe Baltazar por su apoyo y asesoramiento técnico.

A la Dra. Leda Torres por su apoyo en las técnicas de biología molecular y en la secuenciación.

Al Dr. Abraham Landa por su apoyo en la secuenciación manual.

A la M. en IBB Patricia de la Torre por su apoyo en la secuenciación automática.

Al Dr. Martín García por su apoyo en el análisis de identidad de la secuencia

A Miguel Tapia por su apoyo en las técnicas de biología molecular.

Al Dr. Horacio Merchant, Norma Moreno, Leda Torres, Concepción Sánchez y Víctor Valdés por aceptar formar parte del jurado y por sus comentarios al presente trabajo

Agradezco al Centro Mexicano de la Tortuga, en especial al Biólogo Javier Vasconcelos Pérez (Director) por su apoyo y facilidades para la colecta del material biológico.

## ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Las tortugas marinas en México	3
2.2	La tortuga marina <i>Lepidochelys olivacea</i>	4
2.2.1	Distribución geográfica	4
2.2.2	Reproducción	5
2.2.3	Situación poblacional	5
III.	ANTECEDENTES	6
3.1	Determinación genética del sexo	6
3.1.1	Mamíferos	6
3.1.2	Aves	9
3.1.3	Reptiles	10
3.2	Determinación del sexo por temperatura (DST)	11
3.3	Periodo sensible a la temperatura	12
3.4	Efecto de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal	14
3.5	Participación de la aromatasas P450 en la DST	15
3.6	Efectos debidos a la administración de andrógenos	16
3.7	Papel del sistema nervioso en la DST	17
3.8	Genes que participan en la determinación y/o diferenciación sexual en reptiles	18
3.9	<i>Dmrt1</i> (Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1)	20
3.9.1.	<i>Dmrt1</i> en el humano	22
3.9.2	<i>Dmrt1</i> en el ratón	23
3.9.3	<i>Dmrt1</i> en el pollo	25
3.9.4	<i>Dmrt1</i> en reptiles	25
3.9.5	<i>Dmrt1</i> en peces	26
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
V.	HIPÓTESIS	28
VI.	OBJETIVOS	29
6.1	Objetivo general	29
6.2	Objetivos particulares	29
VII.	METODOLOGÍA	30
7.1	Colecta y manejo del material biológico	30
7.2	Muestreo	31
7.3	Oligonucleótidos para <i>Dmrt1</i> , <i>Sox9</i> y $\beta$ -actina	31
7.4	Extracción de RNA total	32

7.5	RT-PCR (Transcripción Inversa–Reacción en Cadena de la Polimerasa)	33
7.6	Electroforésis	34
7.7	Densitometría	35
7.8	Secuenciación	36
VIII.	RESULTADOS	38
8.1	Secuenciación	38
8.2	RT-PCR (Transcripción Inversa–Reacción en Cadena de la Polimerasa)	40
8.2.1	Expresión de <i>Dmrt1</i> a temperatura masculinizante	41
8.2.2	Expresión de <i>Dmrt1</i> a temperatura feminizante	41
8.2.3	Expresión de <i>Sox9</i> a temperatura masculinizante	42
8.2.4	Expresión de <i>Sox9</i> a temperatura feminizante	42
8.3	Densitometría: patrón de expresión de <i>Dmrt1</i> y comparación con el patrón de expresión de <i>Sox9</i>	42
8.3.1	<i>Dmrt1</i>	43
8.3.2	<i>Dmrt1</i> y <i>Sox9</i>	43
IX.	DISCUSIÓN	48
X.	CONCLUSIÓN	56
XI.	BIBLIOGRAFÍA	57
XII.	ANEXO 1	64
	Alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteína DMRT1	64
XIII.	ANEXO 2.	66
	Artículo	66

**ABREVIATURAS**

<b>AchE.</b>	Acetilcolinesterasa
<b>CG.</b>	Células germinales
<b>CITES.</b>	Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de flora y fauna silvestre.
<b>Dax1.</b>	Región crítica DSS-AHC en el cromosoma X
<b>DEPC.</b>	Dietilpirocarbonatos
<b>Dmrt1.</b>	Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1
<b>DMSO.</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>Dpc.</b>	Días post-coitum
<b>DST.</b>	Determinación del sexo dependiente de temperatura
<b>Dsx.</b>	Doublesex
<b>Mab-3.</b>	Male-Abnormal 3
<b>MEGA.</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>dpp.</b>	Días post partum
<b>PD.</b>	Periodo determinado
<b>PI.</b>	Periodo indeterminado
<b>PST.</b>	Periodo sensible a la temperatura
<b>RIA.</b>	Radioinmunoanálisis
<b>RNA.</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensajero
<b>RT-PCR.</b>	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa
<b>SEMARNAP</b>	Secretaría de medio ambiente recursos naturales y pesca
<b>SEMARNAT</b>	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales.
<b>Sf1.</b>	Factor esteroideogénico 1
<b>SNC.</b>	Sistema nervioso central
<b>Sox9.</b>	SRY-like HMG-box gene 9
<b>TBE.</b>	Tris borato EDTA
<b>TF.</b>	Temperatura feminizante
<b>TM.</b>	Temperatura masculinizante
<b>UICN.</b>	Unión internacional para la conservación de la naturaleza
<b>Wt1.</b>	Gen del tumor de Wilms 1

## I. RESUMEN

Aunque en la mayoría de los vertebrados la determinación sexual depende de un control genético; se sabe que en algunas especies, factores epigenéticos como la temperatura intervienen de manera decisiva en la determinación y diferenciación sexual.

Sin embargo, los mecanismos fisiológicos y moleculares relacionados con la determinación sexual por temperatura (DST) aún se desconocen. En estudios previos se ha establecido que algunos genes relacionados con la determinación sexual en mamíferos, se encuentran altamente conservados durante la evolución de los vertebrados.

El gen *Dmrt1* (double sex and Mab-3 related transcription factor 1) es uno de los genes que participan en los procesos de determinación sexual y/o diferenciación sexual. Su nombre proviene de dos genes descritos, uno en *Drosophila melanogaster* y otro en *Caenorhabditis elegans*, ambos presentan un dominio de unión al DNA, llamado dominio DM.

El patrón de expresión de *Dmrt1* ha sido estudiado en humano, ratón, pollo, trucha, cocodrilo y en una especie de tortuga dulceacuícola. En todas estas especies el patrón de expresión observado apoya la idea de que este gen actúa como un regulador sexual de la determinación y diferenciación masculina. Además, es importante señalar que *Dmrt1* está conservado en la escala filogenética, ya que se ha detectado tanto en organismos con determinación sexual genética como ambiental.

Con base en esto, en el presente trabajo nos propusimos analizar la expresión del gen *Dmrt1* durante los periodos de determinación y diferenciación

sexual mediados por la temperatura, utilizando como modelo a la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Se compararon dos grupos de individuos incubados a diferente temperatura: 33°C (Temperatura feminizante, TF) y 26°C (Temperatura masculinizante, TM), en diferentes etapas del desarrollo embrionario (etapa 23–eclosión).

A partir del análisis por RT-PCR, se observó que a TM el gen *Dmrt1* está presente en todas las etapas estudiadas. Sin embargo, a TF la cantidad de transcritos de *Dmrt1* disminuye.

Comparando el patrón de expresión del gen *Dmrt1* y el gen *Sox9*; se observa que los niveles de *Dmrt1* son más altos a TM que a TF en todas las etapas estudiadas. En contraste, los niveles detectados de *Sox9* son similares en ambas temperaturas en las primeras etapas de desarrollo. Al inicio de la diferenciación gonadal *Sox9* es regulado negativamente en los embriones incubados a TF y persiste a TM.

Estos resultados sugieren que *Dmrt1* y *Sox9* pueden estar jugando un papel importante en la determinación sexual por temperatura.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1. *Las tortugas marinas en México*

Las tortugas marinas son más comunes en aguas poco profundas, encontrándose a lo largo de las costas y alrededor de las islas; pero algunas especies, cuya característica de migración es muy marcada, pueden ser encontradas en mar abierto, solitarias o formando grupos hasta de varios miles de individuos.

A las costas mexicanas llegan 7 de las 8 especies de tortugas marinas existentes en el mundo (Pritchard y Mortimer, 1999). En México existen poblaciones anidadoras de primera importancia e incluso únicas en el mundo, como es el caso de *Lepidochelys kempii* (Márquez, 1976). Las tortugas marinas son especies de ambientes tropicales y subtropicales, su presencia es estacional y en nuestro país las zonas de mayor abundancia se circunscriben principalmente a la parte central costera del Pacífico: de Chiapas a Sinaloa, el golfo de California y costa suroeste de Baja California y en las lagunas costeras del istmo de Tehuantepec (Ramírez, 1995). Por el lado oriental frecuentan la costa central de Tamaulipas, el norte de Veracruz, la zona de Campeche, Yucatán y las costas de Quintana Roo. La distribución tanto de las crías como de los individuos juveniles es poco conocida en la mayoría de los casos.

Las tortugas marinas se agrupan en dos familias: Cheloniidae y Dermochelyidae, con seis géneros y ocho especies. (Tabla 1) (Pritchard y Mortimer, 1999).

Tabla 1

Clasificación de las tortugas	Nombre común
Clase: Reptilia Orden: Testudines Familia Dermochelyidae <i>Dermochelys coriacea</i>	Tortuga laúd
Familia Cheloniidae <i>Chelonia mydas</i> <i>Chelonia mydas/C. agassizii</i> <sup>1</sup> <i>Chelonia mydas agassizii</i> <i>Natator depressus</i> <i>Eretmochelys imbricata</i> <i>Caretta caretta</i> <i>Lepidochelys kempii</i> <i>Lepidochelys olivacea</i>	Tortuga verde  Tortuga prieta Tortuga aplanada Tortuga carey Caguama Tortuga lora Tortuga golfina

<sup>1</sup> Hay argumentos válidos en contra o a favor de la designación de la tortuga prieta como una especie dentro del género *Chelonia*; llamada *Chelonia agassizii*. Pritchard y Mortimer (1999) apoyan el concepto de considerarla como una especie ya que reúne el criterio tradicional de grado de divergencia morfológica y existencia probable de mecanismos de aislamiento reproductivo, aunque los genetistas no están de acuerdo.

El género *Lepidochelys* incluye dos especies; *Lepidochelys olivacea*, que tiene una amplia distribución en todo el Pacífico tropical, excepto en la región de Oceanía y *Lepidochelys kempii*, típica del océano Atlántico nororiental.

## 2.2. La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*

### 2.2.1. Distribución geográfica

*Lepidochelys olivacea*, cuyo nombre común en México es tortuga golfina, es la especie de tortuga más abundante en nuestro país. En el Pacífico oriental se observa desde el norte de California hasta Chile, con áreas de mayor concentración en México (Oaxaca, Michoacán, Guerrero y sur de Sinaloa), Centroamérica y más al sur entre Panamá y Colombia (Ramírez, 1995; Márquez, 1996).

### **2.2.2. Reproducción**

Las playas de anidación se localizan a lo largo de la costa del Pacífico; aunque las más importantes se ubican en México y Costa Rica. Actualmente en México las playas de anidación más importantes son las de La Escobilla, Morro Ayutla y Chacahua en Oaxaca y la playa de Tierra Colorada en Guerrero. Existen otras playas que se distribuyen desde Nayarit hasta Chiapas, las cuales registran menor cantidad de anidaciones (Ramírez, 1995).

En la playa La Escobilla, la temporada de anidación es de junio a septiembre, aunque se han observado anidaciones esporádicas en el resto de los meses del año. El anidamiento generalmente ocurre en agregaciones llamadas arribadas. Estas arribadas se llevan a cabo en las noches con vientos fuertes y lluvias. El número de huevos en cada nidada varía entre 80 a 100, cuyo diámetro promedio es de 3.2 a 4.8 cm. (Márquez, 1996; Ramírez, 1995).

### **2.2.3. Situación poblacional de *L. olivacea***

La tortuga marina *L. olivacea* tiene la característica de arribar masivamente a las playas del Pacífico mexicano en su época de reproducción, lo que las ha hecho susceptibles y el número ha disminuido debido a la exagerada explotación de su carne, piel y huevos, por lo que se considera en peligro de extinción. Sin embargo, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) no califica a esta especie en ningún estatus de riesgo (Baillie y Groombridge, 1996).

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES) la coloca en el Apéndice 1 que incluye a todas las especies en peligro de extinción que son o pueden ser afectadas por el comercio. La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) la define como en peligro de extinción, aunque la población de *L. olivacea* en la playa La Escobilla se considera como amenazada, pero no en peligro de extinción.

### **III. ANTECEDENTES**

En los vertebrados, la adquisición de un fenotipo masculino o femenino de la gónada involucra dos procesos: 1) la determinación del sexo que se establece en etapas tempranas del desarrollo embrionario y 2) la diferenciación sexual, en la cual una cascada programada de eventos genéticos y hormonales lleva a la gónada indiferenciada a transformarse en un testículo o en un ovario dependiendo del sexo genético del embrión.

#### **3.1. Determinación genética del sexo**

##### **3.1.1. Mamíferos**

La determinación genética o cromosómica del sexo gonadal depende de la presencia de un gen o genes en uno de los cromosomas sexuales heteromórficos (X y Y). La señal primaria para la diferenciación testicular de la gónada indiferenciada (cresta urogenital), es la presencia del gen *Sry* (*Sry* en ratón y *SRY* en humano), localizado en el brazo corto del cromosoma Y. La expresión de éste gen está confinada a las células precursoras de Sertoli presentes en la cresta

urogenital. En ausencia de *Sry* la gónada indiferenciada se desarrolla como un ovario (Koopman *et al.*, 1990).

A partir del descubrimiento del gen *Sry* como factor determinante de la diferenciación testicular, se ha descrito otra serie de genes relacionados con la determinación y diferenciación sexual. Entre ellos están:

### ***Sf1* (factor esteroideogénico 1)**

Pertenece a la subfamilia de receptores nucleares, los receptores huérfanos que regulan la actividad de las hormonas esteroides. También regula la expresión de otros genes gonadales y adrenales. Se expresa en embriones de ratón de ambos sexos, desde que el mesodermo intermedio se condensa y forma la cresta urogenital. Al comienzo de la diferenciación, los niveles de *Sf1* aumentan en las células de Leydig y en las células de Sertoli, mientras que en los ovarios disminuye. Este gen es necesario para el establecimiento, la diferenciación y/o mantenimiento y proliferación de las células somáticas de la gónada indiferenciada. En estos estudios realizados con ratones que carecen de *Sf1*, no se detectó desarrollo de glándulas adrenales y gónadas debido a que se presentó muerte celular programada. Estos animales también tuvieron reversión sexual de los tractos urogenitales externos e internos. Por su expresión temprana en el desarrollo gonadal y su papel como factor de transcripción, es probable que *Sf1* sea parte de los genes que actúan al inicio de la vía de determinación del sexo (Revisado en Ramkissoon y Goodfellow, 1996; Parker *et al.*, 1999a; Parker *et al.*, 1999b; Swain y Lovell-Bage, 1999 y Vaiman y Pailheux, 2000).

***Wt1* (gen del tumor de Wilms 1)**

Actúa como un factor de transcripción, se expresa muy temprano en los riñones y la cresta urogenital del ratón en ambos sexos; más tarde en el desarrollo se restringe a las células de Sertoli y de la granulosa. En ausencia de *Wt1*, los individuos carecen de riñones y gónadas, tienen poco desarrollo tanto de la glándula adrenal como de los genitales internos y externos. Su expresión temprana en el desarrollo lo implica en el establecimiento de la gónada bipotencial y apoya su papel como regulador de genes esenciales en la gonadogénesis en ambos sexos (Revisado en Ramkissoon y Goodfellow, 1996; Parker *et al.*, 1999a; Parker *et al.*, 1999b; Swain y Lovell-Bage, 1999 y Vaiman y Pailheux, 2000).

***Dax1* (región crítica DSS-AHC en el cromosoma X)**

En el ratón *Dax1* se expresa desde los 11.5 días post coitum (dpc), en las células somáticas de la cresta urogenital, tanto en machos como en hembras. A los 12.5 dpc disminuye su expresión en los cordones testiculares y continua expresándose en las células de la teca del ovario. Estos datos sugieren que *Dax1* es necesario para la diferenciación ovárica pero no para la diferenciación testicular (Swain *et al.*, 1996). La correlación entre el patrón de expresión de *Sry* y *Dax1* sugiere que éste último puede antagonizar la acción de *Sry*, pues al aumentar su expresión dirige el desarrollo ovárico actuando como un gen antitestículo (Swain *et al.*, 1998).

### **Sox9 (SRY-like HMG-box gene 9)**

Sox9 es un gen relacionado al *Sry*. Pertenece a la familia de factores de transcripción de unión al DNA SOX (*SRY-like HMG-box gene*). Su proteína contiene una región muy conservada denominada caja HMG (High Mobility Group).

En el ratón, Sox9 se detecta muy temprano en el desarrollo (10.5 dpc) en la cresta urogenital en ambos sexos. A los 11.5 dpc este gen es regulado negativamente en la gónada de las hembras, mientras que en los machos mantiene su expresión. Entre los 12.5-13.5 dpc la expresión de Sox9 se localiza en las células de Sertoli dentro de los cordones seminíferos. En la etapa postnatal Sox9 continúa expresándose en las células de Sertoli así como en la edad adulta (Morais da Silva *et al.*, 1999 y Kent *et al.*, 1996).

Estas observaciones sugieren que existe una correlación entre la expresión de Sox9 y la determinación y/o diferenciación sexual de los mamíferos.

### **3.1.2. Aves**

Las aves también presentan determinación genética del sexo gonadal. La hembra es heterogamética (ZW) y el macho homogamético (ZZ), a diferencia de los mamíferos en los que las hembras son homogaméticas (XX) y los machos heterogaméticos (XY). Se han planteado dos modelos para explicar como se determina el sexo en las aves: el primero argumenta la existencia de un gen inductor del ovario en el cromosoma W, específico de la hembra. El segundo modelo asume un mecanismo dependiente de dosis, donde un factor autosómico

interactúa con una sola dosis (ZW) o una doble dosis (ZZ) de un producto génico ligado al cromosoma Z (Revisado por Ellegren, 2001).

