



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

“REGULACIÓN EPIGENÉTICA Y DETERMINACIÓN SEXUAL EN LA
TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea*.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BRENDA ARACELI LÓPEZ FALCÓN PIZA

DIRECTOR DE TESIS: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MÉXICO, D.F

NOVIEMBRE, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

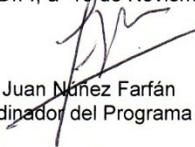
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Septiembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **BRENDA ARACELI LÓPEZ FALCÓN PIZA** con número de cuenta **506021439** con la tesis titulada "**Regulación Epigenética y determinación sexual en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea***", realizada bajo la dirección del **DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**:

Presidente: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO
Vocal: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
Secretario: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Suplente: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
Suplente: M. EN C. MARÍA PATRICIA CONCEPCIÓN PADILLA CORTÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de Noviembre de 2008.



Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos a Instituciones y al Comité Tutorial.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, UNAM por su apoyo y las facilidades otorgadas para la elaboración de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas que me fueron otorgadas para realizar mis estudios de maestría y el apoyo económico que se le otorgó al proyecto “Bases celulares y moleculares de la determinación sexual por temperatura de la tortuga marina”.

A la supervisión de los miembros del Comité Tutorial: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Félix Recillas Targa y Dr. Jesús Chimal Monroy.

Agradecemos la colaboración y facilidades otorgadas por el Centro Mexicano de la Tortuga (CMT) ubicado en Mazunte, Municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca.

Apoyos Económicos y Permisos de Colecta.

La elaboración de la tesis fue financiada a través del recurso económico proporcionado al proyecto “Bases celulares y moleculares de la determinación sexual por temperatura de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*” con Clave de registro: P466790 otorgado por el CONACYT.

La beca con número de registro 204527 correspondiente a la convocatoria NACIONAL INTERNET ENERO – FEBRERO 2006 III proporcionada por el CONACYT me permitió realizar mis estudios de maestría.

El estímulo económico del Sistema Nacional de Investigadores (SIN) como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III con número de expediente 2111 proporcionado por el CONACYT me permitió realizar mis estudios de maestría.

Las colectas del material biológico se realizaron en los términos establecidos por los permisos registrados en los oficios con número: SGPA/DGVS/07163/05; SGPA/DGVS/05249/06; SGPA/DGVS/051701/07 otorgados por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a través de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental y la Dirección General de Vida Silvestre.

Este trabajo de tesis se realizó bajo la Dirección del Dr. Horacio Merchant Larios en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM) de la Universidad Autónoma de México (UNAM) cubriendo los requisitos del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios quien fungió como director de este trabajo de tesis, el cual se realizó con el apoyo de sus conocimientos, ideas, estímulos, críticas y orientación.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Félix Recillas Targa y el Dr. Jesús Chimal Monroy; por sus críticas y comentarios sobre el proyecto de tesis, los cuales ayudaron al desarrollo del proyecto.

A los sinodales y revisores: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Félix Recillas Targa, el Dr. Jesús Chimal Monroy, Dra. Leda Carolina Torres Maldonado y M. en C. Patricia C. Padilla Cortés por la revisión, comentarios y críticas de la tesis.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, UNAM por darme la oportunidad de formarme integralmente.

A la M. en C. Patricia C. Padilla Cortés por su Asesoría y Apoyo Técnico en la obtención e interpretación de los resultados de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Al Técnico del Laboratorio José Guadalupe Baltazar García por su apoyo técnico en la obtención de cortes semifinos y por su incansable labor en el laboratorio.

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia por su Asesoría y apoyo Técnico en el suministro de material biológico, disección de órganos y colecta de suero de *Lepidochelys olivacea*.

Al Dr. Alfonso Dueñas González de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología y del IIBM, UNAM por la donación de ADN de la línea celular CaSki (por sus siglas en inglés: *Human, Caucasian, cérvix, carcinoma, epidermoid, from metastatic site*) no metilado y metilado *in vitro* con la CpG metiltransferasa SssI (M.SssI) (New England *BioLabs*).

Al Dr. Erick de la Cruz Hernández de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología y del IIBM, UNAM por la donación de ADN de la línea celular CaSki no metilado y metilado *in vitro* con M.SssI (New England *BioLabs*).

A la Dra. Norma A. Moreno Mendoza del Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIBM, UNAM por su Asesoría y Apoyo Técnico en el montaje de cultivo de órganos e inmunofluorescencia.

A la Dra. María Elena Flores Carrasco del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIBM, UNAM por sus recomendaciones técnicas sobre la extracción y purificación de ADN.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por la accesibilidad y las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

A la Biól. Verónica Díaz Hernández Díaz del Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIBM, UNAM por sus recomendaciones técnicas sobre la extracción de ADN.

Al LIBB. Miguel Tapia Rodríguez del Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIBM, UNAM por sus recomendaciones técnicas sobre el manejo de software para la modificación y digitalización de Imágenes.

Al LIBB Eduardo Martínez Martínez del Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIBM, UNAM por sus recomendaciones técnicas sobre la inmunofluorescencia.

A la Biól. María de la Luz Molina Cerón del Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIBM, UNAM por sus recomendaciones técnicas sobre la obtención de cortes mediante el criostato.

Al Biól. Cuauhtémoc Peñaflores Salazar, Investigador del CMT, por participar en la colecta y transporte de huevo de Tortuga *Lepidochelys olivacea*.

A la M. en C. Martha Harfush, Investigadora del CMT, por participar en la colecta y transporte de huevo de Tortuga *L. olivacea*.

Al C. Anselmo Cervantes Gutiérrez, Auxiliar Técnico del CMT, por participar en la colecta y transporte de huevo de Tortuga *L. olivacea*.

A la MVZ. Elisa Hernández Guzmán del CMT por participar en la colecta y transporte de huevo de Tortuga *L. olivacea*.

Al MVZ. Christian Martínez Zamora del CMT por participar en la colecta y transporte de huevo de Tortuga *L. olivacea*.

Al C. Alberto Jarquín Cruz, Auxiliar Técnico del CMT, por participar en la colecta y transporte de huevo de Tortuga *L. olivacea*.

Dedicatorias

A la memoria de Ma. Luisa A. Falcón Piza
Gómez, por ser mi más grande motivación.

A Carlos López Valverde por sus oportunos
consejos.

A Carlos López Falcón Piza, mi compañero y
amigo de la infancia.

A Eufemia Valverde de la Rosa, por su gran
cariño y apoyo en los momentos difíciles.

A Héctor Correa Arizmendi, por enseñarme
que no existen las limitaciones y brindarme su
apoyo.

A Rafaela Arizmendi Uribe, por recibirme
como a una hija más.

“No se dejen llevar por enseñanzas diversas y extrañas; porque es excelente que al corazón se le dé firmeza por bondad inmerecida, no por cosas de comer, de las cuales no han sacado provecho los que se ocupan en ellas”.
(Hebreos 13:9)

Índice

Agradecimientos a Instituciones y al Comité Tutoral.....	5
Apoyos Económicos y Permisos de Colecta.....	5
Agradecimientos.....	9
Dedicatorias.....	13
Índice.....	17
Índice de Ilustraciones.....	19
Índice de Tablas.....	20
Lista de Abreviaturas.....	21
Resumen.....	25
1. Introducción.....	29
Antecedentes Generales.....	30
1.1 Epigénesis.....	30
1.1.1 Metilación del ADN.....	32
1.1.2 Distribución de citosinas metiladas e islas CpG.....	32
1.1.3 ADN metiltransferasas.....	34
1.1.4 Inhibidores de la actividad de ADN metiltransferasas.....	35
1.1.5 La metilación del ADN y la represión transcripcional.....	35
1.1.6 Metilación del ADN durante la Evolución Biológica.....	38
1.1.7 La metilación del ADN en el desarrollo embrionario.....	39
1.1.8 El código de histonas.....	42
1.1.9 Acetilación y metilación de histonas.....	42
1.1.10 Desacetilasas de histonas (HDAC).....	43
1.1.11 Inhibidores de desacetilasas de histonas.....	44
1.1.12 Mecanismo de acción de los inhibidores de desacetilasas de histonas.....	44
1.1.13 Modificaciones post-traduccionales de Histonas en el desarrollo embrionario.....	46
1.1.14 Cooperación entre los procesos epigenéticos.....	47
1.2 Determinación sexual en vertebrados.....	48
1.2.1 Determinación sexual por temperatura.....	48
1.2.2 Genes y la determinación sexual por temperatura.....	50
1.2.2 La temperatura afecta la expresión genética y la estructura de la cromatina.....	55
1.3 Diferenciación sexual gonadal de <i>Lepidochelys olivacea</i>	56
1.3.1 El cerebro contribuye a la diferenciación sexual gonadal.....	57
1.3.2 El mesonefros contribuye a la diferenciación sexual de la gónada.....	58
2. Justificación.....	61
3. Hipótesis.....	63
4. Objetivos.....	65
4.1 Objetivo General.....	65
4.2 Objetivos Particulares.....	65
5. Material y Métodos.....	67
5.1 Material biológico.....	67
5.2 Cultivo de gónadas.....	68
5.3 Medición del área de las gónadas en cultivo.....	69
5.4 Histología.....	69
5.5 Inmunofluorescencia.....	69
5.6 Extracción de ADN.....	70
5.7 Hidrólisis del ADN.....	71

5.8 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés: <i>High-performance liquid chromatography</i>).....	71
5.8.1 Preparación de Estándares.....	72
5.8.2 Elución de las muestras y los estándares.....	72
6. Resultados	75
6.1 Las gónadas de <i>L. olivacea</i> de etapas 23 y 24 se encuentran morfológicamente indiferenciadas, pero las gónadas de etapa 27 (Et27) muestran características de ovario o testículo.	75
6.2 Para el cultivo de órganos se emplearon gónadas de embriones en el Periodo Indeterminado (PI) de la Et24 incubados a temperatura feminizante durante 19 días.	77
6.2.1 El tamaño de las gónadas en cultivo tratadas con 5-azacitidina (5-azaC) presenta un decremento significativo con respecto al de las no tratadas.....	78
6.2.2 El tamaño de las gónadas en cultivo tratadas con Tricostantina A (TSA) no presenta un decremento significativo con respecto al de las no tratadas.....	79
6.3 Efecto de la temperatura sobre la distribución <i>in situ</i> de la modificación post-traducciona en la histona H3 acetilada en la lisina 18 (H3K18ac).	80
6.3.1 La temperatura afecta el volumen nuclear y la distribución <i>in situ</i> de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac.....	80
6.3.2 La distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en los núcleos de la corteza de las gónadas <i>in vitro</i> tratadas con 5-azaC genera una señal de mayor intensidad que la que genera en los núcleos medulares.....	82
6.3.3 TSA tienen un efecto tóxico sobre las gónadas en cultivo incubadas a Temperatura Masculinizante (TM) y Feminizante (TF).....	83
6.4 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN en gónadas en cultivo de órganos	84
6.4.1 El nivel global de metilación del ADN de la línea celular CaSki tratado con CpG metiltransferasa Sssl (M.Sssl) aumenta con respecto al del no tratado.	84
6.4.2 El nivel global de metilación del ADN de las gónadas <i>in vitro</i> a TM tratadas con 5-azaC disminuye con respecto al de las gónadas <i>in vivo</i> incubadas a TM.	86
6.4.3 El nivel global de metilación del ADN de las gónadas <i>in vitro</i> a TF tratadas y no tratadas con 5-azaC aumenta con respecto al que presentan las gónadas <i>in vivo</i> incubadas a TF.	88
6.5 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN en gónadas <i>in vivo</i> de embriones de <i>L. olivacea</i>	90
6.5.1 El nivel global de metilación del ADN de las gónadas <i>in vivo</i> en el Perido Sensible a la Temperatura (PST) no difiere al de las gónadas en el Periodo de Determinación Sexual (PDS), incubadas a TF o TM.	90
6.6 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN del cerebro de embriones del PI y PDS de <i>L. olivacea</i>	92
6.6.1 El nivel global de metilación del ADN del cerebro de embriones en el PST aumenta con respecto al del cerebro de embriones en el PDS, incubados tanto a TF como a TM.	92
6.7 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN del mesonefros de embriones en PST y PDS de <i>L. olivacea</i>	95
6.7.1 Los niveles globales de metilación del ADN del mesonefros del PDS a TM aumentan con respecto a los de TF.....	95
6.8 En <i>Lepidochelys olivacea</i> el patrón del nivel global de metilación difiere dependiendo del órgano y etapa de desarrollo.....	97
7. Discusión.....	99
8. Conclusiones	103

9. Perspectivas.....	105
Literatura Citada.....	107

Índice de Ilustraciones

Fig. 1.- Representación esquemática de la vía bioquímica de la metilación, desmetilación y mutagénesis de la citosina y 5-metilcitosina (Figura modificada de Singal y Ginder, 1999).....	32
Fig. 2.- Cambios que sufre el sistema epigenético (metilación del ADN y estructura de la cromatina) en células de mamíferos (Figura modificada de Ohgane <i>et al.</i> , 2008).	33
Fig. 3.- Mecanismos mediante los cuales se propone que la metilación de la citosina reprime la transcripción (Figura modificada de Singal y Ginder, 1999).....	37
Fig. 4.- Representación de la estructura cristalográfica de la interacción de TSA con el sitio activo de HDLP (panel superior). Estructura química de TSA (panel inferior). (Figura modificada de Finnin <i>et al.</i> , 1999).....	45
Fig. 5.- Estructura cromatínica de promotores activos e inactivos (Figura modificada de Grønbaek <i>et al.</i> , 2007).....	47
Fig. 6 Representación esquemática del desarrollo gonadal de <i>L. olivacea</i> y el momento de expresión de los genes <i>Sox9</i> , <i>Dmrt1</i> y <i>Dax1</i> , así como la proteína SOX9.....	53
Fig. 7.- Gráfica que muestra el gradiente de elusión utilizado para el HPCL.....	73
Fig. 8.- Cromatograma que muestra los tiempos de elusión de los estándares.	74
Fig. 9.- Cromatograma que muestra los tiempos de elusión de las bases nitrogenadas de ADN hidrolizado de un <i>pool</i> de gónadas de <i>L. olivacea</i> de Et 26 33°C.	74
Fig. 10.- Etapa 23 a 26°C (TM).....	76
Fig. 11.- Etapa 24 a 33°C (TF).....	76
Fig. 12.- Etapa 27 a 26°C (TM).....	76
Fig. 13.- Etapa 27 a 33°C (TF).....	76
Fig. 14.- Gráfica donde se muestra el área (mm ²) de las gónadas de <i>L. olivacea</i> en cultivo en presencia y ausencia de 20 µg/ml de 5-azaC.	78
Fig. 15 Gónadas de <i>L. olivacea</i> de Et24 de 19 días de incubación a TM después de 14 días de estar en cultivo de órganos en presencia y en ausencia de 20 µg/ml de 5-azaC.	78
Fig. 16.- Gráfica donde se muestra el área (mm ²) de las gónadas de <i>L. olivacea</i> en cultivo de órganos en presencia y ausencia de 800 ng/ml de TSA.	79
Fig. 17 Gónadas de <i>L. olivacea</i> de Et24 de 19 días de incubación a TF después de estar 14 días en cultivo de órganos en presencia y en ausencia de 800 ng/ml de TSA.	79
Fig. 18.- TM.....	81
Fig. 19.- TF.....	81
Fig. 20.- TM+5-azaC (20 µg/ml).....	82
Fig. 21.- TF+5-azaC (20 µg/ml).....	82
Fig. 22.- TM+TSA (50 ng/ml).....	83
Fig. 23- TF+TSA (50 ng/ml).....	83
Fig. 24.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de la línea celular CaSki no metilado y metilado <i>in vitro</i> con la CpG metiltransferasa SssI (M.SssI).	85
Fig. 25.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de gónadas incubadas a TM: <i>In vivo</i> [aisladas de embriones de: Et24 incubados durante 33 días a TM y de Et26 de Intercambio (Incubados por 19 días a TF y los 14 días posteriores incubados a TM)] e <i>In vitro</i> en ausencia y en presencia de 20 µg/ml de 5-azaC.	87

Fig. 26.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de gónadas incubadas a TF: <i>In vivo</i> (aisladas de embriones de <i>L. olivacea</i> en la Et27 33 días de incubación) e <i>In vitro</i> en ausencia y en presencia de 20 µg/ml de 5-azaC.	89
Fig. 27.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de gónadas <i>in vivo</i> aisladas de embriones de <i>L. olivacea</i> del Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS) incubados a TF y TM.	91
Fig. 28.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de cerebros aislados de embriones de <i>L. olivacea</i> en el PST y PDS incubados a TM y TF.	94
Fig. 29.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de mesonefros aislados de embriones de <i>L. olivacea</i> del PST y PDS incubados a TM y TF.	96
Fig. 30.- Comparación de los patrones de metilación del ADN del cerebro, gónada y mesonefros en el Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS) incubados a TF.	97
Fig. 31.- Comparación de los patrones de metilación del ADN del cerebro, gónada y mesonefros en el Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS) incubados a TM.	98

Índice de Tablas

Tabla A. Lotes de huevos de <i>Lepidochelys olivacea</i> 1 al 9 incubados inicialmente a 26°C y transferidos a 33°C. Se detalla etapa y porcentaje de hembras y machos en cada lote al momento del sacrificio.	49
Tabla B Lotes de huevos de <i>Lepidochelys olivacea</i> 10 al 20 incubados inicialmente a 26°C y transferidos a 33°C. Se detalla etapa y porcentaje de hembras y machos en cada lote al momento del sacrificio.	50
Tabla C Detección de la proteína SOX9 en gónadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>L. olivacea</i> . (Modificada de Moreno-Mendoza <i>et al</i> 2001).	52
Tabla D.- Se enlistan los Nidos de <i>L. olivacea</i> colectados de Septiembre de 2005 a Mayo de 2008, así como la fecha de colecta y el número de huevos por nido.	67
Tabla E.- Se muestra las etapas de desarrollo y días de incubación que abarcan los PI, PST y PDS en embriones de <i>L. olivacea</i> incubados a 33°C (TF) y 26°C (TM).	68

Lista de Abreviaturas

- 5-azaC.-** 5-azacitidina.
- 5^mC.-** 5-metilcitosina.
- A.-** Adenina.
- ABC.-** Área bajo la curva del pico presente en el cromatograma que indica el tiempo de retención del estándar de la mezcla de trabajo.
- ABCP.-** Área bajo la curva del pico presente en el cromatograma que indica el tiempo de retención de la base en la muestra problema.
- acetil-CoA.-** Acetil coenzima A.
- AchE.-** Acetilcolinaesterasa
- ADN.-** Ácido desoxirribonucleico.
- ADNMTs.-** ADN metiltransferasas.
- AdoMet.-** S-adenosilmetionina.
- ALL-1.-** El homólogo humano del gen *trithorax (trx)*. *ALL-1* también es conocido como *HRX*, *MLL* y *HTRX1*. Este gen se localiza en el cromosoma 11 (ubicación: 11q23).
- AMP.-** Adenosín monofosfato.
- anti-H3K18ac.-** anticuerpo contra la histona H3 acetilada en la lisina 18.
- AR.-** Ácido retinoico.
- C.-** Citosina.
- CaSki.-** por sus siglas en inglés: *Human, Caucasian, cérvix, carcinoma, epidermoid, from metastatic site*.
- CBHA.-** Ácido bis (m-carboxicinamil) Hidroxámico.
- CDK.-** Cinasas dependientes de ciclinas.
- CG.-** Células germinales.
- CGP.-** Células Germinales Primordiales
- CHAP.-** Péptido cíclico que contiene ácido Hidroxámico.
- cm.-** Cordones medulares.
- c-Myc.-** *Myc* Por sus siglas en inglés: *myelocytomatosis viral oncogene*. El gen *Myc* codifica a una familia de factores de transcripción y c-Myc es uno de ellos.
- CpG.-** Dinucleótidos guanina–citosina donde “p” denota el grupo fosfato.
- CREB.-** Por sus siglas en inglés: *cAMP response element binding*. Es un factor de transcripción que se une a las secuencias CRE (por sus siglas en inglés: *cAMP response elements*) del ADN.
- CTCF.-** Por sus siglas en inglés: *CCCTC-binding factor*.
- dc-AdoMet.-** AdoMet decarboxilasas.
- DG.-** Gónadas diferenciadas.
- DI.-** Diámetro Interno.
- Di.-** Diencéfalo.
- DiI.-** 1,1',dioctadecil-3,3,3'3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato
- DNasa 1.-** Desoxirribonucleasa I.
- DNMT1.-** Gen que codifica a la ADN metiltransferasa tipo 1 (proteína señalada sin cursivas).
- DNMT3a.-** Gen que codifica a la ADN metiltransferasa tipo 3a. La proteína que es codificada por este gen lleva el mismo nombre y se señala sin cursivas.
- DNMT3b.-** Gen que codifica a la ADN metiltransferasa tipo 3b La proteína que es codificada

por este gen lleva el mismo nombre y se señala sin cursivas.

dpc.- Días post-coito.

DSA.- Determinación sexual influenciada por el ambiente.

DSG.- Determinación sexual genética.

DST.- Determinación sexual por temperatura.

E.- Células epiteliales.

E2.- Estradiol.

E2F.- Familia de factores de transcripción que se unen a la secuencia TTTCGCGC. Están involucrados en la regulación del ciclo células y la síntesis del ADN en células de mamífero.

Esteroides C-19.- Esteroides suprarrenales que tienen 19 átomos de carbono. Los esteroides C-19 tienen grupos metilo en C-18 y C-19.

Et.- Etapa.

Factor de transcripción AP-2.- Proteína de Unión al enhancer (potenciador) AP-2.

Fase G1.- Del inglés: *Growth o Gap 1*. Es la primera fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN.

Fase S.- Del inglés: *Synthesis*. Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas.

G.- Guanina.

GAL4-VP16.- Factor de transcripción formado por la fusión del fragmento de unión al ADN del activador de la transcripción Gal4 de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) unido al activador de origen vírico VP16

gl.- Grados de libertad de la prueba estadística.

gp.- Grumos pignóticos.

H.- Coeficiente estadístico de Kruskal-Wallis calculado.

H1.- Histona H1

H19.- Gen que codifica para RNA no codificante.

H2.- Histona H2.

H2A.- Histona H2A.

H2B.- Histona H2B.

H3.- Histona H3.

H3K4me2.- Histona H3 dimetilada en la lisina 4.

H3K9.- Lisina 9 de la histona H3.

H3K9me2.- Dimetilación de la Histona H3 en la lisina 9

H3K9me3.- Histona H3 trimetilada en la lisina 9.

H4.- Histona H4.

HATs.- Acetiltransferasas de histonas.

HClO₄.- Ácido perclórico

HDACs.- Desacetilasas de histonas.

HDLP.- Homólogo de las HDACs de mamífero.

HIS.- Hibridación *in situ*.

HMG.- Dominio del grupo de alta movilidad (por sus siglas en inglés *High mobility group*).

HMTs.- Metiltransferasas de histonas.

HP-1.- Proteína tipo 1 de unión a la heterocromatina.

HPLC.- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (Del inglés: *High-performance liquid chromatography*).

Hsp90.- Del inglés: *heat shock protein 90*. Miembro de la familia de proteínas de choque térmico. Es una molécula chaperona.

Igf2.- Del inglés: *Insulin-like growth factor 2*. Gen que codifica al factor de crecimiento tipo II semejante a insulina.

Igf2r.- Receptor del *Igf2*.

k.- Rangos asignados a los valores absolutos de las muestras, para realizar el cálculo estadístico de T-Wilcoxon.

Kcnq1.- Es un gen que codifica a la subunidad proteica KvLQT1 de los canales de potasio.

M.SssI.- CpG metiltransferasa SssI.

MBD.- Dominio de unión a sitios CpG metilados (por sus siglas en inglés: *methyl-CpG binding domain*).

MeCP1.- Proteína tipo 1 de unión a 5-metilcitosina.

MeCP2.- Proteína tipo 2 de unión a 5 metilcitosina.

mes.- Mesonefros.

Mis.- Sustancia inhibidora de los tubos Müllermanos (por sus siglas en inglés: *Müllerian-inhibiting substance*).

MLL.- Por sus siglas en inglés: *Myeloid/Lymphoid Leukemia* o *Mixed Lineage Leukemia*. Es un gen involucrado en el mantenimiento de la expresión de genes homeóticos (HOX), es uno de los que con mayor frecuencia se ven implicados en translocaciones asociadas a leucemias.

MP.- Molaridad de la base en la muestra problema

mRNA.- Ácido ribonucleico mensajero.

MS.- Molaridad del estándar en la mezcla de trabajo.

MTA.- 59-metilatio-59-deoxiadenosina.

Myn.- Por sus siglas en inglés: *murine Max*.

NAD.- Nicotinamida adenina dinucleótido.

NaOH.- Hidróxido de Sodio

N-CorR.- Receptor nuclear corepresor.

nd.- Núcleos deformados.

NF-κB.- Por sus siglas en inglés: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*. Es un complejo proteico que actúa como factor de transcripción.

NurD.- Remodelador y desacetilador del nucleosoma.

O.C.T.- Por sus siglas en inglés: *optimum cutting temperature*.

ODC.- Ornitina descarboxilasa.

p.- Nivel de significancia (representa la probabilidad de equivocación al elegir o tomar una decisión estadística).

p21.- El término p21 se emplea para un gen humano localizado en el cromosoma 6 (ubicación: 6p21.2), que codifica a un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina llamado CDKN1A, por sus siglas en inglés *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*: inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A.

p53.- Gen también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica una proteína nuclear de 53 KDa, de ahí su nombre

Pb.- Fenil butirato.

PBS.- Buffer de fosfatos

PcG.- Grupo Polycomb.

PCMI.- Por sus siglas en inglés: *pericentriolar material 1*. Es un gen humano. La proteína que es codificada por este gen lleva el mismo nombre y se señala sin cursivas.

PDS.- Periodo con Sexo Determinado.

PI.- Periodo con Sexo Indeterminado.

pRb.- Por sus siglas en inglés: *retinoblastoma protein*: proteína del retinoblastoma, una proteína supresora de tumores.

PRE.- Del inglés: "*Polycomb Response Elements*".

PST.- Periodo Sensible a la Temperatura.

qPCR.- Reacción en cadena de la polimerasa, método cuantitativo.

RAR α .- Receptor α del ácido retinoico.

Rb.- Retinoblastoma.

RC.- Región cortical.

RF.- Factor de retención del estándar de la mezcla de trabajo.

RNA.- Ácido ribonucleico.

SAH.- S-adenosilhomocitosteina.

SAHA.- Ácido Hidroxámico del Suberoylanilide.

SB.- Sal de sodio de ácido butírico.

Sir2.- Del inglés: *Silent information regulator 2*. Es homólogo de la proteína del mamífero: SIRT1, SIR2L1 o Sir2 α . Pertenece a la familia de enzimas desacetilasas/mono-ADP-ribosiltransferasas denominadas Sirtuins.

Sir3.- Proteína homóloga de Sirt3 de humano, perteneciente a la familia de enzimas Sirtuin.

Stock.- Es una voz inglesa que se usa en español con el sentido de existencia o reserva de alguna cosa disponible para uso futuro.

SUV39H1.- Del inglés: *Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)*. Es una enzima de humano metiltransferasa de histonas que metila la lisina 9 de la histona H3.

T.- Testosterona.

T.- Timina.

T.- Coeficiente estadístico de T-Wilcoxon calculado.

TA.- Temperatura ambiente.

tAR.- Ácido transretinoico

Tb.- Temperatura corporal.

Te.- Telencéfalo.

TF.- Temperatura feminizante.

TM.- Temperatura masculinizante.

TRD.- Dominio represor de la transcripción.

trxG.- Genes del Grupo *Trithorax*.

TSA.- Tricostantina A.

U.- Uracilo

UDG.- Gónadas histológicamente indiferenciadas.

Resumen

La tortuga *Lepidochelys olivacea* conocida comúnmente como tortuga golfina es un excelente modelo para estudiar el desarrollo gonadal porque se puede modificar la temperatura de incubación y saber de antemano cual será el sexo del embrión. Estudios recientes establecen que existe una relación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la temperatura corporal. Hasta el momento se sabe que la metilación del ADN y los patrones de modificaciones post-traduccionales de histonas controlan la expresión de genes vitales para el desarrollo embrionario mediante tres mecanismos: 1) La impronta genómica, 2) La inactivación del cromosoma X y 3) La regulación de la expresión tejido-específica de genes. Estudios previos realizados en el laboratorio postularon que el mecanismo termosensor que dirige o regula la determinación y diferenciación sexual gonadal puede encontrarse intrínseco en la gónada o bien en el cerebro. Además, se ha postulado que durante el proceso de diferenciación gonadal, las células mesonefricas hacen una contribución substancial a la estructura del ovario o del testículo. Por todo lo anterior, hemos propuesto la siguiente hipótesis: “La temperatura de incubación afecta los niveles globales de metilación del ADN y/o acetilación de histonas en las gónadas, cerebro y mesonefros de *L. olivacea* durante el desarrollo embrionario. Los diferentes niveles pueden influir directa o indirectamente en la determinación sexual por temperatura regulando la expresión diferencial de genes responsables del desarrollo de ovarios o testículos”. Para poner a prueba esta hipótesis hemos planteado los siguientes objetivos: 1) Determinar mediante Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas *in vitro* incubadas a temperatura feminizante (TF: 33°C) ó masculinizante (TM: 26°C). 2) Determinar los patrones de distribución de acetilación de histonas en las gónadas *in vitro* incubadas a TF ó TM mediante inmunofluorescencia utilizando como marcador el anticuerpo contra la histona H3 acetilada en la lisina 18 (anti-H3K18ac). 3) Mediante inmunofluorescencia y HPLC determinar el efecto de los inhibidores de remodeladores de la cromatina 5-azacitidina (5-azaC) y Tricostantina A (TSA) sobre las células de gónadas *in vitro* incubadas a TM ó TF. 4) Mediante HPLC determinar los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas, mesonefros y cerebro *in vivo* de embriones incubados TM ó TF.

Para los objetivos 1, 2 y 3 se efectuaron cultivos de órganos. Para los cultivos se disecaron gónadas de embriones en la etapa 24 correspondiente a la etapa indeterminada. Después de 14 días de cultivo en presencia o en ausencia de inhibidores de la actividad de ADN metiltransferasas (5-azaC) o Desacetilasas de Histonas (TSA), las gónadas se analizaron con el “software IMAGE J” para determinar el efecto de estos inhibidores sobre su tamaño. Para determinar el efecto de los inhibidores de remodeladores de la cromatina sobre los patrones de distribución de la acetilación de histonas en las gónadas en cultivo se utilizó como marcador la distribución de la Histona H3 acetilada en la lisina 18 (H3K18ac). Para ello, se analizó con microscopía confocal la distribución del anticuerpo anti-H3K18ac. Para determinar los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas en cultivo se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés: *High-performance liquid chromatography*).

Se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre el tamaño de las gónadas en cultivo en presencia de 5-azaC con respecto a sus controles, este efecto se observó tanto en gónadas incubadas a TM como a TF. En contraste, no se observó una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el tamaño de gónadas cultivadas en presencia de TSA con respecto a sus controles, este efecto se observa independientemente de la temperatura de incubación.

El volumen nuclear y la distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en la cromatina se vieron claramente influenciados por la temperatura de incubación. En las gónadas de TM los núcleos fueron más pequeños y homogéneos, en tanto que en las gónadas de TF los núcleos

resultaron ser dos o más veces mayores y con una distribución más heterogénea de la cromatina. Después de 14 días de cultivo en presencia de 5-azaC (20 µg/ml), se encontró un efecto regional. Los núcleos de la corteza mostraron una mayor intensidad en la señal fluorescente que la de los núcleos medulares. El efecto del inhibidor de la metilación del ADN sobre el patrón regional de expresión del anticuerpo anti-H3K18ac fue similar en gónadas incubadas a TM ó a TF. La diferencia en el tamaño de los núcleos debida a la temperatura de incubación observada en las gónadas controles, no se vio modificada por la presencia de la 5-azaC en el medio de cultivo. Por otra parte, el efecto del TSA sobre las células de las gónadas en cultivo resultó severamente tóxico a todas las dosis y a las dos temperaturas de incubación.

El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* a TM en presencia de 5-azaC disminuye de forma significativa con respecto al que presentan las gónadas *in vivo* de embriones incubados a TM. El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* incubadas a TF en ausencia de 5-azaC aumenta de forma significativa con respecto a las gónadas *in vivo* incubadas a TF. El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* incubadas a TF en presencia de 5-azaC aumenta de forma significativa con respecto al que presentan las gónadas *in vivo*.

Debido a que las diferencias significativas detectadas entre las gónadas aisladas y cultivadas tanto por efecto de la temperatura como por la 5-azaC parecen ser un efecto exagerado por la condición experimental en que se mantuvieron, se determinaron mediante HPLC los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas *in vivo* del Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS), tanto incubadas a TF como a TM. Posteriormente, se compararon dichos niveles con los del cerebro y mesonefros de los mismos periodos de desarrollo y temperaturas de incubación. Esperábamos que al hacer esta comparación, pudiéramos determinar cuál de estos tres órganos es el encargado de detectar la temperatura de incubación de *L. olivacea* y regular el efecto de esta sobre la determinación y diferenciación sexual. Nuestra hipótesis de trabajo era que: “En el órgano termosensor, el nivel global de metilación del ADN difiera entre el órgano del PST incubado a TM con respecto al incubado a TF del mismo periodo. Además de que dicha diferencia debería mantenerse o aumentar durante el PDS”.

El porcentaje de metilación del ADN de las gónadas *in vivo* del PDS (Et27) a TF ó TM no difiere de forma estadísticamente significativa al que presentan las gónadas *in vivo* del PST (Et24) de TF y TM. El nivel de metilación del ADN del cerebro embrionario del PDS aumenta significativamente con respecto al que presenta el cerebro del PST, en embriones incubados tanto a TF como a TM. El nivel de metilación del ADN del mesonefros del PDS disminuye significativamente con respecto al que presenta el mesonefros del PST en embriones incubados a TF. El nivel de metilación del ADN del mesonefros del PDS aumenta significativamente con respecto al que presenta el mesonefros del PST en embriones incubados a TM. El nivel de la metilación del ADN del mesonefros del PDS incubado a TM aumenta significativamente con respecto al mesonefros del PDS incubado a TF.

En conclusión, los experimentos en las gónadas cultivadas muestran resultados complejos respecto al efecto de los inhibidores de los remodeladores de la cromatina sobre la metilación del ADN y la acetilación de histonas. La 5-azaC inhibe el crecimiento y afecta el patrón de expresión del anticuerpo anti-H3K18ac de manera independiente a la temperatura de incubación. Este resultado sugiere que la disminución del nivel de metilación del ADN afecta indirectamente el patrón de distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac. Además, el efecto detectado entre la corteza y la medula indican diferencias en la organización de la cromatina de las células de las dos regiones. Sin embargo, no se encontraron diferencias regionales ocasionadas por la temperatura de incubación. Por otro lado, la severa toxicidad de la TSA descartó la posibilidad de conocer su efecto sobre la cromatina de las gónadas en cultivo.

Los resultados del HPLC muestran que los niveles de metilación del ADN del cerebro aumentan en función al avance de su desarrollo pero es independiente de la temperatura. El mesonefros en cambio, mostró diferencias tanto dependientes de la edad como de la temperatura de incubación del embrión. Sin embargo, la técnica de HPLC no permitió determinar diferencias significativas en los niveles de metilación del ADN de las gónadas *in vivo* en los dos parámetros estudiados. Las diferencias de los niveles de metilación de ADN de las gónadas *in vitro* por efecto de la temperatura como por la 5-azaC parecen ser un efecto exagerado por la condición experimental en que se mantuvieron.

El mesonefros juega un papel importante en la diferenciación de las gónadas. El presente hallazgo que muestra la notable influencia de la temperatura sobre sus niveles de metilación, hace razonable postular al mesonefros como el sensor que media el efecto de la temperatura en la determinación y/o diferenciación sexual de *L. olivacea*.

1. Introducción

La determinación sexual en la mayoría de los vertebrados, ocurre en una etapa temprana del desarrollo, a nivel de la gónada morfológicamente indiferenciada. Aquí, la regulación de varios procesos moleculares anticipan los cambios que llevarán a la formación de un ovario o un testículo y después, a la diferenciación de una hembra o un macho, respectivamente. (Merchant-Larios, 2001). Los vertebrados presentan dos diferentes mecanismos de diferenciación sexual: determinación sexual genética (DSG) y la determinación sexual influenciada por el ambiente (DSA). La forma más frecuente de DSA es la determinación sexual por temperatura (DST) (Bull, 1980). En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, la temperatura de incubación del nido determinará el sexo de las crías. A una temperatura de incubación de 33°C se promoverá el sexo femenino (temperatura feminizante, TF) mientras que a 26°C se promoverá el sexo masculino (temperatura masculinizante, TM). De acuerdo con Merchant-Larios *et al.* (1997), en general, la determinación sexual durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea* se puede dividir en tres periodos: Periodo con Sexo Indeterminado (PI), Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo con Sexo Determinado (PDS) (Merchant *et al.*, 1997).

La tortuga *Lepidochelys olivacea* conocida comúnmente como tortuga golfina es un excelente modelo para estudiar el desarrollo gonadal porque se puede modificar la temperatura de incubación y saber de antemano cual será el sexo del embrión. Según Pritchard y Mortimer (1999) la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) presenta las siguientes características taxonómicas: **Carapacho**: corto y ancho, pero más angosto y más alto que en *L. kempii*; alta proyección vertebral en los juveniles, liso, elevado y ligeramente tectiforme (en forma de tienda de campaña) en adultos (especialmente en el Pacífico oriental); cinco a nueve pares de escudos costales (comúnmente seis a ocho) frecuentemente con una configuración asimétrica; escudos del carapacho ligeramente traslapados en inmaduros y sin traslape en adultos; longitud recta del carapacho (LRC) hasta 72 cm. **Cabeza**: relativamente grande, ligeramente triangular; ancho hasta 13 cm; dos pares de escamas prefrontales. **Extremidades**: dos uñas en cada aleta (algunos adultos pueden perder la uña secundaria en las aletas delanteras). **Coloración**: dorso gris en inmaduros; color verde olivo intermedio a oscuro en adultos; ventralmente blanca en inmaduros, amarillo crema en adultos. **Plastrón**: con poro pequeño y distintivo cerca del margen posterior de cada uno de los cuatro escudos inframarginales. **Distribución**: aguas tropicales del Pacífico, Índico y Atlántico del Sur. **Peso**: 35-50 kg. **Tipo preferido de playa**: litorales continentales e islas de barrera en regiones tropicales, frecuentemente cerca de bocas de ríos. **Tamaño y número de huevos**: diámetro promedio de los huevos típicamente 37-42 mm. **Tamaño promedio de nidada** típica 105-120 huevos. **Ubicación geográfica de las playas de anidación**: Pacífico oriental (de Baja California Sur y Sinaloa, México a Colombia), Atlántico del Sur (Guayana a Brasil y Africa occidental), norte del Océano Índico (particularmente en Orissa, India) y Pacífico occidental (Malasia y Tailandia). En el Pacífico mexicano se encuentra principalmente en las costas de Guerrero, Jalisco y Oaxaca. En estas últimas la playa que permanece como la importante para su reproducción es la de La Escobilla (Oaxaca). Anidaciones solitarias o en pequeños grupos; pero en algunos sitios de la India, Costa Rica y México ocurren arribadas donde varios miles de hembras participan en anidaciones masivas simultáneamente (Pritchard *et al.*, 1983; Pritchard y Mortimer, 1999). Es la especie más abundante de tortugas marinas en el Pacífico Oriental. La Convención Internacional para el Tráfico de Especies en Riesgo (CITES) considera a la tortuga golfina en nuestras costas como una especie amenazada, pero no en peligro de extinción.

Por otro lado, en diversas especies de vertebrados, la regulación de la transcripción durante el desarrollo puede deberse a factores epigenéticos, es decir a las características heredables que no

pueden explicarse única y directamente a partir de la secuencia del ADN; ejemplos de factores epigenéticos son las modificaciones químicas del ADN e histonas (Neissa y Guerrero, 2004). Una de las modificaciones químicas del ADN es la metilación de citosinas, la cual se asocia con la represión transcripcional (Bird, 2002). El estado de metilación de un alelo se encuentra inevitablemente ligado a los patrones de modificación de histonas (Richards y Elgin, 2002). El papel modulador de las histonas en los procesos de duplicación, transcripción y recombinación depende de sus modificaciones postraduccionales, como la metilación y la acetilación de algunos de sus aminoácidos. En general, se puede afirmar que la metilación se relaciona, con el empaquetamiento de los nucleosomas, en términos prácticos, con la represión del gen. Mientras que la acetilación, se relaciona con el desempaquetamiento y la expresión del gen (Recillas-Targa y Escamillas-del Arenal, 2004; Neissa y Guerrero, 2004).

Considerando la importancia que tiene la modificación dinámica de la cromatina en la regulación de la expresión del genoma durante el desarrollo, pensamos que es razonable investigar si la temperatura regula dicho proceso a nivel de la gónada. Si es así, sería posible postular que la determinación sexual por temperatura se regule, en parte, por los niveles de metilación del ADN en la gónada.

Antecedentes Generales

1.1 Epigénesis.

El cigoto da origen a un complejo organismo multicelular compuesto de varios tipos celulares diferenciados. Por ejemplo, existen al menos 200 tipos celulares diferenciados en los mamíferos basándose en una variedad de criterios fisiológicos y morfológicos. En general, la diferenciación celular ocurre sin que cambie la secuencia del ADN; sin embargo, en pocas excepciones como durante la diferenciación de las células linfoides si cambia la secuencia del ADN. El fenotipo celular puede mantenerse aun después de la mitosis siempre y cuando la célula esté equipada con mecanismos epigenéticos que permiten que la función del gen sea heredada a las generaciones siguientes (Ohgane *et al.*, 2008). Inicialmente “epigénesis”, palabra que literalmente significa “fuera de la genética convencional”, se definió como “el estudio de los cambios de la función genética mitótica y/o meióticamente heredables que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del ADN (Russo, 1997; Bird, 2002; Jaenisch y Bird, 2003;). Actualmente, epigénesis se refiere “al estudio de los procesos que producen un fenotipo heredable que no dependen estrictamente de la secuencia del ADN” (Lieb *et al.*, 2006). Los procesos epigenéticos son importantes en el desarrollo y diferenciación. Sin embargo, también se han encontrado en diversos organismos, entre ellos humanos y ratones adultos, ya sea ocasionados por un proceso azaroso o por influencia del ambiente (Issa, 2000). Los mecanismos epigenéticos también protegen a la célula de genomas virales que, de lo contrario, secuestrarían las funciones celulares para sus propios fines (Jahner *et al.*, 1982).

Un rasgo epigenético es aquel que es transmitido de forma independiente a la secuencia de ADN. Esto puede ocurrir a nivel de la división celular – por ejemplo, las células hijas pueden heredar un patrón de expresión genética a partir de las células parentales (a lo que se le llama memoria celular). El ejemplo clásico de la herencia epigenética es el fenómeno de impronta genética, en el cual el estado de la expresión de un gen depende de cuál de los padres se derive dicho gen. En los mamíferos, por ejemplo, el gen *Igf2* (el cual codifica al factor de crecimiento tipo II semejante a la insulina) se expresa solamente a partir de la copia paterna del gen, mientras que el gen *H19* se expresa solamente a partir del alelo materno (Felsenfeld y Groudine, 2003). Además, el mecanismo mediante el cual este patrón de herencia se consume involucra (en parte)

la metilación del ADN en el alelo paterno. Esto causa la disociación de una proteína cromatínica conocida como CTCF, la cual normalmente bloquea el enhancer (potenciador) que se localiza río abajo; como consecuencia, el enhancer es libre de activar la expresión de *Igf2* (Bell y Felsenfeld, 2000; Hark *et al.*, 2000).

Se han propuesto dos mecanismos que explican la manera mediante la cual se establece una interacción recíproca entre la metilación del ADN y la modificación de histonas a fin de regular la expresión genética. El primer mecanismo establece que los sitios que poseen dinucleótidos CpG (guanina–citosina) metilados cercanos a un gen reclutan proteínas de unión al ADN metilado; las cuales, a su vez, atraen desacetilasas de histonas ocasionando la pérdida de la acetilación de histonas y el consecuente silenciamiento de la expresión genética (Felsenfeld y Groudine, 2003). El segundo mecanismo establece que hay una interacción recíproca entre las histonas en la cromatina y el ADN que las rodea. Por ejemplo: parece ser que la metilación y la acetilación de la lisina ubicada en la novena posición de la histona 3 (H3K9) son procesos competitivos (Felsenfeld y Groudine, 2003). Si este residuo es acetilado, la histona se desestabiliza y puede causar la dispersión del nucleosoma. Por el contrario, si no es acetilado, puede ser metilado. La metilación de H3K9 incrementa la estabilidad del nucleosoma, impidiendo su disociación o movimiento. Tanto es así que la modificación de la cola de la histona 3 puede actuar como un “interruptor” entre el estado activado (nucleosoma dispersado) e inactivado (nucleosoma estable) de un gen, este hecho se ve reforzado por el estudio reportado por Jackson *et al.* (2002) quienes encontraron que en el hongo *Neurospora* la metilación de la H3K9 es esencial para que ocurra la metilación del ADN. La histona metilada puede ser capaz de reclutar de su vecindad las enzimas que metilan al ADN (Rea *et al.*, 2000). Una vez que el ADN es metilado, éste puede estabilizar al nucleosoma aún más.

La herencia epigenética involucra el mantenimiento de los patrones de modificación de histonas y/o la asociación de proteínas cromosomales correlacionadas con los estados específicos de expresión. Los mismos mecanismos encargados de propagar la estructura de la cromatina (permissiva o represora de la transcripción) son capaces de preservar el patrón de modificación de histonas durante la duplicación del ADN, cuando “el viejo” nucleosoma se distribuye aleatoriamente en ambos lados de la horquilla de duplicación, entremezclándolas con las histonas recién sintetizadas y provenientes del citoplasma (Felsenfeld y Groudine, 2003).

El mantenimiento de los estados transcripcionales activos o represivos representa un mecanismo efectivo para la diferenciación celular (Weintraub *et al.*, 1978). En este modelo, decisiones fundamentales referentes al encendido o apagado de genes individuales o grupales necesita hacerse una sola vez. Este principio es ilustrado más claramente con el grupo de proteínas Polycomb (PcG) que media la represión de los genes en *Drosophila* (Francis y Kingston, 2001). El grupo de genes *Polycomb* (*PcG*) codifica para un conjunto de proteínas que regulan negativamente a los genes homeóticos mientras que *Trithorax* (*trxG*) lo hace positivamente (Pirrotta 1998; Francis y Kingston, 2001; Orlando, 2003). Se ha postulado que PcG y *trxG* son parte de los mecanismos que contribuyen a la memoria epigenética. En particular, las proteínas del grupo PcG son responsables de silenciar no sólo a los genes homeóticos fomentando una estructura de la cromatina represora evitando así la incorporación de factores de transcripción y por lo tanto la transcripción. Uno de los modelos propuestos contempla la formación de complejos moltipéptidicos que reconocen a las secuencias llamadas PRE (del inglés: "*Polycomb Response Elements*"). Proteínas homólogas al grupo PcG y *trxG* han sido identificadas en diversos organismos incluyendo al humano (Francis y Kingston, 2001; Roberts y Orkin, 2004). En particular, los miembros del grupo PcG han sido asociados a la regulación de genes ligados al control del ciclo celular vía la proteína retinoblastoma (Rb; Orlando, 2003). Por otra parte, la sobre expresión anormal de los miembros de PcG se asocia directamente a la proliferación celular relacionado con la progresión del cáncer de próstata (Varambally *et al.*,

2002). De igual manera mutaciones en los miembros de *trxG* han mostrado tener relación con la aparición de tumores pediátricos, en particular a través del complejo *hBm* que corresponde a un elemento de remodelaje ATP-dependiente asociado al grupo *trxG* (Roberts y Orkin, 2004).

1.1.1 Metilación del ADN. La metilación del ADN ocurre en la posición 5 de la citosina que se encuentra en un patrón dinucleotídico: 5'-CG-3' (CpG: C pareada con G) (Bird, 1978, 2002; Gruenbaum *et al.*, 1981). La metilación de la citosina es la única modificación química del ADN de los mamíferos y la más común en las células eucariontes (Fig. 1). El estado de metilación de las islas CpGs se mantiene aún después de la duplicación del ADN mediante la acción de las ADN metiltransferasas, en particular, la *Dnmt1* (Bestor *et al.*, 1988), y por ello esta señal epigenética se hereda a las generaciones celulares siguientes. Como se muestra en la Figura 2, la metilación del ADN generalmente se asocia con la compactación de la cromatina a través de histonas modificadas post-traduccionalmente. Es por ello, que la metilación del ADN y la modificación post-traduccional de histonas juegan un papel natural y crucial en el silenciamiento de genes, estabilización de la estructura cromosómica y la supresión de la movilidad de los retrotransposones (Ohgane *et al.*, 2008).

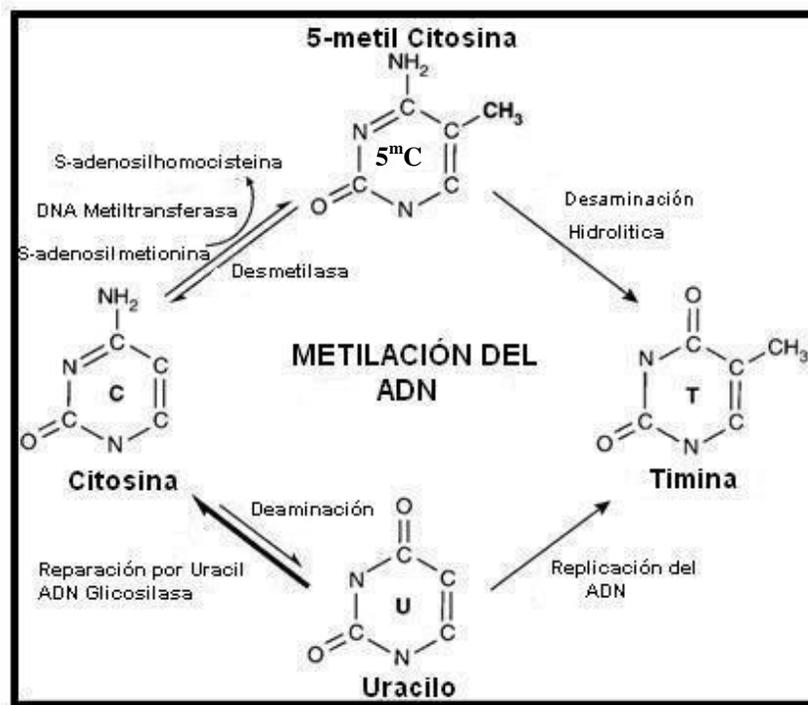


Fig. 1.- Representación esquemática de la vía bioquímica de la metilación, desmetilación y mutagénesis de la citosina y 5-metilcitosina (Figura modificada de Singal y Ginder, 1999).

1.1.2 Distribución de citosinas metiladas e islas CpG. Los genomas eucariontes no se encuentran metilados uniformemente pero contienen regiones metiladas intercaladas con dominios hipo-metilados. Durante la evolución, los dinucleótidos CpG han sido seleccionados progresivamente del genoma de eucariontes superiores y se presentan en una frecuencia del 5% al 10% (Antequera y Bird, 1993_a; Antequera y Bird, 1993_b; Bird, 1995). Se ha postulado que la pérdida de los sitios CpG es causada por la desaminación de 5-metilcitosina (5^mC) a Timina (Fig. 1). Aproximadamente del 70% al 80% de los sitios CpG se encuentran metilados en la mayoría de los vertebrados, incluyendo los humanos (Antequera y Bird, 1993_a;

Bird, 1995). Estas regiones metiladas, típicamente conforman horquillas de cromatina que reprimen la duplicación tardía del ADN mediante su asociación con histonas y su configuración nucleosomal. Esta configuración ocasiona que los factores de transcripción tengan una relativa inaccesibilidad a los promotores de los genes (Tazi y Bird, 1990). En contraste con el resto del genoma, pequeñas regiones de ADN, llamadas islas CpG tienen propiedades distintivas. Estas islas presentan un tamaño que oscila entre 0.5 a 5 kb y se presentan en promedio cada 100 kb. Estas regiones no se encuentran metiladas, son regiones ricas en GC (60% a 70%), la proporción de CpG con respecto a GpC es de al menos 0.6, y por ello la frecuencia de dinucleótidos CpG no se suprime (Antequera y Bird, 1993_a; Cross y Bird, 1995). La cromatina que contiene islas CpG está en general altamente acetilada, carece de la histona H1, e incluye una región libre de nucleosomas (Tazi y Bird, 1990). Esta región con configuración de cromatina abierta facilita la interacción de factores de transcripción con los promotores de genes (Cross y Bird, 1995).

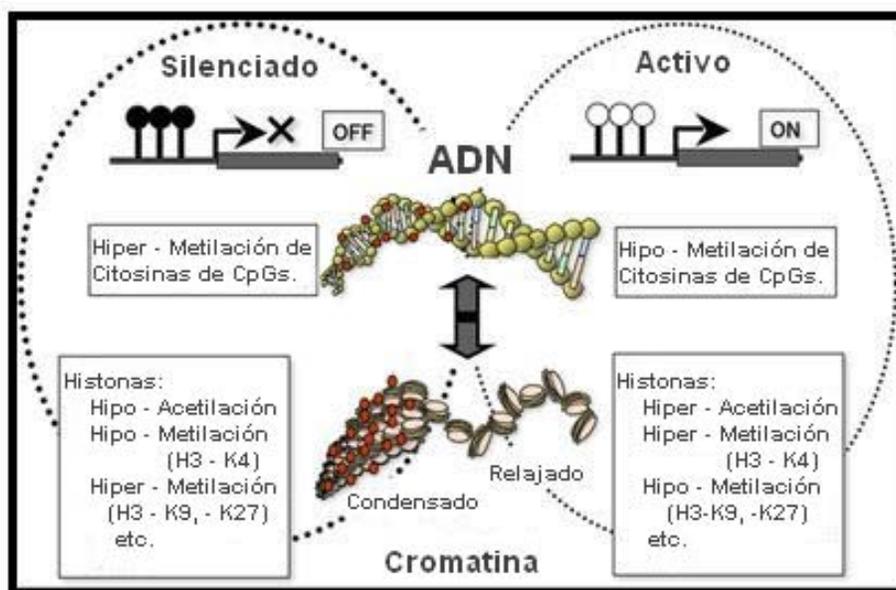


Fig. 2.- Cambios que sufre el sistema epigenético (metilación del ADN y estructura de la cromatina) en células de mamíferos (Figura modificada de Ohgane *et al.*, 2008).

La metilación del ADN y la estructura de la cromatina se coordinan a través de modificaciones de histonas, incluyendo la acetilación y metilación de las mismas. La metilación del ADN y la compactación de la cromatina se asocian con el silenciamiento genético. Una vez establecido el sistema epigenético, en la célula se diferencian los patrones que se heredaran a las generaciones celulares siguientes (Ohgane *et al.*, 2008).

Dependiendo del patrón de metilación que presentan, las regiones reguladoras del genoma se pueden clasificar en dos tipos. Aproximadamente la mitad de todos los genes del ratón y del humano (alrededor de 25,000 genes) contienen islas CpG (Antequera y Bird, 1993_a). La mayoría de dichos genes son “housekeeping” y presentan un patrón de expresión tisular; sin embargo, aproximadamente el 40% exhiben un patrón de expresión tejido-específico (Cross y Bird, 1995). En tejidos no cancerígenos, la gran mayoría de las regiones promotoras que contienen islas CpG se encuentran desmetiladas, independientemente de la actividad transcripcional del gen. Entre las principales excepciones, se pueden mencionar los genes no transcritos presentes en el cromosoma X inactivo y genes autosomales que sufren impronta genómica (uno de los alelos parentales se encuentra metilado) (Baylin, 1997). Por otro lado, algunos genes tejido - específico que carecen de islas CpG presentan un estado de metilación variable, el cual se correlaciona con su patrón de

expresión tejido específico y se encuentra inversamente correlacionado su estatus transcripcional (Cedar, 1988; Bird, 1992).

1.1.3 ADN metiltransferasas. El control epigenético de la expresión genética que se efectúa a través de la metilación de la citosina es facilitado por la actividad de las ADN metiltransferasas (ADNMTs) (Hitchler y Domann, 2007). A las enzimas que transfieren los grupos metilo a los anillos de citosina se les llama 5-metiltransferasas o ADN metiltransferasas (ADNMTs), estas enzimas han sido caracterizadas en una gran cantidad de eucariontes (Bestor, 1994). El sitio blanco de las ADNMTs en el ADN es el dinucleótido palindrómico CG (comúnmente referido como CpG, donde “p” denota el grupo fosfato. Las ADNMTs catalizan la *trans*-metilación de la citosina al transferir los grupos metilo presentes en las S-adenosilmetioninas (AdoMet) al carbono 5 del anillo de la pirimidina (Fig. 1). Esta reacción genera la 5-metilcitosina (5^mC) en el ADN y como residuo de la reacción se produce el cofactor S-adenosilhomocitostestina (SAH) (Hitchler y Domann, 2007).

La metilación de la citosina en los genomas de los mamíferos se efectúa, predominantemente, gracias a la actividad de tres ADNMTs a las cuáles se les conoce como: DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Dependiendo del sustrato con el que trabajan *in vivo*, estas enzimas se subdividen en dos clases (Bacolla *et al.*, 2001). La primera subclase es la encargada de “mantener la metilación del ADN”, esta reacción es catalizada por la DNMT1 y ocurre inmediatamente después de que se efectúa la duplicación del ADN. Este hecho hace pensar que la DNMT1 tiene el papel fundamental de transferir la información epigenética de las células madre a las hijas (Kautiainen y Jones, 1985). La actividad de mantenimiento de la metilación del ADN, que es ejercido por la DNMT1, es prescrita gracias a su alta afinidad por el ADN hemimetilado (Bolden *et al.*, 1986). La duplicación del ADN genera ADN hemimetilado, donde solo la hebra materna contiene CpGs metiladas. Durante la síntesis del ADN la DNMT1 se incorpora al complejo de duplicación a través de interacciones proteína/proteína (Beulieu *et al.*, 2002). Estas interacciones colocan a DNMT1 en sitios próximos a los dinucleótidos CpG hemimetilados recientemente sintetizados.

El primer gen eucariótico perteneciente a una ADNMT fue clonado hace una década (Bestor *et al.*, 1988) y fue el gen de la *Dnmt1* de ratón. Este gen se encuentra altamente conservado dentro de la mayoría de los eucariontes, incluyendo el humano (*DNMT1*) (Yen *et al.*, 1992). Interesantemente, los ortólogos de *Dnmt1* no se han caracterizado en organismos que carecen de metilación del ADN, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Singal y Ginder, 1999). La metiltransferasa *Dnmt1* de mamífero tiene una alta afinidad por los sustratos hemimetilados pero es capaz de llevar a cabo metilación *de novo* en sustratos no metilados *in vitro*. Se ha demostrado que la actividad *de novo* de la metiltransferasa *Dnmt1* puede ser estimulada por estructuras de ADN aberrantes (Laayoun y Smith, 1995).

La segunda subclase son las ADNMTs encargadas de la metilación *de novo* del ADN, estas son las responsables de establecer, post-fecundación, nuevos patrones de metilación que influyen en la regulación de la expresión genética. La metilación *de novo* es catalizada por DNMT3a y DNMT3b. El momento en que se produce la metilación *de novo* es desconcertante, puesto que puede ocurrir en cualquier momento subsecuente a la duplicación del ADN, e iniciar nuevos eventos epigenéticos que pueden ser heredados durante divisiones celulares futuras. Estas metiltransferasas *de novo* fueron identificadas en 1998 con la clonación de *DNMT3a* y *DNMT3b* por Masaki Okano *et al.* (Okano *et al.*, 1998; 1999; Xie *et al.*, 1999). *DNMT3a* y *DNMT3b* son codificadas por diferentes genes (Weisenberger *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Su caracterización inicial reveló una diferencia crucial entre sus actividades y las de DNMT1; ya que, DNMT3a y DNMT3b no tienen una preferencia por el sustrato de ADN hemimetilado o hipometilado. Esta alta afinidad por dinucleótidos CpG hipometilados es crítica para su papel como ADNMT

de metilación *de novo* (Okano *et al.*, 1999). Las dos clases de enzimas componen el equipo enzimático básico para generar y perpetuar el control epigenético de la expresión genética durante el desarrollo, la gametogénesis y la impronta genómica.

1.1.4 Inhibidores de la actividad de ADN metiltransferasas. Dependiendo de sus mecanismos de acción, los inhibidores de la actividad de las ADNMTs pueden dividirse en cinco grupos (Zing y Jones, 1997).

- **Análogos de los nucleósidos (Grupo I).**- Los análogos de los nucleósidos se incorporan a la cadena de ADN e inactivan a las ADNMTs interfiriendo con la unión covalente entre la enzima y el ADN, bloqueando de esta manera la metilación de las citosinas en la fase S (Síntesis) del ciclo celular. El inhibidor de las ADNMTs más estudiado es el 5-azacitidina (5-azaC), el cuál es un análogo de la citosina que se incorpora al ADN en el lugar de la citosina durante el proceso de la duplicación e inhibe la actividad de las ADNMTs. (Gabarra y Bhagwat, 1995; Jackson-Grusby *et al.*, 1997). Algunas de las propiedades biológicas del 5-azaC son: alterar estados diferenciados de ciertas células eucarióticas e inducir nuevos fenotipos (Taylor y Jones, 1979), alterar el funcionamiento de células eucarióticas (Doerksen y Trasler, 1996) e inducir selectivamente la activación de ciertos genes (Dasari *et al.*, 2002). Debido a que el 5-azaC es muy inestable, se han sintetizado análogos mucho más estables como: arabinofuranosil-5-azacitosina, pseudo-isocitidina, 5-fluorocitidina y dihidro-5-azacitidina. (Zing y Jones, 1997)

- **Análogos de S-adenosilmetionina (AdoMet) y S-adenosilhomocisteína (SAH) (Grupo II).**- Los análogos de AdoMet y SAH como Sinefungin y derivados actúan como inhibidores competitivos de AdoMet e inhiben no solamente a las ADNMTs sino también a otras enzimas que requieren AdoMet como: AdoMet descarboxilasas y SAH hidrolasas. Algunos de estos análogos tienen usos potenciales como antifúngicos, antiparásitos, anticancerígenos y agentes antibacteriales (Zing y Jones, 1997).

- **Grupo III.**- Los inhibidores que pertenecen a este grupo inhiben la síntesis de AdoMet mediante la interferencia del metabolismo de la metionina, en este grupo se encuentran: antifolato del metotrexato - el cual inhibe a la dihidrofolato-reductasa, además la etionina y la L-*cis*-AMB inhiben a las AdoMet sintetetasas (Zing y Jones, 1997).

- **Grupo IV.**- Los inhibidores de este grupo actúan mediante impedir la degradación de SAH o la síntesis de espermina y espermidina, ocasionando la acumulación de: SAH, AdoMet descarboxilasas (dc-AdoMet) y 59-metil-59-deoxiadenosina (MTA). Finalmente, como consecuencia se produce la inhibición de la metilación del ADN. Los inhibidores de SAH hidrolasa ocasionan la acumulación de SAH; los inhibidores de ornitina descarboxilasa (ODC), espermidina y espermina sintetasa ocasionan la acumulación de dc-AdoMet; los inhibidores de metil-59-adenosina fosforilasa ocasionan la acumulación de MTA (Zing y Jones, 1997).

- **Grupo (V).**- Este grupo se compone de moléculas que inhiben la metilación del ADN a través de varios mecanismos. En este grupo están péptidos, ácido butírico, espermina y espermidina, algunos carcinógenos, o agentes alcalinos que modifican al ADN que tienen como sitio blanco o inactivan a las ADNMTs. Otro miembro de este grupo es el mRNA antisentido del mRNA de las ADNMTs (Zing y Jones, 1997).

1.1.5 La metilación del ADN y la represión transcripcional. Desde hace mucho tiempo se han propuesto hipótesis que explican el papel que tiene la metilación del ADN en la regulación diferencial de la expresión genética (Riggs, 1975; Holliday, 1975). Varios estudios han encontrado que la metilación sitio-específica de la citosina, dentro o de forma adyacente a los genes, se correlaciona con la represión transcripcional (McGhee y Ginder, 1979; Ginder y McGhee, 1981). La relación inversa entre la metilación de la citosina y la transcripción

ha sido observada en una gran cantidad de genes, aunque no de forma universal (Singal y Ginder, 1999). Razin y Cedar (1991) han descrito la habilidad de la metilación del ADN sobre el promotor para inhibir la transcripción de una variedad de genes en ensayos de transfección *in vitro*, y en algunos casos, dicha metilación se relaciona con el estado inactivo de los genes *in vivo*.

Hasta el momento se han descrito al menos cuatro mecanismos mediante los cuales la metilación inicia la represión transcripcional, en la figura 3 ilustramos tres de estos mecanismos (Singal y Ginder, 1999). En el primer mecanismo la metilación del ADN, que se encuentra sobre el promotor, interfiere directamente con la unión de los factores de transcripción a sus sitios blanco. Diversos factores de transcripción, entre los que se incluyen: AP-2, c-Myc/Myn, el activador CREB ciclina dependiente de AMP, E2F y NF-kB, reconocen secuencias que contienen residuos CpG pero la unión a estas secuencias se bloquea cuando se encuentran metiladas. Sin embargo, este mecanismo no es el único mediante el cual la metilación regula negativamente la transcripción. Esto se puede concluir debido a que existen factores de transcripción como: Sp1 y CTCF. Los cuales se unen a los promotores de los genes, cuya transcripción regulan, aunque éstos se encuentren metilados (Tate y Bird, 1993). Además, muchos sitio blanco de factores de transcripción no presentan residuos del dinucleótido CpG.

El segundo mecanismo implica la unión directa de específicos factores de transcripción a los sitios metilados del ADN, se piensa que estos factores transcripcionales actúan como represores de la transcripción. Se han identificado a dos factores transcripcionales que actúan a través de este mecanismo y son: MeCP1 y MeCP2 (proteínas tipo 1 y 2 de unión a 5-metilcitosina); se ha demostrado que estas proteínas se unen a dinucleótidos CpG metilados, en cualquier secuencia contexto. Aunque en vertebrados, se ha visto que la metilación del ADN inhibe el inicio de la transcripción, en *Neurospora* la metilación del ADN bloquea la elongación de la transcripción a través de mecanismos que son mediados por MeCP1 y/o MeCP2 (Rountre y Selker, 1997).

La importancia de MeCP1 en el mecanismo mediante el cual el ADN regula la expresión genética queda manifiesta debido a que en células en las que esta proteína no se encuentra la metilación del ADN regula negativamente la transcripción de muy pocos genes (Boyes y Bird, 1991). Por otro lado, Boyes y Bird (1991) mencionan que la unión de MeCP1 a genes hiper-metilados inhibe su transcripción. La unión de MeCP1 a promotores hipo-metilados forma un complejo inestable, por lo cual MeCP1 es capaz de bloquear la transcripción de genes siempre y cuando su promotor se encuentre hiper-metilado (Boyes y Bird, 1992). Algunos estudios reportan que al transfectar genes cuyo promotor se encuentra hipo-metilado, estos se expresan ante la presencia del enhancer SV40 en posición *cis*. Sin embargo, no es posible transcribir genes transfectados cuyo promotor se encuentra hiper-metilado, aún ante la presencia de enhancers fuertes en posición *cis* (Boyes y Bird, 1992).

Recientemente se ha demostrado que un complejo electroforético, con una movilidad similar al MeCP1, se forma eficientemente con las secuencias hiper-metiladas del promotor del gen embrionario *rho-globina* pero no con las secuencias hipo-metiladas (Singal, 1997). Además, este complejo puede ser detectado usando extractos nucleares de las mismas células eritroides primarias del ave, en las cuales se ha demostrado que la inhibición de la transcripción es mediada por la metilación (Singal, 1997). Así mismo, se ha demostrado que la metilación juega un papel muy importante en el silenciamiento de la transcripción *in vivo* del gen *rho-globina* en células eritroides aviares de adulto (Ginder *et al.*, 1984, Burns *et al.*, 1988). Estos resultados sugieren que el papel de MeCP1, o de un complejo similar, es silenciar al gen *rho-globina* embrionario durante la eritropoyesis (Singal y Ginder, 1999).

PCM1, un componente del complejo MeCP1, tiene un dominio de unión ha sitios CpG metilados (MBD, por sus siglas en inglés: *methyl-CpG binding domain*) y dos dominios ricos de

cisteína (CXXC). El dominio CXXC se encuentra también en las ADNMTs de animales y en proteínas HRX (también conocidas como MLL ó ALL-1) de mamíferos. Aunque el significado funcional de los dominios CXXC aún no se conoce, existe evidencia de que es parte del dominio de represión de la transcripción (Zelevnik-Le, 1994; Prasad *et al.*, 1995). Se ha demostrado que PCM1 reprime la transcripción *in vitro* de una forma dependiente a la metilación (Cross *et al.*, 1997).