También se ha estudiado la expresión de algunos genes en el pollo, entre ellos están: **Sf1**, que se expresa antes y durante la diferenciación gonadal en las gónadas de ambos sexos, pero la expresión aumenta en los ovarios después del inicio de la diferenciación; **Dax1**, también se expresa durante la diferenciación en las gónadas de ambos sexos pero parece mostrar un nivel mayor de expresión en las hembras que en los machos; **Wt1**, se expresa antes y durante la diferenciación, en niveles similares en las gónadas de ambos sexos; **Sox9**, muestra una expresión específica en el macho y aumenta al momento de la diferenciación de las células de Sertoli en el testículo (Smith *et al.*, 1999a).

### 3.1.3. Reptiles

Los reptiles exhiben diferentes mecanismos de determinación del sexo. En los grupos con determinación genética existen dos modelos. En las serpientes sólo está presente el mecanismo ZZ/ZW mientras que en lagartijas y tortugas existen ambos mecanismos XX/XY y ZZ/ZW. Se han encontrado cromosomas sexuales heteromórficos en algunas tortugas y muchos miembros de la familia colubridae y viperidae (ZZ en el macho y ZW en la hembra) y homomórficos en la familia boidae, sin embargo en estas familias no se han estudiado los genes involucrados en la diferenciación y/o determinación de la gónada anteriormente mencionados.

Además, como se mencionó anteriormente en algunos grupos de reptiles la diferenciación sexual de las gónadas es dependiente de la temperatura de

incubación de los huevos. Este tipo de determinación del sexo es muy estudiado en reptiles ovíparos (Bull, 1980).

### **3.2. Determinación del sexo por temperatura**

La determinación del sexo por temperatura (DST) es un caso especial de determinación del sexo ambiental. La presentan cocodrilos, una gran variedad de tortugas y algunas especies de lagartijas. Los estudios llevados a cabo en el laboratorio han mostrado que la temperatura de incubación afecta la proporción del sexo de las crías. En la mayoría de las tortugas, las temperaturas bajas de incubación (22-27°C) producen machos y las temperaturas altas (31°C en adelante) producen hembras, la temperatura intermedia (temperatura pivote) produce ambos sexos (Bull, 1980). Cabe resaltar que en las especies con DST, cada individuo tiene igual potencial de ser macho o hembra y la temperatura de incubación actúa como la señal inicial de la cascada que lleva al desarrollo de testículos o de ovarios (Crews *et al.*, 1994).

Las tortugas marinas que presentan DST son *Chelonia mydas*, en la que la temperatura de incubación de 26°C produce machos y 33°C produce hembras (Miller y Limpus, 1980). En *Caretta caretta*, la temperatura feminizante es de 32°C o más y la temperatura masculinizante de 28°C o menos (Yntema y Mrosovsky, 1982). En *Eretmochelys imbricata* (Dalrymple *et al.*, 1985) y *Dermochelys coriacea* los huevos incubados a 28.75°C se desarrollan como machos y los incubados a 29.75°C como hembras (Rimblot *et al.*, 1985). Respecto a la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, Morreale y colaboradores (1982) establecieron que la temperatura de incubación afecta la determinación del sexo de los embriones. Establecieron que embriones mantenidos a temperaturas por debajo de los 27°C

producen machos y los incubados a temperaturas por arriba de los 30°C producen hembras.

### **3.3. Periodo sensible a la temperatura**

La temperatura de incubación no sólo influye sobre el sexo de los embriones; se ha observado que también afecta el desarrollo del embrión. Embriones incubados a temperatura por arriba de los 30°C se desarrollan más rápido que los embriones incubados a temperaturas menores. Por consiguiente, para conocer la etapa del desarrollo en el que sucede algún evento durante la embriogénesis de la gónada, es necesario considerar dos parámetros: el tiempo de incubación y la morfología del embrión. En el caso de la tortuga marina *L. olivacea*, a temperatura feminizante (33°C) los embriones se desarrollan más rápido que los incubados a temperatura masculinizante (26°C). De manera que embriones experimentalmente incubados en el mismo nido al mantenerse a una temperatura feminizante (TF) o masculinizante (TM), estarán en diferentes etapas del desarrollo a pesar de haberse iniciado al mismo tiempo la incubación. Por lo que el establecimiento del periodo sensible a la temperatura (PST) se hizo con base en estos dos parámetros: tiempo (días de incubación) y la etapa de desarrollo (aspecto morfológico).

Para establecer el PST así como el periodo indeterminado (PI) y el periodo determinado (PD), se realizaron estudios en los que se intercambiaron embriones de una a otra temperatura para determinar las etapas y días de desarrollo en que responden al cambio (Bull y Vogt 1981 y Yntema y Mrosovsky, 1982).

Ampliando estos estudios, Merchant-Larios y colaboradores (1997) demostraron en la tortuga *L. olivacea* que aunque los embriones incubados a TM

se desarrollan más lento, dejan de responder al intercambio en etapas mas tempranas del desarrollo que los embriones incubados a TF. De esta manera se estableció que los embriones incubados a TM se determinan sexualmente entre las etapas 23-24 (27-37 días) mientras que los embriones incubados a TF, se determinan entre las etapas 24-25 (19-25 días). Se observó que en la TM el periodo indeterminado (PI) se ubica en las etapas 21-22, el periodo sensible a la temperatura (PST) entre las etapas 23-24 y el periodo determinado (PD) de la etapa 25 en adelante. En la TF el PI abarca las etapas 21-24, el PST se estableció en las etapas 24-25 y el PD de la etapa 25 en adelante (Torres-Maldonado *et al.*, 2001a). En la tabla 2 se muestra la comparación del desarrollo entre los embriones incubados a TM y a TF.

**Tabla 2. Comparación de las etapas de desarrollo**

<b>Etapas de desarrollo</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>Cría</b>
<b>Días de incubación 26°C</b>	19	24	27	34	41	49	56	68	75
<b>Días de incubación 33°C</b>	12	15	17	19	25	30	35	41	46

Por otro lado, la diferenciación histológica de la gónada (diferenciación hacia ovario o testículo) se observa a partir de la etapa 25-26, independientemente de la temperatura y los días de incubación. Este hecho sugiere que la determinación y la diferenciación sexual son eventos que se establecen en etapas tempranas del desarrollo como mecanismos irreversibles. Es decir, algún factor o factores que determinan el sexo del embrión actúan tempranamente en el

desarrollo para dirigir los eventos posteriores que llevan a la diferenciación sexual gonadal.

### **3.4. Efectos de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal**

Los primeros estudios fisiológicos sobre la determinación y/o diferenciación sexual dependiente de la temperatura sugirieron la posible participación de las hormonas esteroides en la morfogénesis gonadal.

En huevos de *Alligator mississippiensis* incubados a TM, la administración exógena de estradiol provocó feminización en los embriones, aunque, el esteroide además provocó una mortalidad de entre el 6 y 60% (Bull *et al.*, 1988).

Wibbels y colaboradores (1991) al aplicar estradiol a embriones de *T. scripta* incubados a temperatura pivote (28.02°C) observaron un aumento en la proporción de hembras esperadas en comparación con el efecto provocado por el estradiol o la temperatura.

En estudios realizados en nuestro laboratorio, en *L. olivacea*, se observó que la administración de estradiol también feminiza a los embriones incubados a TM (Merchant-Larios *et al.*, 1997). La respuesta a dicha hormona se presenta entre las etapas 24 y 25 de desarrollo, periodo posterior al PST. Una vez que se inicia la diferenciación morfológica de la gónada (etapa 26) los embriones dejan de responder al estradiol.

Con base en los resultados anteriores se sugirió que las hormonas esteroides pudieran tener un papel en la diferenciación sexual de la gónada de los reptiles con DST durante el periodo sensible a la temperatura (PST) cuando hay

sensibilidad a la hormona para inducir feminización. También se sugirió que la temperatura de incubación y el estradiol pudieran actuar en una vía común para inducir la feminización mediada por receptores específicos de estrógenos (Gutzke y Chymiy, 1988; Crews *et al.*, 1989; Wibbels *et al.*, 1991 y Wibbels y Crews 1992).

Por otra parte, Gahr y colaboradores (1992), encontraron que el estradiol radiactivo se incorpora en gran número de células del mesonefros y de la glándula intrarenal, y no encontraron marca en ninguna célula de la gónada, sugiriendo que la acción del estradiol en la determinación sexual de la gónada puede ser indirecta.

### **3.5. Participación de la aromatasa P450 en la DST**

Dorizzi y colaboradores (1991) evaluaron los niveles de estrógeno por RIA (radioinmunoanálisis) en embriones de *Emys orbicularis*. Encontraron que los niveles de estrógenos son mayores a 30°C (TF) que a 25°C (TM) lo que sugiere una acción directa o indirecta de la temperatura sobre la actividad o la síntesis de la aromatasa P450.

En *C. serpentina* al usar un inhibidor de la aromatasa, aumentó la frecuencia de machos producidos a TF y no se encontró ningún efecto a TM (Rhen y Lang, 1994).

Estos resultados sugieren un papel de la aromatasa P450 en la diferenciación sexual de las gónadas, por medio de la regulación de la expresión del gen de la enzima por algún factor termosensible (posiblemente un gen) involucrándola en la cascada de determinación del sexo en reptiles. De esta manera, se podría sugerir que los estrógenos producidos a TF regulan genes de

dicha cascada, evitando la expresión de un gen determinante del testículo mientras que a TM la baja o nula concentración de estrógenos permitiría la acumulación del producto de dicho gen determinante (Desvages *et al.*, 1993; Rhen y Lang, 1994 y Merchant-Larios *et al.*, 1997).

Por otro lado, en *L. olivacea* la expresión del gen de la aromatasa P-450 muestra niveles de expresión semejantes en las gónadas y en el cerebro anterior y posterior en todas las etapas analizadas en ambas temperaturas de incubación, indicando que la temperatura de incubación no tiene efecto sobre la expresión de P-450 ni en las gónadas ni en el SNC (Torres Maldonado 2001b).

### **3.6. Efectos debidos a la administración de andrógenos**

En *T. scripta* y *A. mississippiensis*, después de un tratamiento con  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (derivado de la testosterona no aromatizable), no se observaron efectos en la diferenciación gonadal a TM o TF (Wibbels y Crews, 1992; Lance y Bogart, 1994). En *T. scripta*, inhibidores de la  $5\alpha$ -reductasa enzima que convierte la testosterona en  $5\alpha$ -DHT, no interfirieron en la diferenciación testicular a TM (Crews y Bergeron, 1994). Estos resultados le restan importancia a los andrógenos en la diferenciación gonadal comparada con los estrógenos.

Por otro lado se han formulado propuestas en las que se vincula al sistema nervioso, es decir, que la temperatura ejerce su influencia en él y éste a su vez en la gónada, dirigiéndola por el camino hacia ovario o testículo.

### **3.7. Papel del sistema nervioso en la DST**

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, Merchant-Larios y colaboradores (1989) por medio de un estudio ultraestructural, detectaron la presencia de terminales nerviosas en etapas tempranas de la diferenciación ovárica. Con base en estas observaciones, se planteó la hipótesis de que el cerebro y la inervación derivada de éste podrían estar jugando un papel importante en la modulación de los procesos de determinación sexual por temperatura.

En los años posteriores continuaron los trabajos enfocados a probar la participación del sistema nervioso en la DST. Merchant-Larios y colaboradores (1990) al cultivar gónadas aisladas tanto a TF como a TM encontraron que éstas no responden al cambio de temperatura. Sin embargo, al evaluar las concentraciones y biotransformación de esteroides por RIA en el cerebro durante el PI, PST y PD se encontró una mayor producción de estradiol en las regiones del diencefalo/mesencefalo (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

Por otro lado, en los estudios realizados por Gutiérrez-Ospina y colaboradores (1999) usando inmunohistoquímica se detectó la enzima acetilcolinesterasa (AChE) para identificar las fibras nerviosas y se encontró que en las hembras al inicio de la diferenciación sexual (etapas 26 a 27), existe una inervación positiva a la actividad de la enzima, mientras que en machos la inervación no fue positiva a la actividad de dicha enzima. Estos resultados también apoyan la idea de que el sistema nervioso podría modular la influencia de la temperatura en la determinación del sexo. Además, la región del cerebro que podría estar sensando la temperatura es el diencefalo/mesencefalo; la presencia de fibras nerviosas puede ser más importante para la diferenciación ovárica.

Por otro lado, Moreno-Mendoza y colaboradores (2001) demostraron que en gónadas de *L. olivacea*, aisladas en las primeras etapas del desarrollo y mantenidas en cultivo de órganos responden a la temperatura de incubación llevando a cabo su diferenciación morfológica. Estos resultados restaron importancia a la participación del sistema nervioso central (SNC) en la determinación sexual. En estos mismos estudios se analizó la expresión del gen *Sox9*. Se observó que dicho gen es regulado negativamente en las gónadas incubadas a TF y mantiene su expresión en gónadas incubadas a TM. El patrón de *Sox9* observado *in vitro* coincide con lo que sucede *in vivo*. Se sugiere que las células gonadales tienen una vía termosensible que regula a *Sox9*.

### **3.8. Genes autosómicos que participan en la determinación y/o diferenciación sexual en reptiles.**

**Wt1.** Spotila y colaboradores (1998) encontraron expresión similar de *Wt1* en complejos urogenitales de la tortuga *T. scripta* durante el PST (etapas 12 a 20) en ambas temperaturas.

En el cocodrilo *Alligator mississippiensis* parece no haber diferencias en el patrón de expresión de *Wt1* en las gónadas de los embriones incubados tanto a TM como a TF, observando niveles similares de las etapas 20-27 (Western *et al.*, 2000). Por su patrón de expresión, se sugiere que *Wt1* es necesario para el desarrollo gonadal y metanéfrico.

**Sf1.** En *T. scripta* se observa expresión de *Sf1* en la gónada indiferenciada (etapas 15 a 17) a TM y TF. Cuando se inicia la diferenciación de la gónada (etapa 18) se observa un aumento en la expresión de *Sf1* en los testículos y disminuye en el ovario. En la etapa 19, se hace más notoria la diferencia de expresión entre las

dos temperaturas de incubación, siendo mayor a TM. En la etapa 23, después del PST, la expresión es casi nula a TF y permanece a TM (Fleming *et al.*, 1999).

En *A. mississippiensis* también se expresa en ambos sexos pero en un nivel más bajo en los machos comparado con las hembras. Estos resultados sugieren que *Sf1* regula las enzimas involucradas en la producción de estrógenos en el ovario y previene la estimulación de producción de estrógenos en el testículo (Western *et al.*, 2000).

**Dax1.** En el cocodrilo *Dax1* se expresa durante el desarrollo del testículo y ovario sin diferencias observables en el patrón de expresión (Western *et al.*, 2000).

En la tortuga marina *L. olivacea*, *Dax1* se expresa de manera similar en las etapas 23 a 26 a TM y TF. En la etapa 27 una o dos etapas después del PST, se encontró un nivel mayor de *Dax1* a TF. Estos resultados sugieren que *Dax1* no está involucrado en la DST en esta especie, posiblemente está relacionado con diferencias funcionales de ovarios y testículos como se ha sugerido en otras especies (Torres Maldonado, 2001b).

**Sox9.** Al estudiar mediante RT-PCR la expresión de *Sox9*, durante el desarrollo gonadal en el cocodrilo, se observó que a TM, primero se expresa en niveles basales, aumentando en las etapas 24 y 25 hasta la etapa 27, mientras que a TF mantiene un nivel basal en todas las etapas. Mediante hibridación *in situ* *Sox9* se detectó en los cordones testiculares, en nivel basal en la etapa 24, y sin embargo en la etapa 25 se observó un aumento. Con esta técnica, no se encontró expresión de *Sox9* en ninguna etapa a TF (Western *et al.*, 1999).

En *T. scripta*, el PST abarca de la etapa 12 a la 20, en la etapa 14, la expresión de *Sox9* es abundante en el mesonefros y en la etapa 17 comienza a expresarse en la gónada indiferenciada. A partir de la etapa 20, cuando inicia la diferenciación gonadal, comienza a aumentar la expresión en el testículo, disminuyendo en el mesonefros; mientras que en el ovario también disminuye. Estos datos muestran que *Sox9* podría tener un papel en la formación del testículo en esta especie (Spotila *et al.*, 1998).

En la tortuga marina *L. olivacea* por medio de inmunocitoquímica se observó el mismo nivel de expresión a TM (27°C) y TF (32°C) de la proteína SOX9. En las etapas 21-24 se localiza en los núcleos de células de la región medular de la gónada. En la etapa 25 a TF sólo algunos núcleos son positivos a SOX9 y en la etapa 26 la gónada es totalmente negativa a SOX9; mientras que en TM continua visible la expresión (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999).

Por medio de RT-PCR en la misma especie, Torres-Maldonado y colaboradores (2001a), observaron que *Sox9* se expresa desde las etapas 23 a 25 a TM y a TF, desde la etapa 26 en adelante continua expresándose a TM y a TF desaparece la expresión. Por su expresión continua a TM se sugiere que *Sox9* puede participar en la cascada de genes que regulan la diferenciación testicular en esta especie.

### **3.9. *Dmrt1* (Doublesex and *Mab-3* related transcription factor 1)**

Raymond y colaboradores (1998) encontraron la primera evidencia de conservación evolutiva de genes determinantes del sexo. Aislaron el gen regulador sexual *Mab-3* (*Mab* por "Male-Abnormal") de *Caenorhabditis elegans* y encontraron que codifica una proteína con dos copias de un motivo de unión al DNA similar al

encontrado en el regulador sexual de *Drosophila melanogaster* *Dsx* (double sex). Dicho dominio que la zinc y confiere unión específica de secuencia, aunque en estructura es distinto a un dedo de zinc clásico. En ambas proteínas (MAB-3 y DSX) se localiza cerca del extremo amino terminal y en la porción carboxilo terminal ambas tienen un dominio rico en serinas y prolinas (Erdman y Burtis, 1993). Debido a que dicho dominio se encontró en DSX y MAB-3 lo llamaron dominio DM.

Además de ser similares en secuencia, también son similares en función: *Mab-3* previene la expresión de proteínas del vitelo en el intestino del macho adulto (por represión de la transcripción del gen de la vitelogenina), también ayuda al desarrollo correcto de los rayos V en la hipodermis lateral durante la morfogénesis de la cola del macho (Shen y Hodgkin, 1988). *Dsx* con sus dos isoformas, *Dsx<sup>F</sup>* activa la transcripción de genes de proteínas del vitelo en las hembras, *Dsx<sup>M</sup>* la reprime en los machos, además también regula la diferenciación de cepillos sexuales y otras estructuras sensoriales en la mosca macho (Coschigano y Wensink, 1993; Baker y Ridge, 1980).

Al realizar experimentos con animales mutantes de *Mab-3*, observaron que *Mab-3* y *Dsx* son funcionalmente intercambiables, ya que *Dsx<sup>M</sup>* ectópico puede restaurar los rayos V en machos mutantes a *Mab-3* pero *Dsx<sup>F</sup>* no tuvo efecto, lo que hace sospechar que *Dsx<sup>M</sup>* y *Mab-3* actúan por medio de mecanismos similares y pueden regular genes similares en el sistema nervioso central. Sus resultados sugieren que por lo menos algunos aspectos de la regulación sexual tienen un origen evolutivo común.

A partir de estos resultados comenzaron los estudios para determinar la posible participación de *DMRT1* en la determinación y/o diferenciación sexual en otras especies.

### 3.9.1. *Dmrt1* en el humano

En el humano se encontró una proteína con dominio DM y se detectó el RNAm solamente en el testículo adulto y lo nombraron *Dmt1* (gen con dominio DM expresado en el testículo). Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p) en la región 9p24.3 que se ha implicado con la reversión sexual XY en el humano, ya que en los individuos con reversión sexual esta región está deletada, sugiriendo que uno o varios genes localizados en la región deletada deben estar presentes en dos copias para el desarrollo testicular en el humano y; debido a que *DMT1* está localizado en esa zona se propuso como ese gen candidato (Raymond *et al.*, 1998 y Veitia *et al.*, 1997).

Por medio de hibridación *in situ*, en embriones humanos XY de 6 semanas de gestación se detectó la expresión de *DMRT1* en la gónada indiferenciada en un patrón puntuado. A las 7 semanas, la expresión se localiza en los túbulos seminíferos en formación y en las células germinales (CG). En los embriones XX no se detectó la expresión de *DMRT1* (Moniot *et al.*, 2000).

Además se identificó otro gen con dominio DM denominado *DMRT2* que también está localizado en la región 9p24.3 solo que *DMRT2* mostró similitud con secuencias de músculo. Además de su localización en la región 9p24.3, *DMRT1* (anteriormente llamado *DMT1*) mostró diferencias de secuencia en cinco posiciones en pacientes con reversión sexual, sugiriendo que estas mutaciones podrían ser la causa de la reversión sexual, pero no se encontraron mutaciones múltiples lo que hace pensar que se debe a una hemigocidad de ambos genes y no a mutaciones en la secuencia. No se encontraron mutaciones dentro del dominio DM de *DMRT2*. Otro dato que apoya la probabilidad de hemigocidad de *DMRT1* y *DMRT2* es que a partir de un análisis de FISH (Fluorescence *in situ*

hybridization) en pacientes con reversión sexual se observó la ausencia de ambos genes (Raymond *et al.*, 1999a y Muroya *et al.*, 2000).

### 3.9.2. *Dmrt1* en el ratón

En embriones de ratón de 11.5 dpc, justo antes de la diferenciación testicular, se observó por medio de hibridación *in toto* que *Dmrt1* comienza a expresarse en las gónadas de ambos sexos y que, a partir de los 14.5 dpc se expresa más intensamente en los testículos que en los ovarios (Smith *et al.*, 1999b).

Datos similares encontraron Raymond y colaboradores (1999b) también por hibridación *in situ*, ellos detectaron RNAm a los 9.5 y 11.5 dpc (cuando se forma la cresta urogenital) en niveles similares en ambos sexos, a los 12.5 y 13.5 dpc cuando comienza la diferenciación gonadal, se detectó en los cordones testiculares (células pre-Sertoli y CG) y en un patrón puntuado en el ovario; a los 14.5 y 15.5 dpc la expresión disminuye en el ovario y se mantiene en el testículo. Por medio de RT-PCR obtuvieron resultados similares.

Mediante inmunohistoquímica en embriones de ratón se detectó la proteína de *Dmrt1* en el núcleo de las células de Sertoli con o sin expresión en las CG (Raymond *et al.*, 2000). Al primer día post parto (dpp) aumentan los niveles de *Dmrt1* en las CG, alcanzando un máximo a los 7 dpp antes de que comience la meiosis. Desde los 7 dpp hasta la etapa adulta, la proteína está presente en las células de Sertoli, en las CG indiferenciadas y en todas las regiones de los túbulos seminíferos. Se expresa dinámicamente en las CG premeióticas (espermatogonias) con una expresión mayor sólo en las regiones del túbulo seminífero donde inicia la espermatogénesis. Así mismo De Grandi y

colaboradores (2000) también obtuvieron datos similares por Northern Blot y reportan la expresión de *Dmrt1* en la gónada de 16.5 dpc y en el testículo adulto aun persiste, pero en el ovario se apaga. En ambos sexos no se detectó expresión de *Dmrt1* en otros tejidos, solamente en la gónada. En el ratón, *Dmrt1* se localiza en el cromosoma 16. Estos datos sugieren que *Dmrt1* podría jugar un papel en el desarrollo o función de ambos tipos celulares (CGP y células de Sertoli) y tal vez regule la entrada a meiosis de las CG (Raymond *et al.*, 1999b, 2000 y De Grandi *et al.*, 2000).

Un trabajo que apoya la participación de *Dmrt1* en el desarrollo o función de las células de Sertoli y las células germinales fue realizado por Raymond y colaboradores (2000) donde generaron ratones mutantes *Dmrt1*<sup>-/-</sup> que presentan testículos pequeños, túbulos seminíferos desorganizados y un número reducido de CG en los testículos de ratón adulto. Mediante tinción con Hematoxilina-Eosina, se observó que a los 10 dpp los testículos comienzan a ser anormales, pues exactamente después de que comienza la meiosis, tienen un número reducido de CG, probablemente por una menor proliferación; además en esta etapa las CG aún permanecen en el centro del túbulo seminífero, indicando que *Dmrt1* es necesario para el movimiento de las CG, que comienza a los 7dpp. No se detectaron CG en meiosis. A los 14 dpp no había CG, los túbulos seminíferos carecían de lumen y estaban llenos de células de Sertoli inmaduras. En estos ratones mutantes, las células de Sertoli parecen sobreproliferar a partir de los 10 dpp pero no maduran.

### 3.9.3. *Dmrt1* en el pollo

En el pollo la expresión de *Dmrt1* fue mayor en gónadas de embriones machos y menor en hembras antes y después de la diferenciación gonadal, llegando a desaparecer en las hembras. En la etapa 25 de desarrollo, cuando se está formando la cresta urogenital también se detectó expresión en los conductos de Wolf. Por medio de RT-PCR se detectó desde la etapa 19. (Shan *et al.*, 2000 y Raymond *et al.*, 1999b). Aunque el equipo de Shan detectó expresión de *Dmrt1* sólo en la gónada.

Aunado a su expresión específica en el macho, el ortólogo de *Dmrt1* se localizó en el brazo corto del cromosoma Z, en una de las regiones conservadas de sintenia cromosómica con el cromosoma 9 humano, el cual resultó ser un verdadero homólogo del *DMRT1* humano por la alta similitud que presentan. No se encontró ningún ortólogo de *DMRT2* en el pollo. (Nanda *et al.*, 1999, 2000).

### 3.9.4. *Dmrt1* en reptiles

Se ha estudiado la expresión de *Dmrt1* en dos reptiles con DST. En el cocodrilo *Alligator mississippiensis* y en la tortuga *Trachemys scripta*. En la tortuga el PST abarca las etapas 15-20. Usando hibridación *in toto* se observó la expresión de *Dmrt1* en las crestas genitales a TF y TM. En las etapas 17 y 20 la expresión de *Dmrt1* fue mayor a TM que a TF. Por RT-PCR se detectó desde la etapa 15 de nuevo con una expresión mayor a TM (Kettlewell *et al.*, 2000).

En el cocodrilo por RT-PCR, también se observó mayor expresión de *Dmrt1* a TM que a TF durante el PST (Smith *et al.*, 1999b).

### 3.9.5. *Dmrt1* en peces

En la trucha *Oncorhynchus mykiss*, usando RT-PCR semicuantitativo y Northern blot se encontró que la expresión de *Dmrt1* comienza a detectarse en etapas tempranas del desarrollo, posteriormente aumenta al presentarse la diferenciación testicular y la expresión disminuye drásticamente durante la espermiación. La expresión de *Dmrt1* siempre fue más baja en los ovarios. En individuos adultos de *O. mykiss* y de la tilapia *Oerochromis niloticus* sólo se detectó en el testículo (Marchand *et al.*, 2000 y Guijun *et al.*, 2000).

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta hace algunos años, el enfoque que se había dado al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo había sido evolutivo y ecológico. Sin embargo, no se tenían evidencias fisiológicas, celulares o moleculares de cómo la temperatura interviene en procesos que inducen el dimorfismo sexual.

Con el descubrimiento del gen determinante de la diferenciación testicular (*Sry*) hubo un gran avance sobre el problema de la diferenciación sexual en mamíferos. Este descubrimiento dio la pauta para tratar de esclarecer a nivel molecular, los eventos relacionados con la determinación sexual por temperatura.

La identidad de los genes que controlan la diferenciación sexual en individuos con DST se conoce muy poco. Sin embargo, como sucede en los mamíferos, la diferenciación sexual morfológica en el embrión se inicia en la gónada embrionaria. Con base en esto es razonable postular que el factor o factores requeridos para la diferenciación sexual de la gónada actúan en etapas tempranas del desarrollo, sobre el primordio gonadal, controlando su diferenciación hacia un ovario o un testículo.

Se ha observado que un gen relacionado con el *Sry*, el gen *Sox9* se encuentra altamente conservado en la evolución de los vertebrados y es el mejor caracterizado en varias especies. En *L. olivacea* al igual que en los mamíferos, *Sox9* se expresa en etapas tempranas del desarrollo en ambos sexos. Al iniciar la diferenciación sexual de la gónada, se apaga en las hembras y continua expresándose en los machos. Con base en estos hallazgos asumimos que otros genes autonómicos como *Dmrt1* podrían estar relacionados con la determinación sexual dependiente de temperatura.

El periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo en la tortuga marina *L. olivacea* así como el periodo determinado e indeterminado ya han sido determinados, en el presente trabajo nos propusimos estudiar la expresión del gen *Dmrt1* durante el desarrollo gonadal. Aunque *Dmrt1* se ha estudiado en otras especies con DST, en *L. olivacea* se conoce muy bien la expresión del gen *Sox9*, por lo que es posible comparar los patrones de expresión de ambos. De esta manera, la correlación entre los dos genes aportaría evidencia importante sobre los eventos moleculares involucrados en la DST en la tortuga marina *L. olivacea*.

## V. HIPÓTESIS

Los genes que regulan la determinación sexual en los vertebrados son altamente conservados. En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* la temperatura de incubación afecta los niveles de expresión del gen *Dmrt1* que participa en la cascada génica de la diferenciación sexual.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general:

Determinar el patrón de expresión del gen *Dmrt1* durante el desarrollo gonadal de la tortuga marina *L. olivacea* en diferentes etapas del desarrollo embrionario en dos temperaturas de incubación, TM y TF y compararlo con el patrón de expresión del gen *Sox9*.

### 6.2. Objetivos particulares:

- ✓ Identificar y aislar el gen *Dmrt1* por secuenciación en la tortuga marina *L. olivacea*.
- ✓ Estudiar el patrón de expresión de transcritos del gen *Dmrt1* en gónadas de embriones incubados a TM durante el PI, PST y PD por RT-PCR.
- ✓ Estudiar el patrón de expresión de transcritos del gen *Dmrt1* en gónadas de embriones incubados a TF durante el PI, PST y PD por RT-PCR.
- ✓ Comparar los patrones de expresión de los genes *Dmrt1* y *Sox9* durante los tres periodos del desarrollo gonadal de *L. olivacea*.

## VII. METODOLOGÍA

### 7.1. Colecta y manejo de material biológico.

Los huevos de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* se colectaron en la playa La Escobilla en la costa del Pacífico en Oaxaca, México (96° 27' 16" oeste, 15° 40' 36" norte) con autorización de la Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, SEMARNAP, México (permiso de pesca de fomento No. 031100-213-03 folio 2866) Los huevos fueron transportados al laboratorio, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, en cajas de unicel con vermiculita húmeda. Los huevos fueron incubados en dos grupos distintos a temperaturas controladas de  $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (temperatura masculinizante) y  $33 \pm 0.1^\circ\text{C}$  (temperatura feminizante), las cuales se monitorearon diariamente (termómetro de la incubadora y dos termómetros en el interior de la misma); se humedecieron periódicamente con agua bidestilada y se examinaron con un ovoscópio para monitorear la viabilidad de los huevos.

Se usaron un total de cuatro nidos listados en la siguiente tabla.

**Tabla3. Nidos utilizados.**

NIDO	FECHA DE COLECTA	NÚMERO TOTAL DE HUEVOS POR NIDO
49	10 enero 2001	109
50	10 enero 2001	96
51	31 marzo 2001	73
52	31 marzo 2001	73

## 7.2. Muestreo.

En ambas temperaturas de incubación se muestrearon los embriones y se disecaron las gónadas y mesonefros en diferentes etapas del desarrollo (23, 24, 25, 26, 27, 28 y cría) las cuales se establecieron tomando como referencia los criterios de Miller (1985): Largo total del embrión, largo y ancho de la cabeza, largo y ancho del caparazón, largo y ancho del plastron, largo de las aletas, la pigmentación y la definición de las escamas.

Las gónadas y mesonefros microdisecados se colocaron en tubos eppendorf estériles y libres de RNasas, se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -70° C en un ultracongelador.

## 7.3. Oligonucleótidos para *Dmrt1*, *Sox9* y $\beta$ -actina

Los oligonucleótidos utilizados para el estudio de *Dmrt1* fueron los denominados JK41 y JK42 diseñados por Kettlewell y colaboradores (2000) para la tortuga de orejas rojas, en donde usaron como base secuencias conocidas del gen *Dmrt1* de otros vertebrados: humano (Raymond *et al.*, 1999a), ratón (Raymond *et al.*, 1999b), pollo (Raymond *et al.*, 1999b) y cocodrilo (Smith *et al.*, 1999b).

Sentido	5' JK41: CGC AGG TTG CAT TGA GAA GGC AGC 3'	Tm=77°C
Antisentido	5' JK42: TCT GCC ATT GGT TTC CTG ATT GGC 3'	Tm=74°C

Los oligonucleótidos utilizados para el estudio de comparación entre *Sox9* y *Dmrt1* fueron los denominados SOT1 y SOT2 diseñados por Torres-Maldonado y colaboradores (2001a) para la tortuga marina *L. olivacea*; en donde usaron como

base secuencias conocidas del gen *Sox9* de otros vertebrados: tortuga de orejas rojas (Spotila *et al.*, 1998), trucha (Takamatsu *et al.*, 1997), cocodrilo (Western *et al.*, 1999), ratón (Wright *et al.*, 1995), pollo (Uwanogho *et al.*, 1996) y humano (Foster *et al.*, 1994).

Sentido	5' SOT1: AGC AGA CCC ACA TCT CC/TC C 3'	Tm=49°C
Antisentido	5' SOT2: GGG A/C/T/GGG CAG GTA C/TTG GTC 3'	Tm=50°C

Como control interno de expresión se realizó la amplificación del mRNA de  $\beta$ -actina utilizando el siguiente par de oligonucleótidos en base a la secuencia publicada por Kost y colaboradores (1983). La reacción de amplificación de  $\beta$ -actina se realizó en paralelo con la del gen *Sox9* con las mismas condiciones de reacción y el mismo programa de amplificación.

Sentido	5' ACTIN1: TGG ATG ATG ATA TTG CTG C 3'	Tm= 54°C
Antisentido	5' ACTIN2: ATC TTC TCC ATA TCA TCC CA 3'	Tm= 56°C

#### 7.4. Extracción de RNA total.

Método TRizol. El método de extracción de RNA total a partir de tejidos de *L. olivacea* se basa en el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las muestras congeladas se homogeneizaron individualmente en 100 $\mu$ l de TRizol (Gibco, BRL) para la gónada y 500 $\mu$ l para el mesonefros, se agregaron 20-100  $\mu$ l de cloroformo y se centrifugaron a 14,000 rpm/ 4°C por 20 min. para separar la fase acuosa donde está disuelto el RNA. Se agregaron 50-250  $\mu$ l de isopropanol para precipitar el RNA toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm/ 4°C por 45 min. Se

separó el sobrenadante y los botones de RNA se lavaron con 1 ml de etanol al 75% en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), nuevamente se centrifugaron a 14,000 rpm/4°C por 45 min., se decantaron los tubos y se dejaron secando los botones de RNA para resuspenderlos en 10 µl de agua ultrapura libre de RNAsas, empleándose un microgramo de RNA total para la reacción de RT-PCR. Los tubos siempre se mantuvieron en hielo.

#### 7.5. RT-PCR (Trascricpción inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Mezcla de trabajo. Se preparó una Mezcla de trabajo para cada gen: *Dmrt1*, *Sox9* y *Actina*, usando un kit One Step: GIBCO BRL para RT-PCR (2X mix, Superscript II RT Taq polimerasa). *Actina* se usó como control interno de expresión.

*Dmrt1*: 10 µl de 2x mix la cual contiene: Buffer 1X con 2 mM de cada dNTP, y 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5µl de oligonucleótidos JK41 y JK42 al 20µM, 0.5µl de una mezcla de Superscript II RT/Taq polimerasa, DMSO al 6%, 3µl de RNA y agua ultrapura para ajustar volumen final a 20 µl.

*Sox9*: 10 µl de 2x mix la cual contiene: Buffer 1X con 2 mM de cada dNTP, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.0µl de oligonucleótidos al 20µM, 0.5µl de una mezcla de Superscript II RT/Taq polimerasa, 3µl de RNA y agua ultrapura para ajustar volumen final a 20 µl.

*β-Actina*: 10 µl de 2x mix la cual contiene: Buffer 1X con 2 mM de cada dNTP, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1µl de oligonucleótidos al 20µM, 0.5µl de una mezcla de

Superscript II RT/Taq polimerasa 3 $\mu$ l de RNA y agua ultrapura para ajustar volumen final a 20  $\mu$ l.

Para realizar la reacción de RT-PCR para *Dmrt1* se usó el termociclador PTC-100 (MJ Research) y para *Sox9* y  $\beta$ -*actina* usó el termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf) por la diferencia en las temperaturas de alineamiento.

Se probaron dos temperaturas de alineamiento para verificar los oligonucleótidos, primero se usó la temperatura anteriormente empleada por Kettlewell y colaboradores (2000), pero aparecieron bandas acompañantes y se optó por aumentar la temperatura a 63°C en donde se obtuvo sólo la banda deseada de *Dmrt1*. Para tales fines se usó el Termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf).