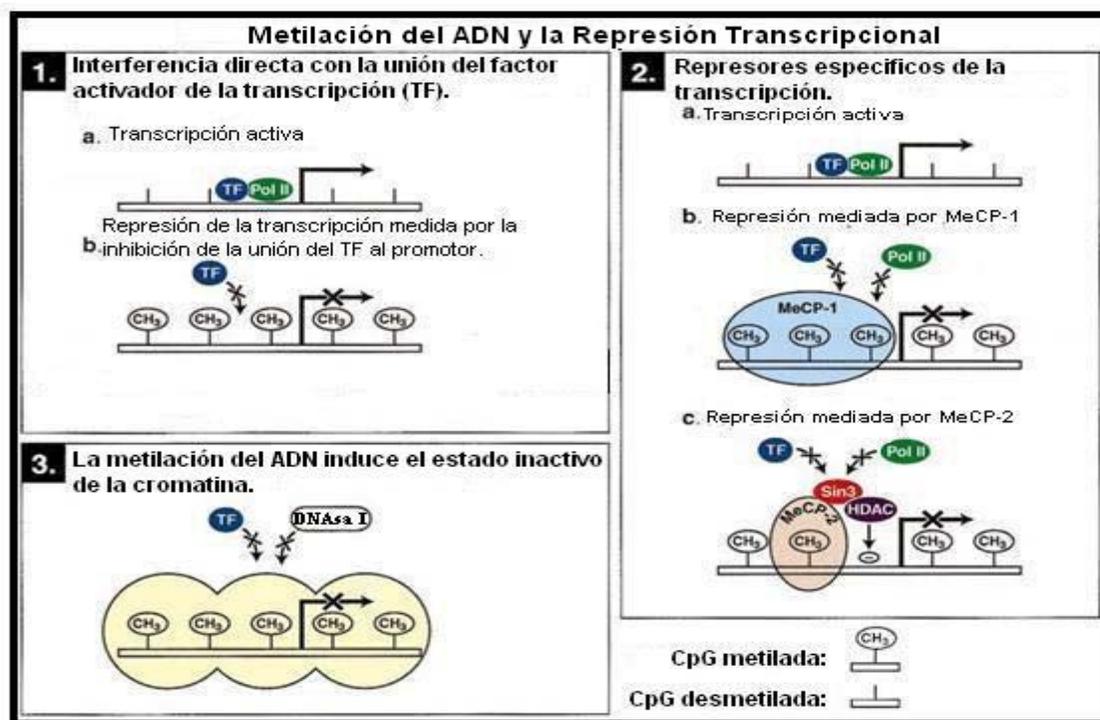


Fig. 3.- Mecanismos mediante los cuales se propone que la metilación de la citosina reprime la transcripción (Figura modificada de Singal y Ginder, 1999).

MeCP2 es más abundante que MeCP1 y es capaz de unirse a ADN que contenga, como mínimo, un solo dinucleótido CpG metilado (Meehan *et al.*, 1992). MeCP2, tal como las ADNMTs, es imprescindible para la viabilidad de las células madre de origen embrionario, pero es esencial para el desarrollo del embrión (Tate *et al.*, 1996). MeCP2 tiene dos dominios: 1) el dominio de unión al dinucleótido CpG metilado, el cual es esencial para su localización cromosomal y 2) el dominio represor de la transcripción (TRD), este dominio tiene la capacidad de inhibir la transcripción de un promotor a distancia, hecho que sugiere que MeCP2 interactúa con la maquinaria de transcripción o con el complejo de iniciación (Nan *et al.*, 1997). Se demostró que una región de MeCP2, que se localiza dentro del TRD, se asocia con el complejo co-represor compuesto por mSin3A y desacetilasas de histonas. El hecho de que la represión transcripcional *in vivo* mediada por MeCP2 puede ser revertida por Tricostatina A, un inhibidor de desacetilasas de histonas, sugiere que dos mecanismos de regulación genética: la metilación del ADN y la desacetilación de histonas, actúan conjuntamente gracias a la acción de MeCP2 (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Además, aunque en algunos casos se ha demostrado que en la represión transcripcional, la metilación del ADN juega un papel dominante sobre la desacetilación de histonas (Ginder *et al.*, 1984; Burns *et al.*, 1988). Se ha propuesto que MeCP2 contribuye al ensamblaje y estabilidad de una estructura cromatínica de carácter represivo (Kass *et al.*, 1997_a). Todo lo anterior hace pensar que cuando MeCP2 se une al DNA metilado puede

estabilizar a los nucleosomas en esta región particular de la cromatina (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998).

En el tercer mecanismo la metilación media la represión transcripcional alterando la estructura de la cromatina. Se ha demostrado que el ADN metilado se une preferencialmente a la Histona H1, la histona que asocia a los nucleosomas en complejos plegados de un orden mayor (McArthur y Thomas, 1996). De esta manera, el estado inactivo de la cromatina puede ser propagado a lo largo del ADN. Los resultados de Keshet *et al.* (1986) apoyan lo anterior, en este estudio se transfectaron células L de ratón con un plásmido portador de una construcción que contenía el gen *β -globina* y otros genes eucariontes, esta construcción fue transfectada en dos condiciones: 1) la construcción fue previamente metilada *in vitro* y 2) la construcción no fue metilada *in vitro*. Keshet *et al.* (1986) reportaron que después de su integración y propagación en el cultivo celular, las secuencias de ADN presentes en la construcción no metilada *in vitro* fueron detectadas en cromatina activa y sensible a la digestión con DNasa I; en contraste las secuencias de ADN presentes en la construcción metilada *in vitro* fueron encontradas en cromatina resistente a la digestión con DNasa I y se encontraban transcripcionalmente inactivas. Así mismo, en un estudio en los que se microinyectó en el núcleo ciertas plantillas de genes, metilados e hipometilados, se encontró que la metilación inhibe la transcripción sólo después de que la cromatina es remodelada a su estado inactivo (Kass *et al.*, 1997_b). Un fuerte activador transcripcional GAL4-VP16, no puede cauterizar el efecto que ejerce la cromatina en su estado inactivo (Kass *et al.*, 1997_b). Para estabilizar el estado inactivo de la cromatina, la metilación bloquea el acceso de factores de transcripción (Kass *et al.*, 1997_{a, b}).

Un asunto que se debe considerar, con respecto a la metilación del ADN y el silenciamiento transcripcional, es determinar si la metilación es un mecanismo de control primario o un efecto secundario de la actividad genética. Se ha visto que en algunos genes, cuya secuencia nucleotídica contiene CpGs, la metilación ocurre después del silenciamiento transcripcional; en otros genes, la pérdida de la metilación ocurre después de la activación transcripcional (Sullivan *et al.*, 1989). Así mismo, se ha demostrado que en algunos sistemas la transcripción se encuentra levemente reprimida por la metilación de CpG, aunque dichos sistemas presenten las condiciones nucleares óptimas para la transcripción, incluyendo la cromatina sensible a la DNasa I (Ginder *et al.*, 1984; Singal *et al.*, 1997). Por lo tanto, parece ser que la metilación, particularmente de genes ricos en CpGs, tiene como función prevenir la activación transcripcional a pesar de que exista un ambiente nuclear óptimo; dicha función sigue o precede a otros eventos que encienden o apagan un gen (Singal y Ginder, 1999).

1.1.6 Metilación del ADN durante la Evolución Biológica. Se han propuesto dos hipótesis que establecen el papel evolutivo de la metilación del ADN. La primera hipótesis surgió partiendo del hecho de que los genes han incrementado su complejidad biológica y numérica. El tamaño del genoma de los organismos de vida libre se ha incrementado: partiendo de unos centenares de genes, en los procariontes (por ejemplo: *Escherichia coli* tiene 4,000 genes), hasta llegar a rangos que van desde los 5,000 a 10,000 genes, en eucariontes invertebrados, y de los 7,000 a 25,000 genes, en vertebrados (Singal y Ginder, 1999). Bird (1995) propone que: “debido a que se ha incrementado el número de genes tejido-específico durante la evolución, la eficiencia de la represión genética debe de haber aumentado también”. Este incremento en la eficiencia de la represión genética se ve evidenciado en el hecho de que: la envoltura nuclear permite que, en las células eucariontes, la traducción y la transcripción se encuentren separadas en tiempo y localización. Mientras que en procariontes la traducción comienza inclusive antes que la transcripción haya terminado. Además, los genes eucariotas no se agrupan en operones como los de los procariontes, esto permite que cada gen eucariota se transcriba separadamente, con un control transcripcional independiente para cada gen. Por otro

lado, los vertebrados, en contraste con los invertebrados, tienen una mayor cantidad de genes y es posible que la metilación del ADN actúe como mecanismo de represión transcripcional adicional (Bird, 1995). Al comparar el patrón de metilación de los invertebrados con respecto al de los vertebrados se encuentran diferencias importantes. En los invertebrados, la metilación de la citosina en el genoma ocurre en una pequeña fracción de los dinucleótidos CpG y en algunos casos, como en *Drosophila*, la proporción del ADN que está metilado es tan baja que no se detecta (Bird, 1995). Parece ser, que en la mayoría de los eucariontes, la metilación del ADN actúa como parte de un sistema que minimiza el daño potencial que puede ser generado por elementos de ADN como los transposones, genomas virales, etc. Sin embargo, debido a que en los vertebrados una gran parte del ADN se encuentra metilado, exceptuando las islas CpG. Bird (1995) propone además, que “la metilación del ADN, en los vertebrados, provee un novedoso estrato de represión global, reduciendo el ruido transcripcional y permitiendo que el organismo acumule y utilice genes, extra a los que son cruciales para su desarrollo, de forma selectiva”. Una teoría alternativa propone que la metilación de la citosina en mamíferos es un sistema nuclear de defensa propio del hospedero, este sistema evolucionó principalmente para contrarrestar los elementos genéticos móviles del sistema endógeno parasitario que representaban una amenaza (Yoder *et al.*, 1997). La metilación de la citosina inactiva al promotor de la mayoría de los virus y los transposones, incluyendo los elementos Alu, los cuales se encuentran metilados en el ADN de las células durante el proceso de diferenciación (Singal y Ginder, 1999). De hecho, la gran mayoría de las 5^mCs que posee el genoma se encuentran dentro de estos elementos. Se ha demostrado que drogas desmetilantes activan la transcripción de transposones endógenos (Schmid, 1996). Además, al transfectar en células humanas elementos L1 hipo-metilados de humano, estos presentan una alta tasa de transposición (Moran *et al.*, 1996) excediendo la tasa de transposición de elementos endógenos idénticos que se encuentran metilados. Para un elemento móvil es beneficioso transponerse en aquellos tejidos que le aseguren la transmisión vertical a la siguiente generación del hospedador. Sin embargo la transposición en tejidos somáticos probablemente sólo resultaría en una pérdida de funcionalidad en el hospedador, sin ningún beneficio para el elemento. Se piensa que la transcripción del elemento L1 de humanos se limita a células indiferenciadas: células germinales tempranas y células tumorales. Esto puede ser debido al significativo decremento de metilación existente en células indiferenciadas (López *et al.*, 1999). De hecho, se ha sugerido que uno de los propósitos de la metilación de CpG es reducir la expresión de elementos móviles en células diferenciadas (Yoder *et al.*, 1997).

1.1.7 La metilación del ADN en el desarrollo embrionario. La idea de que la metilación del ADN controla la expresión genética fue propuesta por primera vez por Robin Holliday y Hohn Pugh en 1975. Ellos propusieron que la metilación del ADN tiene el papel de controlar la actividad de los genes que participan en cada etapa del desarrollo embrionario. Tres eventos del desarrollo embrionario en los que la metilación del ADN juega un papel importante son: 1) La impronta genómica, 2) La inactivación del cromosoma X y 3) La regulación de la expresión tejido-específica de genes. A continuación mencionaremos el papel de la metilación del ADN en cada uno de los casos anteriores.

Impronta genómica.- La impronta genómica es un fenómeno genético por el que ciertos genes son expresados de un modo específico que depende del sexo del progenitor. En los organismos diploides las células somáticas tienen dos copias del genoma. Por lo tanto, cada gen autosómico está representado por dos copias o alelos, cada una de ellas heredada de un progenitor en la fertilización. En la gran mayoría de los genes de los autosomas, la expresión de ambos alelos sucede simultáneamente. Sin embargo, una pequeña proporción de los genes (<1%) está "impresa", es decir, que su expresión depende de sólo uno de los alelos. En mamíferos, hay por lo

menos 30 genes conocidos cuya expresión es controlada a través de la impronta genómica. Esto significa que una condición severa o letal surge si el alelo que se expresa sufre una mutación. Sin embargo, si la misma mutación surge en el alelo que no se expresa no perjudicará el desarrollo del embrión. Esto también significa que los cromosomas maternos y paternos son requeridos para el desarrollo normal de mamíferos. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario de ratón, únicamente se activa el alelo paterno del gen que codifica al factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (*Igf2*) localizado sobre el cromosoma 7. Contrariamente, el alelo del gen que codifica para la proteína que une a este factor de crecimiento (*Igf2r*) se localiza sobre el cromosoma transmitido por la madre. La proteína *Igf2r* une y degrada los excesos de *Igf2*. Una cría de ratón que hereda la supresión del alelo paterno del gen *Igf2r* es normal, pero si la misma supresión es heredada de la madre, el feto experimenta un 30% de incremento en el crecimiento y muere tardíamente durante la gestación (Barlow *et al.*, 1991; DeChiara *et al.*, 1991; Bartolomei y Tilghman, 1997).

En seres humanos la pérdida de un segmento particular del brazo largo del cromosoma 15 resulta en diferentes fenotipos dependiendo si la pérdida está en el cromosoma derivado del progenitor masculino o el femenino. Si el cromosoma con el segmento defectuoso o desaparecido viene del padre, el niño nacerá con el síndrome de Prader-Willi, una enfermedad asociada con retraso mental leve, obesidad, gónadas pequeñas y corta estatura. Si el segmento defectuoso viene de la madre, el niño tendrá síndrome de Angelman, caracterizado por retraso mental severo, convulsiones, ausencia de habla y tiene períodos prolongados de risa inmotivada (Knoll *et al.*, 1989; Nicholls *et al.*, 1998).

En tales casos, las diferencias entre los alelos que se expresan y los que no se expresan en general involucran la metilación de residuos de citosina (Arney *et al.*, 2001). En células germinales primordiales que dan origen al espermatozoide y a los ovocitos, se eliminan casi en su totalidad todas las diferencias de metilación del ADN (Monk *et al.*, 1987; Driscoll y Migeon, 1990). Sin embargo, conforme la célula germinal se desarrolla en espermatozoide u ovocito, sus genes experimentan una extensa metilación. Además, el patrón de metilación de un gen dado puede diferir entre el espermatozoide y el ovocito. Estas diferencias de metilación específicas de un gen se conservan en los cromosomas de las células embrionarias (Sanford *et al.*, 1987; Chaillet *et al.*, Kafri *et al.*, 1992). La metilación de una región enhancer cerca del gen de ratón *Igf2* determina si el gen será o no expresado, y este enhancer es metilado de modo diferente en el espermatozoide y en el ovocito. La expresión de los *loci* maternos y paternos sobre el cromosoma 15 humano también depende de las diferencias de metilación en regiones específicas sobre el cromosoma (Zesching *et al.*, 1997; Ferguson-Smith y Surani, 2001). Esta marca de un gen cuando viene del padre o de la madre es denominada impronta genómica. La impronta genómica agrega información al genoma heredado, información que puede regular los patrones espaciales y temporales de la actividad de un gen.

La inactivación del cromosoma X.- En *Drosophila* y en mamíferos, las hembras se caracterizan por poseer dos cromosomas X por célula, mientras que los machos se caracterizan por tener un único cromosoma X por célula. A diferencia del cromosoma Y, el cromosoma X contiene miles de genes que son esenciales para la actividad celular. Sin embargo, a pesar de que las células de las hembras tienen el doble número de cromosomas X que los que tienen los machos, las células de los machos y de las hembras contienen aproximadamente iguales cantidades de productos génicos codificados por el cromosoma X. Esta igualdad es denominada compensación de la dosis.

En mamíferos, la compensación de la dosis se produce a través de la inactivación de uno de los cromosomas X en cada célula de la hembra. Por tanto, cada célula somática de mamíferos, si es femenina o masculina, tiene solo un cromosoma X en funcionamiento. Este fenómeno se

denomina inactivación del cromosoma X. La cromatina del cromosoma X inactivo es convertida en heterocromatina. El cromosoma X heterocromático es conocido como cuerpo de Barr (Barr y Bertram, 1949). Mediante el monitoreo de la expresión de los genes ligados al cromosoma X, cuyos productos pueden ser detectados en los embriones de las primeras etapas de desarrollo, se demostró que la inactivación del cromosoma X se produce casi al inicio del desarrollo. Esta inactivación parece ser crítica. Tagaki y Abe (1990) reportaron que en un embrión de ratón mutante, en el que ninguno de los dos cromosomas X se inactivan, se detecta muerte de las células ectodérmicas y ausencia en la formación de mesodermo, provocando finalmente la muerte del embrión a los 10 días de gestación. Los mecanismos de inactivación del cromosoma X todavía son pobremente entendidos. En 1991, Bown *et al* encontraron un transcrito de RNA que es producido únicamente a partir del cromosoma X inactivo de seres humanos (Brown, 1991_{a, b}). Este transcrito, *XIST*, no codifica una proteína. En su lugar, se localiza dentro del núcleo e interactúa con la cromatina X inactiva, formando un complejo cuerpo Barr-*XIST* (Brown *et al.*, 1992). Una situación similar existe en el ratón, en el que el transcrito del gen *Xist* cubre al cromosoma X inactivo (Borsani *et al.*, 1991; Brockdorff *et al.*, 1992). La expresión de *Xist* es necesaria solo para iniciar la inactivación del cromosoma X, una vez que la inactivación se produce, la transcripción de *Xist* es prescindible (Brown y Willard, 1994). El RNA *Xist* funciona solamente en *cis*, es decir, en el cromosoma que lo hizo. Cuando las células comienzan a diferenciarse, el RNA *Xist* se estabiliza sobre uno de los dos cromosomas X (Sheardown *et al.*, 1997). Una vez que *Xist* comienza la inactivación de un cromosoma X, el silenciamiento del cromosoma se mantiene al menos de dos maneras. El primer modo involucra la metilación del ADN. El *locus Xist* sobre el cromosoma X activo se hiper-metila, mientras que el gen *Xist* activo se mantiene hipo-metilado (Norris *et al.*, 1994). Lo que es más, se sabe que las regiones promotoras de numerosos genes están metiladas sobre el cromosoma X inactivo y sin metilar sobre el cromosoma X activo (Wolf *et al.*, 1984; Keith *et al.*, 1986; Migeon *et al.*, 1991). El segundo método de mantenimiento de la inactivación del cromosoma X parece involucrar la metilación de un residuo de lisina sobre la Histona H3, esto ocurre casi inmediatamente después de que el RNA *Xist* cubre al cromosoma X que será inactivado. Esta modificación post-traducciona se produce antes de que inicie el silenciamiento transcripcional. Poco tiempo después, la transcripción se detiene, y se produce otra modificación post-traducciona de las histonas asociadas al cromosoma X inactivo, incluyendo la eliminación de los grupos acetilo de la histona H4 (Jeppesen y Turner, 1993; Heard *et al.*, 2001; Mermoud *et al.*, 2002).

Expresión tejido-especifica de genes.- Durante el desarrollo embrionario, la expresión de algunos genes tejido-especifico dentro de un linaje celular está regulada por la metilación del ADN de las regiones promotoras de dichos genes. Este es el caso del promotor del gen *Sry* (por sus siglas en inglés: *sex-determining region of the Y chromosome*). La identificación del gen *SRY* como el FDT fue un gran avance en el campo de la determinación sexual. Después de aislarlo a partir de la región determinante del sexo que se encuentra en el cromosoma Y del humano (Sinclair *et al.*, 1990), se presento evidencia de que mutaciones *de novo* dentro de este gen llevan a la reversión sexual XY (Berta *et al.*, 1990; Jäger *et al.*, 1990). El ortólogo del ratón fue descubierto poco después. El papel del gen *SRY/Sry* en la determinación sexual quedó evidenciado cuando ratones XX a los que se transfectó un fragmento de 14kb del *Sry* de ratón desarrollaron fenotipo masculino (Koopman *et al.*, 1991). Nishino *et al.* (2004) reportaron que la metilación *in vitro* de la región localizada en el costado 5' no-codificante del gen *Sry* de ratón suprime su actividad, lo cual implica que la expresión de este gen es regulada negativamente por la metilación del ADN. El mapa de restricción de bisulfito y la secuenciación con bisulfito de sodio revelaron que la región localizada en el costado 5' no-codificante del gen *Sry* se encuentra hiper-metilada en las gónadas de embriones de ratón de 8.5dpc (días post-coito), en los cuales el

gen *Sry* no se expresa. Además, esta región se encuentra hipo-metilada en la gónada de embriones de ratón de 11.5 dpc. Así mismo, el estatus de hiper-metilación se mantiene en los tejidos que no expresan el gen *Sry*. Con estos datos se concluyó que la expresión del gen *Sry* se encuentra bajo el control de un mecanismo epigenético mediado por la metilación del ADN.

1.1.8 El código de histonas. El ADN está empaquetado en nucleosomas. El nucleosoma constituye la unidad básica de la estructura de la cromatina y está formado por un octámero de proteínas histónicas (dos moléculas de cada una de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4), envuelto en dos asas de ADN abarcando 146 pares de bases (Spotswood y Turner, 2002; Jenuwein y Allis, 2001; Zhang y Reinberg, 2001; Grozinger y Schreiber, 2002; Agalioti *et al.*, 2002). Además de organizar efectivamente al material genético en el núcleo, los nucleosomas juegan un papel importante en la regulación de la actividad genética debido a que controlan el acceso de los factores de transcripción al material genético. Cuando Karolin Luger *et al.* (1997) descubrieron que estructura del nucleosoma descubrieron que los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales de las proteínas histónicas sobresalen del eje central del nucleosoma. A estas protuberancias se les denominó “extremos amino-terminales de histonas”. Debido a que los extremos amino-terminales de las histonas se proyectan desde la estructura principal de los nucleosomas, son capaces de modular las interacciones: ADN - nucleosoma y nucleosoma - nucleosoma. El cambio de las interacciones entre los nucleosomas se efectúa por un complejo arreglo de modificaciones sobre los extremos amino-terminales de las histonas (Hitchler y Domann, 2007). Los extremos amino-terminales de las histonas están sujetas a modificaciones post-traduccionales como: acetilación de la lisina, metilación de la lisina y la arginina, fosforilación de la serina y ubiquitinación de la lisina (Jenuwein y Allis, 2001; Zhang y Reinberg, 2001; Agalioti *et al.*, 2002; Richards y Elgin, 2002).

La hipótesis del código de histonas propone que la combinación de diferentes modificaciones postraduccionales sobre los extremos amino-terminales de las histonas definen un código de señalización, el cual sirve como un lenguaje interfásico entre las histonas y los mecanismos de modificación de la cromatina; esta comunicación asigna a cada dominio de la cromatina una estructura particular y una función específica (Strahl y Allis, 2000; Turner, 2002). De hecho, cada histona tiene varios sitios susceptibles a sufrir modificaciones. Asumiendo que los núcleos de histonas de cada nucleosoma pueden adquirir diferentes modificaciones, su combinación en el microambiente multinucleosomal puede crear un código epigenético tremendamente complejo (Govin *et al.*, 2004). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que existen factores que reconocen y se unen a histonas que poseen un conjunto de modificaciones particulares (Jenuwein y Allis, 2001; Khorasanizadeh, 2004).

1.1.9 Acetilación y metilación de histonas. La adición y remoción de las modificaciones de histonas es un proceso enzimático. La acetilación de histonas es catalizada por enzimas denominadas acetiltransferasas de histonas (HATs), las cuales utilizan la acetil-CoA como cofactor (Racey y Byvo *et al.*, 1971; Noland *et al.*, 1971). Existen diversas HATs en las células de mamíferos. La acetilación de histonas ocurre principalmente en los residuos de lisina de los extremos amino-terminales de las histonas H3 y H4. El reclutamiento de las HATs a los promotores generalmente se asocia con la activación de la transcripción. Por ejemplo, usualmente las regiones reguladoras de genes que se encuentran transcripcionalmente activos presentan una gran cantidad de histonas acetiladas en la lisina 9 (H3K9ac). Sin embargo, contrario a la acetilación de histonas, la metilación de histonas puede activar o inhibir la transcripción, dependiendo de donde ocurre la modificación (Hitchler y Domann, 2007).

La familia de metiltransferasas de histonas (HMTs) se compone de enzimas capaces de metilar lisinas y argininas ubicadas en los extremos amino-terminales de las histonas. Las HMTs, al igual que las ADNMTs, utilizan AdoMet como cofactor y producen SAH como residuo de la reacción. La metilación de las HMTs sobre los aminoácidos ubicados en los extremos amino-terminales de histonas genera un incremento de la complejidad del mecanismo epigenético que controla la expresión genómica (Zhang *et al.*, 2003). Para ilustrar esta complejidad citaremos la dicotomía existente en la metilación de la histona H3. La dimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me₂) está usualmente asociada con la activación transcripcional. Mientras que la trimetilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me₃) inhibe la transcripción. Además, la metilación de ciertas lisinas de la histona H3 pueden bloquear la modificación de otras lisinas ubicadas en la misma histona (Wang *et al.*, 2001_a). Por otro lado, cuando SUV39 H1 trimetila a H3K9 (H3K9me₃) genera el sustrato de la proteína de unión a la heterocromatina 1 (HP-1) (Rea *et al.*, 2000). Una vez que HP-1 se une a H3K9me₂, recluta HMTs adicionales facilitando la formación de heterocromatina a lo largo del gen (Lachner *et al.*, 2001).

La acetilación y la metilación de los extremos amino-terminales de las histonas no son modificaciones permanentes. Las desacetilasas de histonas (HDACs) y las desmetilasas de histonas remueven la acetilación y metilación, respectivamente; lo cual le da plasticidad al mecanismo de control epigenético que controla la expresión genómica (Libby, 1970; Hay y Candido, 1983; Klose *et al.*, 2006). La presencia de HDACs dentro de las regiones reguladoras de los genes es consistente con el mecanismo de silenciamiento epigenético. Se puede mantener un estado de silenciamiento epigenético removiendo los grupos acetilo de las histonas. HDACs y desmetilasas de histonas son capaces de trabajar conjuntamente con las HAT y las HMTs a fin de silenciar la expresión genómica. Por ejemplo, cuando las HDACs remueven los grupos acetilo de H3K9 permiten que, esta misma, sea metilada por las HMTs; lo cual induce la formación de heterocromatina (Bartova *et al.*, 2005).

1.1.10 Desacetilasas de histonas (HDAC). Las HDAC también están involucradas en la acetilación reversible de proteínas no histónicas (por ejemplo: p53, tubulina y varios factores transcripcionales). Muchos tipos de cáncer están asociados con proteínas HAT y/o HDAC cuya actividad se encuentra alterada (Timmermann *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001_b; Jones y Baylin, 2002).

Las HDACs de mamíferos se han clasificado en tres clases. Las desacetilasas de la clase I (HDACs 1, 2, 3 y 8) presentan homología entre sus sitios catalíticos. Las desacetilasas de la clase II son: HDACs 4, 5, 6, 7, 9 y 10 (Grozinger *et al.*, 2001; De Ruijter *et al.*, 2003). El dominio catalítico C-terminal y el dominio regulador N-terminal de las HDACs 4, 5, 7 y 9 guardan homología entre sí (Marks *et al.*, 2003). Algunos residuos conservados presentes en ciertas regiones del núcleo catalítico de HDAC11 tienen homología con residuos del sitio catalítico de enzimas de la clase I y II de mamíferos (Marks *et al.*, 2003). Dos regiones del sitio catalítico de HDACs 6 y 10 presentan homología con las mismas regiones de las enzimas de clase II (Marks *et al.*, 2003). La tercer clase de HDAC se compone de una familia muy conservada de desacetilasas, llamada Sir2, dependientes de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) (Marks *et al.*, 2003). Las HDAC I y II se inhiben en presencia de Tricostatina A (TSA), Ácido Hidroxámico del Suberoylanilide (SAHA) y compuestos relacionados (Marks *et al.*, 2003).

Existe creciente evidencia de que las HDACs tienen una función tejido - específica. Los niveles de las HDACs 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10 son aproximadamente los mismos en tejido normal; sin embargo, HDAC 4 se expresa en tejido muscular embrionario de ratón pero no en el tejido muscular adulto (Khojbin *et al.*, 2001; Turner, 2002; De Ruijter *et al.*, 2003). Las HDACs de la clase I se encuentran casi exclusivamente en el núcleo; mientras que, las HDACs de la clase II conectan al núcleo y al citoplasma a través de ciertas señales celulares (Grozinger *et al.*, 2001; De

Ruijter *et al.*, 2003). Las HDACs 1 y 3 pueden desacetilar cualquier lisina presente en los extremo amino-terminales de cualquiera de los cuatro tipos de proteínas que componen al octámero de histonas, aunque con diferentes grados de efectividad (Turner, 2002). La HDAC 6 desacetila preferentemente las lisinas 5 y 8 de los extremo amino-terminales de la histona H4.

Las HDACs no se unen directamente al ADN pero son reclutadas a él mediante complejos proteicos que difieren en su subunidad composicional (Khochbin *et al.*, 2001). Por ejemplo, se ha reportado que las HDACs 1 y 2 forman un complejo proteico junto con Sir3, NurD (remodelador y desacetilador del nucleosoma) y N-CorR (receptor nuclear corepresor). Los extremos amino-terminales de HDACs 4, 5 y 7 interactúan con el factor de transcripción miogénico tipo 2, el cual está involucrado en la diferenciación muscular (Mckinsey *et al.*, 2001).

1.1.11 Inhibidores de desacetilasas de histonas. Los inhibidores de HDAC se pueden dividir en las siguientes clases estructurales: hidroxamatos, ciclo péptidos, ácidos alifáticos, benzamidas y cetonas electrofílicas (Marks *et al.*, 2003).

- **Inhibidores de HDAC de la clase de los hidroxamatos.-** La Tricostatina A (TSA) es un hidroxamato, fue el primer producto natural al que se le atribuyó la capacidad de inhibir directamente a HDAC (Yoshida *et al.*, 1990). El Ácido Hidroxámico del Suberoylanilide (SAHA), el cual contiene relativamente menor complejidad estructural, es un inhibidor (a concentraciones nanomolares) de HDACs parcialmente purificadas (Richon *et al.*, 1998). Se ha reportado que el CBHA (ácido bis (m-carboxicinamil) hidroxámico) es un potente inhibidor de HDAC (Richon *et al.*, 1998). También, se ha reportado que diversos derivados de CBHA, incluyendo LAQ-824 y ácidos sulfonamida hidroxámico (Curtin, 2002; Bouchain *et al.*, 2003; Lavoie *et al.*, 2001) son inhibidores potentes de HDAC.

- **Inhibidores de HDAC de la clase de los ciclo péptidos.-** Los ciclo tetrapéptidos constituyen la clase estructural más compleja de inhibidores de HDAC, entre ellos se encuentran: depsipéptido (Furumai *et al.*, 2002), apicidina (Singh *et al.*, 2002) y los CHAPs (péptido cíclico que contiene ácido hidroxámico) (Furumai *et al.*, 2001). Estos pueden inhibir a las HDACs estando a concentraciones nanomolares. Aún no han sido probados para el tratamiento de enfermedades (Marks *et al.*, 2003).

- **Inhibidores de HDAC de la clase de los ácidos alifáticos.-** Los ácidos alifáticos, son la clase de inhibidores de HDAC de menor potencia (activo solamente a niveles milimolares), entre ellos se puede mencionar al ácido calproico y fenil butirato (PB) (Phiel *et al.*, 2001; Boivin *et al.*, 2002).

- **Inhibidores de HDAC de la clase de las benzamidas.-** Ejemplos de inhibidores de la clase benzamida son: MS-275 y CI-994 (Marks *et al.*, 2003). Esta clase de inhibidores son menos potentes que los hidroxamatos y los tetrapéptidos cíclicos (Prakash *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 1999). Los CBHA son derivados de benzamidas y tienen la misma potencia (Lavoie *et al.*, 2001).

- **Inhibidores de HDAC de la clase de las cetonas electrofílicas.-** Las cetonas electrofílicas forman una nueva clase de inhibidores de HDAC. Entre estos agentes se encuentran varios trifluorometil cetonas y α -cetoamidas (Frey *et al.*, 2002). Este tipo de inhibidores, al igual que las benzamidas, inhiben a las HDACs estando a concentraciones micromolares (Marks *et al.*, 2003).

1.1.12 Mecanismo de acción de los inhibidores de desacetilasas de histonas. Los inhibidores de HDAC inducen: la diferenciación, el arresto del crecimiento y/o apoptosis. Se ha demostrado que ejercen este efecto sobre un espectro amplio de células: transformadas, en cultivo y tumores en animales (incluyendo cáncer hemático y tumores sólidos) (Marks *et al.*, 2001).

Para ilustrar lo anterior, a continuación describiremos el efecto que tiene el SB sobre el ciclo celular como resultado de su acción como inhibidor de HDAC (Yamamoto *et al.*, 1996). El SB es una sal de sodio de ácido butírico, tiene una cadena corta de ácido graso; y se encuentra en el plasma y el tracto gastrointestinal de mamíferos (Marks *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el SB inhibe la proliferación de células cancerígenas del colon (Siavoshian *et al.*, 1997; Archer *et al.*, 1998), el ovario (Krupitza *et al.*, 1996) y los carcinomas hepatocelulares (Yamamoto *et al.*, 1998). Ito *et al.* (2001) reportaron que al suministrar SB a células en cultivo de glioma humano (T98G, U251MG y U87MG) se inhibió la transición de la fase G1 a la S del ciclo de división celular; esta inhibición se asoció con un incremento en la expresión de p21^{WAF-1} y la reducción de la fosforilación de pRb. Para que se efectúe adecuadamente la fosforilación de pRb, y a su vez el ciclo celular progrese de la fase G1 a la S, se requiere que las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) 4/6 y CDK2 se activen al mismo tiempo que se expresan las ciclinas D y E, respectivamente (Marks *et al.*, 2003). p21^{WAF-1} forma un complejo con la ciclina D y CDK4 o 6 así como con la ciclina E y CDK2, por ello la reducción de la actividad de CDK ocasiona la inhibición de la transición de ciclo celular de la fase G1 a la S (Harper *et al.*, 1993).

El mecanismo de acción de los inhibidos de HDAC fue elucidado por Finnin *et al.* (1999). En su estudio reportaron los detalles estructurales de dos inhibidores de HDAC (TSA y SAHA) y su interacción con HDLP (un homólogo de las HDACs de mamífero). Este estudio reveló que el sitio catalítico de ambos inhibidores se conforma por: una bolsillo tubular, un sitio de unión a Zinc y dos sistemas cargados de Asparagina e Histidina comunicados entre sí (Fig. 4). Los residuos que forman parte del sitio catalítico de los inhibidores son los encargados de unirse al sitio activo de HDAC impidiendo su unión al sustrato, lo cual ocasiona su inhibición y la consecuente acumulación de histonas acetiladas en el núcleo celular (Fig. 4). Los residuos que conforman el sitio activo de las HDAC y que tienen contacto con los inhibidores se conservan en toda la familia de las HDAC.