Los programas de amplificación utilizados se muestran en la tabla 4.

## 7.6. ELECTROFORESIS

Los productos de RT-PCR (10 $\mu$ l  $\beta$ -*Actina* y 10 $\mu$ l de *Dmrt1* y *Sox9*) se corrieron en geles de agarosa al 2.5% en TBE1X (GIBCO BRL) teñidos con bromuro de etidio 0.1 $\mu$ g/ml. Se observaron en un transiluminador de luz Ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid DS-34 con una apertura de 5.6 y una exposición de ½ segundo empleándose una película Polaroid Polopan asa 3000 con un tiempo de revelado de 1 minuto. Los fragmentos obtenidos en la reacción de RT-PCR fueron de 473 pb para *Dmrt1*, 309 pb para *Sox9* y 252 pb para  $\beta$ -*Actina*.

Tabla 4. Programas de amplificación

PROGRAMAS DE AMPLIFICACIÓN				
Paso	JK41-42		SOT1-2 Y ACTIN1-2	
	Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min. (1 ciclo)	50	30 min. (1 ciclo)
2	94	5 min. (1 ciclo)	94	5 min. (1 ciclo)
3	94	30 seg.	94	30 seg.
4	63	30 seg.	55	30 seg.
5	72	30 seg.	72	30 seg.
6	ir a 3 35 veces más		ir a 3 35 veces más	
7	72	5 min. (1 ciclo)	72	5 min. (1 ciclo)
8	4	sostenido	4	sostenido
9	fin		fin	

### 7.7. DENSITOMETRÍA.

Las fotos tomadas a los geles con la misma cámara fotográfica DS34, el mismo transiluminador, la misma película y tiempo de revelado, se escanearon sin modificar el contraste o brillo en un Scanner HP 6300 con una resolución de 300 dpi. Para obtener la lectura densitométrica de las bandas se usó el programa Scion Image Beta 4.0 (Copyright 1997-2000 Scion Corporation) delimitando el área de las bandas del gen *Dmrt1* y después las bandas del control interno  $\beta$ -Actina conservando el mismo tamaño de área con la que se delimitaron las bandas de *Dmrt1*. La zona elegida se evaluó pixel por pixel en la escala de blanco a negro (0-256). Este programa asigna un valor por área a cada banda. El mismo procedimiento se realizó para *Sox9*. El número total de geles analizados para establecer el nivel de expresión se muestra en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Número de geles analizados para establecer el patrón de expresión de *Dmrt1* en cada etapa de desarrollo de la tortuga marina *L. olivacea*.

<b>DMRT1</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>CRÍA</b>
<b>26°C</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>33°C</b>	5	5	5	5	5	5	5

Tabla 6. Numero de geles analizados para la comparación entre *Dmrt1* y *Sox9* en cada etapa de desarrollo de la tortuga marina *L. olivacea*.

<b>DMRT1/ SOX9</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>CRÍA</b>
<b>26°C</b>	9/7	11/8	9/8	10/8	11/8	10/5	10/5
<b>33°C</b>	8/6	10/8	12/8	9/8	8/7	9/5	9/3

Para realizar la correlación de la expresión de *Dmrt1* y *Sox9* se usó el mismo RNA para la reacción de RT-PCR.

Los datos semi-cuantitativos para el perfil de expresión se calcularon relacionando los valores obtenidos por área de la banda para *Dmrt1* y *Sox9* con los valores obtenidos del gen control  $\beta$ -actina en cada etapa

Después los datos semi-cuantitativos se promediaron en cada etapa y se expresaron en una gráfica.

### 7.8. Secuenciación.

Para realizar la secuenciación del producto de RT-PCR se obtuvieron las bandas del gel de agarosa y se siguió el procedimiento con los reactivos para extracción de geles QIAquick (QIAGEN). Se cortó la banda del gel de agarosa con un bisturí estéril, se pesó en un tubo translúcido adicionándose tres veces el peso

de la banda en volumen de Buffer QG. Se incubó a 50°C hasta disolver el agarosa y posteriormente se verificó que el color de la mezcla fuera de color amarillo, lo que indica un pH 7.5 ya que la adsorción a la membrana QIAquick es eficiente sólo a dicho pH. Se adicionó un volumen de isopropanol (igual al peso de la banda) a la muestra y se mezcló. Se puso la columna en un tubo colector agregándose 800µl de muestra en la columna y se centrifugó por un minuto a 14,000 rpm. Se decantó eliminando el sobrenadante y se agregaron 500µl de buffer QG a la columna para remover todas las trazas de agarosa, centrifugándose durante un minuto a 14,000 rpm. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y se lavó la columna con 750 µl de buffer PE, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó por un minuto a 14,000 rpm. Después de eliminar el sobrenadante se colocó la columna en un tubo colector de 1.5 ml y con agua ultrapura libre de RNAsas y DNAsas agregada en el centro de la membrana se dejó reposar y se centrifugó por un minuto a 14,000 rpm para eluir el DNA. Éste se almacenó a -20°C hasta su uso para la secuenciación. Para secuenciar se usó un secuenciador automático Applied, Biosystems, utilizando un microgramo del fragmento puro y un micromol del oligonucleótido sentido, para la secuencia sentido y 1µl del oligonucleótido antisentido para la secuencia complementaria.

Para corroborar los resultados se realizó una secuencia manual en el laboratorio del Dr. Abraham Landa.

El análisis de homología de la secuencia de aminoácidos de *L. olivacea* y otros vertebrados se realizó con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar *et al.*, 1993).

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Secuenciación

Secuencia obtenida del fragmento de RT-PCR purificado.

```

          10           20           30           20
          |           |           |           |
ag gcc caa gaa gaa gag ctg ggg atc agc cat ccc atc cct ctg cca
   50           60           70           80           90
   |           |           |           |           |
agt gcc ccg gag ctc ttc gtt aag aag gaa acc aat ggt ggc agc tcc
   100          110          120          130          140
   |           |           |           |           |
tgt tta ttg ttg gaa aac agc agc ccg aca cat tca aca aac aca gca
   150          160          170          180
   |           |           |           |           |
act aca gca tcc acc acc cca tca gag gga cgg atg ctc att cag gac
 190          200          210          220          230
   |           |           |           |           |
ata cct tcc atc acc agc aga ggg cat ctg gag agc aca tct gat ttg
   240          250          260          270          280
   |           |           |           |           |
gtt gtg gac tcc acc tac tac agc agt ttt tac cag cca tct ctg tat
   290          300          310          320          340
   |           |           |           |           |
cct tac tac aac aac ctt tac aac tat tcc cag tac cag atg gca gtg
   350          360          370          380          390
   |           |           |           |           |
gcc agt gaa tcc tcc tct agt gat atg ggg ggc aca cta gta ggg tcc
   400          410          420          430
   |           |           |           |           |
cct gtg aaa aac agc ctg cga agc ctc cca gcc aca tac atg tca a

```

Comparación de la secuencia de aminoácidos del fragmento de la proteína  
DMRT1 en *L. olivacea* y otros vertebrados.

Humano ( <i>H. sapiens</i> )	<b>QVALRRQQAQEELGISHPIPLPSAAE</b>
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	<b>QVALRRQQAQEELGISHPIPLPSAAE</b>
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	<b>QVALRRQQAQEELGISHPVPLPSAPE</b>
Cocodrilo ( <i>A. mississippiensis</i> )	<b>QVALRRQQAQEELGISHPIPLPSATE</b>
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	<b>QVALRRQQAQEELGISHPIPLPSAPK</b>
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	<b>QVALRRQQAQEELGISHPIPLPSAPE</b>
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	LLVKRENNGSNPCLMTECSG-TSQPPP
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	LLVKRENNASNPCLMAENSS-SAQPPP
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	PVVVK-SSSSSSCLLDSSSPAHTST
Cocodrilo ( <i>A. mississippiensis</i> )	LFVKKENSGGSSCLLLESSSPHTST
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	LFVKKENGGSSCLLLESSSPHTSTNT
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	LFVKKETNGGSSCLLENSSPHTSTNT
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	ASVPTTAAS-EGRMVIQDIPAVTSRGH
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	ASTPTPAAS-EGRMVIQDIPAVTSRGH
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	VAAAAASAPPEGRMLIQDIPISRSRGH
Cocodrilo ( <i>A. mississippiensis</i> )	VTTVSTSPS-EGRMLIQDVPSITSRGH
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	ATTASTTPS-EGRMLIQDIPISITSRGH
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	ATTASTTPS-EGRMLIQDIPISITSRGH
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	VENTPDLVSDSTYYSSFYQPSLFPYYN
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	MENTSDLVSDPAYYSSFYQPSLFPYYN
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	LESTSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYYN
Cocodrilo ( <i>A. mississippiensis</i> )	LESTSDLVV-----
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	LESTSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYYN
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	LESTSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYYN
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	NLYNCPQYSMALAADSASGEVGNPLGG
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	NLYNYPQYSMALSAESSSEVGNLGG
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	NLYNYSQYQMAVATESSSSETGGTFVG
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	NLYNYSQYQMAVASDSSSSDMGGTLAG
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	NLYNYSQYQMAVASESSSSDMGGTLVG
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	SPVKNSLRGLPGPYVPGQTGNQWQ
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	SPVKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQ
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	SAMKNSLRSLPATYMSSQSGKQWQ
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	SPVKNSLRSLPATYMSSQSGNQWQ
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	SPVKNSLRSLPATYMSSQSGNQWQ

Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias se indican en negritas y el porcentaje de identidad se muestra a continuación en la siguiente tabla.

**Tabla 7. Porcentaje de identidad de la secuencia parcial de aminoácidos de DMRT1 entre distintos vertebrados.**

	HUMANO	RATÓN	POLLO	COCODRILLO	TORTUGA	GOLFINA
Humano	100%					
Ratón	86%	100%				
Pollo	62.18%	62.18%	100%			
Cocodrilo	62.95%	62.95%	79.56%	100%		
Tortuga	65.97%	65.97%	80.86%	90.12%	100%	
Golfina	65.27%	67.39%	82.28%	88.89%	96.53%	100%

La secuencia se incorporó a la base de datos GenBank con el número de acceso AF335421.

## 8.2. RT-PCR (Transcripción Inversa–Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Se estudió la expresión de *Dmrt1* en embriones incubados a temperatura feminizante (TF) (33°C) y temperatura masculinizante (TM) (26°C) en diferentes etapas del desarrollo.

El número de gónadas por etapa analizadas se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 8. Número de gónadas por muestra analizadas**

ETAPA DE DESARROLLO	NÚMERO DE GÓNADAS
Etapa 23	4 gónadas
Etapa 24	2 gónadas
Etapa 25	1 gónada
Etapa 26	1 gónada
Etapa 27	1 gónada
Etapa 28	1 gónada
Cría	1 gónada

### **8.2.1. Expresión de *Dmrt1* a temperatura masculinizante (TM)**

En la figura 1 se muestra el análisis por RT-PCR de *Dmrt1* a TM y a TF. El fragmento de  $\beta$ -actina de 252 pb se usa como control de expresión interno.

A TM las gónadas de todas las etapas muestran el fragmento de 473 pb de *Dmrt1*. En las etapas 23, 24 y 25 la intensidad de las bandas es similar y aumenta en las etapas 26 y 27 y en la etapa 28 y cría de nuevo es similar a la intensidad mostrada en las etapas 23-25.

A TM la expresión de *Dmrt1* se observó durante todas las etapas de desarrollo estudiadas y en un nivel mayor de expresión comparado con la expresión a TF (Grafica1).

### **8.2.2. Expresión de *Dmrt1* a temperatura feminizante (TF)**

En contraste a lo encontrado a TM, a TF el fragmento de *Dmrt1* es visible solo en las etapas 23-25. Figura 1.

En las etapas 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se observó expresión, pero a partir de la etapa 26 hay una disminución en la misma como se observa en la grafica 1. En las crías no se detectó el transcrito.

### **8.2.3. Expresión de Sox9 a temperatura masculinizante (TM)**

En la figura 2 se muestra el análisis por RT-PCR de Sox9 a TM y a TF. El fragmento de *β-actina* de 252 pb se usa como control de expresión interno.

A TM se observó la banda de 309 pb de Sox9 en todas las etapas de desarrollo analizadas (23-cría). Estos resultados coinciden con lo reportado por Torres-Maldonado y colaboradores (2001a)

### **8.2.4. Expresión de Sox9 a temperatura feminizante (TF)**

En contraste a lo encontrado a TM, a TF el fragmento de Sox9 es visible desde la etapa 23 hasta la etapa 25. A partir de la etapa 26 ya no se observa el transcrito. Figura 2. Estos resultados coinciden con lo reportado por Torres-Maldonado y colaboradores (2001a).

### **8.3. Densitometría: patrón de expresión de Dmrt1 y comparación con Sox9**

Los datos semi-cuantitativos obtenidos se muestran en las tablas 9, 10 y 11.

Los valores de la tabla 9 se usaron para establecer los niveles de transcritos en el patrón de expresión de *Dmrt1* y los valores de la tabla 11 para realizar la comparación entre *Dmrt1* y *Sox9*.

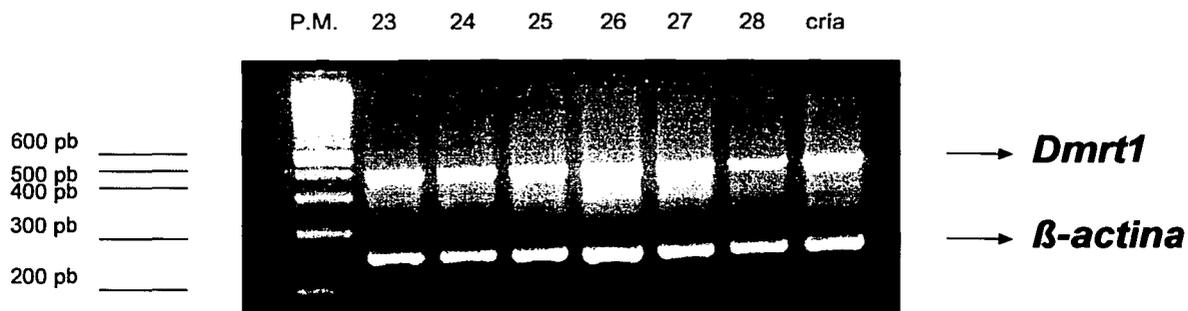
### **8.3.1. *Dmrt1***

La gráfica 1 muestra el nivel de expresión de *Dmrt1*. Se observaron diferencias en el patrón de expresión en ambas temperaturas, a temperatura masculinizante (26°C) se expresó en todas las etapas estudiadas alcanzando un pico máximo en la etapa 25. A temperatura feminizante (33°C) la expresión disminuye en la etapa 26 y desaparece en las crías. Los niveles de expresión observados a temperatura masculinizante son 3-4 veces mayores que los observados a temperatura feminizante (Grafica 1).

### **8.3.2. *Dmrt1* y *Sox9*.**

Se observa un nivel mayor de expresión del gen *Dmrt1* a TM comparado con *Sox9* en la misma temperatura, pero *Sox9* mostró un nivel mayor de expresión a TF. Los dos genes coincidieron en su pico máximo durante la etapa 25 a TM mientras que a TF *Sox9* muestra un descenso drástico en la etapa 24 comparado con *Dmrt1* cuyo descenso no es tan marcado, pero *Sox9* deja de expresarse en la etapa 26 y *Dmrt1* continua expresándose aunque en un nivel más bajo y ya no se detecta en las crías. El patrón de expresión de *Sox9* coincide con los datos anteriormente reportados por Torres-Maldonado y colaboradores (2001a). Ver la gráfica 2.

## 26°C (TM)



## 33°C (TF)

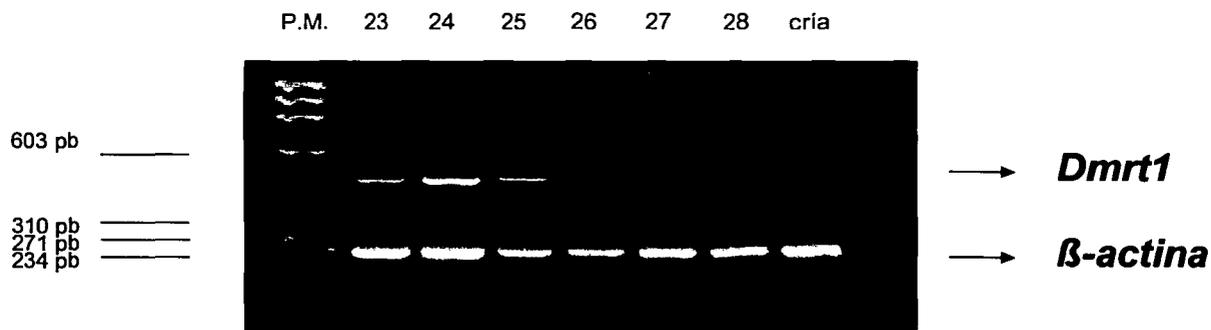


FIGURA 1. Análisis por RT-PCR de gónadas embrionarias de *L. olivacea* para *Dmrt1*. Se muestran las etapas estudiadas en las dos temperaturas de incubación: 33 °C (TF) y 26°C (TM). Carril PM: marcador de peso molecular (100 pb y  $\Phi$ X174/HaeIII), carriles 23-cría: etapas de desarrollo. La figura muestra un experimento de RT-PCR representativo.

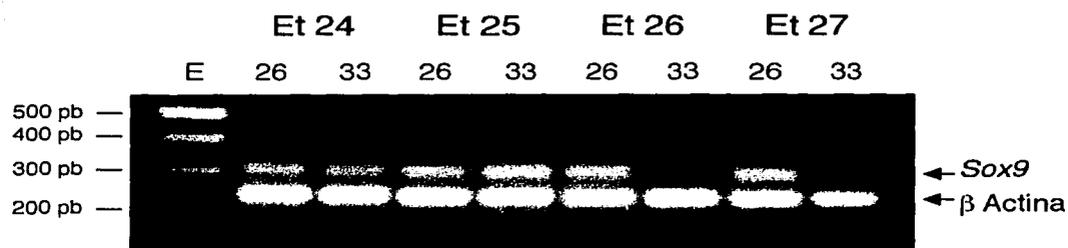


Figura 2. Análisis por RT-PCR de gónadas embrionarias de *L. olivacea* para *Sox9*. Se muestran las etapas estudiadas en las dos temperaturas de incubación: 33 °C (TF) y 26°C (TM). Carril E: Marcador de peso molecular (100pb), carriles 26: gónadas de embriones incubados a 26°C, carriles 33: gónadas de embriones incubados a 33°C. Et. 24, 25, 26, 27: etapas de desarrollo La figura muestra un experimento de RT-PCR representativo.