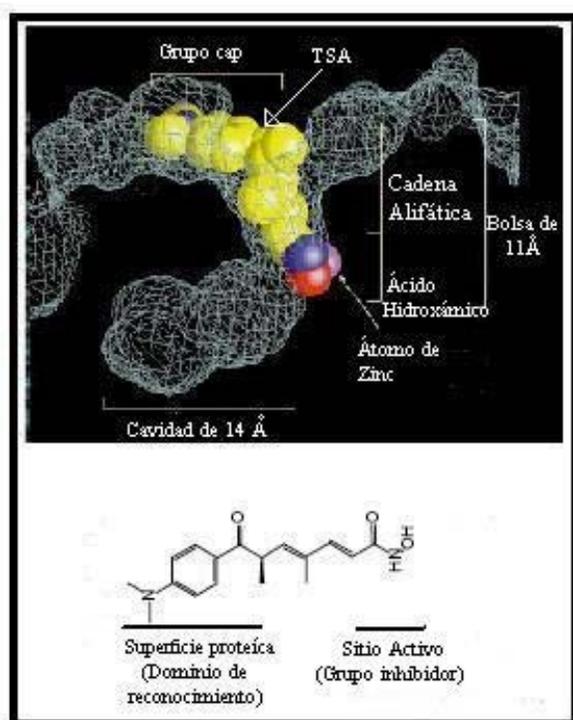


Fig. 4.- Representación de la estructura cristalográfica de la interacción de TSA con el sitio activo de HDLP (panel superior). Estructura química de TSA (panel inferior). (Figura modificada de Finnin *et al.*, 1999)

El grupo de ácido hidroxámico, la mayor parte de la cadena alifática y parte del grupo fenil-dimetilamina del TSA están enterrados en el sitio activo de HDLP (60% de la cara superficial del TSA). La cavidad interna del sitio activo de HDLP tiene un volumen de 144Å³ (panel superior). (Finnin *et al.*, 1999)

Se cree que el efecto de los inhibidores de HDAC es causado, en parte, debido a la acumulación de proteínas acetiladas, como las histonas, las cuales parecen tener un papel

fundamental en la regulación de la transcripción genética (Jenuwein y Allis, 2001; Zhang y Reinberg, 2001; Agalioti *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que los inhibidores de HDAC evitan la formación de tumores a través del siguiente mecanismo: los inhibidores de HDAC evitan la desacetilación de histonas, la acumulación de histonas acetiladas ocasiona la activación (o represión) de la transcripción de un número selecto de genes cuya expresión causa la inhibición del crecimiento de las células tumorales (Marks *et al.*, 2003). El perfil de expresión de células en cultivo en presencia de los inhibidores apoya este modelo. Los estudios demuestran que la expresión de un pequeño número de genes (del 2-5%) se altera (activa o reprime) (Butler *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Rogione *et al.*, 2001; Van Lint *et al.*, 1996). El mecanismo de represión o activación de genes aún no se entiende por completo, sin embargo es claro que es resultado de un efecto directo o indirecto de la acetilación de histonas o del incremento de la acetilación de otras proteínas no histónicas (ejemplo: factores de transcripción) (Marks *et al.*, 2003).

Uno de los genes cuya expresión comúnmente es inducida por inhibidores de HDAC es p21^{WAF1} (cinasa inhibidora del ciclo celular) en células de: cáncer de colon humano, H1299 del cáncer de pulmón humano, MDA-MB-435 del cáncer de mama y A549 del cáncer de pulmón humano (Nakano *et al.*, 1997; Sambucetti *et al.*, 1999). La expresión de p21, inducida por los inhibidores de HDAC, se correlaciona con el incremento de la acetilación de histonas en su región promotora (Sambucetti *et al.*, 1999; Richon *et al.*, 2000), sugiriendo que p21^{WAF1} es un gen blanco directo de los inhibidores de HDAC. Lo que es más, células madre de origen embrionario que presentan deficiencia de HDAC1 presentan tasas de proliferación muy reducidas (Lagger *et al.*, 2002). Sin embargo, la inducción de p21^{WAF1} no se requiere para el efecto apoptótico inducido por el inhibidor de HDAC. De hecho, al inhibir la expresión de p21^{WAF1} inducida por SAHA ocasiona el incremento de la apoptosis (Vrana *et al.*, 1999). Además de la p21^{WAF1}, diversos genes son inducidos o reprimidos por los inhibidores de HDAC; estos genes deben jugar papeles importantes en la respuesta antiproliferativa inducida por el inhibidor de HDAC (Marks *et al.*, 2003).

Por otro lado, debido a que las HDAC también están involucradas en la acetilación reversible de proteínas no histónicas, sus inhibidores permiten que se incremente la acetilación de dichas proteínas. El incremento de esta modificación post-traduccional en ciertas proteínas altera la síntesis proteica de las mismas o de aquellas con las cuales se asocian. Por ejemplo, el depsipéptido causa un incremento en la acetilación de la proteína chaperona Hsp90, ocasionando un decremento en la unión de sus proteínas cliente y como consecuencia la degradación de estas últimas (Yu *et al.*, 2002). Es por ello, que se puede decir que la combinación de efectos transcripcionales y post-traduccionales ocasiona la alteración de la expresión proteica.

1.1.13 Modificaciones post-traduccionales de Histonas en el desarrollo embrionario. Las modificaciones post-traduccionales de histonas también están involucradas en la regulación de la expresión genética durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, el patrón de metilación de histonas cambia durante el desarrollo embrionario. La trimetilación de H3K9 y la monometilación de H4K29 cambian dinámicamente durante la formación del tubo neural del ratón (Biron *et al.*, 2004). La metilación de histonas y la maquinaria remodeladora de la cromatina también juega un papel vital en el control de la expresión de genes mediante la impronta genómica. Como ya se ha mencionado, la metilación del ADN es uno de los mecanismos mediante los cuales la impronta genómica tiene lugar. Sin embargo, la metilación de histonas también puede inducir la impronta genómica de forma independiente a la metilación del ADN. El gen *Kcnq1* sufre impronta genómica en la placenta del ratón mediante incrementar la hipo-metilación de H3K9 y la trimetilación de H3K2 (Umlauf *et al.*, 2004).

1.1.14 Cooperación entre los procesos epigenéticos. A pesar de que se ha intentado esclarecer el papel que tienen la metilación del ADN y/o la modificación de histonas en la activación del mecanismo epigenético que controla la transcripción; hasta el momento, es ampliamente aceptado que ambos procesos cooperan entre sí para controlar la expresión genética en mamíferos (Hichler y Domann, 2007). Estudios recientes encontraron que el ADN hipermetilado comúnmente se encuentra en heterocromatina condensada y transcripcionalmente inactiva (Antequera *et al.*, 1989; Boyes y Bird, 1991). Actualmente, se acepta que la metilación del ADN y la modificación de histonas son procesos que pueden activarse mutuamente; sin embargo, aún es incierto cual de los dos es precursor del otro (Hichler y Domann, 2007). Como hemos mencionado, se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales la metilación y la modificación de histonas actúan cooperativamente controlando la transcripción, algunos de ellos dependen de la actividad de las MeCPs y las ADNMTs (Fig. 5). Las MeCPs, después de unirse al ADN metilado, reclutan a enzimas modificadoras de histonas como: HDACs y HMT; las modificaciones de histonas definen un código de señalización que activa los procesos de heterocromatización de genes ocasionando su silenciamiento (Boyes y Bird, 1991; Fucks *et al.*, 2003_a). Por otro lado, las ADNMTs reclutan la maquinaria remodeladora de la cromatina, la cual inicia la represión epigenética de la transcripción (Bachman *et al.*, 2001; Fucks *et al.*, 2003_b). Además, a través de interacciones proteína-proteína, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas son capaces de generar la formación de heterocromatina y como consecuencia silenciar la transcripción de genes (Hichler y Domann, 2007).

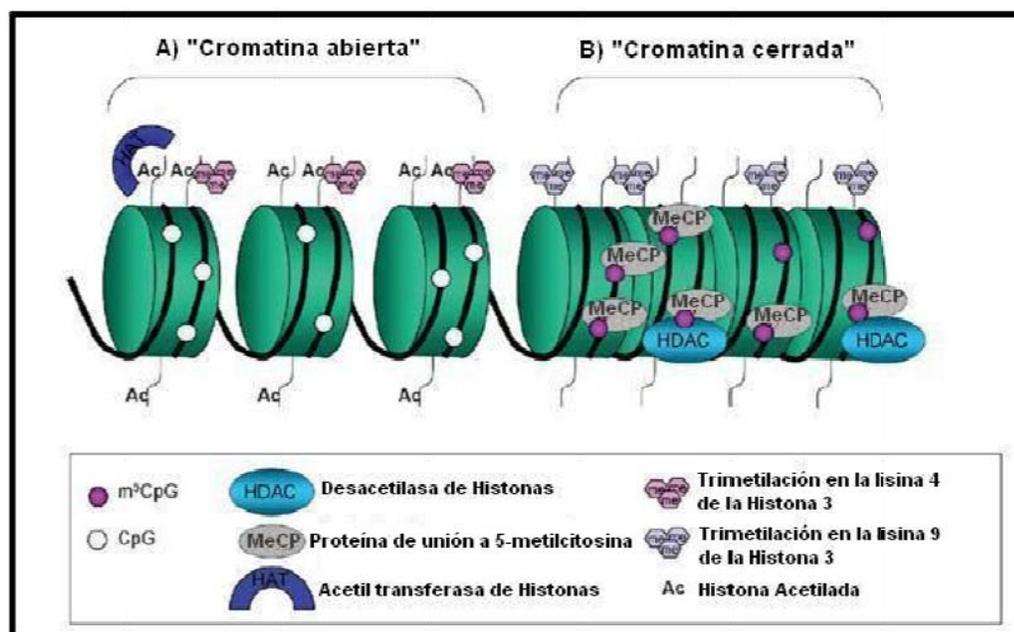


Fig. 5.- Estructura cromatínica de promotores activos e inactivos (Figura modificada de Grønbaek *et al.*, 2007).

A) Cromatina estructuralmente activa en algunos casos se caracteriza por citosinas hipo-metiladas y acetilación en los extremos amino-terminales de las histonas. Esta estructura porta una marca de activación: la histona H3 se encuentra trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3) (Grønbaek *et al.*, 2007).

B) Las MeCP, después de unirse a 5^mC, atraen a HDACs, las cuales remueven los grupos acetilo de los extremos amino-terminales de las histonas, como consecuencia el ADN se compacta en una estructura heterocromática. Esta estructura porta una marca de silenciamiento: la histona H3 se trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3) (Grønbaek *et al.*, 2007).

1.2 Determinación sexual en vertebrados.

En vertebrados la gónada embrionaria pasa por tres fases de desarrollo. La primera fase consiste en la formación de una gónada bipotencial o cresta genital, en la cual la gónada se forma como un tejido mesonefrico ventromedial espeso. Esta cresta genital tiene el potencial de diferenciarse como ovario o testículo, sin embargo su destino se establece durante la segunda fase de desarrollo en la cual se establece el sexo del embrión. En la tercera fase del desarrollo, la gónada adquiere el fenotipo de ovario o testículo (Merchant-Larios, 1993).

El término “sexo gonadal” se refiere al proceso de diferenciación sexual que lleva a cabo la gónada indiferenciada para transformarse en testículo u ovario. Este proceso resulta fundamental en la fisiología de la reproducción, ya que representa la primera manifestación fenotípica de la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario. Dicha diferenciación fenotípica es tanto morfológica como fisiológica, y durante ella la gónada indiferenciada adquiere la capacidad de sintetizar y secretar algunos factores necesarios para la diferenciación sexual (Merchant-Larios, 1993).

Es necesario señalar la diferencia entre *determinación sexual* y *diferenciación sexual*. La *determinación sexual* es el estadio del desarrollo en el cual se establece el destino sexual; mientras que la *diferenciación sexual* se refiere a las diferencias detectables (camino molecular) entre los embriones machos y hembras en cualquier estadio de desarrollo. En otras palabras la determinación se refiere a la causa y la diferenciación se refiere al efecto. (Merchant-Larios, 2001).

En los vertebrados existen dos tipos principales de determinación sexual. La determinación sexual genotípica (DSG) se caracteriza porque los factores genéticos determinan el fenotipo sexual de la gónada inicialmente bipotencial; entre los organismos que exhiben este tipo de determinación sexual se encuentran mamíferos, aves y algunos reptiles. Sin embargo, en otros vertebrados, los factores ambientales dirigen el desarrollo sexual, este es el caso de las especies con determinación sexual por temperatura (DST) como los cocodrilos y muchas tortugas (Bull *et al.*, 1993).

1.2.1 Determinación sexual por temperatura. En las diferentes especies de reptiles con determinación sexual por temperatura (DST) la respuesta a la temperatura de incubación define tres patrones distintos. Existe una “temperatura de incubación pivote” la cual se define como el régimen termal de incubación en el que se presenta un ratio sexual 1:1 (Merchant-Larios, 2001).

A continuación se enlistan los patrones de DST según Merchant-Larios (2001):

- I. Temperatura baja feminizante y temperatura alta masculinizante = FM
- II. Temperatura baja masculinizante y temperatura alta feminizante = MF
- III. Temperatura baja feminizante, temperatura intermedia masculinizante y temperatura alta feminizante = FMF

Debido a que el patrón de determinación sexual III ocurre en todos los grupos de reptiles con DST (tortugas, cocodrilos y lagartijas), esto sugiere que FMF debe ser el patrón ancestral y que el patrón FM (ausente en tortugas) o MF (presente solo en tortugas) son patrones derivados a través de la supresión de hembras a bajas o altas temperaturas. Los embriones de reptiles con DST tienen un periodo termosensible (PST) definido como el periodo mínimo de desarrollo durante el cual la exposición de una serie de huevos a una temperatura feminizante o masculinizante resulta en un fenotipo 100% femenino o masculino respectivamente (Merchant-Larios, 2001).

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, la temperatura de incubación del nido determinará el sexo de las crías. A una temperatura de incubación de 32°C se promoverá el sexo femenino (temperatura feminizante, TF) mientras que a 27°C se promoverá el sexo masculino (temperatura masculinizante, TM). De acuerdo con Merchant-Larios *et al.* (1997), en general, la determinación sexual durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea* se puede dividir en tres periodos: Periodo con Sexo Indeterminado (PI), Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo con Sexo Determinado (PSD) (Fig. 6).

El Periodo Indeterminado (PI) abarca los días de incubación en los que al intercambiar los embriones incubados a TM a TF e inversamente en estas etapas, menos del 95% responden a la temperatura de intercambio. El Periodo Sensible a la Temperatura (PST) abarca los días de incubación en los que al intercambiar los embriones incubados a TM a TF e inversamente en estas etapas, más del 5% pero menos del 95% responden a la temperatura de intercambio. El Periodo de Sexo Determinado (PDS) abarca los días de incubación en los que al intercambiar los embriones incubados a TM a TF e inversamente en estas etapas, más del 95% responde a la temperatura de intercambio (Merchant-Larios *et al.*, 1997).

Para establecer la duración del PI, PST y PSD a 33°C (TF) y 26°C (TM) Merchant-Larios *et al.* (Datos no publicados) dividieron un nido en 20 lotes de 15 huevos cada uno. Los lotes 1 al 9 se incubaron inicialmente a TF, mientras que los lotes 10 al 20 se incubaron a TM. Los lotes 1 al 9 fueron transferidos a TF a los 19, 26, 27, 28, 31, 32, 34 y 38 días de incubación. Mientras que los lotes 10 al 20 fueron transferidos a TM a los 19, 22, 23, 25, 27 y 28 días de incubación. Los lotes 1 al 9 fueron sacrificados a los 41, 48, 50, 49, 57, 50 y 54 días de incubación. Mientras que los lotes 10 al 20 fueron sacrificados a los 28, 32, 45, 52, 53 y 57 días de incubación respectivamente. Se determinó la etapa de desarrollo de acuerdo a los criterios establecidos en Merchant *et al.* (1997). De cada embrión se diseco el par de gónadas, se fijó con Karnosky pH 7.2, se post-fijaron en una en solución de tetraóxido de osmio 1%, se deshidrató en soluciones de etanol de concentraciones crecientes y se incluyó en epon 812. Se obtuvieron cortes semifinos de 0.5µm de espesor con ultramicrotomo (Reichert Ultracuts, Leica) y se tiñeron con azul de toluidina 0.5%. Los cortes se observaron con un microscopio óptico (Zeiss, Alemania) para determinar el sexo del embrión. En las tablas A y B se detalla el porcentaje de hembras y machos, así como la etapa de desarrollo en que se encontraban los embriones de cada lote en el momento de ser sacrificados.

Tabla A. Lotes de huevos de *Lepidochelys olivacea* 1 al 9 incubados inicialmente a 26°C y transferidos a 33°C. Se detalla etapa y porcentaje de hembras y machos en cada lote al momento del sacrificio.

Intercambios de 26 a 33°C													
Lote	Temperatura de incubación inicial (°C)	Edad en la que se efectuó el intercambio (días)	Etapa en la que se efectuó el intercambio	Intercambio	Temperatura			Sexo			Hembras %	Machos %	Indefinidos %
					2da	Edad (días)	Etapa	Hembras	Machos	Indefinidos			
1	26	19	20/21	→	33	41	28	8	0		100	0	
2	26	25	21/22	→	33	41	27/28	5	0		100	0	
3	26	27	23	→	33	48	28	6	1		75	12.5	
4	26	28	23	→	33	50	28	5	0		100	0	
5	26	31	23/24	→	33	49	28	5	9		36	64	
6	26	32	23	→	33	57	29/31	0	4		0	100	
7	26	32	23/24	→	33	50	28	3	5		37.5	62.5	
8	26	34	24	→	33	50	28	0	14		0	100	
9	26	38	24/25	→	33	54	28/29	0	9		0	100	

Tabla B Lotes de huevos de *Lepidochelys olivacea* 10 al 20 incubados inicialmente a 26°C y transferidos a 33°C. Se detalla etapa y porcentaje de hembras y machos en cada lote al momento del sacrificio.

Intercambios de 33 a 26°C													
Lote	Temperatura de incubación inicial (°C)	Edad en la que se efectuó el intercambio (días)	Etapa en la que se efectuó el intercambio	Intercambio	Temperatura 2da	Edad (días)	Etapa	Sexo			Hembras %	Machos %	Indefinidos %
								Hembras	Machos	Indefinidos			
10	33	19	24	→	26	23	25	0	2?		0	100	
11	33	19	24	→	26	45	28	0	8		0	100	
12	33	19	24	→	26	53	30	0	6		0	100	
13	33	22	24/25	→	26	23	25/26	1	1	3	20	20	60
14	33	22	24/25	→	26	32	26/27	1	0	2	33	0	67
15	33	22	24/25	→	26	45	28	3	1		75	25	
16	33	23	24/25	→	26	53	34	15	0		100	0	
17	33	25	25	→	26	52	30	14	0		100	0	
18	33	26	26	→	26	45	28	10	0		100	0	
19	33	27	25	→	26	57	31	9	0		100	0	
20	33	28	26/27	→	26	45	28	9	0		100	0	

Por los datos arrojados en el estudio anterior se concluye que a TF el PST inicia a los 19 días de incubación cuando el embrión se encuentra en la etapa 24 de desarrollo y finaliza a los 25 días de incubación cuando el embrión inicia la etapa 26. Por el contrario, a TM el PST inicia en el día 25 de incubación cuando el embrión se encuentra en la etapa 23 y finaliza a los 34 días de incubación cuando el embrión inicia la etapa 25. Por otro lado, el desarrollo histológico de la gónada (distinción entre ovario y testículo) se hace evidente en la etapa 26 independientemente de la temperatura y días de incubación (Fig. 6). Debido a que el PST a TM finaliza en la etapa 25 y a TF en la etapa 26, es razonable postular que el mecanismo molecular de la determinación sexual y el proceso de diferenciación morfológica de la gónada son eventos disociables. Por lo tanto, como se observa en la figura 6 durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea* el tiempo de incubación y la etapa del desarrollo son independientes.

1.2.2 Genes y la determinación sexual por temperatura. Ohno (1967) fue el primero en sugerir que la determinación sexual ambiental (DSA) debe ser el precursor de la determinación sexual genética (DSG). Desde entonces, otros autores han considerado la posibilidad de que el ancestro reptil de aves y mamíferos debe ser un reptil con DST. Aunque, el factor inicial determinante del sexo gonadal difiere radicalmente entre DST y DSG, se ha sugerido que muchos de los genes que están involucrados en los procesos río abajo de la diferenciación gonadal en organismos con DST son los mismos que en DSG. Sin embargo, se postula la posibilidad de que los genes involucrados en las fases tempranas de la determinación sexual de la gónada bipotencial se expresen de forma dimórfica antes o al inicio del PST. Mientras tanto, los genes que tienen una participación más integral río abajo de la vía de diferenciación del testículo o del ovario deben de expresarse de una forma dimórfica después del PST (Shoemaker *et al.*, 2007).

A continuación se mencionan algunos genes que están involucrados en la determinación y diferenciación sexual de la gónada de *L. olivacea*, una especie con DST.

Sox9. *Sox9/SOX9* es un gen autosomal que se expresa en las células somáticas gonadales y que es necesario para la formación del testículo del ratón y del humano (Huang *et al.*, 1999). Este gen codifica una proteína con un motivo de 80 aminoácidos conocido como el dominio HMG (por sus siglas en inglés: *High mobility group*). El dominio HMG se encuentra en un gran número de factores de transcripción que tienen la propiedad de unirse al surco menor del ADN (Grosschedl *et al.*, 1994), entre los que se encuentra una familia codificada por los genes

SOX/Sox (Por sus siglas en inglés *Sry-related HMG box*) a los que pertenece *SOX9/Sox9* (Stevanovic *et al.*, 1993).

Se ha propuesto que el gen *Sox9* es un regulador de la formación del testículo evolutivamente conservado, lo cual concuerda con el hecho de que presenta un patrón de expresión macho-específico en diversas especies de vertebrados, entre las que se pueden mencionar especies con DST como: la tortuga de agua dulce *Trachemys scripta* (Spotila *et al.*, 1998), el lagarto americano *Alligator mississippiensis* (Western *et al.*, 1999) y la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999).

En *L. olivacea* la detección inmunohistoquímica de la proteína SOX9 se detecta en gónadas indiferenciadas de la etapa 21 (Et21) a la Et24 tanto a 26°C (TM) como a 33°C (TF). Sin embargo, cuando la gónada alcanza la Et26 la expresión de SOX9 permanece en la gónada incubada a TM pero no se detecta a TF (Fig. 6) (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999). La detección del mRNA de *Sox9* mediante RT-PCR semicuantitativo es positiva en gónadas indiferenciadas de embriones de la Et23 a la Et25 incubados tanto a 26°C (TM) como a 33°C (TF) (Fig. 6) (Torres-Maldonado *et al.*, 2001). Sin embargo, al iniciar la diferenciación morfológica sexual de la gónada en embriones de Et26, SOX9 permanece regulado positivamente en los cordones medulares de las gónadas masculinas pero es regulado negativamente en las gónadas femeninas (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Torres-Maldonado *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que el mecanismo molecular de determinación sexual dependiente de la temperatura en *L. olivacea* se relaciona con la regulación de la expresión del gen *Sox9*.

Moreno-Mendoza *et al.* (2001) reportan que la detección histológica e inmunocitoquímica de SOX9 revela que las gónadas en cultivo de órganos y las gónadas *in vivo* tienen una respuesta similar cuando su temperatura de incubación inicial es de 33°C (TF) y se les cambia a una temperatura de incubación de 26°C (TM) y viceversa.

Moreno-Mendoza *et al.* (2001) diseccionaron y colocaron en cultivo gónadas de embriones de Et24 durante 19 días incubados a TF. En estas gónadas la detección inmunohistoquímica de la proteína SOX9 fue positiva en el núcleo de las células de los cordones medulares; en contraste, las células del epitelio superficial rara vez presentaron núcleos positivos a SOX9. Después de 4 días de cultivo, el SOX9 permanece positivo en los cordones medulares de las gónadas incubadas tanto a TM como a TF. Después de 6 días de cultivo, en las gónadas *in vitro* de TF se observó un drástico descenso en el número de células positivas a SOX9, mientras que en las gónadas contralaterales incubadas a TM, SOX9 mantuvo su síntesis en los cordones medulares. Después de 8 y 10 días de cultivo las gónadas incubadas a TM mantuvieron la síntesis de SOX9 en los cordones medulares, mientras que en las gónadas contralaterales incubadas a TF no se detectan células positivas a SOX9. Es necesario hacer notar, que los patrones de expresión de SOX9 en gónadas de embriones completos de TF que permanecieron a esta temperatura o que fueron intercambiados de TF a TM, a partir de los 19 días de incubación estando en la Et24, fueron similares a los de las gónadas en cultivo de la edad y temperatura correspondiente. En las gónadas de embriones intercambiados la señal inmunofluorescente de SOX9 es intensa en el día 10. En gónadas de embriones mantenidos a TF el número de células positivas a SOX9 decrece rápidamente. En éstas últimas, en el día 25 el número de células positivas a SOX9 se redujo y se les encontraba principalmente en la región medular interna, finalmente en el día 29 SOX9 es indetectable. Todos éstos datos se resumen en la Tabla C.

Por otro lado, Moreno-Mendoza *et al.* (2001) reportan que el patrón de expresión de SOX9 de las gónadas *in vivo* incubadas a TM se asemeja al de las gónadas en cultivo incubadas a TM provenientes de embriones de Et23 incubados durante 27 días a TM. Sin embargo, la regulación negativa de SOX9 sufre un retraso de varios días en las gónadas incubadas a TF provenientes de embriones de Et23 incubadas inicialmente durante 27 días a TM. Es decir, mientras que en gónadas de embriones incubados inicialmente a TF el SOX9 comienza su regulación negativa a

los 6 días de cultivo a TF, las gónadas provenientes de embriones incubados inicialmente a TM mantienen un pequeño número de células SOX9 positivas a los 10 días de incubación en condiciones de cultivo a TF. No es hasta los 13 días de cultivo a TF que la región medular de las gónadas se encuentra desprovista de núcleos positivos a SOX9. Las gónadas *in vivo* de embriones de Et 27 cuya temperatura de incubación fue cambiada de 26°C a 33°C, o aquellos que se mantuvieron a 26°C, muestran un patrón de expresión similar al de las gónadas en cultivo. Éstos datos se presentan en la Tabla C.

Tabla C Detección de la proteína SOX9 en gónadas *in vitro* e *in vivo* de *L. olivacea*. (Modificada de Moreno-Mendoza *et al* 2001).

Días de cultivo	Gónadas <i>in vitro</i>		Gónadas <i>in vivo</i>	
	26°C	33°C	26°C	33°C
Gónadas de embriones incubados a 33°C durante 19 días (Et24)				
4	+ (6)	+ (6)	+ (6)*	+ (6)
6	+ (6)	± (6)	+ (6)*	± (6)
8	+ (6)	- (6)	+ (6)*	- (6)
10	+ (8)	- (8)	+ (8)*	- (8)
Gónadas de embriones incubados a 26°C durante 27 días (Et23)				
4	+ (4)	+ (4)	+ (4)	+ (4)•
6	+ (4)	+ (4)	+ (4)	+ (4)•
8	+ (4)	± (4)	+ (4)	± (4)•
10	+ (4)	± (4)	+ (4)	± (4)•
13	+ (4)	± (4)	+ (4)	- (4)•

Nota: Los Números en el parentesis indican el número de gónadas analizadas

* Gónadas que sufrieron intercambio del 33 a 26°C

• Gónadas que sufrieron intercambio de 26 a 33°C

Los niveles de expresión del gen *Sox9* en las gónadas de embriones de *T. scripta* del PST incubados a TF son similares a los de las gónadas de embriones incubados a TM del mismo periodo; y solamente durante la diferenciación dichos niveles se incrementan en el testículo con respecto a los del ovario hasta que el transcrito se vuelve testículo-específico (Spotila *et al.*, 1998).

Shoemaker *et al.* (2007) determinaron, mediante hibridación *in situ* (HIS) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), los patrones de expresión de los genes *Sox9*, *Mis* y *Dmrt1* en la gónada de embriones de *T. scripta* que se encontraban en el periodo de determinación y diferenciación sexual. Además, visualizaron y compararon la localización de los patrones de expresión de cada gen durante la formación de la gónada bipotencial (Et15), a la mitad y al final del PST (Et17 y Et19), así como durante dos etapas donde la gónada se está diferenciando (Et21 y Et23). Hasta nuestro conocimiento, este es el primera reporte de que en un organismo con DST *Sox9* se expresa de una forma testículo-específica en etapas tempranas del PST, antes del inicio de la expresión testículo-específica de *Mis* [Substancia inhibidora de los tubos Müllerianos (por sus siglas en inglés *Müllerian-inhibiting substance*)].

Mediante HIS Shoemaker *et al.* (2007) encontraron que en *T. scripta* la expresión de *Sox9* en la gónada bipotencial (Et15) incubada a TM se concentra en grupos celulares, los cuales aparentemente son células de Sertoli de los túbulos seminíferos en desarrollo, que rodean células que no expresan *Sox9*. Aunque, los niveles de expresión del gen *Sox9* en las gónadas incubadas a TF son similares a los de las incubadas a TM, el patrón de expresión del transcrito es difuso a TF. Parece ser que está localización diferencial corresponde a un dimorfismo funcional que antecede al PST. Así mismo, conforme el PST progresa y la temperatura ejerce su efecto, en embriones de Et17 el nivel de expresión de *Sox9* en gónadas incubadas a TM es comparable al de las gónadas incubadas a TF; sin embargo, en las primeras el patrón de expresión de *Sox9* continúa concentrándose en determinados grupos celulares, mientras que en las segundas es difuso. Estos datos se confirmaron con qPCR (Shoemaker *et al.*, 2007). Por otro lado, los resultados de HIS revelaron que durante las etapas de diferenciación testicular (Et21 y Et23), en las gónadas

incubadas a TM aumentan los niveles de expresión de *Sox9* y el número grupos celulares que lo expresan. Ésto posiblemente es resultado de la expansión de los cordones sexuales primitivos y su transformación en tubos seminíferos. Mientras tanto, muy pocas células de las gónadas incubadas a TF expresan el transcrito. Con qPCR se confirmó que la expresión del gen *Sox9* en gónadas de embriones de Et21 y Et23 incubados a TF es mínima comparada con expresión de dicho gen en gónadas de TM de las mismas etapas. (Shoemaker *et al.*, 2007).

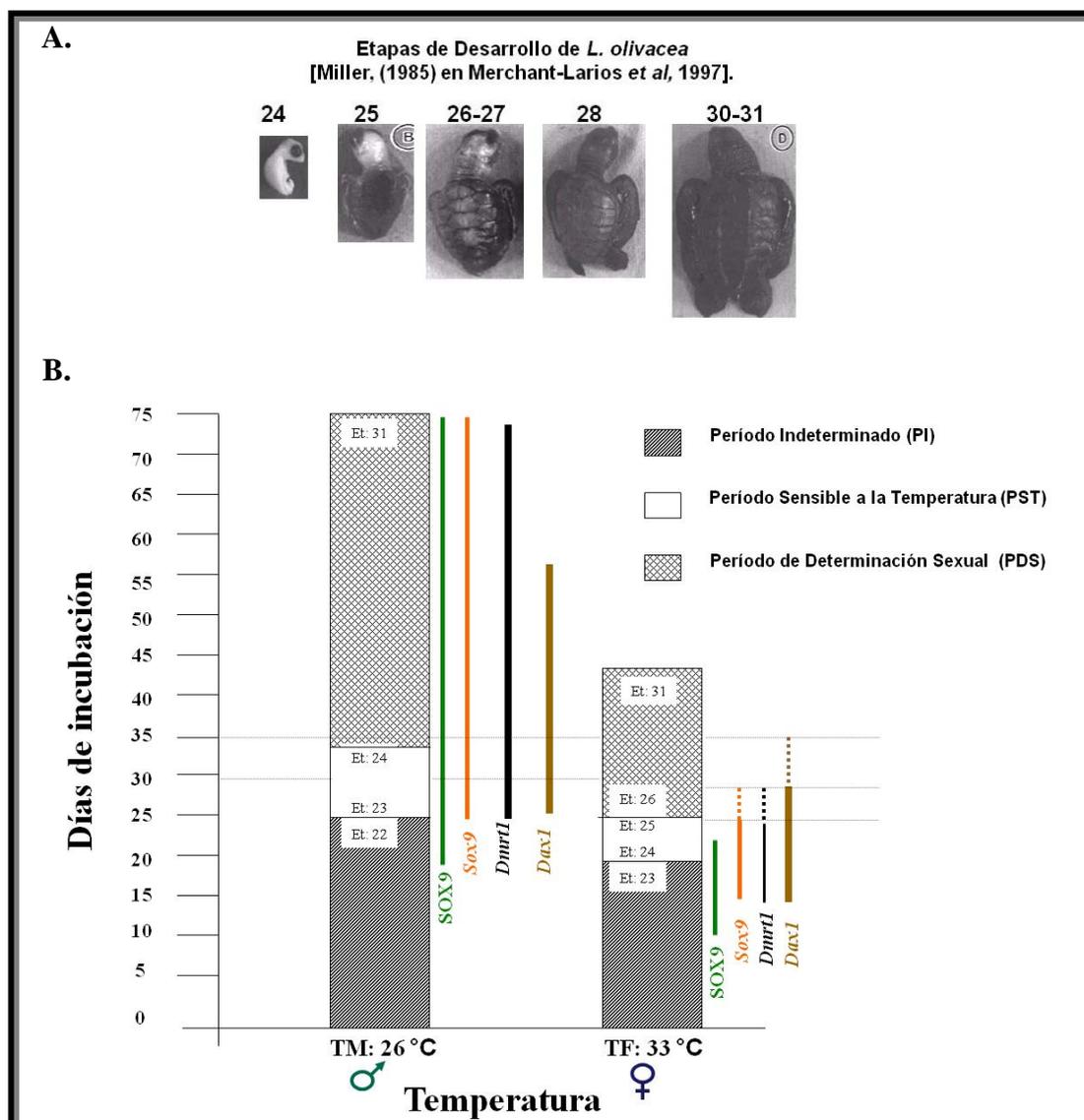


Fig. 6 Representación esquemática del desarrollo gonadal de *L. olivacea* y el momento de expresión de los genes *Sox9*, *Dmrt1* y *Dax1*, así como la proteína SOX9.

A. Se muestran las etapas de Desarrollo de *L. olivacea* (Modificado de Merchant-Larios *et al.*, 1997). **B.** Se señala gráficamente las etapas y días del desarrollo embrionario de *L. olivacea* que abarcan los periodos: PI, PST y PD (Merchant-Larios *et al.*, datos no publicados). Así mismo, se señala que la proteína SOX9 (-) se detecta de la Et21 a la Et31 en gónadas incubadas a TM, mientras que en gónadas incubadas a TF se detecta de la Et21 a la Et24. El gen *Sox9* (-) se expresa de la Et23 a la Et31 a TM y de la Et23 a la Et26 a TF. El gen *Dmrt1* (-) se expresa de la Et23 a la Et31 a TM y de la Et23 a la Et26 a TF. El gen *Dax1* (-) se expresa de la Et23 a la Et27 a TM y de la Et23 a la Et27 a TF. Con líneas interrumpidas se señala en que etapas disminuye la expresión del gen aunque sigue siendo detectado (Esquema construido a partir de los datos de: Moreno-Mendoza *et al.*, 1999, Torres-Maldonado *et al.* 2002).

Dmrt1. Evidencia sobre la conservación molecular de los mecanismos de determinación sexual entre los fila a llevado al descubrimiento del gen *Dmrt1* (Por sus siglas en inglés: *Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) en mamíferos; el cuál posee una función similar al del gen de determinación sexual *mab-3* de nematodos y al gen *doublesex* de moscas (Shen y Hodgkin, 1988; Burtis y Baker, 1989). *Dmrt1* codifica un factor de transcripción con un dominio DM, un dominio de unión al ADN identificado en los reguladores sexuales de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (*double sex*) (Erdman y Burtis, 1993) y *Caenorhabditis elegans* (*mab-3*) (Raymond *et al.*, 1998).

En el lagarto americano, la expresión del gen *Dmrt1* se detectó mediante RT-PCR en el sistema urogenital de embriones incubados tanto a TM como TF. Posteriormente, la expresión de este gen aumenta significativamente en las gónadas de machos con respecto a las de hembras (Smith *et al.*, 1999).