**Tabla 9. Promedio de la relación *Dmrt1*/ $\beta$ -actina (No. de geles analizados)**

<i>Dmrt1</i>	23	24	25	26	27	28	cría
26°C	1.47553742 (5)	2.048155123 (5)	2.182690659 (5)	2.153418712 (5)	1.984453404 (5)	2.009986672 (5)	1.429861028 (5)
33°C	0.816986442 (5)	0.345419919 (5)	0.346488878 (5)	0.301228538 (5)	0.087721651 (5)	0.060491817 (5)	0 (5)

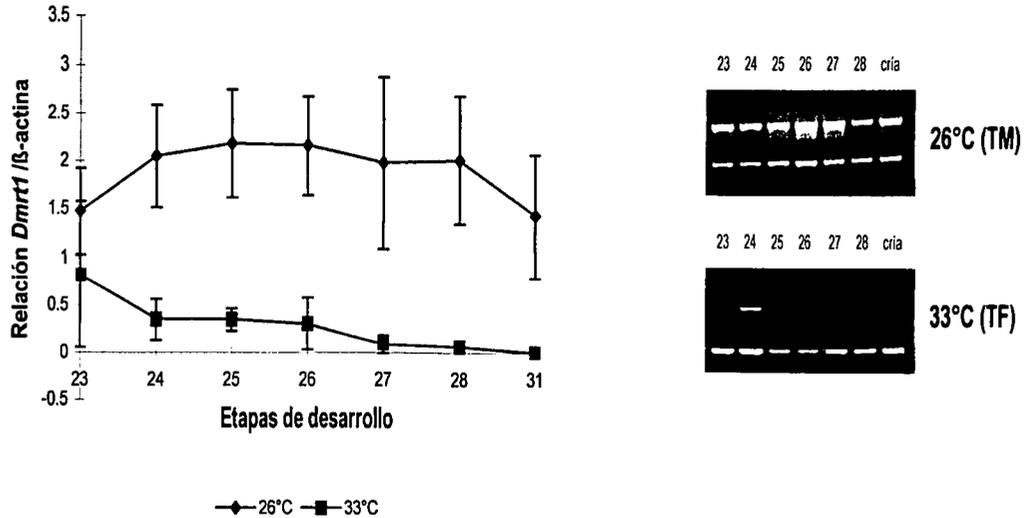
**Tabla 10. Promedio de la relación *Sox9*/ $\beta$ -actina (No. de geles analizados)**

<i>Sox9</i>	23	24	25	26	27	28	cría
26°C	0.810605855 (7)	0.805612936 (8)	0.949435352 (8)	0.927161312 (8)	0.859979278 (8)	0.750281411 (5)	0.552510126 (5)
33°C	1.007265454 (6)	1.015950976 (8)	0.54130481 (8)	0.049375 (8)	0 (7)	0 (5)	0 (3)

**Tabla 11. Promedio de la relación *Dmrt1*/ $\beta$ -actina (No. de geles analizados)**

<i>Dmrt1</i>	23	24	25	26	27	28	Cría
26°C	1.098114259(9)	1.365057217 (11)	1.681460552 (9)	1.527256172 (10)	1.379459612 (11)	1.528523914 (10)	1.099442559 (10)
33°C	0.737550027(8)	0.597811574 (10)	0.623475118 (12)	0.411801568 (9)	0.205394601 (8)	0.104174737 (9)	0 (9)

### Expresión de *Dmrt1*



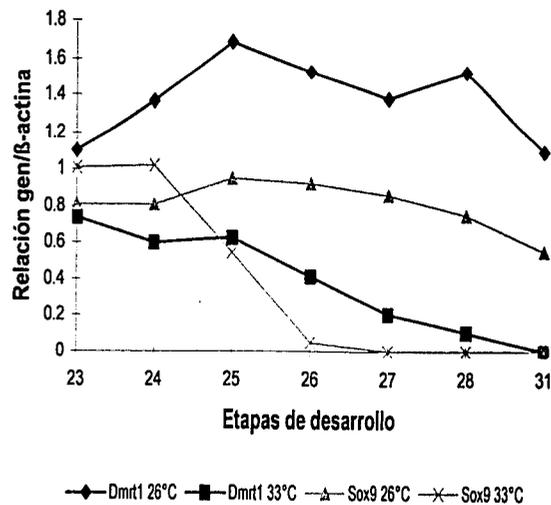
Grafica 1. Perfiles de expresión durante el desarrollo gonadal para *Dmrt1*. En la gráfica se muestran los niveles de transcrito en gónadas embrionarias de *L. olivacea* incubadas a TM y TF. En el eje Y se grafica la proporción *Dmrt1*/ $\beta$ -Actina y en el eje X las etapas de desarrollo analizadas. Se muestran los valores calculados  $\pm$  la desviación estándar.

## IX. DISCUSIÓN

La tabla de porcentaje de identidad muestra que la secuencia parcial de la proteína DMRT1 de *L. olivacea* tiene una alta similitud a la de otras especies, particularmente a la tortuga *T. scripta* con 96.53% de similitud seguida por el cocodrilo *A. mississippiensis* (Smith *et al.*, 1999b) con 88.89%, el pollo *G. gallus* (Raymond *et al.*, 1999b) con 82.28%, el ratón *M. musculus* (Raymond *et al.*, 1999b) con 67.39% y la menor similitud con el humano *H. sapiens* (Raymond *et al.*, 1999a) con 65.27%. Los datos obtenidos muestran que DMRT1 esta conservado en los vertebrados.

*Dmrt1* codifica una proteína que pertenece a la familia DM, familia de factores de transcripción cuyo dominio DM se une al DNA de forma específica. Este dominio esta relacionado con las proteínas codificadas por *Mab-3* de *C. elegans* y *Dsx* de *D. Melanogaster*, que también presentan dominio DM. En estos invertebrados estas dos proteínas juegan papeles similares en la diferenciación sexual, *Mab-3* dirige el desarrollo de rayos sensoriales (rayos V) necesarios para el apareamiento y previene la expresión de vitelogeninas en el intestino del macho y; *Dsx* controla la formación de los cepillos sensoriales en el sistema nervioso central y regula la expresión de proteínas del vitelo en la grasa corporal. El dominio DM es dependiente de zinc pero es diferente de un dedo de zinc clásico, y es necesario para su función, como lo muestra un experimento llevado a cabo por Raymond y colaboradores en 1998 donde mutaciones en el dominio DM eliminan la actividad de *Mab-3 in vivo*. Otro dato importante es que estas dos proteínas son similares en función ya que DSX<sup>M</sup> puede reemplazar a MAB-3 restaurando la formación de los rayos sensoriales de machos mutantes a *Mab-3*. (Coschigano y Wensink, 1993; Baker y Ridge, 1980; Shen y Hodgkin, 1988; Erdman y Burtis, 1993).

## Expresión *Dmrt1* y *Sox9*



Grafica 2. Perfiles de expresión durante el desarrollo gonadal para *Dmrt1* y *Sox9*. En la gráfica se muestran los niveles de transcrito en gónadas embrionarias de *L. olivacea* incubadas a TM y TF. En el eje Y se grafica la proporción *Dmrt1*/ $\beta$ -Actina y *Sox9*/ $\beta$ -Actina y en el eje X las etapas de desarrollo analizadas.

El hecho de que *Dmrt1* muestre un dominio homólogo con los genes *Dsx* y *Mab-3* sugiere que la similaridad de estructura y función de los mecanismos determinantes del sexo esta conservada evolutivamente. Basado en esta conservación evolutiva, la expresión localizada sólo en las gónadas de humano, ratón, aves, reptiles y dos especies de peces (vertebrados que utilizan tres mecanismos distintos de determinación sexual) con una expresión dimórfica sexual, expresión restringida al testículo en etapas posteriores del desarrollo y permanencia específica en el testículo del animal postnatal así como su localización cromosómica en una región asociada con la reversión sexual XY en el humano y en el cromosoma sexual Z en el pollo sugiere que *Dmrt1* es un regulador ampliamente conservado del desarrollo sexual de los vertebrados (Raymond *et al.*, 1999b; Smith *et al.*, 1999b; Kettlewell *et al.*, 2000; Guijun *et al.*, 2000 y Marchand *et al.*, 2000)

Además, los genes con dominio DM son los primeros que muestran expresión sexual dimórfica en varios fila de vertebrados e invertebrados con localización específica en la gónada, de esta manera *Dmrt1* podría representar un componente antiguo conservado en la vía de determinación del sexo en los vertebrados.

En la tortuga marina *L. olivacea*, *Dmrt1* se expresó en embriones incubados a TM durante todas las etapas de desarrollo en un nivel de expresión mayor que a TF, éste fue aumentando a partir de la etapa 24, alcanzando su pico máximo en la etapa 25 y, comenzó a descender a partir de la etapa 26. En los embriones incubados a TF se registró un descenso gradual a partir de la etapa 26 y ya no se detectó en las crías.

En *L. olivacea* el PI, PST y PD se ubican en las etapas 21-22, 23-24 y 25 en adelante respectivamente, en embriones incubados a TM (26°C). A TF (33°) el PI, PST y PD se ubican en las etapas 21-24, 24-25 y 25 en adelante respectivamente (Torres-Maldonado *et al.*, 2001a). El pico máximo de expresión encontrado en los embriones incubados a TM, posiblemente se deba a que en esta etapa comienzan a distinguirse los cordones sexuales, que permanecen continuos con el epitelio superficial en algunas regiones, y el descenso en el nivel de expresión registrado a partir de la etapa 27 en la misma temperatura de incubación se deba a que en la etapa 28 se distinguen los cordones sexuales en la médula, el epitelio superficial es delgado y hay pocas células germinales.

Al comparar el patrón de expresión de *Dmrt1* en *L. olivacea* con otros vertebrados también se observó similitud.

En el ratón, *Dmrt1* también se expresa sólo en la gónada, a niveles inferiores en los embriones XX comparado con los embriones XY. Se expresa antes de la diferenciación testicular en ambos sexos. Aumenta al inicio de la diferenciación testicular y desaparece en el ovario. En el ratón, *Dmrt1* se localiza en los cordones testiculares particularmente en las células de Sertoli y en las CG, mientras que los ratones mutantes para *Dmrt1*, muestran testículos pequeños túbulos seminíferos desorganizados y una pérdida de células germinales lo que pone de manifiesto una falla en la diferenciación del testículo acompañada de una muerte de células germinales mas que una transformación de testículo a ovario (Raymond *et al.*, 2000) Estos datos sugieren que *Dmrt1* podría jugar un papel en el desarrollo o función de ambos tipos celulares y tal vez la entrada a meiosis de las CG, pero desmiente la idea de que participe en la formación de la gónada ya que los ratones mutantes si presentan gónadas aunque de menor tamaño, pero no se observó ningún efecto en la diferenciación ovárica (Raymond *et al.*, 1999b,2000; De Grandi *et al.*, 2000). En su trabajo Raymond y colaboradores (1999b) sugiere que *Dmrt1* podría activar la transcripción de *Sry* ya que comienza

a expresarse a los 10.5 dpc y *Dmrt1* a los 9.5 dpc, aunque aun hace falta investigar al respecto para comprobar esta hipótesis.

A partir de los resultados obtenidos en *L. olivacea* se sugiere que *Dmrt1* participa en la determinación testicular ya que, además de tener siempre un nivel de expresión mayor en los machos, aumenta su expresión en la etapa 24, alcanzando su pico máximo en la etapa 25 cuando comienzan los cambios histológicos en la gónada que ponen en evidencia el inicio de la diferenciación testicular y, de acuerdo con los reportes en el ratón, posiblemente también se exprese en las células de Sertoli importantes en el desarrollo testicular.

En la tortuga *T. scripta* y el cocodrilo *A. mississippiensis*, especies que presentan DST, estudiaron su expresión durante el PST y por medio de hibridación *in toto* y RT-PCR (en el cocodrilo solo usaron RT-PCR) encontraron que tiene un nivel mayor de expresión en TM que en TF (Kettlewell *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 1999b). Estos datos concuerda con los resultados encontrados en *L. olivacea* pero, en *T. scripta* reportan expresión de *Dmrt1* en el mesonefros de embriones incubados a TM, pero en nuestro estudio realizado en *L. olivacea* no se detectó el transcrito en el mesonefros, además en nuestro estudio se realizó un análisis de nivel de expresión y se analizaron etapas posteriores al PST reportando que en las crías ya no se detecta el transcrito.

Aún queda por dilucidar cómo es regulado *Dmrt1* por la temperatura, si ésta regulación es directa o indirecta. Se han formulado dos propuestas: 1) La transcripción o estabilidad es controlada por algún factor(es) cuya actividad es dependiente de temperatura: inductor a 26°C ó represor a 33°C y 2) *Dmrt1* podría ser una proteína dependiente de temperatura por si mismo y controlar su propio nivel de RNAm. Así establecería y mantendría la diferenciación testicular, aquí, *Dmrt1* inicialmente se expresaría en bajos niveles independiente de temperatura y a 26°C regularía positivamente su propia expresión de RNAm. Sin embargo aún

no se sabe con certeza si alguno de los dos mecanismos existe (Kettlewell *et al.*, 2000).

En el pollo, por medio de hibridación *in toto*, *Dmrt1* se detectó a un nivel mayor en gónadas de embriones machos comparada con gónadas femeninas antes y durante la diferenciación gonadal y desaparece posteriormente en las hembras. Raymond y colaboradores (1999b) detectaron la expresión de *Dmrt1* también en los conductos de Wolf cuando se esta formando la cresta urogenital, pero el equipo de Shan y colaboradores (2000) usando northern blot e hibridación *in toto*, solo lo detectaron en la gónada. Estos datos también concuerdan con nuestros datos ya que en *L. olivacea* también se expresa en niveles mayores a TM que a TF. Aunque en el pollo, por su localización en el cromosoma Z, se le ha vinculado como el factor determinante del sexo en las aves. Se postula que en los machos que poseen dos cromosomas Z hay dos copias de *Dmrt1* necesarias para la formación del testículo y que en las hembras con un cromosoma Z, con una sola copia o con la acción de genes ligados al cromosoma W, se induce la diferenciación ovárica (Nanda *et al.*, 1999).

Por esta razón, *Dmrt1* podría ser el factor regulador temprano en la vía de determinación del sexo en las aves, ya que es el único gen regulador masculino que ha sido localizado en los cromosomas sexuales de las aves y es posible que haya sido reclutado como un factor regulador temprano en la vía de determinación sexual (Shan *et al.*, 2000).

Por otra parte, Hori y colaboradores (2000) encontraron una forma alterada del gen *PKCIW*, inhibidor de la proteinasa C, que se localiza en el cromosoma W, al cual designaron como *Wpkci*, O'Neill y colaboradores (2000) se refieren al mismo gen como *ASW* (Avian Sex-specific W-linked). Este gen también se encuentra en una copia en el cromosoma Z. Se expresa en la cresta urogenital femenina previo a la diferenciación sexual, con mayores niveles en la cresta que

en el mesonefros. Se detecta con mayor expresión en la médula comparado con la corteza del ovario en desarrollo, aunque disminuye en etapas posteriores (Revisado por Ellegran H. 2001). En contraste con *Dmrt1*, este gen también se expresa en varios tejidos de los pollos femeninos adultos, por esta razón *Dmrt1* continúa siendo un fuerte candidato como el determinante sexual en aves, además de que también está conservado en su localización en el cromosoma Z de otras tres aves galliformes (Nanda *et al.*, 2000).

Correlacionando el patrón de expresión de *Dmrt1* con los periodos de desarrollo embrionario de *L. olivacea*, se sugiere que *Dmrt1* no participa en la determinación sexual femenina de *L. olivacea* ya que continúa su expresión después de que los embriones incubados a TF están comprometidos (etapa 25-26) a seguir la vía de diferenciación hacia ovario, pero sí participa en la determinación sexual masculina que están comprometidos hacia la vía masculina en la etapa 24-25 además, el aumento en la expresión de *Dmrt1* ocurre durante el PST, lo que sugiere que la expresión de *Dmrt1* es regulada por la temperatura como en *A. mississippiensis* y *T. scripta*.

En cuanto a la comparación del patrón de expresión de *Dmrt1* con *Sox9* en nuestro estudio se encontró un patrón muy similar en contraste con los reportes en el pollo, cocodrilo y la tortuga *T. scripta* donde *Dmrt1* precede la expresión de *Sox9*. En los embriones incubados a TM ambos genes se expresaron en todas las etapas analizadas, pero el nivel de expresión de *Dmrt1* fue mayor que el nivel de *Sox9*.

Por otro lado, el gen *Dax1*, otro gen identificado en *L. olivacea*, mantiene su expresión en las gónadas, en niveles semejantes en todas las etapas estudiadas a TF. A TM disminuye en la etapa 26, cuando ya está determinado el testículo, lo que sugiere que *Dax1* participa en la diferenciación del ovario en esta especie (Torres Maldonado, 2001b).

Los resultados en *L. olivacea* apoyan la hipótesis de una implicación importante para *Dmrt1* en la determinación y/o diferenciación testicular en los vertebrados.

Los hallazgos presentados anteriormente sugieren que aunque las vías de determinación del sexo han experimentado cambios evolutivos, en particular los factores reguladores tempranos, algunos genes reguladores tardíos como *Dmrt1* están altamente conservados en sus funciones en diferentes vías de la diferenciación sexual. Los genes reguladores tempranos en los cromosomas sexuales son esenciales para disparar una cascada de interacciones que involucran diferentes genes ligados al sexo y genes autosómicos que gobiernan el desarrollo de los órganos reproductores y las características sexuales secundarias. Esto concuerda con el punto de vista de que son más tolerados los cambios al inicio de la cascada génica que en niveles inferiores (Marin y Baker, 1998) y es posible que en las aves, *Dmrt1* haya sido reclutado como un factor regulador temprano en la vía de determinación sexual (Shan *et al.*, 2000).

## X. CONCLUSION

- ▼ Las diferencias en los niveles de expresión del gen *Dmrt1* por efecto de la temperatura anteceden a las diferencias del gen *Sox9*. El nivel de *Dmrt1* es mayor a TM cuando el de *Sox9* es similar a las dos temperaturas. Esto sugiere que el gen *Dmrt1* pudiera participar en la inactivación del gen *Sox9* a TF.