Existe mucha similitud entre la secuencia parcial de aminoácidos de DMRT1, reportada por Torres-Maldonado *et al.* (2002), de *L. olivacea* con respecto a las reportadas para humano y ratón; sin embargo esa similitud es menor con respecto a las reportadas para pollo, lagarto americano y tortuga de orejas rojas. La expresión temprana de *Dmrt1* en las gónadas de mamíferos, aves y reptiles sugiere que este gen juega un papel importante en la determinación sexual (Raymond *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 1999; Kettlewell *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2000)

En dos especies con DST, el lagarto americano y la tortuga de orejas rojas, la expresión testículo-específica de *Dmrt1* precede a la expresión de *Sox9*; lo cual sugiere que *Dmrt1* actúa río arriba de *Sox9*. Mediante RT-PCR semicuantitativo Torres-Maldonado *et al.* (2002) determinaron los niveles de expresión de *Dmrt1* en gónadas de *L. olivacea*, sus resultados muestran que dichos niveles son menores en las gónadas incubadas a TF con respecto a los de las gónadas incubadas a TM, estos resultados son similares a los reportados para *A. mississippiensis* y *T. scripta*. Debido a que estos niveles se presentan durante y después del PST, es claro que la expresión de *Dmrt1* es regulada por la temperatura en estas tres especies. Como ya se ha mencionado, en *L. olivacea* la regulación negativa de la proteína y del mRNA de *Sox9* durante las Et25 y Et26 se correlaciona con la determinación sexual femenina. Por el contrario, la gónada se compromete a diferenciarse como testículo a partir de la Et24, cuando el mRNA de *Sox9* y su proteína presentan el mismo nivel de expresión tanto en gónadas de TF como de TM (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Torres-Maldonado *et al.*, 2001). Por lo tanto, el hecho de que durante el PST el nivel de expresión de *Dmrt1* en la gónada de TM es mayor al que se presenta en la gónada de TF soporta la idea de que *Dmrt1* actúa río arriba de *Sox9* manteniendo su expresión en las gónadas masculinas (Fig. 6) (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). Los resultados anteriores hacen pensar que en *L. olivacea*, los genes *Sox9* y *Dmrt1* se encuentran activamente regulados a TF promoviendo la determinación sexual femenina de la gónada (Torres-Maldonado *et al.*, 2002).

Dax1. La proteína Dax1 (por sus siglas en inglés: *dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) se ha clasificado como un miembro atípico de la familia de receptores nucleares hormonales debido a que contiene un dominio de unión a ligando pero carece del dominio de dedos de Zinc de unión al ADN que se encuentra en otros miembros de la familia (Zanaria *et al.*, 1994). Dax1, como las proteínas con caja HMG, se pueden unir al surco menor del ADN y a las estructuras del ADN en forma de bucle (Young *et al.*, 1992). En ratón la proteína Dax1 actúa como un regulador negativo de la transcripción mediando la actividad del ácido retinoico. Esta proteína evita la diferenciación testicular actuando antagónicamente a la proteína SRY (Goodfellow y Camerino, 1999).

Torres-Maldonado *et al.* (2002) utilizaron RT-PCR semicuantitativo para determinar el nivel de expresión del mRNA del gen *Dax1* en las gónadas de *L. olivacea*, sus resultados coinciden con

los reportados para el lagarto americano *A. mississippiensis*; es necesario hacer mención de que estas dos especies tienen diferentes patrones de DST (Western *et al.*, 2000). En *L. olivacea* la expresión de *Dax1* fue detectada durante el PST tanto en gónadas incubadas a TM como a TF. De la Et23 a la Et26 el mRNA de *Dax1* presentan un patrón de expresión similar en gónadas incubadas tanto a TM como a TF (Fig. 6) (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). Durante la Et27 (uno o dos etapas posteriores a la determinación sexual de hembra o macho, respectivamente) se detectaron diferencias significativas entre las gónadas incubadas a TF y las incubadas a TM (Fig. 6) (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Asumiendo que: durante el PST los niveles sexo-específicos de la expresión del gen están directamente relacionados con la determinación sexual; se propone que las diferencias significativas de la expresión de *Dax1*, que se presentan después del PST, no están involucradas con la DST de estas especies (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). Así mismo, podría especularse que en *L. olivacea* *Dax1* posee algún papel relacionado con las diferencias funcionales entre ovarios y testículos, tal como se ha sugerido en otras especies (Yu *et al.*, 1998; Torres-Maldonado *et al.*, 2002).

1.2.2 La temperatura afecta la expresión genética y la estructura de la cromatina. La temperatura corporal (Tb) es uno de los factores que afectan en gran medida la vida de los organismos poiquilotérmicos. En particular, tiene un gran impacto en la expresión genética. Gracey *et al.* (2004) reportan que la Tb afecta el nivel de transcripción de 252 genes presentes en distintos órganos de carpa (*Cyprinus carpio*). En dicho estudio los autores formaron 4 grupos de carpas, cada grupo fue colocado en un estanque de agua con distinta temperatura (23, 27, 10°C y 30°C) y se les dejó allí durante 22 días. El grupo control se encontraba en el estanque que tenía 30°C. Finalmente, con ayuda de microarreglos se analizó el nivel de expresión de los genes presentes en: riñón, cerebro, corazón, músculo, hígado, intestino y branquias.

La “hipótesis de termoestabilidad” propuesta por Bernardi y Bernardi (1986) postula que la Tb afecta el nivel de expresión de genes, así como la estructura y composición del genoma. Esta hipótesis se enuncia de la siguiente manera “la evolución de organismos de sangre caliente a partir de organismos de sangre fría generó un incremento de GC (GC es la fracción molar de guanina y citosina en el ADN), lo cual proporcionó estabilidad térmica al ADN, RNA y proteínas de los primeros”.

Jabbari *et al.* (1997) utilizando HPLC determinaron el nivel de 5^mC del ADN de diversos órganos de 42 vertebrados. Utilizando sus datos e incluyendo datos de la literatura compilaron una tabla en la que registraron los niveles de 5^mC y GC de 87 especies de todas las clases de vertebrados. Al analizar sus registros observaron que: el porcentaje promedio de metilación del ADN de peces (1.7%) y anfibios (1.98%) es mayor que el de mamíferos (0.88%), aves (1.02%) y reptiles (1.00%), incluso lo duplica. Es más, considerando que aproximadamente el 42.5% del genoma de las cinco clases de vertebrados lo constituyen dominios conformados por el dinucleótido GC, es factible decir que: el 9% de las citosinas que constituyen el genoma de peces y anfibios se encuentran metiladas; mientras que el 4.5% de las citosinas que componen el genoma de mamíferos, aves y reptiles están metiladas. En base a los resultados anteriores y en la capacidad de desaminación de 5^mC a Timina Shen *et al.* (1994) y Jabbari *et al.* (1997) proponen que los organismos cuya Tb es alta (mamíferos, aves y reptiles) presentan una tasa de desaminación de 5^mC a Timina que supera a la de organismos cuya Tb es baja (peces y anfibios), lo cual ocasiona que la frecuencia del dinucleótido GC y el nivel global de metilación del ADN sea menor en los primeros con respecto a los segundos.

Por otro lado, recientemente, Varriale y Bernardi (2006), utilizaron HPLC para analizar los niveles de metilación del genoma de peces que viven en zonas cuya temperatura ambiental difiere entre sí. Sus resultados indican que los peces polares exhiben niveles de metilación del ADN

mayores a los de los peces tropicales y de zonas templadas, lo cual sugiere que existe una relación inversa entre los niveles de metilación y la temperatura corporal. Asimismo, los mismos autores utilizaron HPLC para analizar los niveles de metilación de 43 reptiles, los cuales representan cuatro órdenes y 20 familias. Sus resultados mostraron que las serpientes y las lagartijas exhiben niveles de metilación semejantes a los que presentan los peces tropicales; mientras que las tortugas y los cocodrilos, presentan niveles de metilación muy semejantes a los mamíferos.

1.3 Diferenciación sexual gonadal de *Lepidochelys olivacea*.

Merchant-Larios *et al.* (1989) describieron el desarrollo de la gónada de *L. olivacea*, empleando técnicas citoquímicas y de microscopía electrónica. Encontraron que las Células Germinales Primordiales (CGP) siguen un camino migratorio semejante al de las CGP de los mamíferos. Se detectan primero en el endodermo del saco vitelino, después pasan al mesenterio del intestino posterior y finalmente llegan a la región urogenital. Las gónadas indiferenciadas se forman por la proliferación de las células del mesotelio y del mesénquima en las crestas genitales. Ambos tipos celulares forman los cordones epiteliales medulares. Las gónadas de embriones incubados a TF son las primeras en diferenciarse. Sin embargo, las células germinales no inician la profase de la primera división meiótica ni forman folículos sino hasta 84 días después de la eclosión. Las gónadas de embriones incubados a TM muestran características estructurales similares a las de las gónadas indiferenciadas. Es decir, poseen claros cordones medulares asociados al epitelio cortical, en el cual se encuentran la mayoría de las CGP. La detección histoquímica de tejido esteroideogénico fue positiva en las glándulas adrenales, pero negativa en las gónadas de ambos sexos. Finalmente encontraron que los conductos Müllermanos persisten en los machos después de la eclosión. En *L. olivacea*, la diferenciación de la gónada es todavía incipiente en el momento de la eclosión.

El embrión se desarrolla más rápido a temperatura feminizante que a temperatura masculinizante. En correlación con lo anterior, las gónadas crecen más rápido a la temperatura feminizante (Torres-Maldonado, 2001).

Torres-Maldonado (2001) describió el desarrollo gonadal de embriones incubados a 33°C (TF) de la siguiente manera:

- En las etapas 21-23 las células mesenquimáticas se condensan en grupos cerca del epitelio celómico de la cresta genital.
- En las etapas 23-24 la gónada se encuentra en estado indiferenciado con cordones sexuales no desarrollados. La corteza está compuesta de células epiteliales cuboidales y células germinales.
- En las etapas 25-26 se forman los cordones sexuales y permanecen continuos con la superficie del epitelio en algunas regiones.
- En las etapas 27-28 se nota una diferencia histológica al compararlas con las de 26°C, el epitelio superficial aumenta de espesor y contiene muchas de las células germinales, los cordones medulares todavía son evidentes.
- En la etapa 29 los cordones medulares aparecen fragmentados.
- En los ovarios de las crías se aprecia una corteza desarrollada y se aprecia la fragmentación de los cordones sexuales medulares.

Torres-Maldonado (2001) describió el desarrollo gonadal de embriones incubados a 26°C (TF) de la siguiente manera:

- A 26°C el desarrollo gonadal es semejante al de 33°C en las primeras etapas.
- En la etapa 23-24 se encuentra en estado diferenciado, similar al encontrado a 33°C.

- En la etapa 25-26 se distinguen los cordones sexuales rodeados de tejido estromático y permanecen continuos con el epitelio superficial en algunas regiones.
- En la etapa 28 se distinguen los cordones sexuales en la médula y el epitelio superficial se ve delgado sin células germinales.
- En los testículos de las crías son notables los cordones testiculares en la región medular y están separados del epitelio celómico por tejido estromático.

1.3.1 El cerebro contribuye a la diferenciación sexual gonadal. Se ha hipotetizado que la temperatura de incubación puede regular la capacidad de la gónada indiferenciada de aromatizar los derivados C-19 de esteroides (por ejemplo testosterona) a estrógenos (Pieau *et al.*, 1982; Crews *et al.*, 1994; Spotila *et al.*, 1994; Rhen y Lang, 1994; Wibbels *et al.*, 1994; Crews, 1995; 1996; Lance, 1997; Merchant-Larios *et al.*, 1997). En este escenario, la TF puede incrementar la conversión local de testosterona a estrógeno mediante aumentar la concentración y actividad del gen *aromatasa p450* en las gónadas (Lance y Bogart, 1991; Desvages *et al.*, 1993; Dorizzi *et al.*, 1994). Debido a que los estrógenos tienen un efecto feminizante en los embriones en desarrollo (Dorizzi *et al.*, 1991; Bull *et al.*, 1998), el incremento de la producción del estrógeno gonadal puede disparar el programa de diferenciación ovárica (Wibbels *et al.*, 1993). En contraste, la TM debe inhibir la expresión del gen *aromatasa p450*, ocasionando que se reduzca la concentración de estrógeno en la gónada. Las concentraciones bajas de estrógeno en la gónada son incapaces de interrumpir la actividad de la enzima testosterona reductasa (Crews *et al.*, 1994), una enzima responsable de convertir la testosterona en dihidrotestosterona (ejemplo de hormona masculinizante) (Wibbels *et al.*, 1992). En el mecanismo antes descrito, la temperatura y la concentración local de estrógenos ejercen un efecto sinérgico en la determinación del fenotipo gonadal (Crews, 1996; Wibbels *et al.*, 1991). En efecto, mientras la temperatura de incubación compromete a la gónada a adquirir un fenotipo particular, la presencia o ausencia de estrógenos consolida dicho compromiso.

Mientras el mecanismo descrito anteriormente brinda una explicación de cómo la diferenciación sexual por temperatura procede, poco se conoce acerca del proceso celular responsable de activar dicha cascada de eventos. Spotila *et al.* (1994) proponen que la temperatura de incubación debe regular directamente la expresión de genes gonadales (como el gen *aromatasa p450*), lo cual sugiere que existe un mecanismo termosensor intrínseco en la gónada. Lo que es más, Moreno-Mendoza *et al.* (2001) demostraron que la detección histológica e inmunocitoquímica de SOX9 revela que las gónadas en cultivo de órganos y las gónadas *in vivo* tienen una respuesta similar cuando su temperatura de incubación inicial es de 33°C (TF) y se les cambia a una temperatura de incubación de 26°C (TM) y viceversa.

Sin embargo, también hay evidencias que sugieren que el cerebro posee un mecanismo termosensor que dictamina la determinación sexual gonadal de *Lepidochelys olivacea*. Merchant-Larios *et al.* (1989) realizaron un estudio de alta resolución sobre el desarrollo gonadal de *L. olivacea*, en el cuál encontraron que la gónada indiferenciada posee terminales nerviosas, las cuales no están presentes en mamíferos, por lo que propusieron que el sistema neuroendocrino juega un papel importante en la determinación sexual de *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989). En este sentido, es necesario mencionar que la evolución de los vertebrados ha creado sofisticados sistemas neuronales para monitorear la temperatura ambiental a través de cambios en la temperatura corporal (Hensel, 1973; Satinoff, 1978; Nelson *et al.*, 1984). En líneas generales, este sistema transporta la información sobre el calor y el frío, capturada por los termosensores, desde la superficie del cuerpo hasta las estructuras del sistema nervioso central. Después de recibir e integrar la información térmica, las estructuras del sistema nervioso central (médula espinal, tallo cerebral y el diencefalo) mandan una serie de respuestas efectoras específicas cuyo objetivo final es regular la temperatura de un segmento o el organismo completo

(Hensel, 1973; Jessen y Mayer, 1971; Jessen *et al.*, 1972; Mercer y Simon, 1984; Nelson *et al.*, 1984). Por lo tanto, es posible que las estructuras del sistema nervioso censen la temperatura de incubación, la traduzcan y disparen o modulen la diferenciación sexual en las especies de reptiles (Gutiérrez-Ospina, 1999).

La hipótesis de que durante el desarrollo embrionario de los reptiles el cerebro es capaz de responder a cambios en la temperatura de incubación ha sido puesta a prueba por Coomber *et al.* (1997) y Salame-Méndez *et al.* (1998). Estos dos grupos reportaron, respectivamente, que en diferentes regiones del hipotálamo de la lagartija y la tortuga marina la temperatura de incubación regula el metabolismo oxidativo y la aromatización de la testosterona, esta regulación es independiente a los niveles circulantes de las hormonas sexuales. Salame-Méndez *et al.* (1998) analizaron los niveles de testosterona (T) y estradiol (E2) en las gónadas, dos regiones del cerebro –telencéfalo (Te) y diencefalo/mesencefalo (Di)- y suero sanguíneo de embriones en desarrollo de *L. olivacea* incubados a TM o TF. Así mismo, se estudio la conversión de pregnenolona (P5) a T y T a E2 en gónadas y cerebro. Los análisis se efectuaron durante tres periodos: el PST, gónadas histológicamente indiferenciadas (UDG) y gónadas diferenciadas (DG). En las gónadas, suero sanguíneo y cerebro, las concentraciones de T fueron mayores a TF durante los tres periodos, mientras que en las gónadas y el suero sanguíneo, los niveles de E2 fueron similares a TF y TM. En el Di, la concentración de E2 fue significativamente mayor a TM. La Biotransformación de P5 a T en los tejidos gonadales fue significativamente mayor a TF en PST y se incrementa durante UDG y DG. Sin embargo, la conversión de T a E2, fue similar a las dos temperaturas durante los tres periodos. En el cerebro, Di mostro una mayor eficiencia en la transformación de T a E2 a TF. En este estudio Salame-Méndez *et al.* (1998) proponen que el Di es la región del cerebro que censa la temperatura durante la determinación sexual.

Gutiérrez-Ospina *et al.* (1999) evaluaron la posible participación del sistema nervioso en la DST mediante mostrar la existencia y origen de fibras nerviosas positivas a acetilcolinaesterasa (AChE) en gónadas indiferenciadas de embriones masculinos y femeninos de *Lepidochelys olivacea* de las Et20 a la Et27. Las fibras nerviosas positivas a AchE se visualizaron a partir de la Et24. Las inyecciones de DiI (1,1',dioctadecil-3,3,3'3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato) y las imágenes tomadas con ayuda del confocal mostraron que algunos de estos nervios gonadales surgen de la parte inferior del tórax y la región superior de las vertebrae lumbares de la columna vertebral (donde se aloja la médula espinal). Debido a que la médula espinal es capaz de integrar por si misma respuestas termoreguladoras sin la intervención de estructuras pertenecientes a los niveles superiores del sistema nervioso central, Gutiérrez-Ospina *et al.* (1999) evaluaron la maduración de la médula espinal durante la Et20 a la Et27. La maduración de la médula espinal avanza más rápido en embriones femeninos que en masculinos, cuando la determinación sexual se está efectuando para cada sexo; este proceso inicia y finaliza antes en el embrión femenino que en el masculino. Estas observaciones abren la posibilidad de que la médula espinal y las inervaciones que se derivan de ésta participan en dirigir o modular los procesos que determinan y/o diferencian sexualmente a la gónada de forma dependiente a la temperatura, particularmente en embriones femeninos de *L. olivacea* (Gutiérrez-Ospina *et al.*, 1999).

1.3.2 El mesonefros contribuye a la diferenciación sexual de la gónada. Al iniciar el desarrollo gonadal, en el embrión del ratón, las gónadas tanto de machos como de hembras se establecen en la cara interna del mesonefros, un riñón rudimentario que corre paralelamente a la gónada diferenciada adjunto a cada lado del mesenterio dorsal. Posteriormente, cuando la gónada masculina se diferencia en testículo, los ductos mesonéfricos dan origen a los conductos de Wolff, así mismo se piensa que estos contribuyen a la formación de la *rete testis*, en machos, y a la *rete ovarii* (vestigial), en las hembras. Muchos trabajos han

sugerido que, durante el proceso de la diferenciación gonadal, las células mesonefricas hacen una contribución substancial a la estructura del ovario o del testículo mismo, y se han hecho diversos estudios descriptivos que soportan esta idea (Upadhyay *et al.*, 1979, 1981; Wartenberg, 1981; Zamboni y Upadhyay, 1982). Wartenberg *et al.* (1991) con ayuda de microscopia de luz y electrónica describieron la migración celular a partir del mesonefros y del epitelio celómico a los testículos en desarrollo. Estos autores postularon que las células de Sertoli, intersticiales, mioides peritubulares y de Leydig tienen un origen mesonefrico. Aunque el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual puedan tener lugar en ausencia del mesonefros (Merchant-Larios *et al.*, 1984; Rodemer *et al.*, 1986), Rodemer *et al.* (1986) demostraron experimentalmente que en quimeras de pollo el mesonefros proporciona células al estroma gonadal. Buer *et al.* (1993) colocaron en cultivo testículos de 11.5dpc, con o sin mesonefros, durante 7 días. En los testículos sin mesonefros la diferenciación de los cordones testiculares fallo, sin embargo, cuando se cultivaron en presencia de un mesonefros proveniente de un embrión masculino o femenino, los testículos desarrollaron cordones aparentemente normales. Los testículos cultivados cerca de un mesonefros pero separados por un filtro permeable, no desarrollaron cordones. Así mismo, tanto Buer *et al.* (1993) como Merchant-Larios *et al.* (1993) demostraron, mediante experimentos en los que injertaron gónadas en el mesonefros, que a los 11.5dpc las células estromales provenientes del mesonefros invaden a la gónada masculina. Merchant-Larios *et al.* (1993) postulan que las interacciones que se establecen entre las células estromales de origen mesonefrico y las células de soporte, que se encuentran en la cresta genital, son necesarias para la formación de los cordones seminíferos. Tres tipos de células estromales de origen mesonefrico invaden la gónada masculina y son: las células endoteliales, mioides y las células del fibroblasto (Merchant-Larios *et al.* 1993). Merchant y Moreno-Mendoza (1998) reconstruyeron crestas urogenitales en cultivo de órganos mediante injertar crestas genitales masculinas morfológicamente indiferenciadas de embriones CD-1 al mesonefros (XX y XY) de embriones transgénicos ROSA26 cuyas células expresan β -galactosidasa bacteriana. Con una técnica mejorada para la detección de la actividad de la enzima β -galactosidasa en electromicrografía, Merchant y Moreno-Mendoza (1998) estudiaron la migración celular y la diferenciación de las células mesonefricas. Se encontró, que adicionalmente a su diferenciación como células mioides y conectivas, algunas de las células mesonefricas adquieren características ultraestructurales de células esteroideogénicas de Leydig. Varias de las células positivas a β -galactosidasa se diferenciaron como células de Leydig en gónadas injertadas en mesonefros masculinos o femeninos. Estos resultados sugieren que las células mesonefricas responden a señales putativas producidas en la gónada masculina y participan en la morfogénesis y la diferenciación celular del testículo fetal.

Li y Kim (2004) han caracterizado el efecto inhibitor del ácido retinoico (AR) sobre las gónadas de rata XY en desarrollo. Además, investigaron los eventos celulares que se requieren para el desarrollo gonadal XY, incluyendo la migración celular desde el mesonefros a la gónada, la diferenciación de las células de Sertoli y la sobrevivencia de gonadocitos. Colocaron gónadas XY de embriones de rata de 13 dpc en cultivo de órganos en ausencia y presencia del ácido transretinoico (tRA). Encontraron que tRA inhibe la migración de las células del mesonefros a la gónada. Lo que es más, el tratamiento con tRA decrece la expresión de la substancia inhibitora de los conductos Müllermanos (Mis) en las células de Sertoli y reduce dramáticamente el número de gonadocitos. Se detectó un incremento de la apoptosis en la gónadas XY cultivadas en presencia de tRA, sugiriendo que la pérdida de gonadocitos pueden incrementar la apoptosis. Adicionalmente, Am580, un compuesto sintético que exhibe propiedades agonistas específicas del receptor α del ácido retinoico (RAR α), disminuyó los efectos inhibitoros del tRA en la gónada XY en desarrollo incluyendo la migración de las células mesonefricas y la sobrevivencia de gonadocitos. Por el contrario, Ro 41-5253, un antagonista selectivo de RAR α suprimió la

habilidad inhibidora de tRA en las gónadas en desarrollo. Estos resultados sugieren que el ácido retinoico actúa a través del RAR α afectando negativamente la diferenciación de las células de Sertoli, la sobrevivencia de los gonadocitos y bloquea la migración de las células mesonefricas, lo cual lleva a la inhibición de las gónadas XY en desarrollo.

2. Justificación

En general, la importancia de la epigénesis durante el desarrollo embrionario y la posibilidad de que factores ambientales como la temperatura modulen la expresión genética en la gónada, hacen relevante intentar correlacionar los niveles globales de metilación del ADN con la determinación sexual por temperatura en *Lepidochelys olivacea* .

3. Hipótesis

La temperatura de incubación afecta los niveles globales de metilación del ADN y/o acetilación de histonas en las gónadas, cerebro y mesonefros de *Lepidochelys olivacea* durante el desarrollo embrionario. Los diferentes niveles pueden influir directa o indirectamente en la determinación sexual por temperatura regulando la expresión diferencial de genes responsables del desarrollo de ovarios o testículos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar los niveles globales de metilación del ADN en la gónada, mesonefros y cerebro de embriones de la tortuga marina *L. olivacea* antes y después de la determinación sexual por temperatura.

4.2 Objetivos Particulares

1.-Determinar mediante HPLC los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas *in vitro* incubadas a temperatura feminizante (TF: 33°C) ó masculinizante (TM: 26°C).

2.- Determinar los patrones de distribución de la acetilación de histonas en las gónadas *in vitro* incubadas a TF ó TM mediante inmunofluorescencia, utilizando como marcador el anticuerpo contra la histona H3 acetilada en la lisina 18 (anti-H3K18ac).

3.- Mediante inmunofluorescencia y HPLC determinar el efecto de los inhibidores de remodeladores de la cromatina 5-azacitidina (5-azaC) y Tricostantina A (TSA) sobre las células de gónadas *in vitro* incubadas a TM ó TF.

4.- Mediante HPLC determinar los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas, mesonefros y cerebro *in vivo* de embriones incubados a TM ó TF.

5. Material y Métodos

5.1 Material biológico.

Se utilizaron huevos de la tortuga marina *L. olivacea* de nidos de reciente ovoposición, colectados en la playa Escobilla (92° 27' 16" L.O; 15° 40' 46" L.N.) ubicada en la costa central del estado de Oaxaca, México. Las colectas se realizaron en diferentes meses de tres años consecutivos (2005 - 2008). Los huevos colectados se colocaron en cajas de poliestireno expandido con vermiculita húmeda estéril. Se trasladaron a la Ciudad de México por vía aérea. En el laboratorio los huevos se ubicaron en cajas de plástico y fueron cubiertos con vermiculita estéril húmeda. Las cajas con huevos se introdujeron en incubadoras de temperatura controlada de $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (masculinizante, TM) y $33 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (feminizante, TF). Diariamente se registró la temperatura mediante termómetros colocados en el interior de las incubadoras. Las temperaturas de incubación se colocaron con base en los reportado por Merchant-Larios *et al.* (1997). Los huevos utilizados provenían de los nidos enlistados en la tabla D.

Tabla D.- Se enlistan los Nidos de *L. olivacea* colectados de Septiembre de 2005 a Mayo de 2008, así como la fecha de colecta y el número de huevos por nido.

Nidos colectados de Septiembre de 2005 a Mayo de 2008		
Nido	Fecha de Colecta	Numero de huevos por nido
1	30 de Septiembre de 2005	90
2	30 de Septiembre de 2005	110
3	22 de Febrero de 2006	97
4	22 de Febrero de 2006	103
5	22 de Febrero de 2006	92
6	22 de Febrero de 2006	108
7	15 de Mayo de 2006	96
8	15 de Mayo de 2006	104
9	15 de Mayo de 2006	100
10	15 de Mayo de 2006	100
11	8 de Mayo de 2007	95
12	8 de Mayo de 2007	105
13	29 de Julio de 2007	107
14	20 de Agosto de 2007	110
15	20 de Agosto de 2007	90
16	15 de Enero de 2008	106
17	15 de Enero de 2008	94
18	6 de Febrero de 2008	98
19	6 de Febrero de 2008	102
20	9 de Mayo de 2008	106
21	9 de Mayo de 2008	94

- Se utilizaron gónadas, mesonefros y cerebros de embriones del PST de Et24 durante 34 días incubados a TM (26°C) y durante 19 días incubados a TF (33°C), en ambos casos durante esta etapa la gónada se encuentra morfológicamente indiferenciada. Así mismo, se

utilizaron estos mismos órganos de embriones del PDS de Et27 incubados durante 33 días a TF y durante 59 días incubados a TM, en ambos casos la gónada se encuentra morfológicamente diferenciada.

En la tabla E se muestra la comparación entre el desarrollo de los embriones incubados a 26°C (TM) y los incubados a 33°C (TF). En los antecedentes se explica el análisis que se efectuó para determinar qué etapas y días de incubación comprenden los PI, PST y PDS en función de la temperatura de incubación. Así mismo, en la figura 6 y en las tablas A y B se muestran los datos resultantes de dicho análisis. Además, para construir la tabla E se utilizaron datos reportados por Torres-Maldonado (2001).

Tabla E.- Se muestra las etapas de desarrollo y días de incubación que abarcan los PI, PST y PDS en embriones de *L. olivacea* incubados a 33°C (TF) y 26°C (TM).

Etapas de Desarrollo	21	22	23	24	25	26	27	31
Periodos para TF	PI			PST		PDS		
Días de Incubación a 33°C (TF)	12	15	17	19	25	30	35	46
Días de Incubación a 26°C (TM)	19	24	27	34	41	49	56	75
Periodos para TF	PI			PST		PDS		

5.2 Cultivo de gónadas.

Para los cultivos de órganos se emplearon gónadas de embriones en el PST de Et24 incubados durante 19 días a TF. Las condiciones de cultivo se han reportado previamente por Moreno-Mendoza *et al.* (2001). En condiciones estériles se aisló el par de gónadas, cada gónada se colocó de forma individual sobre un filtro Millipore de poro con diámetro 0.4 µm (No. Cat. PICMO3050) (previamente esterilizado durante 5 minutos en etanol al 70%). A su vez, dicho filtro fue suspendido sobre 600 µl de medio de cultivo suplementado. Se empleó medio de cultivo L-15 suplementado con: 10% de suero de tortuga inactivado (el suero de tortuga se preparó en nuestro laboratorio a partir de la sangre de tortugas adultas del Centro Mexicano de la Tortuga Marina en Oaxaca), 0.16% de NaCl, 20 µl de antibióticos (penicilina/estreptomycin) por cada 10 ml de L-15.

Las gónadas sobre los filtros suspendidos en el medio de cultivo se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos dentro de microcámaras de cultivo. Una gónada, de cada embrión, se cultivo a TF y la contralateral a TM. El cultivo duro 14 días.

Las gónadas en cultivo se dividieron en seis grupos: dos grupos control cuyo medio de cultivo suplementado carecía de los inhibidores de los remodeladores de la cromatina (un grupo fue incubado a TF y otro a TM), dos grupos a cuyo medio de cultivo suplementado se le agregó 5-azaC (un grupo fue incubado a TF y otro a TM) y dos grupos a cuyo medio de cultivo se le agregó TSA (un grupo fue incubado a TF y otro a TM). La 5-azaC (Sigma-Aldrich) fue utilizada en las siguientes concentraciones: 10 y 20 µg/ml (Skreb *et al.*, 1993). Mientras que TSA (Sigma-Aldrich) fue utilizada en las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 400 y 800 ng/ml (Sawa *et al.*, 2001; Mizukami *et al.*, 2004). El medio de cultivo suplementado, de todos los grupos, se renovó a los 4, 8 y 12 días de cultivo.

Al concluir los 14 días de cultivo, se capturó la imagen de cada gónada con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon (Modelo SMZ 15000) al que se le adaptó una cámara Zeiss Axio Cam MRC. Posteriormente, una gónada de cada grupo se procesó para microscopia de inmunofluorescencia y el resto se congeló con nitrógeno líquido a -70°C para, posteriormente, ser procesadas para su análisis con HPLC.

5.3 Medición del área de las gónadas en cultivo.

Se capturó la imagen de todas las gónadas procesadas para cultivo con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon (Modelo SMZ 15000) al que se le adaptó una cámara Zeiss Axio Cam MRC. Estas imágenes fueron utilizadas para medir el área de las gónadas en cultivo con ayuda del software IMAGE J. Los datos fueron estadísticamente evaluados mediante las pruebas estadísticas: Kruskal-Wallis y de rangos múltiples.

5.4 Histología.

Se procesaron complejos urogenitales de embriones incubados a TF y TM de la Et24 y Et 23, respectivamente, así como de la Et27 de ambas temperaturas. Se fijaron en buffer de Karnosky pH 7.2 durante 1 hora. Posteriormente, se dejaron 1 hora en buffer de cocodilato de sodio 0.1 M. Se post-fijaron en una solución de tetraóxido de osmio 1% durante 1 hora (Zetterqvist, 1956). El tejido se deshidrató en etanol (en concentraciones crecientes: 70, 80, 90, 95 y 100% durante 15 minutos en cada uno). Se dejaron en óxido de propileno (dos cambios de 20 minutos cada uno), se pre-incluyeron en una mezcla de óxido de propileno y epon 812 en proporción 1:1 (1 hora), después en una mezcla igual pero en proporción 1:2 (1 hora). Se dejaron en una mezcla de epon a temperatura ambiente durante 24 horas. Se incluyeron en Epon 812 durante 24 horas. Se obtuvieron cortes semifinos de $0.5\ \mu\text{m}$ de espesor con ultramicrotomo (Reichert Ultracuts, Leica) y se tiñeron con azul de toluidina 0.5%. Los cortes se observaron con un microscopio óptico (Zeiss, Alemania). Las imágenes se capturaron con ayuda del microscopio confocal (Pascal, Zeiss).

5.5 Inmunofluorescencia.

Una gónada de cada grupo de cultivo fue procesada para inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la histona H3 acetilada en la lisina 18 (anti-H3K18ac) como anticuerpo primario. Así mismo, se procesaron (como control de cultivo) gónadas de embriones incubados durante 33 días a TM y TF, así como gónadas de embriones de intercambio (incubados durante 19 días a TF después de los cuales durante 14 días se incubaron a TM). Todos los anteriores pertenecían al mismo nido del cual fueron tomados los embriones cuyas gónadas estuvieron en cultivo.

Las gónadas se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% preparada en PBS pH 7.4. Se lavaron 5 minutos en PBS pH 7.4 y se incubaron toda la noche a 4°C en sacarosa al 30% preparada en Buffer de fosfatos (PBS) de pH 7.4. Posteriormente, los tejidos se lavaron rápidamente en PBS pH 7.4 y se incluyeron en medio "Tissue-Tek® O.C.T™ Compound" dentro de cápsulas Beem, evitando la presencia de PBS pH 7.4 y de burbujas, una vez orientados dentro de las cápsulas se congelaron lentamente con Hexano (colocado sobre una cama de hielo seco). Los tejidos incluidos se sacaron del hexano y se colocan a -20°C durante 30 minutos. A -20°C se realizaron cortes de diferentes zonas del mismo tejido de $10\ \mu\text{m}$ de espesor con ayuda del criostato (Leica), y se montaron en portaobjetos cubiertos con Poly-L-Lisina (SIGMA). Los cortes se delimitaron con un lápiz hidrofóbico para inmunohistoquímica (DAKO). Las laminillas con los cortes se introdujeron en una campana de vacío durante 1 hora a TA. Las laminillas se colocaron dentro de una cámara húmeda, una vez ahí

se les lavó con PBS pH 7.4 durante 10 minutos a TA para eliminar el “Tissue-Tek® O.C.T™ Compound”. El tejido se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.2% disuelto en PBS durante 30 minutos a TA (cambiando la solución cada 10 minutos). En seguida se hicieron tres lavados de 10 minutos a TA con Tween-20 0.05% disuelto en PBS pH 7.4. Se bloqueo con albúmina de suero bovino (SIGMA) al 1% disuelta en una solución de Tween-20 al 0.05% en PBS durante 2 horas a TA. Las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario policlonal hecho en conejo contra la histona H3 acetilada en la lisina 18 (Abcam) a una concentración de 1:500 (diluido en la solución de bloqueo) durante toda la noche a 4°C. Se hicieron 5 lavados a TA de 5 minutos cada uno con una solución de Tween-20 al 0.05% en PBS pH 7.4. Las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con CyTM5 contra conejo hecho en cabra (CHEMICON) disuelto en la solución de bloqueo a una concentración de 1:100 durante 1 hora a TA. Las laminillas se lavaron 5 veces durante 5min (cada ocasión) a TA con Tween 0.05% disuelto en PBS pH 7.4. Al finalizar, las laminillas se montaron con medio para montar fluorescente (DakoCytomation). Se monitorearon en el microscopio de fluorescencia y se analizaron con ayuda del microscopio confocal (Pascal, Zeiss).

5.6 Extracción de ADN.

Se extrajo ADN de gónadas de los grupos de cultivo: control y tratadas con 5-azaC, tanto de los incubados a TF como a TM. Además, se extrajo ADN de cerebro, gónada y mesonefros de embriones en el PDS y en el PST, ambos de TF y TM. Los embriones en el PDS eran de la Et27 de 33 días de incubación a TF y de Et27 de 59 días de incubación a TM. Los del PST eran de la Et24 de 34 días de incubación a TM y de la Et24 de 19 días de incubación a TF. Así mismo, se extrajo ADN (como control de los grupos de cultivo) de gónadas de embriones de intercambio (incubados durante 19 días a TF, después de los cuales durante 14 días se incubaron a TM) y de gónadas de embriones incubados durante 33 días a TM y TF. Éstas últimas, son gónadas de embriones pertenecientes al mismo nido del que se tomaron los embriones cuyas gónadas estuvieron en cultivo. Para realizar la extracción del ADN de estos tejidos se utilizó DNAzol (Invitrogen Cat. No. 10503-027).

Se maceraron de 25 a 50 mg de tejido en 1 ml de DNAzol con ayuda de micropistilos (Eppendorf Cat. No.0030120973) previamente tratados con DEPC y esterilizados. El tejido macerado en el DNAzol se incubó por 10 minutos a TA, posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm a 4°C y el sobrenadante viscoso se transfirió a un tubo nuevo. Al sobrenadante se le adicionó 500 µl de etanol absoluto para precipitar el ADN, esta mezcla se incubó a TA durante 3min. Después, se centrifugó 15 minutos a 14,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se decantó. Posteriormente, al pellet se le agregaron 800 µl de Etanol al 80% y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se decantó y se dejó que el pellet secará a TA durante 20 minutos. El pellet (ADN) se disolvió en 300 µl de agua de ampollita y se incubó a 50° C durante 10 minutos.

El ADN que se extrajo con DNAzol fue tratado con RNasa A de páncreas bovino (Roche Applied Science, Cat. No. 1010109142001). Al ADN se le agregó RNasa A, esta última quedó a una concentración final de 10 µg/ml. Se incubó durante 1 hora a 50° C. Posteriormente, se agregó un volumen fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (Invitrogen) pH 8. La mezcla anterior se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Con ayuda de una punta de 200 µl se removió la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo. A esta última se le adicionó Acetato de Sodio pH 5.2 3M en una proporción equivalente a 1/10 de volumen total (de la fase acuosa), a esta mezcla se le adicionaron 2.5 volúmenes (de la fase acuosa anterior más el Acetato de Sodio) de Etanol Absoluto. Se dejó incubando a -20°C toda la noche. Al siguiente día, se centrifugó durante 15 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante y al pellet se le agregaron

800 µl de Etanol al 80%, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5min a 4°C y el pellet se dejó secar a TM durante 20 minutos. El pellet (ADN) se disolvió en 18 µl de agua de ampollita. Se determinó la concentración del ADN registrando su absorbancia a 260 y 280 nm con ayuda del nanodrop (ND-1000). Se calculó la pureza del ADN con la fórmula:

$$IP_{ADN} = \frac{Abs_{260}}{Abs_{280}} \geq 1.8$$

Donde: **IP_{ADN}**: Índice de Pureza del ADN
Abs₂₆₀: Lectura de Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm.
Abs₂₈₀: Lectura de Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 280 nm.

Nota: Para la hidrólisis solamente se utilizaron las muestras que registraban un $IP_{ADN} = 1.8$.

Para calcular la concentración del ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$[ADN] = Abs_C \times Abs_{260}$$

Donde: **[ADN]**: Concentración de ADN en la muestra.
Abs_C: Constante de unidad de absorbancia: 50 µg/ml.

Nota: El ADN se guardó a -20° C hasta el día que fue utilizado para ser hidrolizado.

5.7 Hidrólisis del ADN.

Para la hidrólisis se utilizó 1 µl de ácido perclórico (HClO₄) al 70% (Sigma) por cada 0.9 µg de ADN y se incubó a 100°C durante 1 hora (cuidando que la temperatura permaneciera constante). Para calcular la cantidad de Hidróxido de Sodio (NaOH) 10 N que se necesitaba para neutralizar el HClO₄ al 70% se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_{Base} = \frac{(N_{Acido} \times V_{Acido})}{N_{Base}}$$

Donde: **V**: Volumen
N: Normalidad

Nota: La muestra hidrolizada se ajustó a pH 6 agregando 1 µl de HClO₄ 1 N y/o NaOH 1 N.

La muestra hidrolizada se pasó a través de filtros para jeringa de Nylon de 4 mm de 0.2 µm de poro Nalgene (Cat. No. 176-0020). Las muestras se inyectaron en el equipo para HPLC antes de que transcurrieran 5 horas, a partir del momento en que se ajustó el pH, mientras tanto se dejaron a 4°C y se cubrieron de la luz.

5.8 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés: *High-performance liquid chromatography*).

Para determinar los tiempos de elución de las bases nitrogenadas que componen al ADN de las muestras problema, se utilizaron como estándares de referencia: citosina (C), 5-metilcitosina (5^mC), uracilo (U), guanina (G), timina (T) y adenina (A); proporcionadas por Sigma.

Como controles del método de HPLC puesto a punto en el presente estudio se utilizó ADN de la línea celular CaSki no metilado y metilado *in vitro* con la enzima CpG Metiltransferasa SssI (M.SssI) (New England BioLabs) donado por el Dr. Alfonso Dueñas González y el Dr. Erick de

la Cruz Hernández de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología y del IIBM, UNAM.

5.8.1 Preparación de Estándares. Se preparo un stock de cada estándar como se describe a continuación:

- Citosina 26.3 mM.- 0.292 mg de citosina se disolvieron en 40 μ l de HCl 1 N y 960 μ l de H₂O.

Del stock anterior se tomaron 285 μ l y se diluyeron en 715 μ l de H₂O, para dejarlo a una concentración final de 7.5 mM.

- 5-metilcitosina 12.7 mM.- 0.3 g de 5-metilcitosina se disolvieron en 40 μ l de HCl 1 N y 960 μ l de H₂O.

Del stock anterior se tomaron 24 μ l y se diluyeron en 976 μ l de H₂O, para dejarlo a una concentración final de 300 μ M.

- Uracilo 16.95 mM.- 1.9 mg de Uracilo se disolvieron en 40 μ l de Etanol absoluto, 40 μ l de NaOH 1 N y 920 μ l de H₂O.

Del stock anterior se tomaron 442 μ l y se diluyeron en 558 μ l de H₂O, para dejarlo a una concentración final de 7.5 mM.

- Guanina 8.34 mM.- 1.26 mg se disolvieron en 200 μ l de NaOH 1 N y 800 μ l de H₂O.

Del stock anterior se tomaron 900 μ l y se diluyeron con 100 μ l de H₂O para dejarlo a una concentración final de 7.5 mM.

- Timina 10 mM.- 2.88 mg de Timina se disolvieron en 200 μ l de HClO 1 N y 800 μ l de H₂O.

- Adenina 11.7 mM.- 1.59 mg se disolvieron en 200 μ l HCl 1 N y 800 μ l de H₂O.

Del stock anterior se tomaron 855 μ l y se diluyeron en 145 μ l de H₂O para dejarlos a una concentración final de 10 mM.

La mezcla stock de estándares fue preparada mezclando: 10 μ l de citosina 7.5 mM, 10 μ l de 5-metilcitosina 0.3 mM, 5 μ l de uracilo 7.5 mM, 5 μ l de timina 10.0 mM, 10 μ l de guanina 7.0 mM y 5 μ l de adenina 10.0 mM; finalmente está mezcla se diluyó en 180 μ l de HClO₄ pH 6.

150 μ l de la mezcla stock de estándares, descrita anteriormente, fue diluida en 450 μ l HClO₄ pH 6. A esta última solución le llamaremos “mezcla de trabajo” y contiene los estándares en las siguientes concentraciones: Citosina (C) 0.083 mM, 5-metilcitosina (5^mC) 0.003 μ M, Uracilo (U) 0.456 mM, Guanina (G) 0.077 mM, Timina (T) 0.055 mM y Adenina (A) 0.055 mM. Esta solución se pasó a través de filtros para jeringa de Nylon de 4 mm de poro 0.2 μ m de Nalgene (Cat. No. 176-0020), se guardó a 4°C y se protegió de la luz.

5.8.2 Elución de las muestras y los estándares. Para la separación, identificación y cuantificación de las bases nitrogenadas se utilizó una columna de fase inversa Ultrasphere C18 de 4.6 mm de diámetro interno (DI), 150 mm de longitud y 5 μ m de diámetro de partícula, además de una pre-columna Ultrasphere ODS de 4.6 mm DI, 45 mm de longitud y 5 mm de diámetro de partícula, para proteger la columna analítica. La fase móvil consiste de una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 3.7 y metanol 99.5 : 0.5 (v/v), la cual conforma la fase móvil débil y como fase móvil fuerte se utilizó el amortiguador de fosfatos 10 mM pH 3.7 más metanol en una relación 90 : 10 (v/v). La elución fue por gradiente como se muestra en la Figura 7. El flujo de la fase móvil fue de 0.8ml/min.

La detección se realizó a una longitud de onda de 280 nm con una sensibilidad de 0.25 a.u.f.s. El análisis se realizó a TA en 30 min. La columna fue re-equilibrada durante 15 min, con

la fase débil. Después de terminar de hacer las corridas cromatográficas fue necesario lavar durante 20 min con agua grado HPLC. La identificación de los picos se realizó comparando los tiempos de retención de los estándares con respecto a los tiempos de retención de los picos presentes en el cromatograma de las muestras problema (ver Fig. 8 y 9). La solución estándar se inyectó cada 5 corridas de las muestras hidrolizadas. El volumen de inyección fue de 10 μl . La concentración mínima inyectada de ADN hidrolizado de las muestras problema fue de 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

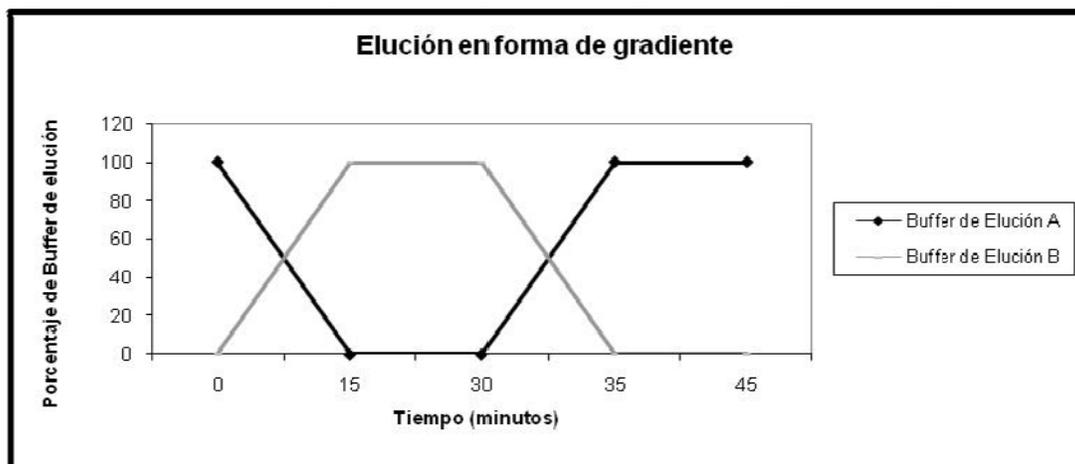


Fig. 7.- Gráfica que muestra el gradiente de elución utilizado para el HPCL.

El porcentaje de 5-metilcitosina (5^{m}C) se calculó, utilizando las áreas bajo la curva de los picos presentes en el cromatograma que indican el tiempo de retención de 5^{m}C y C, de acuerdo a la siguiente fórmula reportada por Corvetta *et al.* (1991):

$$\%5^{\text{m}}\text{C} = \left[\frac{\%5^{\text{m}}\text{C}}{(\%5^{\text{m}}\text{C} + \text{C})} \right] * 100$$

Además, también se calculó el porcentaje de 5^{m}C substituyendo en la formula anterior las concentraciones Molares de la 5^{m}C y C (Loennechen *et al.*, 1989). La concentración Molar de 5^{m}C y C en la muestra problema se calculó con la siguiente fórmula:

$$RF * ABCP = MP$$

Donde: **ABCP:** Área bajo la curva del pico presente en el cromatograma que indica el tiempo de retención de la base en la muestra problema.
MP: Molaridad de la base en la muestra problema
RF: Factor de retención del estándar de la mezcla de trabajo.

El RF se calculó con la siguiente fórmula:

$$RF = \frac{MS}{ABC}$$

Donde: **MS:** Molaridad del estándar en la mezcla de trabajo.
ABC: Área bajo la curva del pico presente en el cromatograma que indica el tiempo de retención del estándar de la mezcla de trabajo.

Los resultados fueron analizados con ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus Versión 5, aplicando las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y T-Wilcoxon, según fuera

necesario. Además, a los grupos de análisis a los que se les aplicó la prueba de Kruskal-Wallis se les analizó adicionalmente con la prueba de rangos múltiples.

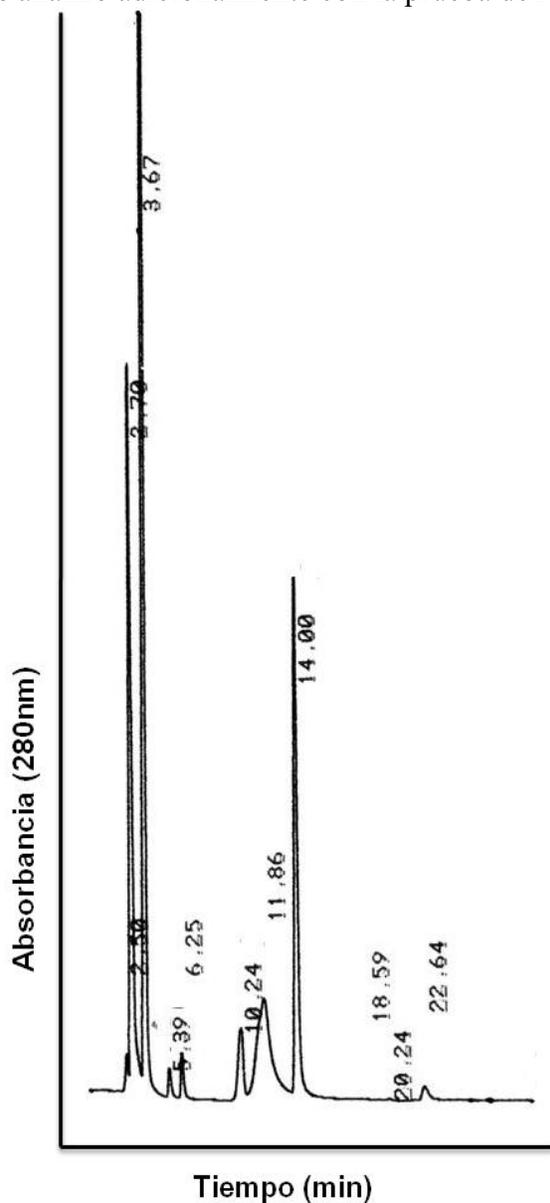


Fig. 8.- Cromatograma que muestra los tiempos de elución de los estándares.

Tiempo de elución (min)	Bases nitrogenadas
3.67	C
5.39	5 ^m C
6.25	U
10.24	G
11.86	T
14.00	A

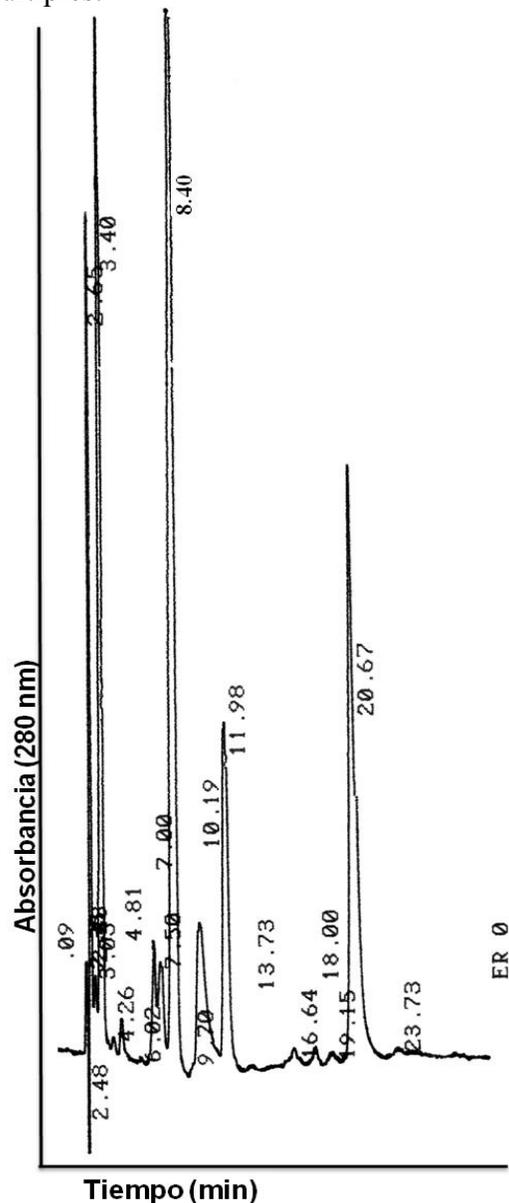


Fig. 9.- Cromatograma que muestra los tiempos de elución de las bases nitrogenadas de ADN hidrolizado de un *pool* de gónadas de *L. olivacea* de Et 26 33°C.

Tiempo de elución (min)	Bases nitrogenadas
3.40	C
4.81	5 ^m C
No está presente	U
8.40	G
10.19	T
11.98	A

6. Resultados

6.1 Las gónadas de *L. olivacea* de etapas 23 y 24 se encuentran morfológicamente indiferenciadas, pero las gónadas de etapa 27 (Et27) muestran características de ovario o testículo.

A fin de describir la morfología de las gónadas *in vivo* en el período indeterminado (PI) y en el periodo de determinación sexual (PDS) de embriones incubados a temperatura masculinizante y feminizante se empleo microscopia confocal. En las etapas 23 y 24 de embriones incubados a 26°C (temperatura masculinizante: TM) y 33°C (temperatura feminizante: TF), respectivamente, las gónadas están morfológicamente indiferenciadas (Figs. 10 y 11). Estudios previos demostraron que al intercambiar los embriones incubados de TM a TF e inversamente en estas etapas, más del 95% responden a la temperatura de intercambio, por lo que se consideró que se encontraban en el período de sexo indeterminado (PI). Sin embargo, en la Et27 es posible distinguir testículos (Fig. 12) y ovarios (Fig. 13) en los embriones incubados a TM y TF, respectivamente. En esta etapa, al hacer intercambios de temperatura ningún embrión respondió a la segunda temperatura por lo que se considero que se encontraban en el periodo de determinación sexual (PDS).

Como puede apreciarse en las Figs. 10 y 11, las crestas genitales de embriones incubados a TM o TF presentan la región medular ocupada por los cordones medulares (cm) y la región cortical (RC) opuesta al mesonefros (mes), esta última se forma por células epiteliales (E) que envuelven a numerosas células germinales (CG).

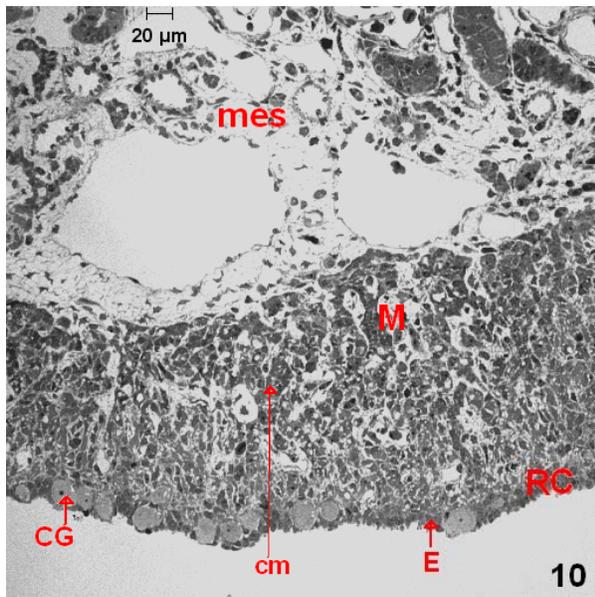


Fig. 10.- Etapa 23 a 26°C (TM)

Las crestas genitales de embriones incubados a TM y TF presentan la región medular (M) ocupada por los cordones medulares (cm) y la región cortical (RC) opuesta al mesonefros (mes), esta última se forma por células epiteliales (E) que envuelven a numerosas células germinales (CG).

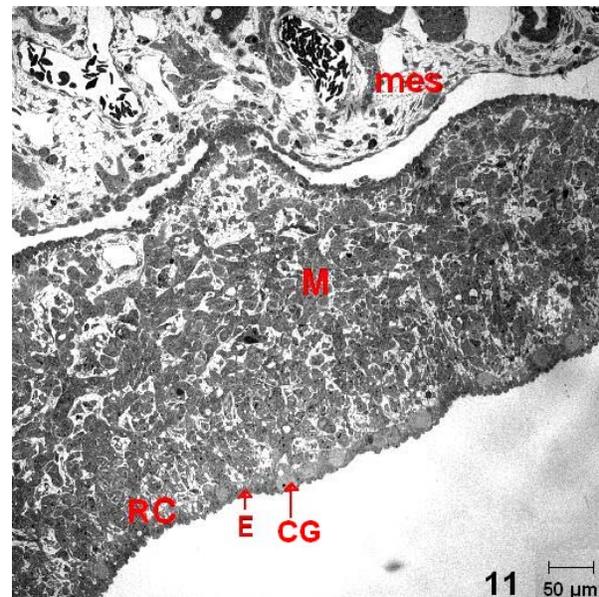


Fig. 11.- Etapa 24 a 33°C (TF)

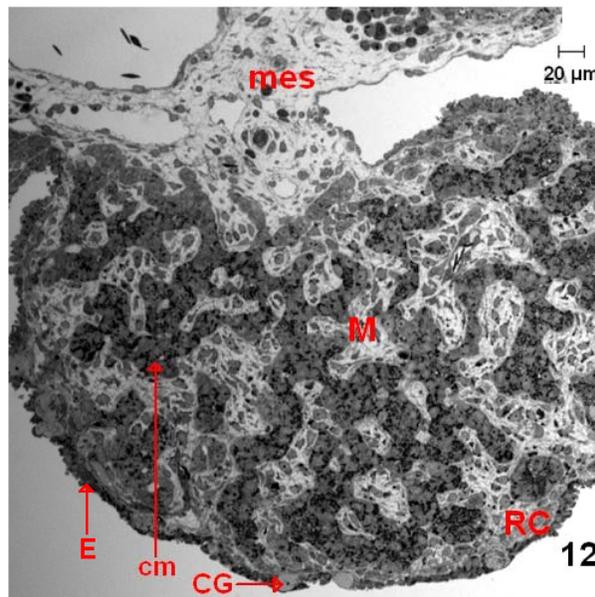


Fig. 12.- Etapa 27 a 26°C (TM)

En la Et27 es posible distinguir testículos en los embriones incubados a TM. Las gónadas de embriones incubados a TM muestran características estructurales similares a las de las gónadas indiferenciadas. Es decir, poseen claros cordones medulares rodeados de tejido estomático y asociados al epitelio cortical, en el cual se encuentran la mayoría de las células germinales. Cordones medulares (cm), Región cortical (RC), Mesonefros (mes), Células epiteliales (E), Células germinales (CG) y Región medular (M)

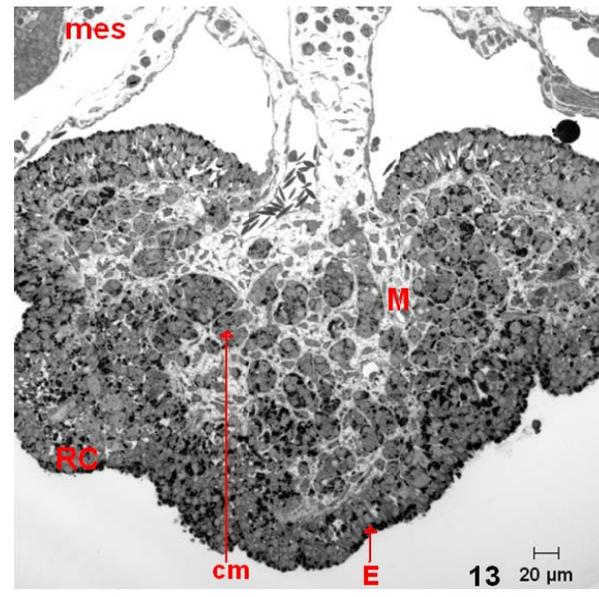


Fig. 13.- Etapa 27 a 33°C (TF)

En la Et27 es posible distinguir ovarios en los embriones incubados a TF. El epitelio cortical aumenta de espesor y contiene muchas de las células germinales, los cordones medulares todavía son evidentes.

Cordones medulares (cm), Región cortical (RC), Mesonefros (mes), Células epiteliales (E), Células germinales (CG) y Región Medular (M)

6.2 Para el cultivo de órganos se emplearon gónadas de embriones en el Periodo Indeterminado (PI) de la Et24 incubados a temperatura feminizante durante 19 días.

Para el cultivo de órganos se emplearon gónadas de embriones de Et24 incubados durante 19 días a 33°C (TF) del PI, debido a que como se muestra en la tabla B el 100% de los embriones incubados a TF durante los primeros 19 días de incubación responden a la temperatura cuando son transferidos a 26°C (TM) lo cual nos da la seguridad de que todas las gónadas que se incuben a TM responderán al cambio de temperatura. Además, las gónadas de Et24 a TF tienen un tamaño razonable como para que la disección se realice de forma rápida, lo cual no compromete la viabilidad de la gónada y permite que ésta llegue al cultivo en las mejores condiciones posibles. Por otro lado, como se muestra en la tabla A para estar seguros de que el 100% de las gónadas incubadas inicialmente a TM al ser transferidas a TF respondan al cambio de temperatura necesitaríamos iniciar el cultivo con gónadas de Et22 lo cual es prácticamente imposible puesto que la gónada es muy pequeña como para ser disecada.

Según lo reportado por Moreno-Mendoza *et al.* (2001) la detección histológica e inmunocitoquímica de SOX9 revela que las gónadas en cultivo de órganos y las gónadas *in vivo* tienen una respuesta similar cuando su temperatura de incubación inicial es de 33°C (TF) y se les cambia a una temperatura de incubación de 26°C (TM). Esto nos hace suponer que el camino molecular de DTS no se altera bajo condiciones de cultivo. Por esta razón, esperábamos que:

- Las gónadas de Et24 incubadas 19 días a 33°C después de ser colocadas en cultivo durante 14 días tuvieran características morfológicas, histológicas y moleculares semejantes a las de las gónadas de embriones intercambiados de TF a TM de 33 días (19 días a TF + 14 días a TM).
- Las gónadas de Et24 incubadas 19 días a 33°C después de ser colocadas en cultivo durante 14 días a TM se encontrarán en la Et26 tal como sucede con las gónadas intercambiadas de TF a TM (ver tabla B).
- Las gónadas de Et24 incubadas 19 días a 33°C después de ser colocadas en cultivo durante 14 días a TF se encontrarán en la Et27 tal como sucede con las gónadas incubadas durante 33 días a de TF.
- Tanto las gónadas *in vitro* incubadas a TM y TF se encontrarían dentro del PDS (ver Fig. 6).

Por lo tanto, esperábamos que si todo lo anterior es cierto “al concluir los 14 días de cultivo el nivel de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* incubadas a TM se asemejarían al de las gónadas provenientes de embriones intercambiados de TF a TM de 33 días (19 días a TF + 14 días a TM), mientras que el nivel de metilación de las gónadas *in vitro* incubadas a TF se asemejarían a las de las gónadas provenientes de embriones incubados durante 33 días a TF”.

6.2.1 El tamaño de las gónadas en cultivo tratadas con 5-azacitidina (5-azaC) presenta un decremento significativo con respecto al de las no tratadas.

Se midió el área de las gónadas en cultivo a fin de determinar si el tratamiento con 5-azaC afecta su crecimiento. Se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el tamaño de las gónadas, incubadas a TM o TF, tratadas con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC con respecto a las no tratadas con 5-azaC (Figs. 14 y 15).

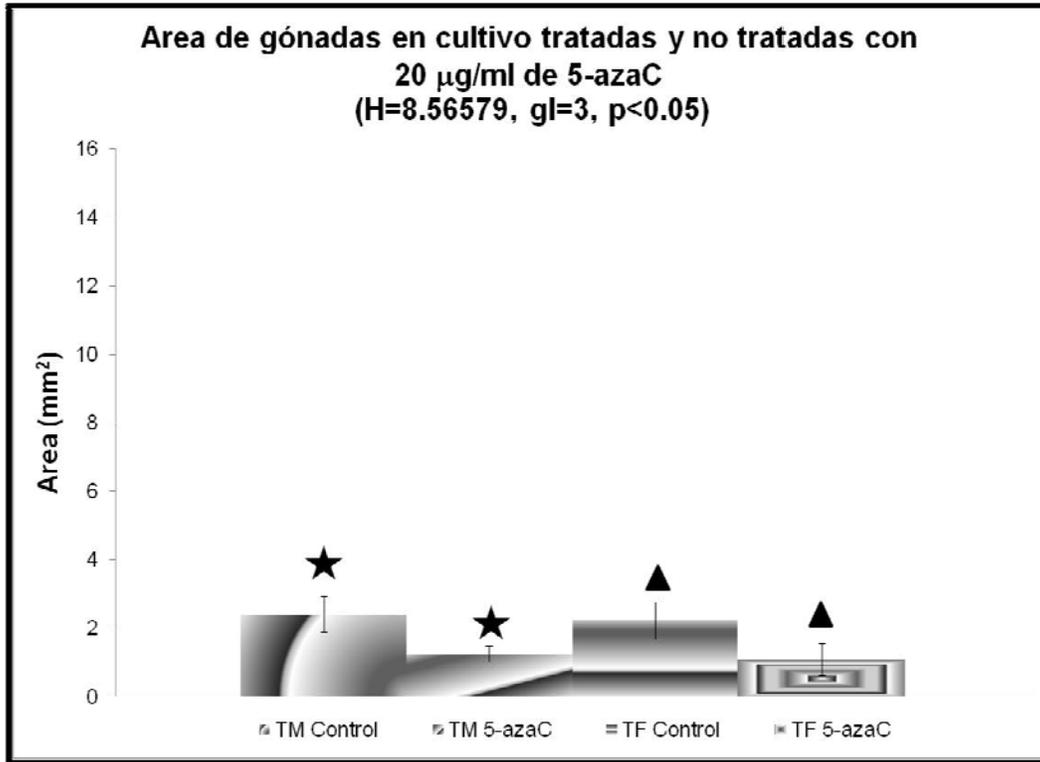


Fig. 14.- Gráfica donde se muestra el área (mm²) de las gónadas de *L. olivacea* en cultivo en presencia y ausencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que hay una diferencia estadística significativa ($H=8.56579$, $gl=3$, $p < 0.05$) entre algunos de los 4 grupos analizados que se muestran en la gráfica. Con los símbolos: ★ y ▲ se señala entre que grupos, según la prueba de rangos múltiples, existe una diferencia estadísticamente significativa. Los grupos señalados con un mismo símbolo presentan una diferencia significativa entre sí

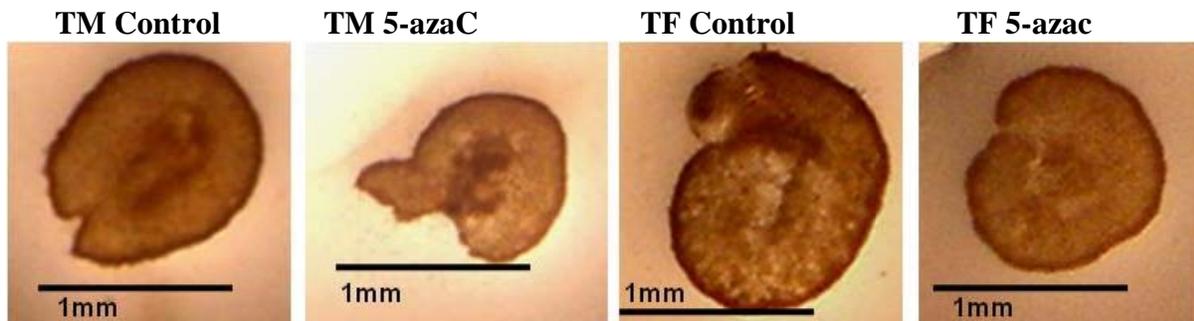


Fig. 15 Gónadas de *L. olivacea* de Et24 de 19 días de incubación a TM después de 14 días de estar en cultivo de órganos en presencia y en ausencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC.

6.2.2 El tamaño de las gónadas en cultivo tratadas con Tricostantina A (TSA) no presenta un decremento significativo con respecto al de las no tratadas.

Se midió el área de las gónadas en cultivo a fin de determinar si el tratamiento con TSA afecta su crecimiento. No se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el tamaño de las gónadas, incubadas a TM o TF, tratadas con 400 y 800 ng/ml de TSA con respecto a las no tratadas con TSA (Figs. 16 y 17).