**XI. BIBLIOGRAFÍA**

- Baillie J.** y Groombridge B. 1996. IUCN red list of threatened animals. Gland, Switzerland: IUCN, 369 pp.
- Baker, B.S.** y Ridge K.A. (1980). Sex and the single cell: I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 94 (2): 383- 423.
- Bull J.J.** (1980). Sex determination in reptiles. (1980). *The Quarterly Review of Biology* Marzo; 55 (1): 3-21.
- Bull J.J.,** Gutzke W.H.N. y Crews D. (1988). Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 425-428.
- Bull J.J.** y Vogt R.C. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *J. Exp. Zool.* 218(3):435-40.
- Chomczynski P.** y Sacchi N. (1987). Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction: *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Coschigano K.T.** y Wensink P.C. (1993). Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. *Genes and development* 7: 42-54.
- Crews D.** y Bergeron J.M. (1994). Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature sex determination. *J. Endocrinology* 143, 279-289.
- Crews D.,** Bergeron J.M., Bull J.J., Flores D., tousignant A., Skipper J.K. y Wibbels T. (1994). Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Developmental genetics* 15: 297-312.
- Crews D.,** Wibbels T., y Gutzke W.H.N. (1989). Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 159-166.
- Dalrymple G.H.,** Hampp J.C. y Wellins D.J. (1985). Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *J. Herpetol.* 19: 158-159.

- De Grandi A.**, Calvari V., Bertini V., Bulfone A., Peverali G., Camerino G., Borsani G. y Guioli S. (2000) The expression pattern of a mouse *doublesex*-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mechanisms of Development* 90: 323-326.
- Desvages G.**, Girondot M. y Pieau C. (1993). Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *General and comparative endocrinology* (92):54-61.
- Dorizzi M.**, Mignot T.M. Guichard A. Desvages C. y Pieau C. (1991). Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation* 47: 9-17.
- Ellegren H.** (2001). Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z on W? *EMBO Reports* 2 (3): 192-196.
- Erdman S.E.** y Burtis K.C. (1993). The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *The EMBO Journal* 12 (2): 527-535.
- Fleming A.**, Wibbels T., Skipper J.K. y Crews D. (1999). Developmental Expression of Steroidogenic Factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology* 116: 336-346.
- Foster J.W.**, Dominguez-Steglich M.A., Guioli S., Kwok C., Weller P.A. Stevanovic M., Weisenbach J., Mansour S., Young I.D. y Goddellow P.N. (1994). Campomelic Dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in a SRY-related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1927-1931.
- Gahr M.** Wibbels T. y Crews D. (1992). Sites of estrogen uptake in embryonic *Trachemys scripta*, a turtle with a temperature-dependent sex determination. *Biol. Reprod.* 46: 458-463.
- Guijunn G.**, Kobayashi T. y Nagahama Y. (2000). Sexually dimorphic expression of two types of DM (*Doublesex/Mab-3*)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272: 662-666.
- Gutierrez-Ospina G.**, Jiménez-Trejo F.J., Favila R., Moreno-Mendoza N., Granados-Rojas L., Barrios F.A., Díaz-Cintra S. y Merchant-Larios H. (1999) Acetylcholinesterase-positive innervation is present at undifferentiated stages of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos gonads: implications for temperature-dependent sex determination. *Journal of Comparative Neurology* 410: 90-98.

- Gutzke W.H.N.** y Chymiy D.B. (1988). Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 265-267.
- Kent J.**, Wheatley SC., Andrews JE., Sinclair AH y Koopman P. (1996). A male-specific role for *Sox9* in vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813-2822.
- Kettlewell J.R.**, Raymond C.S. y Zarkower D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* 26: 174-178.
- Koopman P.**, Münsterberg A., Capel B., Vivian N. y Lovell-Badge R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 380: 450-452.
- Kost T.A.**, Theodorakis N. y Hughes S.H. (1983) The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acid Research* 11: 8287-8301.
- Kumar, S.**, Tamura, K. y Nei, M. (1993). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park. PA 16802. 130p.
- Lance, V.A.** y Bogart M.H. (1994) Studies on sex determination in the american alligator. *The Journal of Experimental Zoology* 270: 79-85.
- Marchand O.**, Govoroun M., D'Cotta H., McMeel O., Lareyre J., Bernot A., Laudet V. y Guiguen Y. (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1493: 180-187.
- Marin I.** y Baker B.S. (1998) The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* 281: 1990-1994.
- Márquez R.** (1996). Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Ed. La ciencia desde México. 144: 113-114.
- Márquez, R.** (1976). Reservas naturales para la conservación de las tortugas marinas. Instituto Nacional de Pesca, México.
- Merchant-Larios H.** y Villalpando I. (1990). Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: an organ culture study. *The Journal of Experimental Zoology* 254: 327-331.

- Merchant-Larios H., Ruiz-Ramírez S., Moreno-Mendoza N. y Marmolejo-Valencia A. (1997).** Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea* General and Comparative Endocrinology 197: 373-385.
- Merchant-Larios H., Villalpando F.I. y Centeno U.B. (1989).** Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. Herpetological Monographs 3: 43-61.
- Miller J.D. (1985).** Embriology of marine turtles. En: Biology of the reptilia. Gans C., Billet F., Maderson PF. Eds. Wiley, New York; 14: 270-328.
- Miller J.D. y Limpus C.J. (1980).** Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas*. En Zoological Board of Victoria. Banks CB nad Martin AA. Eds. Proc. Melbourne Herpetological Symp. Victoria.
- Moniot B., Berta P., Scherer G., Südbeck P. y Poulat F. (2000).** Male specific expression suggests role of *DMRT1* in human sex determination. Mechanisms of development 91: 323-325.
- Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A. y Lovell-Badge R. (1996).** Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nature Genetics 14: 62-68.
- Moreno-Mendoza, Harley V.R. y Merchant-Larios H. (1999).** Expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*, at male or female promoting temperatures. Journal of experimental zoology 284: 705-710.
- Moreno-Mendoza, Harley V.R. y Merchant-Larios H. (2001).** Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. Developmental Biology 229: 319-326.
- Morreale S.J., Ruiz G.J., Spotila J.R. y Standora E.A. (1982).** Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. Science 216: 1245-1247.
- Muroya K., Okuyama T., Goishi K., Ogiso Y., Fukuda S., Kameyama J., Sato H., Yoshimi S., Terasaki H., Gomyo H., Wakui K., Fukushima Y. y Ogata T. (2000)** Sex-determining gene(s) on distal 9p: Clinical and molecular in six cases. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85 (9): 3094-3100.

- Nanda I., Shan Z., Scharl M., Burt D-W., Koehler M., Nothwang H-G., Grützner F., Paton I.D. Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T., y Schmid M. (1999).** 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nature genetics* Marzo. 21: 258-259.
- Nanda I., Zend-Ajusch E., Shan Z., Grützner F., Scharl M., Burt D.W., Koehler M., Fowler V.M., Goodwin G., Schneider W.J., Mizuno S., Dechant G., Haaf T. y Schmid M. (2000).** Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)-view on avian sex determination. *Cytogenetics and Cell Genetics* 89: 67-78.
- Parker K. L., Schimmer B. P. y Schedl A. (1999a).** Genes essential for early events in gonadal development. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 831-838.
- Parker K.L., Schedl A. y Schimmer B. P. (1999b).** Gene interactions in gonadal development. *Ann. Rev. Physiol.* 61: 417-433.
- Pritchard P.C.H. y Mortimer J.A. (1999).** Taxonomy, External Morphology, and Species Identification. in *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles.* Eckert K.L., Bjørndal K.A., Abreu-Grobois F.A. y Donnelly M. editores. pag: 21.
- Ramírez J. (1995).** Tortugas marinas en México. *Biodiversitas Año 1 (1) Mayo.* En el Boletín de la Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad (Conabio): 5-8.
- Ramkissoon Y. y Goodfellow P. (1996).** Early steps in mammalian sex determination. *Current Opinion in Genetics and Development* 6: 316-321.
- Raymond C.S. Shamu C.E. Shen M.M., Seifert K.J., Hirsch B., Hodgkin J. y Zarkower D. (1998).** Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* Feb. 391 (12): 691-692.
- Raymond C.S., Kettlewell J.R., Hirsch B., Bardwell V.J. y Zarkower D. (1999b).** Expression of *Dmrt1* in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggest a Role in Vertebrate Sexual Development. *Developmental Biology* 215: 208-220.
- Raymond C.S., Murphy M.W., O'Sullivan M.G. Bardwell V.J. y Zarkower D. (2000).** *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for male differentiation. *Genes and Development* Oct. 15; 14 (20): 2587-2595.

- Raymond C.S.**, Parker E.D., Kettlewell J.R., Brown L.G., Page D.C., Kusz K., Jaruzelska J., Reinberg Y., Flejter W.L., Bardwell V.J., Hirsch B. y Zarkower D. (1999a). A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Human Molecular Genetics* 8 (6): 989-996.
- Rhen T.** y Lang J.W. (1994). Temperature-dependent sex determination in the Snapping Turtle: Manipulation of the Embryonic Sex Steroid Environment. *General and Comparative Endocrinology* 96: 243-254.
- Rimblot F.**, Fretey J., Mrosovsky N., Lescure J. y Pieau C. (1985). Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea turtle *Dermodochelys coriacea* (Vandelli, 1761) *Amphibia-Reptilia* 6: 83-92.
- Salame-Méndez A.**, Herrera-Muñoz J., Moreno-Mendoza N. y Merchant-Larios H. (1998). Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *The Journal of experimental Zoology* 280: 304-313.
- Shan Z.**, Nanda I., Wang Y., Schmid M., Vorkamp A. y Haaf T. (2000). Sex-specific expression of an evolutionary conserved male regulating gene, *DMRT1*, in birds. *Cytogenetics and cell genetics* 89: 252-257.
- Shen M.M.** y Hodgkin J. (1988). *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell Sep*; 54 (23): 1119-1031.
- Smith C.A.**, McClive P.J., Western P.S., Reed K.J. y Sinclair A.H. (1999b). Conservation of a sex-determining gene. *Nature Dic.* 402 (9): 601-602.
- Smith, C.A.**, Matthijs J.S. y Sinclair A.H. (1999a). Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234: 395-402.
- Spotila L.D.**, Spotila J.R. y Hall S. (1998). Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared Slider turtle, *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Zoology* 281: 417-427.
- Swain A.** y Lovell-Badge R. (1999). Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes and Development* Abril 1; 3(17): 755-767.
- Swain A.**, Zanaria E., Hacker A., Lovell-Badge R. y Camerino G. (1996). Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genetics* 12: 404-409.
- Swain A.**, Narvaez V., Burgoyne P., Camerino G., y Lovell-Badge R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.

- Takamatsu N.**, Kanda H., Ito M., Yamashita S. y Shiba T. (1997). Rainbow trout Sox9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene* 202:167-170.
- Torres-Maldonado L.**, Moreno-Mendoza N., Landa A. y Merchant-Larios H. (2001a). Timing of Sox9 downregulation and female sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of experimental zoology* 290: 498-503.
- Torres Maldonado L. C.** (2001b). Aspectos moleculares involucrados en la determinación del sexo por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. Tesis de doctorado. UNAM.
- Uwanogho D.**, Rex M., Carwright E.J., Pearl G., Scotting P.J. y Sharpe P.T. (1996). Gene Bank accession U12533. *Gallus gallus* Sox9 transcription factor (Sox9) mRNA, complete cds. 3 oct.
- Vaiman D.** y Pailheux E. (2000). Mammalian sex reversal and intersexuality. *TIG* November.16 (11): 488-494
- Veitia R.**, Nunes M., Brauner R., Doco-Fenzy M., Joanny-Flinois O., Jaubert F., Lortat-Jacob S., Fellous M. y McElreavey K. (1997). Deletions of distal 9p associated with 46, XY male to female sex reversal: Definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1 *Genomics* 41: 271-274.
- Western P.S.**, Marshall-Graves J.A. y Sinclair A.H. (1999). Temperature-dependent sex determination: Upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Developmental Dynamics* 214: 171-177.
- Western P.S.**, Harry J.L., Marshall-Graves J.A. y Sinclair A.H. (2000). Temperature-dependent sex determination in the american alligator: expression of *SF1*, *WT1* and *Dax1* during gonadogenesis. *Gene* 241: 223-232.
- Wibbels T.** Bull J.J. y Crews D. (1991). Synergism of temperature and estradiol: A common pathway in sex determination? *Jour. Exp. Zool.* 269: 130-134.
- Wibbels T.** y Crews D. (1992). Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *J. Endocrinol.* 133: 121-129.
- Wright E.**, Hargrave M.R., Christiensen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gandharan U., Greenfield A., y Koopman P. (1995). The *Sry*-related gene *Sox9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature genetics* 9:15-29
- Yntema C.L.** y Mrosovsky N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Can. J. Zool.* 60 (5): 1012-1016.

## XII. ANEXO 1

Alineación de secuencias de aminoácidos de la proteína de DMRT1

**Dmrt1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1)****Homo sapiens.** Completa.**Mus musculus.** Completa.**Gallus gallus.** Parcial.**Alligator mississippiensis.** Parcial.**Trachemys scripta.** Parcial.**Lepidochelys olivacea.** Parcial.

Humano	MPNDEAFSKPSTPSEAPHAPGVPPQGRAGGF GKASGALVGAASGSSAGGS
Ratón	MPNDDTFGKPSTPTEVPHAPGAPPQ GKAGGYSKAAGAMAGAAGGSGAGGS

Humano	SRGGGSGSGASDLGAGSKKSPRLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFRCMWRDC
Ratón	--GGASGSGPSGLGSGSKKSPRLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFRCMWRDC
Pollo	PGAG-KKLPRLPKCARCRNHGYSSPLKGHKRFRCMWRDC
Trachemys	GHKRFRCMWRDC

Humano	QCKKCNLIAERQRMVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAAELLVKRE
Ratón	QCKKCSLIAERQRMVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAAELLVKRE
Pollo	QCKKCSLIAERQRMVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPVPLPSAPEPVVKK-
Cocodrilo	SLIAERQRMVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSATEL FVKKE
Trachemys	QCKKCSLIAERQRMVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPKLFVKKE
L. olivacea	QVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPEL FVKKE

Humano	NNGSNPCLMTECSG-TSQPPASVPTTAAS-EGRMVIQDIPAVTSRGHVE
Ratón	NNASNPCLM AENSS-SAQPPASTPTPAAS-EGRMVIQDIPAVTSRGHME
Pollo	SSSSSSCLLQDSSSPAHSTSTVAAAAASAPPEGRMLIQDIPSITSRGHLE
Cocodrilo	NSGGSSCLLLESSSPHSTSTVTTVSTSPS-EGRMLIQDVPSITSRGHLE
Trachemys	NNGGSSCLLLESSSPHSTSTNTATTASTTPS-EGRMLIQDIPSITSRGHLE
L. olivacea	TNGGSSCLLLENSSPHSTSTNTATTASTTPS-EGRMLIQDIPSITSRGHLE

Humano	NTPDLVSDSTYYSSFYQPSLFPYNNLYNCPQYSMALAADSASGEVGNPL
Ratón	NTSDLVSDPAYYSSFYQPSLFPYNNLYNYPQYSMALSAESSS GEVGNPL
Pollo	STSDLVSDSTYYSSFYQPSLYPYNNLYNYSQYQMAVATESSSSETGGTF
Cocodrilo	STSDLV
Trachemys	STSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYNNLYNYSQYQMAVASDSSSSDMGGTL
L. olivacea	STSDLVVDSTYYSSFYQPSLYPYNNLYNYSQYQMAVA SESSSSDMGGTL

Humano **GGSPVKNSLRGLPGPYVPGQTGNQWQ**MKNMENRHAMSSQYRMHSYYP  
 Ratón **GGSPVKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQ**MKTSESRHPVSSQYRMHSYYP  
 Pollo **VGSAMKNSLRSLPATYMSQS****SGKQWQ**MKGMENRHAMSSQYRMCSYYP  
 Trachemys **AGSPVKNSLRSLPATYMSQS****SGNQWQ**MKSTESRHAMSSQYRMHSY  
 L.olivacea **VGSPVKNSLRSLPATYMSQS****SGNQWQ**

Humano YLGQSVP-----QFFTFEDAPSYPEARASVFSPSSQDSGLVSLSSSSP  
 Ratón YLGQSMS-----QILTFEEGPSYSEAKASVFSPSSQDSGLVSLSSSSP  
 Pollo YLGQGVGSPTCVTQILASEDTPSYSESKARVFSPPSSQDSGLGCLSS--

Humano ISNKSTKAVLECEPAS-EPSSFTVTPVIEEDE--  
 Ratón MSNESSKGVLECESESASSEPSYAVSQVLEEDEDE  
 Pollo ---ESTKGDLECEPHQ-EPGAFVSPVLEGE---

El dominio DM esta subrayado y el fragmento amplificado en negritas.



ACADEMIC  
PRESS

General and Comparative Endocrinology xxx (2002) xxx-xxx

GENERAL AND COMPARATIVE  
ENDOCRINOLOGY

www.academicpress.com

## 2 Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* during temperature 3 sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*

4 L.C. Torres Maldonado,<sup>a</sup> A. Landa Piedra,<sup>b</sup> N. Moreno Mendoza,<sup>a</sup>  
5 A. Marmolejo Valencia,<sup>a</sup> A. Meza Martínez,<sup>a</sup> and H. Merchant Larios<sup>a,\*</sup>

6 <sup>a</sup> Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria, UNAM Apartado Postal 70228, C.P. 04510  
7 México, DF, Mexico

8 <sup>b</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City C.P. 04510, Mexico

9 Accepted 20 August 2002

### 10 Abstract

11 Sex determination is controlled either by genetic or environmental factors. In mammals *Sry* initiates determination but no  
12 homologue of this gene exists in non-mammalian species. Other genes of the mammalian sex-determining pathway have been  
13 identified in gonads of different vertebrates. *Sox9*, *Dax1*, and *Dmrt1* are expressed at the onset of gonadal development in birds and  
14 reptiles. In the sea turtle *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination (TSD), *Sox9* is expressed in undif-  
15 ferentiated gonads at male- (MPT) or female-promoting temperatures (FPT). At MPT, *Sox9* remains expressed in male gonads, but  
16 at FPT it is downregulated coinciding with the onset of the ovarian morphologic differentiation and female sex determination. At  
17 MPT however, male sex is determined early than at FPT in still undifferentiated gonads suggesting that other genes maintain *Sox9*  
18 expression in testis. Here we used RT-PCR to study the expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* in gonads of embryos of *L.*  
19 *olivacea* incubated at MPT or at FPT. The profiles were correlated with sex determination during and after the temperature-sensitive  
20 period (TSP). *Dax1* maintained similar levels at both temperatures during the TSP. The *Dax1* expression level increased significantly  
21 in ovaries compared to testes at stage 27, once they were morphologically distinct. The expression levels of *Dmrt1* were higher at  
22 MPT than at FPT at all stages, in contrast with *Sox9* levels which were similar at both temperatures at stages 23–25. Together,  
23 current results suggest that, whereas *Dax1* is not involved in TSD in *L. olivacea*, upregulation of *Dmrt1* and downregulation of *Sox9*  
24 may play a role in male and female sex determination, respectively.  
25 © 2002 Published by Elsevier Science (USA).

26 **Keywords:** Temperature sex-determination (TSD); *Dmrt1*; *Dax1*; *Sox9*

### 27 1. Introduction

28 Vertebrates exhibit at least three different sex-deter-  
29 mining mechanisms. Whereas in mammals the male is  
30 the heterogametic sex (X or Y sperms), in birds the  
31 heterogametic sex is the female (Z or W oocytes). The  
32 third mechanism is found in several species of reptiles  
33 lacking sex chromosomes. In these species, temperature  
34 determines sex at a critical stage of development (Bull,  
35 1980).

In mammals sex determination depends of the gene 36  
*Sry* (Koopman et al., 1991; Sinclair et al., 1990). In birds 37  
and reptiles no *Sry* homologue has been found, but 38  
homologues of several other mammalian sexual genes 39  
have been identified (Smith et al., 1999a; Spotila et al., 40  
1998; Western et al., 1999). Among them *Dax1* has been 41  
studied in several vertebrates. *Dax1* encodes an atypical 42  
member of the nuclear receptor family that retains the 43  
conserved ligand-binding motif but lacks the zinc-finger 44  
DNA-binding motif (Zanaria et al., 1994). In the mouse, 45  
*Dax1* expression has been detected during the first stages 46  
of gonadal and adrenal development, its expression 47  
persists in the developing ovary but decreases in the 48  
testis coinciding with *Sry* activation and testis differen- 49  
tiation (Swain et al., 1996). *Dax1* gene homologues have 50

\* Corresponding author. Fax: +525-5622-3897.

E-mail address: merchant@servidor.unam.mx (H. Merchant Larios).

51 been found in the chicken (Smith et al., 1999a; Smith  
52 and Sinclair, 2001) and in *Alligator mississippiensis*, a  
53 species with temperature sex-determination (TSD)  
54 (Western et al., 2000). Although in the two latter species  
55 it was found that *Dax1* is expressed in embryonic gonads  
56 of both sexes, its levels were not determined.

57 On the other hand, *Dmrt1* encodes a transcription  
58 factor with a DM domain, a DNA-binding domain  
59 identified in the sexual regulators of *Drosophila melano-*  
60 *gaster* (double sex) (Erdman and Burtis, 1993) and  
61 *Caenorhabditis elegans* (mab-3) (Raymond et al., 1998).  
62 DM domain genes have been implicated in sexual de-  
63 velopment in vertebrates as well. Expression of *Dmrt1*  
64 is sexually dimorphic in mouse, chicken, alligator, and  
65 red-eared slider turtle. In mouse embryos, *Dmrt1* is ex-  
66 pressed in early genital ridges of both sexes and then  
67 increases in testis but decreases in ovaries (Raymond et  
68 al., 1999). In the chicken, the *Dmrt1* gene is found on the  
69 Z chromosome, suggesting that two doses of *Dmrt1*  
70 might be necessary for testis development, whereas a  
71 single copy may lead to female sexual differentiation  
72 (Nanda et al., 1999). In addition, the *Dmrt1* gene shows  
73 double gonad-specific expression in developing male  
74 gonads, compared with female gonads; this difference is  
75 evident before and during the time of gonadal sex dif-  
76 ferentiation (Raymond et al., 1999; Smith et al., 1999b).  
77 In the alligator, *Dmrt1* gene expression is initially de-  
78 tectable by RT-PCR in the urogenital systems of em-  
79 bryos incubated at both male- (MPT) and female-  
80 promoting (FPT) temperatures. However, gonadal ex-  
81 pression subsequently became higher in male embryos  
82 than in female embryos (Smith et al., 1999b). In the  
83 fresh water turtle *Trachemys scripta*, *Dmrt1* expression is  
84 higher at MPT than at FPT during the thermosensitive  
85 period (TSP) (Kettlewell et al., 2000).

86 The *Sry*-related gene *Sox9* is upregulated in male  
87 gonads of mouse and chicken (Kent et al., 1996; Morais  
88 Da Silva et al., 1996). In reptiles lacking sexual chro-  
89 mosomes, the *Sox9* gene is also upregulated in male  
90 gonads. Three species with TSD have been studied: the  
91 red-eared slider turtle *T. scripta* (Spotila et al., 1998), the  
92 American alligator *A. mississippiensis* (Western et al.,  
93 1999), and the Olive ridley *L. olivacea* (Moreno-Men-  
94 doza et al., 1999).

95 In *L. olivacea* the MPT are 26–27°C and the female  
96 promoting FPT are 32–33°C, the TSP occurs between  
97 stages 21 and 26 (Merchant-Larios et al., 1997). In this  
98 species, *Sox9* expression in the gonads is regulated by  
99 temperature: whereas it is expressed in both MPT and  
100 FPT at stages 21–25, it is downregulated at FPT from  
101 stage 26 and onwards (Moreno-Mendoza et al., 1999).  
102 Shifting embryos or isolated gonads from MPT to FPT  
103 revealed that *Sox9* downregulation occurs at the onset  
104 of morphological differentiation of the ovaries in vivo  
105 (Torres-Maldonado et al., 2001) and in vitro (Moreno-  
106 Mendoza et al., 2001). Although shifting experiments

107 showed that downregulation of *Sox9* coincides with fe-  
108 male sex determination, male determination occurs one  
109 or two stages earlier, when this gene is expressed in  
110 gonads of embryos incubated at both temperatures.  
111 Thus, it is reasonable to postulate that other gene(s)  
112 placed upstream of *Sox9* respond earlier to sex-deter-  
113 mining temperature in *L. olivacea*.

114 In the present work, we used RT-PCR to make the  
115 mRNA expression profiles of *Dax1* and *Dmrt1* in go-  
116 nads of *L. olivacea* during and after the TSP and com-  
117 pared these profiles with the expression profile of *Sox9*.  
118 The results were correlated with sex determination in  
119 this species.

## 120 2. Materials and methods

### 121 2.1. Embryos

122 Freshly laid eggs of *L. olivacea* (olive ridley) were  
123 collected at La Escobilla beach on the Pacific Coast of  
124 Oaxaca, Mexico (96°27'16"W, 15°40'36"N). The eggs  
125 were transported to the laboratory in Mexico City and  
126 incubated at 26°C (MPT) or at 33°C (FPT). Embryos  
127 were sampled at stages 23–28 and at hatching according  
128 with Miller's criteria, 1985. All protocols described were  
129 approved by local animal rights committees of the Sec-  
130 retary for Environment and Natural Resources  
131 (SEMARNAT) and the National Autonomous Uni-  
132 versity of Mexico.

### 133 2.2. Total RNA isolation and RT-PCR

134 Urogenital complexes were dissected out from em-  
135 bryos incubated at 26°C (MPT) or at 33°C (FPT).  
136 Gonads were separated from the adjacent mesonephros  
137 and frozen in an Eppendorf tube in variable numbers  
138 depending on the development stage: Four gonads at  
139 stage 23 (2 embryos); two gonads at stage 24, (1 em-  
140 bryo), and one gonad at stages 25–31, (1 embryo each).  
141 Experiments were repeated five times for each stage.

142 Gonadal tissue was frozen and stored at -70°C.  
143 Total RNA was prepared homogenizing the tissue in  
144 100 µl Trizol reagent (Life Technologies Invitrogen) and  
145 50 µl chloroform was added. The aqueous phase was  
146 precipitated in 150 µl isopropanol at 4°C overnight. The  
147 RNA pellet was rinsed in 75% ethanol and resuspended  
148 in 12 µl DEPC-treated ddH<sub>2</sub>O and immediately used for  
149 RT-PCR. Reverse transcriptase-polymerase chain reac-  
150 tion (RT-PCR) amplifications were performed using two  
151 degenerated primers designed from conserved amino  
152 acid sequences of DAX1 protein from *A. mississippiensis*  
153 (Western et al., 2000), *G. galus* (Smith et al., 1999a), *M.*  
154 *musculus* (Swain et al., 1996), and *H. sapiens* (Guo et al.,  
155 1996). The sense primer was *Dax1*-1: 5'-ACC AAG  
156 GAG TAC/T GCA/C/T/G TACT CT-3', the antisense

157 primer was *Dax1*-2: 5'-TCC AGA/CT/G AGC ATA/G  
158 TCA/G TCC AT-3', this primer amplifies a 271-bp  
159 fragment. For the *Dmrt1* gene we used the previously  
160 reported primers: JK41: 5'-CGC AGG TTG CAT TGA  
161 GAA GGC AGC-3' (sense), JK42: 5'-TCT GCC ATT  
162 GGT TTC CTG ATT GGC-3' (antisense) (Kettlewell et  
163 al., 2000), these primers amplify a 473-bp fragment. For  
164 expression control, amplification of  $\beta$ -actin mRNA was  
165 performed using the following primers: Actin 1: 5'-TGG  
166 ATG ATG ATA TTG CTG C-3' (sense), Actin 2: 5'-  
167 ATC TTC TCC ATA TCA TCC CA-3' (antisense) (Kost  
168 et al., 1983). The actin primers produce a 252-bp frag-  
169 ment.

170 RT-PCR reactions were carried out by means of the  
171 One Step RT-PCR Kit (Life Technologies Invitrogen),  
172 using 3  $\mu$ l total RNA per reaction, 1 $\times$  buffer reaction  
173 mix containing 0.2 mM of each dNTP, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>,  
174 and 0.2  $\mu$ M  $\beta$ -actin primers or 0.3  $\mu$ M of *Dax1* or *Dmrt1*  
175 primers in separate tubes, in a total volume of 20  $\mu$ l. All  
176 reactions for *Dmrt1* contained 6% DMSO. cDNA syn-  
177 thesis was performed at 50 °C for 30 min and ampli-  
178 fication conditions were: 94 °C/5 min (once) for initial  
179 denaturation, 94 °C/30 s for denaturation, 56 °C ( $\beta$ -ac-  
180 tin) 60 °C (*Dax1*) and 63 °C (*Dmrt1*)/60 s for annealing,  
181 72 °C/60 s for extension (35 cycles), and 72 °C/10 min  
182 (once) for final extension. To confirm that the amplified  
183 products did not come from genomic DNA, we used a  
184 control sample with total RNA without reverse tran-  
185 scriptase and with only *Taq* DNA polymerase in the RT-  
186 PCR experiments. Ten microliters of each RT-PCR re-  
187 action were electrophoresed on a 2.5% agarose gel with  
188 0.1  $\mu$ g/ml ethidium bromide in TAE 1 $\times$  buffer (Sam-  
189 brook and Russell, 2001).

### 190 2.3. Sequences and analysis

191 The identity of the amplified fragments was con-  
192 firmed by automatic sequencing. All sequences were  
193 bidirectionally determined with an ABI PRISM 310  
194 sequencer, based on fluorescent PCR sequencing (Per-

kin-Elmer). All nucleotide sequences were submitted to  
GenBank and the protein sequence was deduced.

Homology analysis of the amino acid sequence  
alignments of *L. olivacea* and other vertebrates was  
performed with MEGA (Molecular Evolutionary Ge-  
netic Analysis) software (Kumar et al., 1993).

### 2.4. Densitometry

Gels were visualized by UV transillumination and  
photographed with a DS-34 Polaroid camera; the in-  
tensity of each band was quantified by densitometry  
using the Scion Image program (Beta 4.0.2. Scion Im-  
age. Copyright 1997-2000 Scion Corporation). The  
semiquantitative results are expressed as arbitrary units  
of the ratio between the mRNA levels of the studied  
gene (*Dax1* or *Dmrt1*) and  $\beta$ -actin. The ratios of the five  
samples analysed per stage were averaged and the means  
( $\pm$ SD) is shown in the graphics. To compare the ex-  
pression profile of the genes *Dax1* and *Dmrt1* with the  
expression profile of *Sox9*, the ratio between *Sox9* and  
 $\beta$ -actin was plotted, using the RT-PCR results of our  
previous paper (Torres-Maldonado et al., 2001).

### 3. Results

The *Dax1* fragment amplified with the pair of oligo-  
nucleotides designed for the present study was identified  
by sequencing (GenBank Accession No. AY077685).  
Table 1 shows the DAX1 amino acid partial sequence  
alignment with the sequence of other vertebrates and the  
comparative identity between them. Amino acid identity  
of the partial sequence of DAX1 of *L. olivacea* with  
other vertebrates is: human 73.07%, mouse 67.7%,  
chicken 90.32%, and alligator 90.13%. The highest  
identity of the Olive ridley was with chicken, and the  
lowest with alligator and mouse (Table 2).

The *Dmrt1* fragment amplified with the pair JK41  
and JK42 oligonucleotides was identified by sequencing  
(GenBank Accession No. AF335421). The nucleotide

Table 1  
Partial Sequence alignment of DAX1 in some vertebrates

Species	GenBank	Sequence <sup>a</sup>
Human	U31929	TKEYAYLEKGTVLVFPDVPGLQCVKEYI QQLQWGTQQILSEHTRMTHQGFPHDRFIE
Mouse	U41568	TKEYAYLEKGTVLVFPDLPGLQCVKEYIE QLQWRTQQILTEHIRMQRREYQIRSAE
Chicken	AF202991	TKEYAYLEKGTVLVFPDLPGLQCTQYIEGLQKEAQEALNEHVRLIHRGDQARFAK
Alligator	AF180295	PKEYAYLEGAVLVFPDLPGLQCTQYIQGLQREAQALNEHVRLIHRGDQARFAK
Olive ridley	AY077685	TKEYAYLEKGT VLVFPDLPGLQCVQYIQGLQREAQALNEHVRLIHRGDQARFAK
Human	U31929	LNSTLFLLRFINANVIA KLFFRPIIGTVSMDDMML
Mouse	U41568	LNLSLFLLRFINSDVVT KLFFRPIIGAVSMDDMML
Chicken	AF202991	LNVLVSLLRFINANVIA KLFFRPIIGTVSMDDMML
Alligator	AF180295	LNIALSLLRSINAE
Olive ridley	AY077685	LNVLVSLLRFINANVIA KLFFRPIIGTVSMDDMML

<sup>a</sup>Identical residues are in bold letters, dashes indicate unknown or absent residues.

Table 2  
DAX1 amino acid sequence identities in some vertebrates

	Identity (%)				
	Human	Mouse	Chicken	Alligator	Olive ridley
Human	100				
Mouse	78.05	100			
Chicken	73.07	72.01	100		
Alligator	67.6	66.17	90.13	100	
Olive ridley	73.07	67.7	90.32	90.13	100

sequence was translated into the amino acid sequence and compared with corresponding sequences of other vertebrates (Table 3). The identity of DMRT1 of *L. olivacea* with other vertebrates is: human 65.26%, mouse 67.38%, chicken 82.27%, alligator 88.89%, and red-eared slider turtle 96.52%. The highest similarity of the Olive ridley was with the red-eared slider turtle and the lowest between chicken and human (Table 4).

Fig. 1A shows the expression of *Dax1* detected by RT-PCR in gonads from embryos at MPT (26 °C) and FPT (33 °C). A 252-bp fragment of  $\beta$ -actin was used as internal expression control. Although the 271-bp fragment of *Dax1* was detected in all samples, its intensity differed. Whereas at stages 23–26 the band intensities were similar at both temperatures, at stage 27 the band intensity showed a clear decrement in gonads from embryos incubated at MPT. The expression profiles of *Dax1* at MPT and FPT showed no significant differences at stages 23–26. Only at stage 27 of FPT a significantly higher expression level of *Dax1* was found (Fig. 1B). The RT-PCR analysis of *Dmrt1* expression is shown in Figs. 2A and B. The 473-bp fragment of *Dmrt1* was detected in gonads of *L. olivacea* at all stages of MPT

(Fig. 2A). At stages 23–25 the band intensities were similar, they increased at stages 26 and 27 and at stages 28 and 31 they were similar to the intensities shown at stages 23–25. In contrast, with FPT the *Dmrt1* fragment was detected only at stages 23–25.

The expression profiles of *Sox9* showed that the levels of expression are similar at both temperatures for stages 23–25. From stage 26 onwards a dramatic fall of expression occurs with FPT (Fig. 3).

The levels of expression of *Dmrt1* showed a profile quite different to the *Dax1* profiles. Although at stage 23 the *Dmrt1* expression levels were not significantly different at MPT and FPT, the levels were significantly higher at MPT than at FPT from stage 24 onwards. At FPT, the low level of mRNA expression of *Dmrt1* decreased at stage 27 and disappeared at stage 31 (Fig. 2C).

The expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* in gonads of embryos incubated at MPT or at FPT are shown in Fig. 1B, Fig. 2C and Fig. 3, respectively. At stages 23–25 the levels of expression of *Dax1* and *Sox9* did not show differences significant in embryonic gonads incubated at both temperatures. At stage 26, however, the expression level of *Sox9* decreased dramatically whereas the level of *Dax1* showed a significant decrease only at stage 27 (Fig. 1B and Fig. 3).