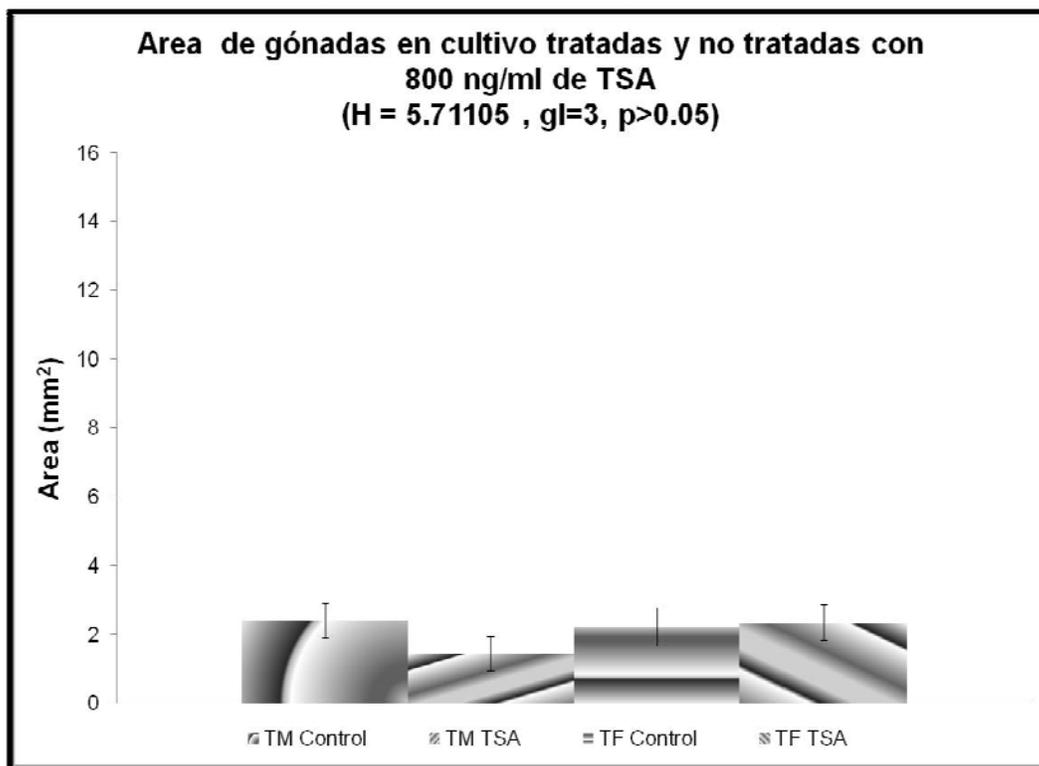


Fig. 16.- Gráfica donde se muestra el área (mm^2) de las gónadas de *L. olivacea* en cultivo de órganos en presencia y ausencia de 800 ng/ml de TSA. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que no hay una diferencia estadística significativa entre los 4 grupos analizados que se muestran en la gráfica ($H = 5.71105$, $gl=3$, $p > 0.05$).

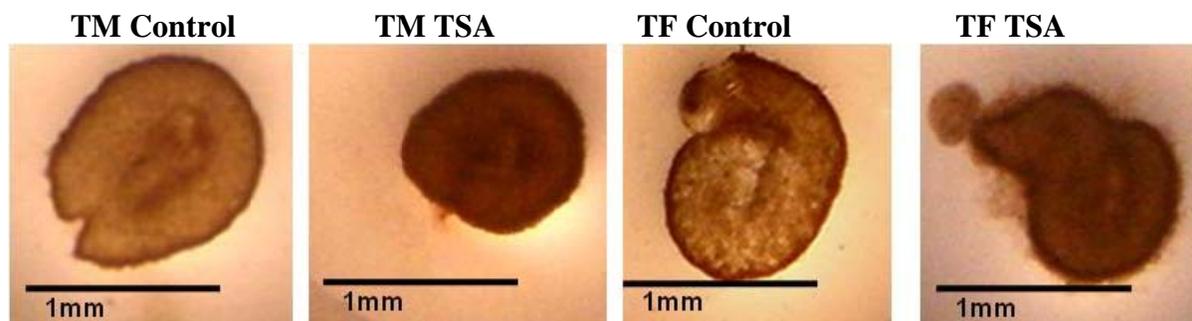


Fig. 17 Gónadas de *L. olivacea* de Et24 de 19 días de incubación a TF después de estar 14 días en cultivo de órganos en presencia y en ausencia de 800 ng/ml de TSA.

6.3 Efecto de la temperatura sobre la distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3 acetilada en la lisina 18 (H3K18ac).

Como hemos mencionado, la acetilación de histonas generalmente se asocia a un estado transcripcionalmente activo de la cromatina. Por lo anterior, decidimos evaluar el efecto de la temperatura sobre los patrones de distribución de la acetilación de histonas, para lo cual utilizamos como marcador el patrón de distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3 acetilada en la lisina 18 (H3K18ac) detectado con el anticuerpo anti-H3K18ac. Con este fin, se diseccionaron gónadas de embriones de Et24 de 19 días de incubación a TF, las cuales se colocaron en cultivo de órganos tratándolos o no con los inhibidores de los remodeladores de la cromatina 5-azaC o TSA. Después de 14 días de cultivo, las gónadas fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario: anti-H3K18ac.

6.3.1 La temperatura afecta el volumen nuclear y la distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac.

Se utilizó un anticuerpo anti-H3K18ac para evaluar la distribución de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac en los núcleos de las células de las gónadas cultivadas en ausencia de los inhibidores de los remodeladores de la cromatina durante 14 días a TM y TF, respectivamente (Figs. 18 y 19). El volumen nuclear y la distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en la cromatina se ven claramente influenciados por la temperatura de incubación. En TM los núcleos son más pequeños y homogéneos (Fig. 18) en tanto que en TF los núcleos son dos o más veces mayores y presentan una distribución heterogénea de la cromatina (Fig. 19).

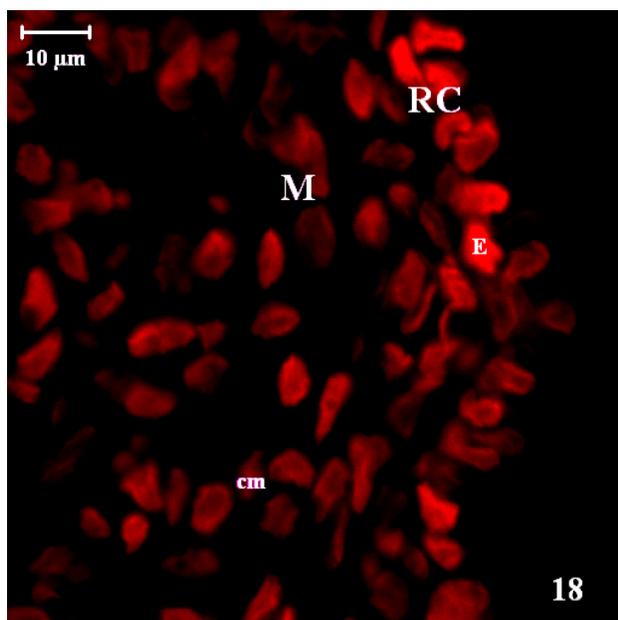


Fig. 18.- TM

En la figura 18 se observa la distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en los núcleos de las células de las gónadas cultivadas durante 14 días a TM. El volumen nuclear y la distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en la cromatina se ven claramente influenciados por la temperatura de incubación. En TM los núcleos son pequeños y homogéneos. Cordones medulares (cm), Región cortical (RC), Células epiteliales (E) y Región Medular (M)

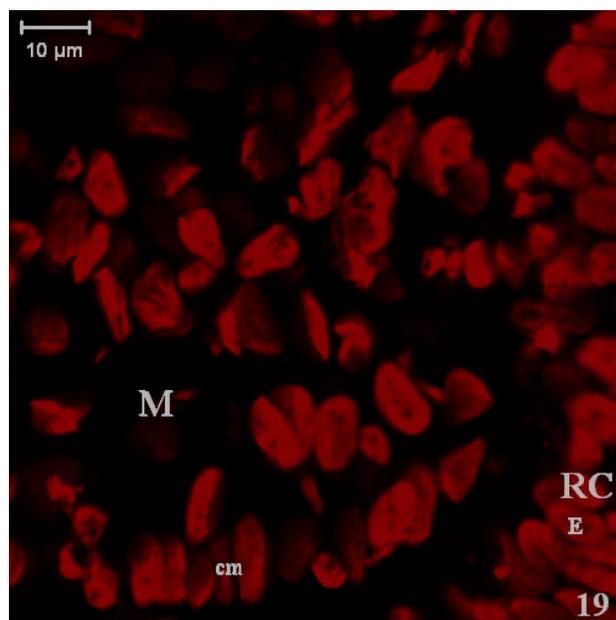


Fig. 19.- TF

En la figura 19 se observa la distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en los núcleos de las células de las gónadas cultivadas durante 14 días a TF. Los núcleos son dos o más veces mayores con respecto a los de TM y presentan una distribución heterogénea de la cromatina. Cordones medulares (cm), Región cortical (RC), Células epiteliales (E) y Región Medular (M)

6.3.2 La distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en los núcleos de la corteza de las gónadas *in vitro* tratadas con 5-azaC genera una señal de mayor intensidad que la que genera en los núcleos medulares.

A fin de determinar si el efecto de la temperatura sobre el volumen nuclear y la distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac depende de la actividad de las ADNMTs, se determinó la distribución de esta modificación post-traducciona con el anticuerpo anti- H3K18ac en gónadas en cultivo tratadas con 5-azacitidina (5aza-C), un inhibidor de la actividad de las ADNMTs. Las gónadas en cultivo se trataron con 5-azaC en las siguientes concentraciones: 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Después de 14 días de cultivo en presencia de 5aza-C (20 $\mu\text{g/ml}$), se encontró una distribución regional diferente sobre el patrón de distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en los núcleos de las células medulares y corticales. Este mismo patrón de distribución del anticuerpo anti-H3K18ac se observó en los núcleos de las células medulares y corticales de las gónadas en cultivo tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC (resultados no mostrados). Los núcleos de la corteza muestran en general una mayor intensidad que la de los núcleos medulares (Figs. 20 y 21). El efecto del inhibidor de la metilación del ADN sobre el patrón de expresión del anticuerpo anti-H3K18ac fue similar en las gónadas incubadas a TM y a TF. La diferencia en el tamaño de los núcleos debida a la temperatura de incubación, no se vio modificada por la presencia de la 5aza-C en el medio de cultivo. Por lo tanto, parece ser que el patrón de distribución de la modificación pos-traducciona H3K18ac no parece depender de la actividad de las ADNMTs.

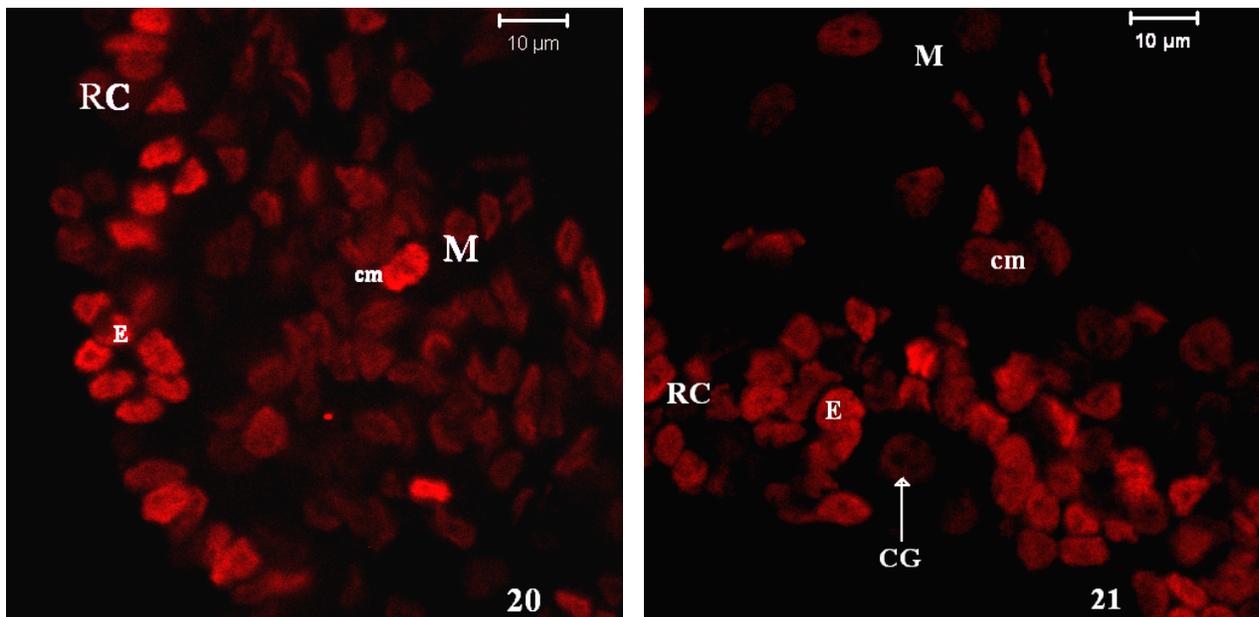


Fig. 20.- TM+5-azaC (20 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 21.- TF+5-azaC (20 $\mu\text{g/ml}$)

La distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en la cromatina de los núcleos de la corteza de las gónadas en cultivo incubadas a TM y TF tratadas con 5-azaC (20 $\mu\text{g/ml}$) muestra en general una mayor intensidad que la de los núcleos medulares. Cordones medulares (cm), Región cortical (RC), Células epiteliales (E), Células germinales (CG) y Región Medular (M). Para ver controles remitirse a Figs. 18 y 19.

6.3.3 TSA tienen un efecto tóxico sobre las gónadas en cultivo incubadas a Temperatura Masculinizante (TM) y Feminizante (TF).

A fin de determinar si el efecto de la temperatura sobre el volumen nuclear y la distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac depende de la actividad de las acetilasas de histonas (HDAC), se determinó la distribución de esta modificación post-traducciona con el anticuerpo anti- H3K18ac en gónadas en cultivo tratadas con Tricostantina A (TSA), un inhibidor de la actividad de las HDACs (50, 100, 200, 400 y 800 ng/ml).

El efecto de TSA sobre las células de las gónadas en cultivo resultó severamente tóxico a todas las dosis y a las dos temperaturas. Aunque algunos núcleos parecen resistir el efecto tóxico, la gran mayoría de ellos fueron deformados y numerosos grupos pignóticos detectados con el anticuerpo anti-H3K18ac aparecieron dispersos en las gónadas en cultivo (Figs. 19 y 20).

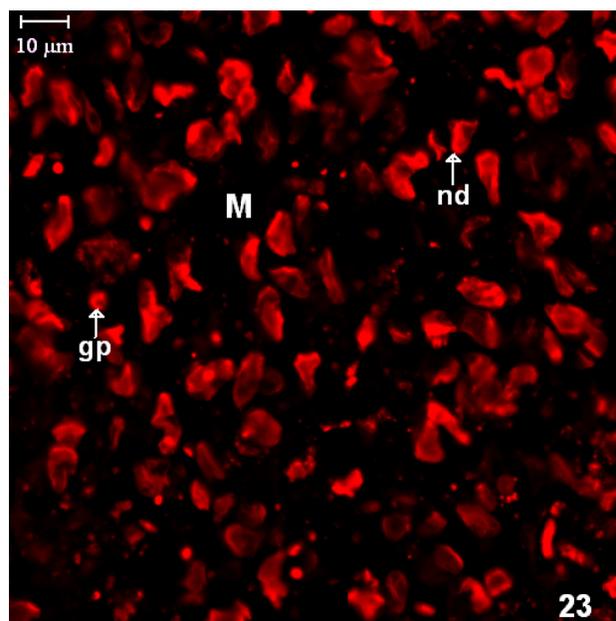
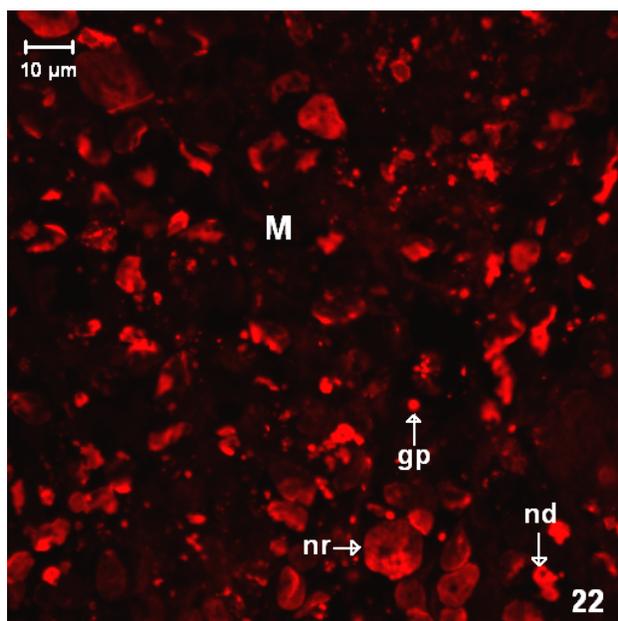


Fig. 22.- TM+TSA (50 ng/ml)

Fig. 23- TF+TSA (50 ng/ml)

El efecto de TSA sobre las células de las gónadas en cultivo resultó severamente tóxico a todas las dosis y a las dos temperaturas. Aunque algunos núcleos parecen resistir el efecto tóxico, la gran mayoría de ellos fueron deformados y numerosos grupos pignóticos detectados con el anticuerpo contra la α H3K18 aparecieron dispersos en las gónadas en cultivo. Región medular (M), grupos pignóticos (gm), núcleos deformados (nd), núcleos que parecen resistir el efecto tóxico de TSA (nr). Para ver controles remitirse a Figs. 18 y 19.

6.4 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN en gónadas en cultivo de órganos

Para determinar los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas *in vitro* tratadas y no tratadas con 5-azaC incubadas a TM o TF, se utilizó la técnica de HPLC previamente descrita y los resultados fueron analizados con la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

6.4.1 El nivel global de metilación del ADN de la línea celular CaSki tratado con CpG metiltransferasa SssI (M.SssI) aumenta con respecto al del no tratado.

La confiabilidad de la técnica de HPLC se comprobó mediante analizar el porcentaje de metilación del ADN de la línea celular CaSki no metilado y metilado *in vitro* con la enzima CpG metiltransferasa SssI (M.SssI) (New England *BioLabs*). Al analizar los porcentajes de metilación de las muestras anteriores con la prueba estadística T-Wilcoxon se demostró que hay diferencia estadística entre ambas muestras ($T=-13.52$, $k=3$, $p<0.05$) (Fig. 24).

Mediante HPLC encontramos que en el ADN de CaSki metilado *in vitro* con M.SssI el 5.2% de las Citosinas se encuentran metiladas. Mientras que en el ADN de CaSki no metilado *in vitro* el 2.2% de las Citosinas se encuentran metiladas. Estos resultados muestran que la técnica de HPLC que utilizamos en este estudio nos permitió detectar el aumento del porcentaje de citosinas metiladas generadas por metilar *in vitro* con M.SssI el ADN de CaSki. No esperábamos que el 100% de las Citosinas del ADN de CaSki metilado *in vitro* se encontraran metiladas, debido a que esta enzima solo metila los residuos de Citosina que se encuentran dentro del dinucleótido CpG de la doble cadena del ADN. Sin embargo, sí esperábamos que al comparar el porcentaje de citosinas metiladas del ADN metilado *in vitro* de CaSki fuera mayor con respecto al del no metilado *in vitro*, lo cual sí sucedió como se puede observar en la Fig. 24. Esto nos ayuda a comprobar que esta técnica arroja resultados confiables.

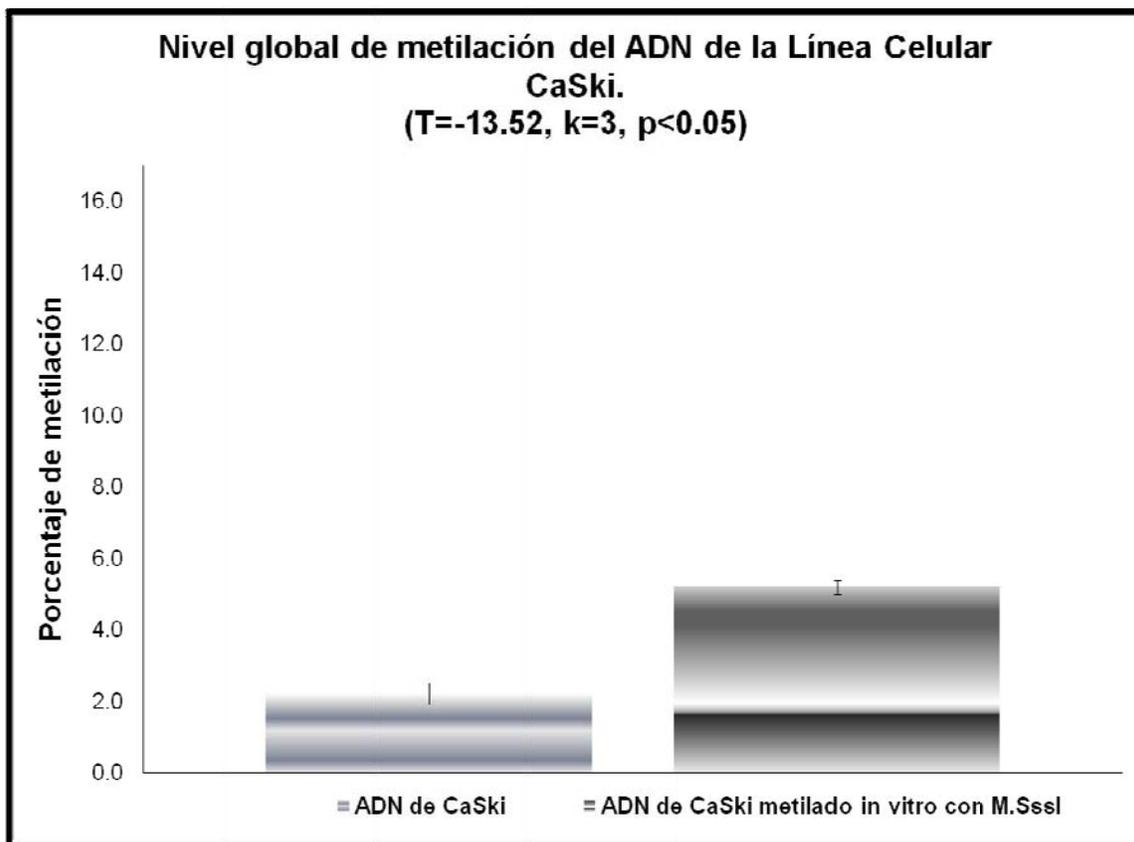


Fig. 24.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de la línea celular CaSki no metilado y metilado *in vitro* con la CpG metiltransferasa SssI (M.SssI).

El análisis con la prueba estadística T-Wilcoxon muestra que hay una diferencia estadística significativa entre los dos grupos analizados (T=13.52, k=3, p<0.05).

6.4.2 El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* a TM tratadas con 5-azaC disminuye con respecto al de las gónadas *in vivo* incubadas a TM.

Se comparó el porcentaje de metilación del ADN de gónadas cultivadas durante 14 días a TM en presencia o en ausencia del inhibidor 5-azaC, con el porcentaje de metilación de gónadas *in vivo* de embriones del mismo nido mantenidos a TM o cambiados de TF a TM durante 14 días. La edad de las gónadas analizadas *in vivo* fue de 33 días, equivalente a las gónadas en cultivo. Es decir, la edad de las gónadas en cultivo fue de 19+14=33 días (se disecaron en el día 19 para colocarlas en cultivo + 14 días de cultivo) (Fig. 25). El análisis estadístico mostró que entre algunos de estos 4 grupos existe una diferencia estadística significativa ($H=8.2$, $gl=3$, $p<0.5$) (Fig. 25). La prueba de rangos múltiples reportó que:

- No existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el porcentaje de metilación del ADN de gónadas *in vivo* incubadas a TM con respecto al que presentan las gónadas *in vivo* cuya temperatura de incubación se cambió de TF a TM.
- No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) entre el porcentaje de metilación del ADN de las gónadas *in vivo* cuya temperatura de incubación se cambió de TF a TM con respecto al que presentan las gónadas *in vitro* (en cultivo de órganos) a TM en ausencia de 5-azaC.
- No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre el nivel de metilación de las gónadas *in vivo* incubadas a TM con respecto al que presenta las gónadas *in vitro* en ausencia de 5-azaC a TM.
- El nivel de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* a TM en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ 5-azaC disminuye de forma estadísticamente significativa ($p<0.05$) con respecto al que presentan las gónadas *in vivo* incubadas a TM.
- No se registró una diferencia significativa ($p>0.05$) entre el nivel de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* en ausencia de 5-azaC a TM con respecto al que presentan las gónadas *in vitro* en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC.

Como se describió anteriormente, contrario a nuestras expectativas no existió un decremento significativo en los niveles de metilación del ADN de las gónadas en cultivo incubadas a TM en presencia del inhibidor de las ADNMTs 5-azaC con respecto a las que no fueron tratadas con dicho inhibidor. Sin embargo, si existió un decremento significativo del nivel de metilación del ADN de las gónadas en cultivo incubadas a TM en presencia del inhibidor con respecto a las gónadas *in vivo* incubadas durante 33 días a TM. Lo cual parece indicar que la inhibición de las ADNMTs disminuye el nivel de metilación del ADN de las gónadas incubadas a TM.

Por otro lado, parece ser (aunque esta diferencia no es significativa estadísticamente) que el nivel de metilación de las gónadas en cultivo a TM en ausencia del inhibidor disminuye con respecto al de los controles *in vivo*. Parece ser que esta disminución en el nivel de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* se genera como una respuesta ante las condiciones experimentales en las que se encontraban. Debido a que la hipo-metilación del ADN generalmente se relaciona con la activación transcripcional de genes (Antequera *et al.*, 1989; Boyes y Bird, 1991), esta disminución en los niveles de metilación del ADN en las gónadas *in vitro* pudiera indicar que, en estas condiciones, las gónadas activan la expresión de una serie de genes que normalmente no se activarían si las gónadas continuaran su desarrollo en el embrión. Es posible que estos genes participen en ayudar a la sobrevivencia de la gónada en condiciones de cultivo. Se ha demostrado, que ante condiciones de estrés que ponen en peligro al organismo se activan una serie de genes que protegen al organismo ante tales circunstancias (Gracey *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2007).

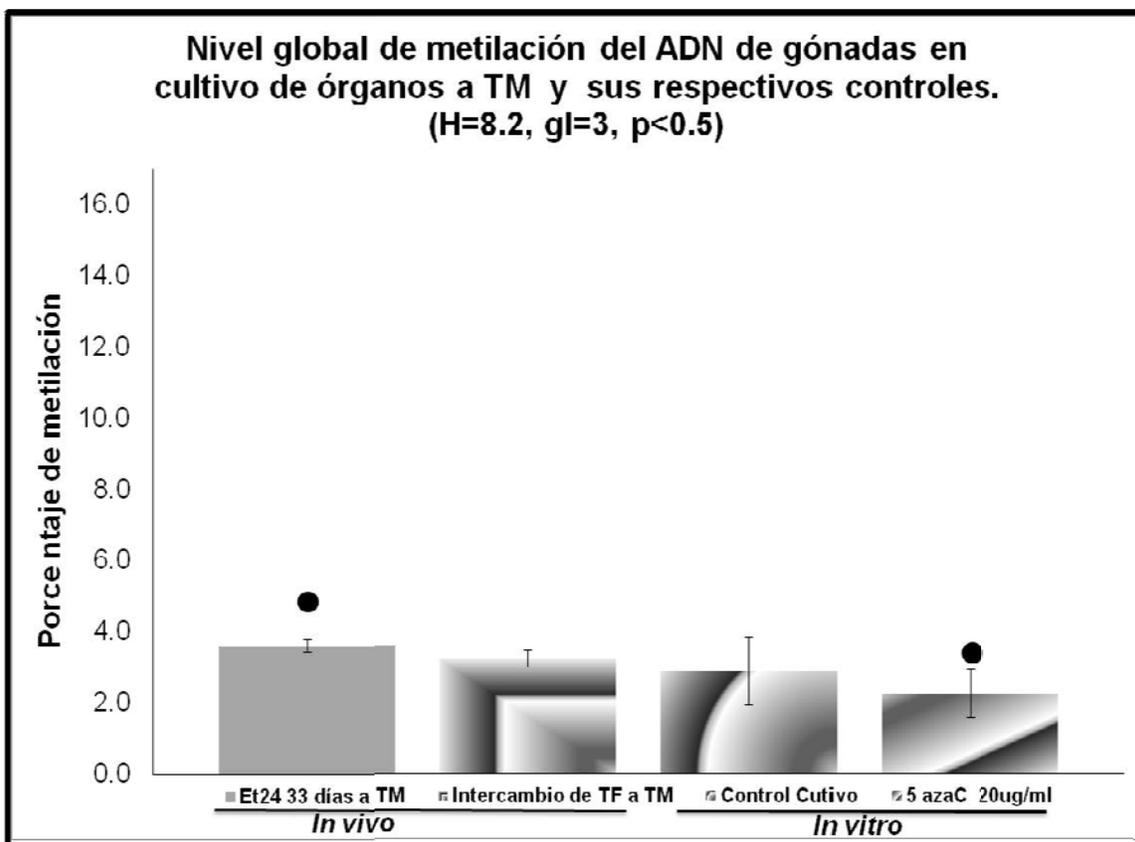


Fig. 25.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de gónadas incubadas a TM: *In vivo* [aisladas de embriones de: Et24 incubados durante 33 días a TM y de Et26 de Intercambio (Incubados por 19 días a TF y los 14 días posteriores incubados a TM)] e *In vitro* en ausencia y en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que hay una diferencia estadística significativa ($H=8.2$, $gl=3$, $p<0.05$) entre algunos de los cuatro grupos analizados. Con el símbolo: ● se señala entre qué grupos, según la prueba de rangos múltiples, existe una diferencia estadísticamente significativa.

6.4.3 El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* a TF tratadas y no tratadas con 5-azaC aumenta con respecto al que presentan las gónadas *in vivo* incubadas a TF.

En la Figura 26 se comparan los niveles de metilación del ADN global entre gónadas *in vivo* e *in vitro* de TF. El análisis estadístico encontró que entre estos 3 grupos existe una diferencia estadística significativa ($H=7.1$, $gl=2$, $p<0.05$) (Fig. 26). La prueba de rangos múltiples reportó que existe:

- El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* incubadas a TF en ausencia de 5-azaC aumenta de forma estadísticamente significativa ($p<0.05$) con respecto al que presentan las gónadas *in vivo* incubadas a TF.
- El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* incubadas a TF en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ 5-azaC aumenta de forma estadísticamente significativa ($p<0.05$) con respecto al que presentan las gónadas *in vivo* incubadas a TF.
- No se encontró una diferencia significativa ($p>0.05$) entre los niveles globales de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* incubadas a TF en ausencia y presencia de 5-azaC.

Como se describió anteriormente, contrario a nuestras expectativas no existió un decremento significativo en los niveles de metilación del ADN de las gónadas en cultivo incubadas a TF en presencia del inhibidor de las ADNMTs 5-azaC con respecto a las que no fueron tratadas con dicho inhibidor.

Por otro lado, el nivel de metilación de las gónadas en cultivo a TF en ausencia y presencia del inhibidor aumenta con respecto al de los controles *in vivo*. Parece ser que este aumento en el nivel de metilación del ADN de las gónadas *in vitro* se genera como una respuesta ante las condiciones experimentales en las que se encontraban. Debido a que la hiper-metilación del ADN generalmente se relaciona con la represión transcripcional de genes (Antequera *et al.*, 1989; Boyes y Bird, 1991), este aumento en los niveles de metilación del ADN en las gónadas *in vitro* pudiera indicar que, en estas condiciones, las gónadas reprimen la expresión de una serie de genes que pudieran afectar la viabilidad de la gónada en condiciones de cultivo. Se ha demostrado que ante condiciones de estrés que ponen en peligro al organismo cambian los niveles de expresión de una serie de genes, lo cual protege al organismo de tales circunstancias (Gracey *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2007).

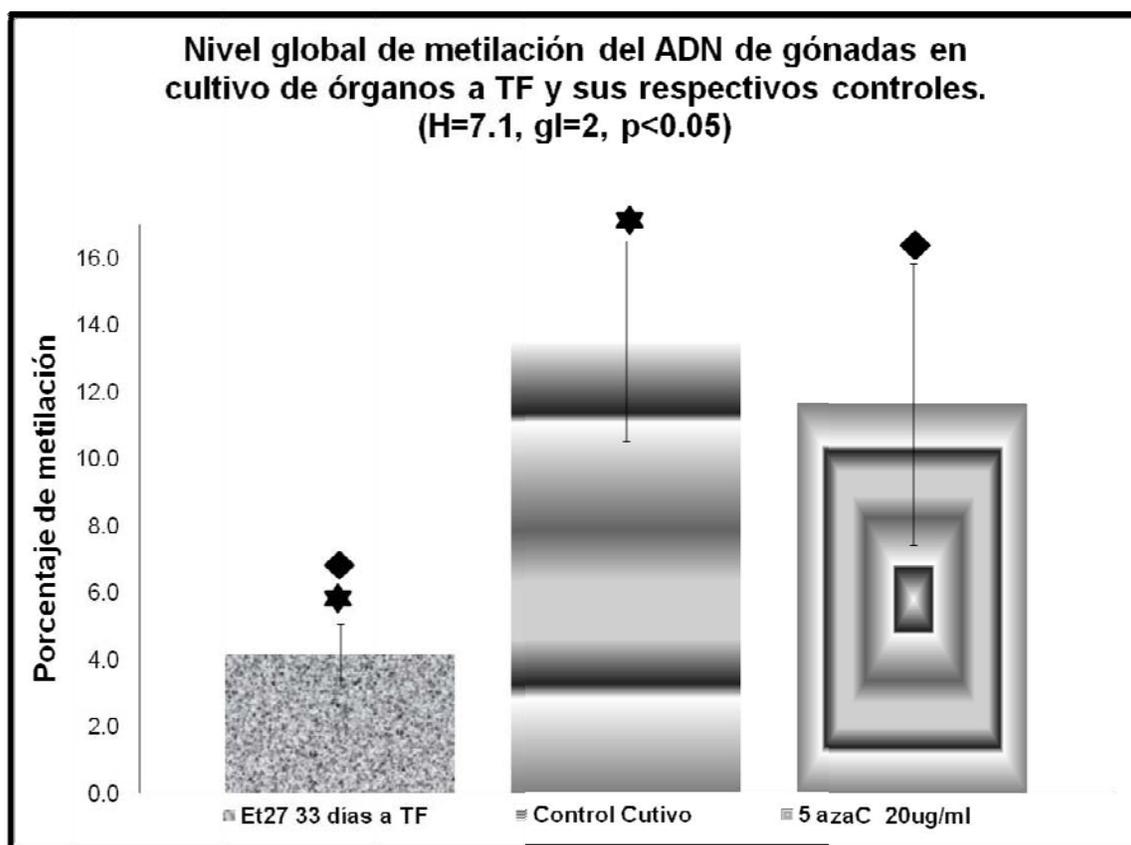


Fig. 26.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de gónadas incubadas a TF: *In vivo* (aisladas de embriones de *L. olivacea* en la Et27 33 días de incubación) e *In vitro* en ausencia y en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de 5-azaC.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que hay una diferencia estadística significativa ($H=7.1$, $gl=2$, $p<0.05$) entre los cuatro grupos analizados. Con los símbolos: \blacklozenge y \blackstar se señala entre que grupos, según la prueba de rangos múltiples, existe una diferencia estadísticamente significativa. Los grupos señalados con un mismo símbolo presentan una diferencia significativa entre sí.

6.5 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN en gónadas *in vivo* de embriones de *L. olivacea*.

Debido a que las diferencias significativas detectadas entre las gónadas aisladas y cultivadas tanto por efecto de la temperatura como por la 5-azaC parecen ser un efecto exagerado por la condición experimental en que se mantuvieron, se determinaron los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas *in vivo* mediante HPLC y los resultados fueron analizados con la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

6.5.1 El nivel global de metilación del ADN de las gónadas *in vivo* en el Período Sensible a la Temperatura (PST) no difiere al de las gónadas en el Período de Determinación Sexual (PDS), incubadas a TF o TM.