4. Discussion

The similarity of the DAX1 amino acid partial sequence of the Olive ridley with human and mouse was lower than the similarity with chicken and alligator. The

Table 3  
Partial sequence alignment of DMRT1 in some vertebrates

Species	GenBank	Sequence <sup>a</sup>
Human	AF130728	QVALRRQQA <b>Q</b> KKELGISHPI PLPSAAKLLV <b>K</b> RE <b>N</b> NGSNPCLMTECSG-TSQPPASVPTT
Mouse	AF192561	QVALRRQQA <b>Q</b> KKELGISHPI PLPSAAKLLV <b>K</b> RE <b>N</b> NASNPCLMA <b>N</b> SS-SAQPPASTPTP
Chicken	AF123456	QVALRRQQA <b>Q</b> KKELGISHPV PLPSA <b>P</b> EPV <b>V</b> KK-SSSSSCLLQDSSSPAHSTSTVAAAAA
Alligator	AF192560	QVALRRQQA <b>Q</b> KKELGISHPI PLPSA <b>T</b> EL <b>F</b> V <b>K</b> RE <b>N</b> NGSSCLLLESSSP <b>H</b> STSTV <b>T</b> VT <b>V</b> ST
Red-eared <sup>b</sup>	AF201387	QVALRRQQA <b>Q</b> KKELGISHPI PLPSA <b>P</b> EL <b>F</b> V <b>K</b> RE <b>N</b> NGSSCLLLESSSP <b>H</b> STST <b>T</b> ATT <b>A</b> ST
Olive ridley <sup>c</sup>	AF335421	QVALRRQQA <b>Q</b> KKELGISHPI PLPSA <b>P</b> EL <b>F</b> V <b>K</b> RE <b>N</b> NGSSCLLLESSSP <b>H</b> STST <b>T</b> ATT <b>A</b> ST
Human	AF130728	AAS-EGRMV <b>I</b> QDI <b>P</b> AV <b>T</b> SR <b>G</b> H <b>V</b> EN TPDLVSDSTYSSFYQPSL <b>F</b> Y <b>N</b> LY <b>N</b> CPQ <b>Y</b> SMAL
Mouse	AF192561	AAS-EGRMV <b>I</b> QDI <b>P</b> AV <b>T</b> SR <b>G</b> H <b>M</b> EN TSDLVSDPAYSSFYQPSL <b>F</b> Y <b>N</b> LY <b>N</b> YPQ <b>Y</b> SMAL
Chicken	AF123456	SAPPEGRMLIQDIP <b>S</b> IP <b>S</b> RG <b>H</b> LES TSDLVVDSTYSSFYQPSL <b>F</b> Y <b>N</b> LY <b>N</b> YSQ <b>Y</b> QMAV
Alligator	AF192560	SPS-EGRMLIQDVPSIT <b>S</b> RG <b>H</b> LES TSDLVVDSTYSSFYQPSL <b>F</b> Y <b>N</b> LY <b>N</b> YSQ <b>Y</b> QMAV
Red-eared	AF201387	TPS-EGRMLIQDIP <b>S</b> IT <b>S</b> RG <b>H</b> LES TSDLVVDSTYSSFYQPSL <b>F</b> Y <b>N</b> LY <b>N</b> YSQ <b>Y</b> QMAV
Olive ridley	AF335421	TPS-EGRMLIQDIP <b>S</b> IT <b>S</b> RG <b>H</b> LES TSDLVVDSTYSSFYQPSL <b>F</b> Y <b>N</b> LY <b>N</b> YSQ <b>Y</b> QMAV
Human	AF130728	AADSASG <b>E</b> V <b>G</b> NSL <b>G</b> GS <b>P</b> V <b>K</b> NSLR GLPGPYV <b>P</b> Q <b>T</b> Q <b>G</b> Q <b>W</b> Q
Mouse	AF192561	SAESSSG <b>E</b> V <b>G</b> NSL <b>G</b> GS <b>P</b> V <b>K</b> NSLR SLPAPYV <b>P</b> Q <b>T</b> Q <b>G</b> Q <b>W</b> Q
Chicken	AF123456	ATSSSS <b>E</b> FG <b>G</b> T <b>F</b> V <b>G</b> SA <b>K</b> NSLR SLPATY <b>M</b> SS <b>Q</b> B <b>K</b> Q <b>W</b> Q
Red-eared	AF201387	ASDSSSD <b>M</b> GG <b>T</b> L <b>A</b> GS <b>P</b> V <b>K</b> NSLR SLPATY <b>M</b> SS <b>Q</b> B <b>K</b> Q <b>W</b> Q
Olive ridley	AF335421	ASSSSSD <b>M</b> GG <b>T</b> L <b>V</b> GS <b>P</b> V <b>K</b> NSLRSLP <b>A</b> TY <b>M</b> SS <b>Q</b> B <b>K</b> Q <b>W</b> Q

<sup>a</sup> Identical residues are in bold letters, dashes indicate unknown or absent residues.  
<sup>b</sup> *Trachemys scripta*.  
<sup>c</sup> *Lepidochelys olivacea*.

Table 4  
DMRT1 amino acid sequence identities in some vertebrates

	Identity (%)						
	Human	Mouse	Chicken	Alligator	Red-eared	Olive ridley	
Human	100						
Mouse	85.98	100					
Chicken	59.32	62.17	100				
Alligator	62.94	62.94	79.56	100			
Red-eared <sup>a</sup>	65.96	65.96	80.86	90.12	100		
Olive ridley <sup>b</sup>	65.26	67.38	88.89	88.89	96.52	100	

<sup>a</sup> *Trachemys scripta*.

<sup>b</sup> *Lepidochelys olivacea*.



Fig. 1. Expression of *Dax1* mRNA analysed by RT-PCR and densitometry. (A) Representative agarose gel electrophoresis of gonads from embryos incubated at MPT or FPT. Total RNA from gonads at stages 23-27 (lines 23-27) was used.  $\beta$ -actin served as reference of the loading amount of total RNA for each stage. (B) Expression profiles showing the *Dax1*/ $\beta$ -actin ratio in gonads incubated at MPT ( $\square$ ) or FPT ( $\Delta$ ) sampled at stages 23-27.

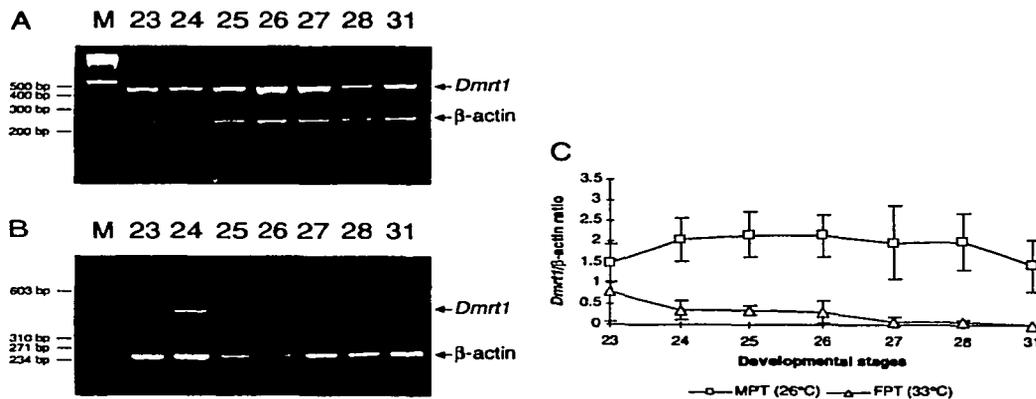


Fig. 2. Expression of *Dmrt1* mRNA analysed by RT-PCR and densitometry. Total RNA from gonads at stages 23-31 (lanes 23-31) of development at MPT (A) or FPT (B).  $\beta$ -actin was used as reference. (C) The expression profiles of transcript levels quantified by densitometry are expressed as *Dmrt1*/ $\beta$ -actin ratio per stage of development (23-31) at MPT ( $\square$ ) or FPT ( $\Delta$ ).

299 greatest similarity when all vertebrates were compared  
300 was between *L. olivacea* and chicken with 90.32%, the  
301 lowest between alligator and mouse with 66.17%. The *L.*  
302 *olivacea* DAX1 appeared to be closer to chicken and

alligator DAX1. However, current results suggest that  
the similarity of DAX1 between different groups of  
vertebrates is low. *Dax1* is X-linked in human and  
mouse (Zanaria et al., 1994; Swain et al., 1996), but is

303  
304  
305  
306

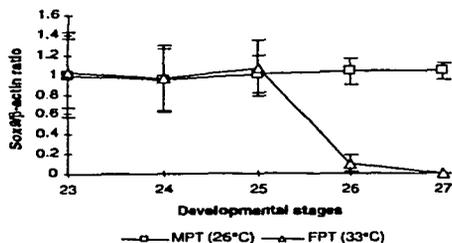


Fig. 3. Profile levels of expression of *Sox9* analysed by densitometry. Results are shown as *Sox9*/β-actin ratio analysed in gonads incubated at MPT (□) or FPT (Δ) at stages 23–27.

307 autosomic in marsupials (Pask et al., 1997). Its chromo-  
308 somal localization in chicken, alligator, and Olive  
309 ridley are still unknown.

310 The role of *Dax1* during gonadal development ap-  
311 pears to be diverse in different groups of vertebrates. In  
312 mouse, *Dax1* expression is detected early in male and  
313 female gonads and is downregulated in males (Swain et  
314 al., 1996). Strains of transgenic mice carrying weak al-  
315 leles of *Sry* together with extra copies of *Dax1* can show  
316 male to female sex reversal suggesting that *Dax1* acts as  
317 an “antitestis” factor antagonizing *Sry* function (Swain  
318 et al., 1998). In the chicken, however, *Dax1* is not  
319 downregulated at the onset of testis differentiation as it  
320 is in the mouse, suggesting that its role is different  
321 among vertebrate species (Smith and Sinclair, 2001).

322 The present data of *Dax1* expression in *L. olivacea*  
323 confirm results obtained in the alligator *A. mississippi-*  
324 *ensis*, a species with a different pattern of temperature  
325 sex determination (Western et al., 2000). *Dax1* expres-  
326 sion was detected during the thermosensitive period  
327 (TSP) with both, MPT and FPT. In *L. olivacea* current  
328 results show that *Dax1* is expressed similarly with both  
329 temperatures at stages 23–26. Significant differences  
330 between samples at FPT and MPT were detected up to  
331 stage 27, one or two stages after female or male sex  
332 determination, respectively (Merchant-Larios et al.,  
333 1997). Assuming that sex-specific levels of gene expres-  
334 sion during the TSP are directly related to sex determi-  
335 nation, the fact that significant differences of *Dax1*  
336 expression were found after the TSP, suggests that this  
337 gene is not involved in TSD in this species. One may  
338 speculate that *Dax1* in *L. olivacea* may be related to  
339 functional differences between ovaries and testes as  
340 suggested in other species (Yu et al., 1998).

341 The similarity between DMRT1 amino acid partial  
342 sequence of *L. olivacea* with human and mouse is lower  
343 than with chicken, alligator, and the red-eared slider  
344 turtle. The highest similarity comparing the studied  
345 vertebrates is between the Olive ridley and the chicken  
346 with 90.32%, the lower is found between the alligator  
347 and the mouse with 66.17%.

In mammals, birds, and reptiles, early sex-specific 348  
expression of *Dmrt1* in gonads suggests its possible role 349  
in sex determination (Kettlewell et al., 2000; Nanda et 350  
al., 1999; Raymond et al., 1998; Raymond et al., 1999; 351  
Raymond et al., 2000). In two species with TSD, the 352  
American alligator and the red-eared slider turtle, sex- 353  
specific *Dmrt1* expression precedes *Sox9* expression in 354  
males suggesting that *Dmrt1* may act upstream of *Sox9*. 355

356 Current results in *L. olivacea* show that the levels of  
357 *Dmrt1* expression remain lower at FPT than at MPT as  
358 in *A. mississippiensis* and *T. scripta*. Since this occurs  
359 during and after the TSP, it is clear that *Dmrt1* expres-  
360 sion is regulated by temperature in the three species. As  
361 was previously found, *Sox9* downregulation at stages  
362 25–26 is related to female sex determination in *L. oliv-*  
363 *acea* (Moreno-Mendoza et al., 1999; Torres-Maldonado  
364 et al., 2001). In this species however, testis are com-  
365 mitted at stage 24, when *Sox9* is expressed similarly at  
366 both temperatures. Thus, the higher level of expression  
367 of *Dmrt1* at MPT than at FPT during the TSP supports  
368 the idea that *Dmrt1* may act upstream of *Sox9* main-  
369 taining its expression in male gonads. Furthermore,  
370 the finding that there is a correlation between female sex  
371 determination and downregulation of *Sox9* and low  
372 levels of *Dmrt1* suggest that these two genes are actively  
373 regulated at FPT to allow ovarian commitment and fe-  
374 male sex determination in *L. olivacea*.

#### Acknowledgments

The authors thank José Guadalupe Baltazar and 376  
Miguel Tapia for their technical assistance, José Va- 377  
scancelos and Martha Harfush for their field assistance 378  
under SEMARNAT authorization 031100-213-03, 379  
Martín García for the MEGA analysis, Raf Schouwena- 380  
ars and Ada Torres for their assistance for figure 381  
presentation. 382

#### References

Bull, J., 1980. Sex determination in reptiles. Q. Rev. Biol. 55, 3–21. 384  
Erdman, S., Burris, K., 1993. The *Drosophila* doublesex proteins share 385  
a novel zinc-finger-related DNA-binding domain. EMBO J. 12, 386  
527–535. 387  
Guo, W., Lowell-Badge, R., Zhang, Y., Huang, B., Burris, P., 1996. 388  
Abch, the mouse homologue of *DAX1*: cloning, characterization, 389  
and synteny with *GyK*, the glycerol kinase locus. Gene 178, 31–34. 390  
Kent, J., Wheatley, S., Andrews, J., Sinclair, A., Koopman, P., 1996. A 391  
male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination. 392  
*Development* 122, 2813–2822. 393  
Kettlewell, J., Raymond, C., Zarkower, D., 2000. Temperature- 394  
dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentia- 395  
tion. *Genesis* 26, 174–178. 396  
Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, 397  
R., 1991. Male development of chromosomally female mice 398  
transgenic for *Sry*. *Nature* 351, 117–121. 399

- 400 Kost, T., Theodorakis, N., Hughes, S., 1983. The nucleotide sequence  
401 of the chick cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acid Res.* 11, 8287-  
402 8301.
- 403 Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 1993. MEGA: Molecular Evolutionary  
404 Genetics Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State  
405 University, University Park. PA 16802. p. 130.
- 406 Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., Mar-  
407 molejo-Valencia, A., 1997. Correlation among thermosensitive  
408 period, estradiol response, gonad differentiation in the sea turtle  
409 *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107, 373-385.
- 410 Miller, J.D., 1985. Embryology of marine turtles. In: Gans, C., Billet,  
411 F., Manderson, P. (Eds.), *Biology of the Reptilia*, 14. Wiley-Liss,  
412 New York, NJ, pp. 270-328.
- 413 Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H., 1999. Differ-  
414 ential expression of *SOX9* in gonads of the sea turtle *Lepidochelys*  
415 *olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *J. Exp. Zool.*  
416 284, 705-710.
- 417 Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H., 2001. Tem-  
418 perature regulates *SOX9* expression in cultured gonads of *Lepid-*  
419 *ochelys olivacea*, a species with temperature sex determination.  
420 *Dev. Biol.* 229, 319-326.
- 421 Morais Da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain,  
422 A., Lovell-Badge, R., 1996. *Sox9* expression during gonadal  
423 development implies a conserved role for the gene in testis  
424 differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14, 62-68.
- 425 Nanda, I., Shan, Z., Schartl, M., Burt, D., Koehler, M., Nothwang,  
426 H., Grützner, F., Paton, I., Windsor, D., Dunn, I., Engel, W.,  
427 Stachel, P., Mizuno, S., Haaf, T., Schmid, M., 1999. 300 million  
428 years of conserved synteny between chicken Z and human  
429 chromosome 9. *Nat. Genet.* 21, 258-259.
- 430 Pask, A., Toder, R., Wilcox, S., Camerino, G., Marshall-Graves, J.,  
431 1997. The candidate sex-reversing *DAX1* gene is autosomal in  
432 marsupials: implications for the evolution of sex determination in  
433 mammals. *Genomics* 41, 422-426.
- 434 Raymond, C., Shamu, C., Shen, M., Seifert, K., Hirsch, B., Hodgking,  
435 J., Zarkower, D., 1998. Evidence for evolutionary conservation of  
436 sex-determining genes. *Nature* 391, 691-695.
- 437 Raymond, C., Kettlewell, J., Hirsch, B., Bardwell, V., Zarkower, D.,  
438 1999. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and  
439 chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development.  
440 *Dev. Biol.* 215, 208-220.
- 441 Raymond, C., Murphy, M., O'Sullivan, M., Bardwell, V., Zarkower,  
442 D., 2000. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators,  
443 is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14,  
444 2587-2595.
- Sambrook, J., Russell, M., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory* 445  
446 *Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New  
447 York.
- Sinclair, A., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, J., Griffiths, B., Smith,  
448 M., Foster, J., Frischauf, A., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.,  
449 1990. A Gene from the human sex-determining region encodes a  
450 protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*  
451 346, 240-244.
- Smith, C., Smith, M., Sinclair, A., 1999a. Gene expression during  
452 gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234, 395-402. 453
- Smith, C., McClive, P., Western, P., Reed, K., Sinclair, A., 1999b. 454  
455 Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402, 601-602. 456
- Smith, C., Sinclair, A., 2001. Sex determination in the chicken embryo. 457  
458 *J. Exp. Zool.* 290, 691-699.
- Spotila, L., Spotila, J., Hall, S., 1998. Sequence and expression of *WT1* 459  
460 in the red-cared slider turtle *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* 281,  
461 417-427.
- Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R., Camerino, G., 462  
463 1996. Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex  
464 determination as well as in adrenal and hypothalamus function.  
465 *Nat. Genet.* 12, 404-409.
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., Lovell-Badge, 466  
467 R., 1998. *Dax1* antagonises *Sry* action in mammalian sex deter-  
468 mination. *Nature* 391, 761-767.
- Torres-Maldonado, L., Moreno-Mendoza, N., Landa, A., Merchant- 469  
470 Larios, H., 2001. Timing of *SOX9* downregulation and female sex  
471 determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J.*  
472 *Exp. Zool.* 290, 498-503.
- Western, P., Harry, J., Marshal-Graves, J., Sinclair, A., 1999. 473  
474 Temperature-dependent sex determination in the American alliga-  
475 tor: AMH precedes *SOX9* expression. *Dev. Dyn.* 216, 411-419.
- Western, P., Harry, J., Marshal-Graves, J., Sinclair, A., 2000. 476  
477 Temperature-dependent sex determination in the American alliga-  
478 tor: Expression of *SFI*, *WT1*, and *DAX1* during gonadogenesis.  
479 *Gene* 241, 223-232.
- Yu, R., Ito, M., Jameson, L., 1998. The murine *Dax1* promoter is 480  
481 stimulated by Sf-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-  
482 TF (chicken ovoalbumin upstream promoter-transcription factor)  
483 via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol. Endo-*  
484 *crinol.* 12, 1010-1022.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T., Guioli, S., Guo, 485  
486 W., Lalli, E., Mower, C., Walker, A., McCabe, E., Meitinger, T.,  
487 Monaco, A., Sassone-Corsi, P., Camerino, G., 1994. An unusual  
488 member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible  
489 for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635-641. 489