En la Figura 27 se muestra el nivel global de metilación del ADN de las gónadas de embriones en el PDS y en el PST, ambos de TF y TM. Las gónadas de embriones en el PDS son de Et27 de 33 días de incubación a TF y de Et27 de 59 días de incubación a TM. Los del PST son de Et24 de 34 días de incubación a TM y de Et24 de 19 días de incubación a TF. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis encontró que entre algunos de estos 4 grupos no existe una diferencia estadística significativa ($H=2.06$, $gl=3$, $p>0.05$). La prueba de rangos múltiples reportó que:

- No existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el porcentaje de metilación del ADN de las gónadas en el PDS con respecto al que presentan las gónadas en el PST, ambas provenientes de embriones incubados a TF.
- No existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el porcentaje de metilación del ADN de las gónadas en el PDS con respecto al que presentan las gónadas en el PST, ambas provenientes de embriones incubados a TM.
- No existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el nivel global de metilación del ADN de las gónadas de embriones en el PST incubados a TF con respecto al que presentan las gónadas de embriones en el PST incubados a TM.
- No existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el nivel global de metilación del ADN de las gónadas de embriones en el PDS incubados a TF con respecto al que presentan las gónadas de embriones incubados a TM en el PDS.

A pesar de nuestras expectativas, no detectamos diferencias significativas en las gónadas ni en función de la etapa de desarrollo ni en relación a la temperatura de incubación. El resultado resultó sorprendente ya que en las gónadas de *L. olivacea* la expresión de varios genes como: *Sox9*, *Dmrt1* -relevantes en la determinación sexual- y *Dax1*-relevantes en la diferenciación sexual- difieren dependiendo de la etapa de desarrollo entre las gónadas incubadas a TM y TF (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). Por lo cual, dependiendo de la temperatura de incubación y la etapa de desarrollo es posible que existan diferencias específicas en los niveles de metilación de los elementos reguladores de dichos genes que no son posibles de detectar mediante esta técnica.

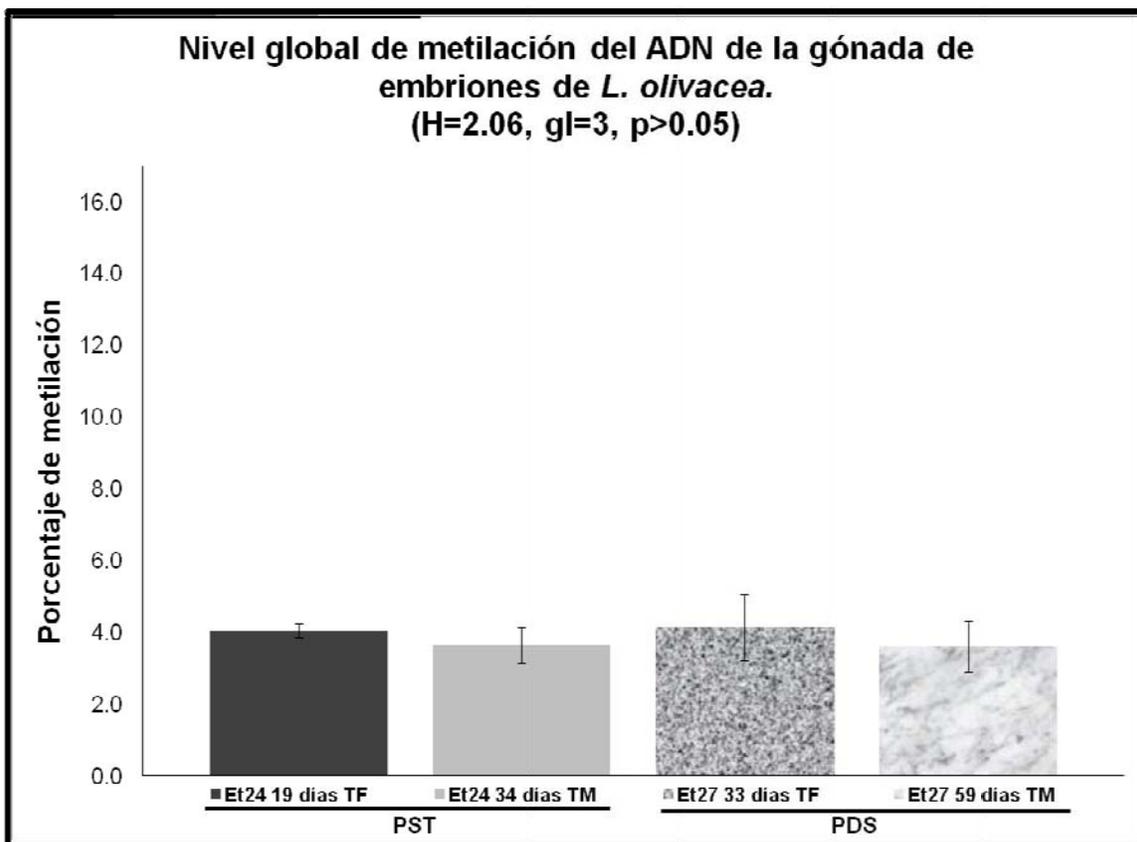


Fig. 27.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de gónadas *in vivo* aisladas de embriones de *L. olivacea* del Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS) incubados a TF y TM.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que no hay una diferencia estadística significativa ($H=2.06$, $gl=3$, $p>0.05$) entre los 4 grupos analizados.

6.6 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN del cerebro de embriones del PI y PDS de *L. olivacea*.

Merchant-Larios *et al.* (1989) han propuesto que el sistema neuroendocrino tiene un papel importante en la determinación sexual en la tortuga *L. olivacea*; debido a que han encontrado que en las gónadas indiferenciadas existen terminales nerviosas que no están presentes en mamíferos. Gutiérrez-Ospina *et al.* (1999) encontraron fibras nerviosas en el parénquima durante el PST. Estas fibras se identificaron claramente en las etapas 24-27, etapas en las que se determina el ovario a TF. Además, reportan que estas fibras se originan de la médula espinal. Por lo tanto, proponen que la médula espinal y las inervaciones que se derivan de ésta participan en dirigir o modular los procesos que determinan y/o diferencian sexual a la gónada de forma dependiente a la temperatura, particularmente en embriones femeninos de *L. olivacea*. Coomber *et al.* (1997) y Salame-Méndez *et al.* (1998) reportaron, respectivamente, que en diferentes regiones del hipotálamo de la lagartija y la tortuga marina *L. olivacea* la temperatura de incubación regula el metabolismo oxidativo y la aromatización de la testosterona (T) regulando así la transformación de T a estradiol (E2), esta regulación es independiente a los niveles circulantes de las hormonas sexuales. En este escenario, la TF puede incrementar la conversión local de testosterona a estrógeno mediante aumentar la concentración y actividad del gen *aromatasa p450* (Desvages *et al.*, 1993; Dorizzi *et al.*, 1994; Lance y Bogart, 1991). Debido a que los estrógenos tienen un efecto feminizante en los embriones en desarrollo (Bull *et al.*, 1998; Dorizzi *et al.*, 1991), el incremento de la producción del estrógeno puede disparar el programa de diferenciación ovárica (Wibbels *et al.*, 1993). A partir de estos datos se ha propuesto que el cerebro actúa como sensor de la temperatura de incubación, de tal forma que ante una TF aumenta la tasa de transformación de T a E2 en el cerebro, de esta manera al elevarse la concentración de E2 se activan los eventos moleculares encargados de activar o regular la determinación sexual femenina (Salame-Méndez *et al.*, 1998). Debido a esto, nosotros esperábamos que “el nivel de metilación del ADN del cerebro *in vivo* del PST incubado a TM difiriera al que presenta el cerebro del mismo periodo incubado a TF. Además de que dicha diferencia se mantuviera o aumentara durante el PDS”. Para poner a prueba esta hipótesis determinamos los niveles globales de metilación del ADN en el cerebro *in vivo* mediante HPLC.

6.6.1 El nivel global de metilación del ADN del cerebro de embriones en el PST aumenta con respecto al del cerebro de embriones en el PDS, incubados tanto a TF como a TM.

En la Figura 28 se muestra el nivel global de metilación del ADN de cerebros de embriones en el PDS y en el PST, ambos de TF y TM. Las gónadas de embriones en el PDS son de Et27 de 33 días de incubación a TF y de Et27 de 59 días de incubación a TM. Los del PST son de Et24 de 34 días de incubación a TM y de Et24 de 19 días de incubación a TF. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis encontró que entre algunos de estos 4 grupos existe una diferencia estadística significativa ($H=22.1$, $gl=3$, $p<0.05$). La prueba de rangos múltiples reportó que:

- El nivel de metilación del ADN del cerebro embrionario en el PDS aumenta significativamente ($p<0.05$) con respecto al que presenta el cerebro en el PST, en embriones incubados tanto a TF como a TM.
- No existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el nivel global de metilación del ADN del cerebro de embriones en el PST incubados a TF con respecto al del cerebro de embriones incubados a TM en el PST.

- No existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre el nivel global de metilación del ADN del cerebro de embriones incubados a TF en el PDS con respecto al que presenta el cerebro de embriones incubados a TM en el PDS.

Tawa *et al* (1990) reportan que los niveles de metilación del cerebro del ratón incrementan paulatinamente conforme avanza su desarrollo. De acuerdo con los presentes resultados, se observa este mismo patrón en el cerebro de *L. olivacea* puesto que los niveles de metilación del ADN del cerebro de Et27 son mayores a los de la Et24. Esto puede atribuirse al hecho de que los niveles de metilación del ADN se incrementan en función de la estabilización de las células diferenciadas.

Estudios previos de nuestro grupo mostraron que existen diferencias significativas en la actividad esteroidogénica durante el desarrollo del cerebro de *L. olivacea* dependiendo de la etapa y la temperatura de incubación (Salame-Méndez *et al.*, 1998). Salame *et al.* (1998) reportan diferentes concentraciones de estradiol en el cerebro posterior de *L. olivacea*. En el cerebro de embriones incubados a TF se reportó una concentración de estradiol de 40 pg/mg de proteína, mientras que en embriones incubados a TM la concentración reportada fue de 5 pg/mg de proteína. Debido a estos resultados, nosotros esperábamos encontrar diferencias entre los niveles de metilación del ADN del cerebro de embriones de la misma etapa incubados a distinta temperatura. Sin embargo, esto no sucedió. Por otro lado, Torres-Maldonado (2001) evaluó el nivel de expresión del mRNA de los genes *Sox9* y *aromatasa p450* en la región anterior y posterior del cerebro de embriones de Et23 a la Et27 incubados a TM y TF. En dicho estudio se reporta que el mensajero del gen *Sox9* está presente en ambas regiones del cerebro de ambas temperaturas y en todas las etapas que evaluaron, por lo cual sugieren que aunque en el cerebro este gen regule su desarrollo no está relacionado con la determinación del sexo de *L. olivacea*. En cuanto a la expresión del gen aromatasa P450 en cerebro anterior y posterior no observaron diferencias entre las dos temperaturas en ninguna de las etapas evaluadas, por lo cual sugieren que la regulación de la expresión de este gen puede darse a nivel post-transcripcional. Nuestros resultados aparentemente coinciden con esto último, sin embargo no podemos afirmarlo tajantemente puesto que la técnica de HPLC que utilizamos no detecta cambios en el nivel de metilación de los elementos reguladores de genes específicos, en este caso aquellos relacionados con la regulación de las vías esteroidogénicas.

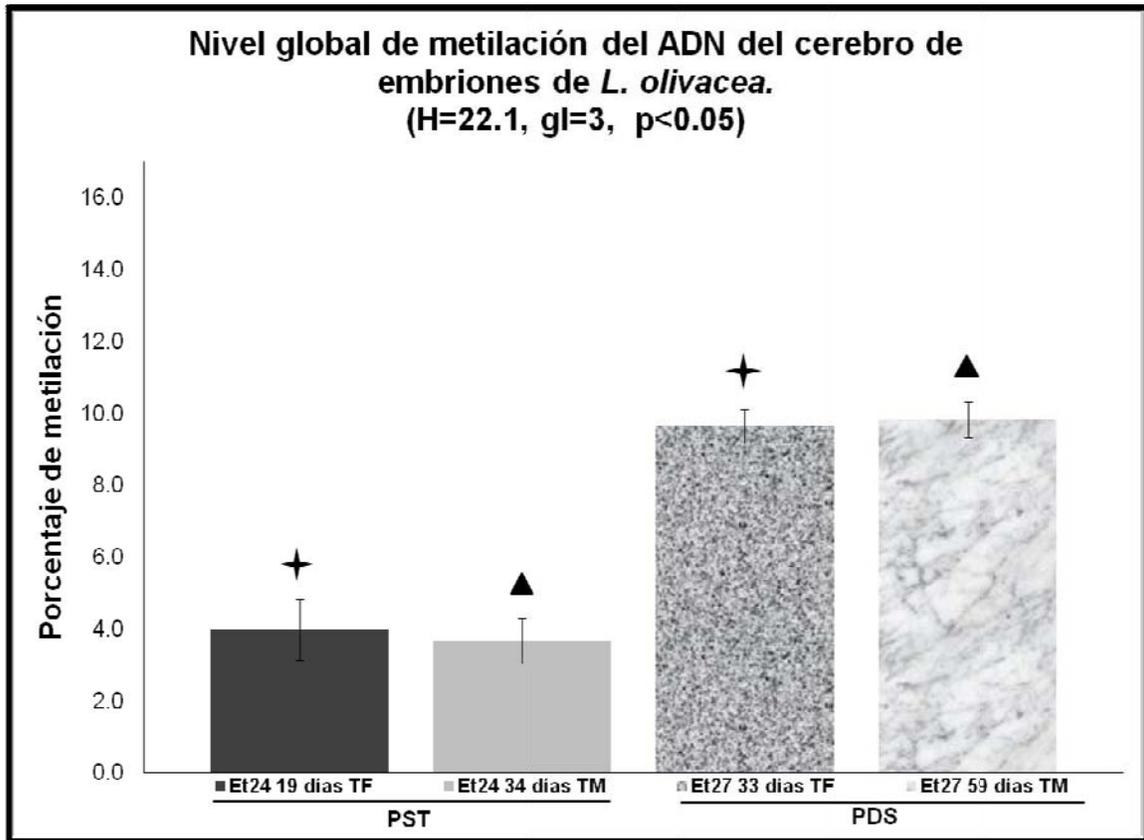


Fig. 28.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de cerebros aislados de embriones de *L. olivacea* en el PST y PDS incubados a TM y TF.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que hay una diferencia estadística significativa ($H=22.1$, $gl=3$, $p<0.05$) entre algunos de los 4 grupos de muestras representados en esta gráfica. Con los símbolos: ✦ y ▲ se señala entre qué grupos, según la prueba de rangos múltiples, existe una diferencia estadísticamente significativa. Los grupos señalados con un mismo símbolo presentan una diferencia significativa entre sí.

6.7 Mediante HPLC se evaluó el efecto de la temperatura sobre la metilación del ADN del mesonefros de embriones en PST y PDS de *L. olivacea*

Buehr *et al.* (1993) y Merchant-Larios *et al.* (1993) han demostrado que en condiciones *in vitro* se requiere la presencia del mesonefros para la formación de los cordones seminíferos de la gónada fetal de ratón. Por lo cual, postulamos que el mesonefros debe tener un papel importante en la determinación sexual por temperatura de la gónada de *L. olivacea*, si esto es cierto esperamos que los niveles globales de metilación del ADN en el mesonefros *in vivo* del PST incubado a TM difiera del incubado a TF, además de que esta diferencia se mantenga o aumente durante el PDS. Para probar esta hipótesis determinamos los niveles globales de metilación del ADN en el mesonefros *in vivo* mediante HPLC.

6.7.1 Los niveles globales de metilación del ADN del mesonefros del PDS a TM aumentan con respecto a los de TF.

En la Figura 29 se muestra el porcentaje de metilación del ADN de mesonefros de embriones en el PDS y en el PST, ambos de TF y TM. Las gónadas de embriones en el PDS son de Et27 de 33 días de incubación a TF y de Et27 de 59 días de incubación a TM. Los del PST son de Et24 de 34 días de incubación a TM y de Et24 de 19 días de incubación a TF. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis encontró que entre algunos de estos 4 grupos existe una diferencia estadística significativa ($H=19.1$, $gl=3$, $p<0.05$). La prueba de rangos múltiples reportó que:

- El nivel de metilación del ADN del mesonefros en el PDS disminuye significativamente ($p<0.05$) con respecto al que presenta el mesonefros en el PST, ambos provenientes de embriones incubados a TF.
- El nivel de metilación del ADN del mesonefros embrionario en el PDS aumenta significativamente ($p<0.05$) con respecto al que presenta el mesonefros en el PST en embriones incubados a TM.
- No existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el nivel global de metilación del ADN del mesonefros de embriones en el PST incubados a TF con respecto al del mesonefros de embriones en el PST incubados a TM.
- El nivel de metilación del ADN del mesonefros embrionario en el PDS incubados a TM aumenta significativamente ($p<0.05$) con respecto al que presenta el mesonefros en el PDS incubados a TF.

Como se describió anteriormente, el nivel de metilación del mesonefros del PDS de Et27 de TM es mayor que el de TF del mismo periodo y etapa, esto parece indicar que en la Et27 las células del mesonefros muestran una gran sensibilidad a la temperatura reflejada en los niveles de metilación del ADN. El significativo incremento en la metilación del mesonefros a TM en la Et27, permite especular sobre un probable rol de las células mesonefricas en la consolidación y diferenciación de los cordones seminíferos de *L. olivacea*. Debido a que generalmente la metilación del ADN se correlaciona con la regulación negativa de la expresión genética (Antequera *et al.*, 1989; Boyes y Bird, 1991) es posible que en el mesonefros de Et27 de TM tenga mayor número de genes regulados negativamente que el mesonefros de Et27 de TF. Como la Et27 corresponde al periodo en que el sexo ya está determinado y la gónada ha iniciado su diferenciación morfológica, podemos suponer que los genes regulados en forma diferencial se encuentran relacionados con la vía de determinación y diferenciación sexual femenina.

Estudios en el ratón demostraron el importante papel del mesonefros para la morfogénesis de los cordones seminíferos en el testículo embrionario (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993). Abundantes vasos sanguíneos, células mesenquimáticas precursoras de células mioides y

de Leydig penetran a la gónada desde la región mesonefrica. Además, Li y Kim (2004) sugieren que el ácido retinoico actúa a través del receptor α del ácido retinoico (RAR α) afectando negativamente la diferenciación de las células de Sertoli, la sobrevivencia de los gonadocitos y bloquea la migración de las células mesonefricas, lo cual ocasiona a la inhibición de la diferenciación de las gónadas XY de rata. Por lo tanto, podríamos especular que algunos genes cuya expresión se regula positivamente mediante la metilación del ADN en el mesonefros de Et27 de TF son aquellos que se activan ante la presencia del ácido retinoico y son responsables de afectar negativamente la diferenciación de las células de Sertoli y bloquear la migración de las células mesonefricas. Sin embargo, debido a que la técnica de HPLC empleada no permite detectar diferencias en elementos reguladores de genes específicos, queda por investigarse el posible mecanismo molecular por medio del cual el mesonefros pudiera participar en la determinación y/o diferenciación de la gónada.

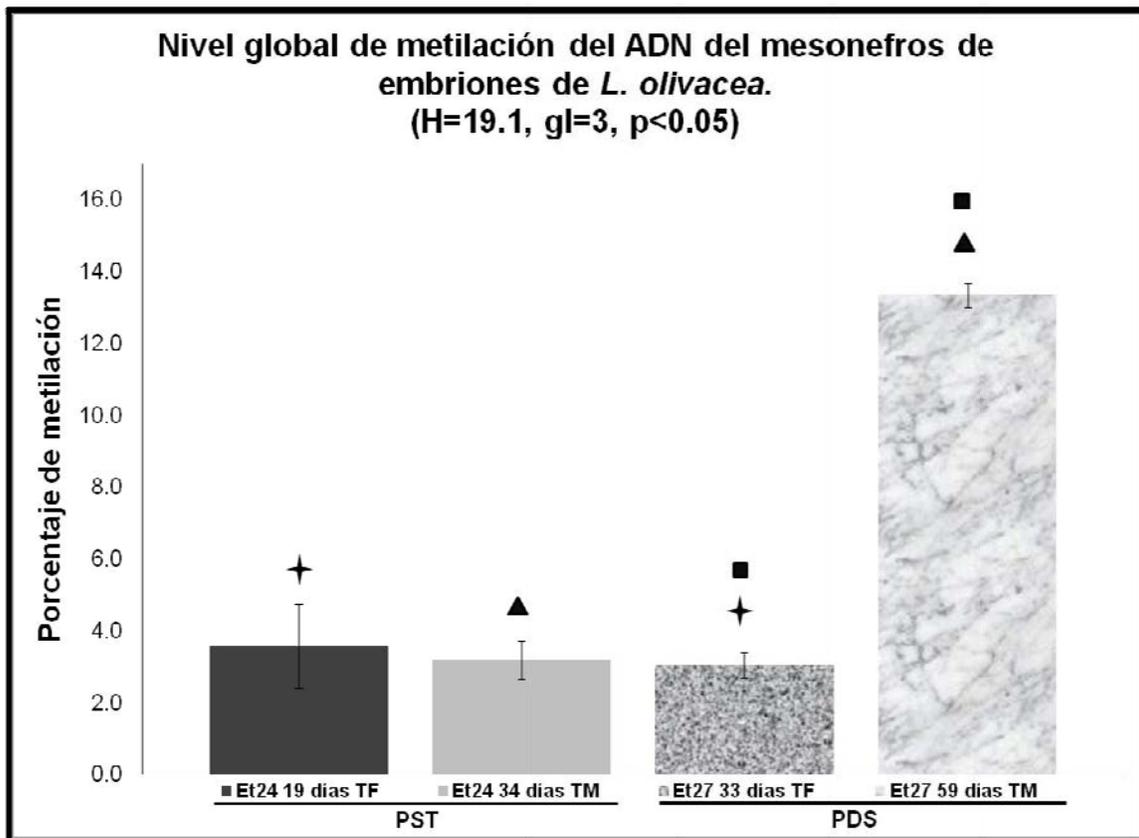


Fig. 29.- Gráfica en la que se representa el porcentaje de metilación del ADN de mesonefros aislados de embriones de *L. olivacea* del PST y PDS incubados a TM y TF.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis muestra que hay una diferencia estadística significativa ($H=19.1$, $gl=3$, $p<0.05$) entre algunos de los 4 grupos de muestras representados en esta gráfica. Con los símbolos: \star , \blacksquare y \blacktriangle se señala entre qué grupos, según la prueba de rangos múltiples, existe una diferencia estadísticamente significativa. Los grupos señalados con un mismo símbolo presentan una diferencia significativa entre sí.

6.8 En *Lepidochelys olivacea* el patrón del nivel global de metilación difiere dependiendo del órgano y etapa de desarrollo.

Las figuras 30 y 31 muestran que los niveles globales de metilación en los embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* difieren dependiendo del órgano analizado y de la etapa de desarrollo. Los niveles globales de metilación encontrados en los tres órganos analizados muestran patrones diferentes. En el cerebro el nivel global de metilación aumenta del PST al PDS tanto a TF como a TM. En el mesonefros el nivel global de metilación disminuye del PST al PDS a TF, mientras que a TM aumenta del PST al PDS. Sin embargo, en la gónada *in vivo* el nivel global de metilación no cambia del PST al PDS tanto a TF como a TM.

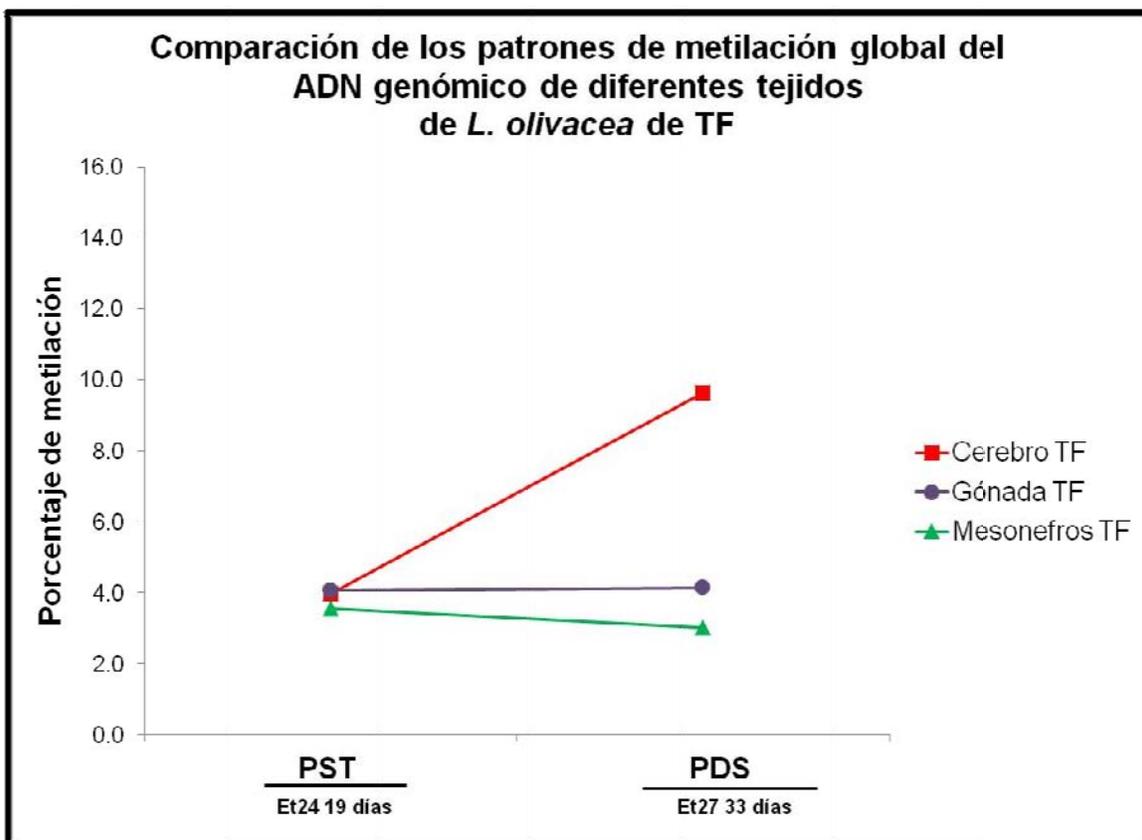


Fig. 30.- Comparación de los patrones de metilación del ADN del cerebro, gónada y mesonefros en el Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS) incubados a TF.

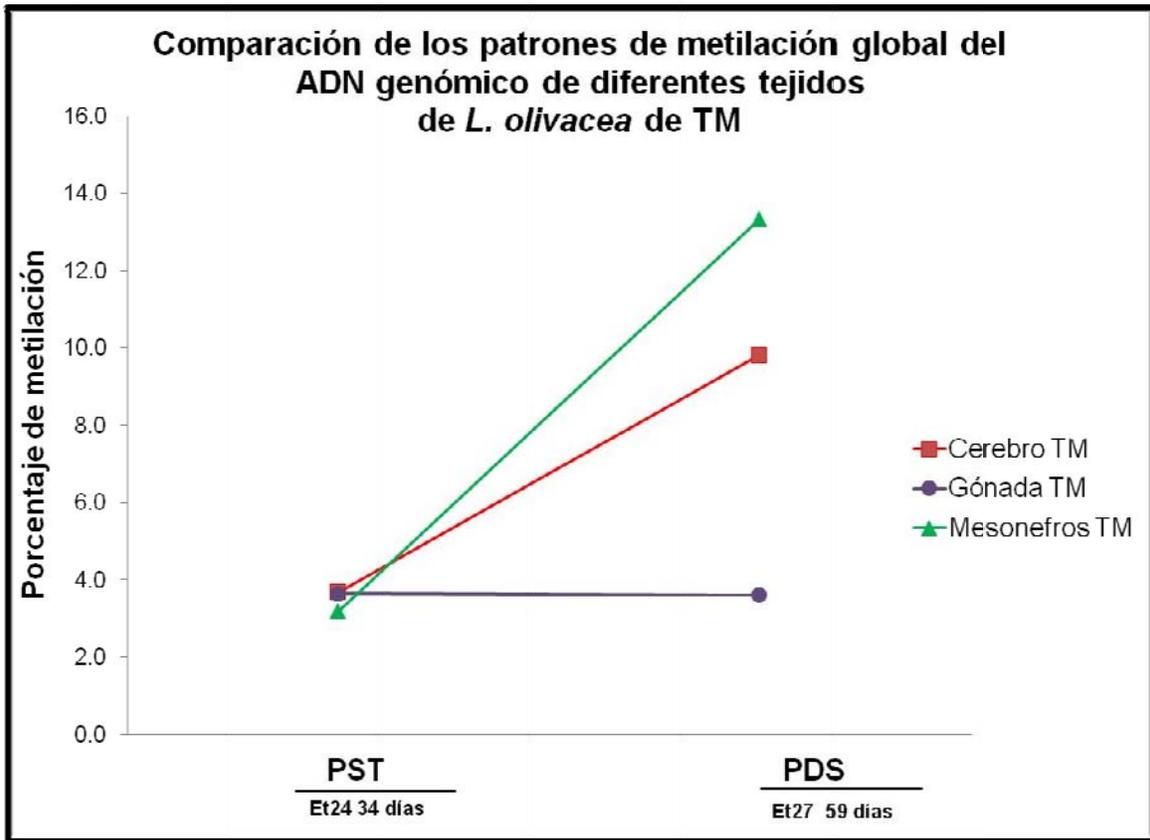


Fig. 31.- Comparación de los patrones de metilación del ADN del cerebro, gónada y mesonefros en el Periodo Sensible a la Temperatura (PST) y Periodo de Determinación Sexual (PDS) incubados a TM.

7. Discusión

Los niveles globales de metilación del ADN son variables entre los diferentes grupos de vertebrados. Utilizando HPLC, Jabbari *et al.* (1997) determinaron los niveles de 5-metilcitosina (5^mC) en el ADN en un extenso número de diversos vertebrados. Los autores reportaron que existe una evidente correlación evolutiva entre peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. El porcentaje de metilación es mayor en peces y mamíferos y menor en aves y mamíferos. Los reptiles aparecen como el grupo más heterogéneo de vertebrados cubriendo un amplio rango entre los vertebrados con mayor y menor nivel de metilación. Varriale y Bernardi (2006) encontraron que las serpientes y lagartijas poseen niveles de metilación cercanas a los peces en tanto que tortugas y cocodrilos se aproximan a los mamíferos.

Además de los estudios con fines comparativos desde un punto de vista filogenético, la determinación de los niveles globales de metilación del ADN se han correlacionado con la evolución de la capacidad para regular la temperatura. El hecho que las tortugas marinas posean una temperatura 1 a 3°C superior a la del agua del mar, sugiere que han adquirido una incipiente regulación de su temperatura interna (Mrosovsky y Pritchard, 1971), lo cual las ubica, junto con los cocodrilos, cerca de los vertebrados homeotérmicos (aves y mamíferos).

Aunque Varriale y Bernardi (2006) reportaron que aproximadamente el 0.98% del genoma de *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* (ambas son tortugas marinas) se compone de 5^mC , su estudio fue hecho sobre el ADN extraído de tejidos adultos. Hasta donde sabemos, no existen reportes en la literatura, donde se hayan estudiado los niveles globales de metilación del ADN durante el desarrollo embrionario en ninguna especie de reptil. Nuestros actuales resultados muestran que los niveles globales de metilación en los embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* difieren dependiendo del órgano analizado y de la etapa de desarrollo. Las diferencias encontradas en los tres órganos analizados muestran patrones diferentes, lo cual resultó algo sorprendente considerando el papel atribuido a la metilación del ADN.

Si los niveles de metilación se incrementaran en función de la estabilización de la cromatina en células diferenciadas, era de esperarse un incremento en los niveles en la Et27 comparado con la Et24 en el cerebro, mesonefros y gónadas de *L. olivacea*. Sin embargo, tal expectativa se cumple solamente en el cerebro. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que existen diferencias significativas en la actividad esteroideogénica durante el desarrollo del cerebro de esta especie dependiendo de la etapa y la temperatura de incubación (Salame-Méndez *et al.*, 1998). El haber detectado diferencias entre etapas y no haberlas encontrado en relación con la temperatura de incubación puede tener al menos dos posibles explicaciones: 1) Los elementos reguladores de los genes involucrados en la biotransformación de las hormonas esteroides no dependen de la metilación diferencial del ADN ni de cambios físicos en la cromatina. 2) La técnica de HPLC utilizada no detecta cambios en el nivel de metilación de los elementos reguladores de genes específicos, en este caso aquellos relacionados con la regulación de las vías esteroideogénicas.

Por otro lado, en el caso del mesonefros se encontraron diferencias significativas en los niveles de metilación entre las etapas 24 y 27, el patrón resultó muy diferente al del cerebro. A temperatura masculinizante (TM) el incremento en la metilación del ADN fue dramático en la Et27 comparado con el registrado en la Et24. Aunque el incremento en el cerebro resultó menor, la tendencia fue similar. Sin embargo, en contraste con el cerebro, el mesonefros de los embriones incubados a temperatura feminizante (TF) registraron una disminución en los niveles de metilación en la Et27. Es claro entonces que en la Et27, las células del mesonefros muestran una gran sensibilidad a la temperatura reflejada en los niveles de metilación del ADN. No obstante, comparando los niveles a una y otra temperatura no se encontraron diferencias

significativas en la Et24. Como esta etapa corresponde al período sensible a la temperatura (PST) en el que los embriones responden a un cambio determinando su sexo de acuerdo con la segunda temperatura de incubación (TF a TM= macho ó TM a TF= hembra), quedan aún por estudiar los niveles en las etapas 25 y 26 para conocer si las diferencias detectadas en la Et27 son graduales.

A pesar de nuestras expectativas, no detectamos diferencias significativas en las gónadas ni en función de la etapa de desarrollo ni en relación a la temperatura de incubación. El resultado fue sorprendente ya que en las gónadas de *L. olivacea* la expresión de varios genes como: *Sox9*, *Dmrt1* -relevantes en la determinación sexual- y *Dax1*-revelantes en la diferenciación sexual- difieren dependiendo de la etapa de desarrollo entre las gónadas incubadas a TM y TF (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). Debido a que Torres-Maldonado *et al.* (2002) reportaron que genes como *Sox9* y *Dmrt1* presentan una expresión diferencial macho-específica en gónadas *in vivo* del PDS, esperábamos encontrar diferencias en el nivel de metilación del ADN de las gónadas del PDS incubadas a TF con respecto a las incubadas a TM; pero no detectamos tales diferencias. Estos resultados nos hace suponer que el patrón de expresión de los genes con distribución macho-específica como *Sox9* y *Dmrt1* estudiados por Torres-Maldonado *et al.* (2002) no son regulados por la metilación del ADN. Sin embargo, es posible que la técnica de HPLC del ADN global, empleada en el presente estudio no nos permita detectar diferencias específicas del patrón de metilación de elementos reguladores de genes de la vía de expresión de *Sox9* o genes implicados en la vía de determinación y diferenciación testicular de *L. olivacea*.

Los resultados de las gónadas en cultivo organotípico mostraron diferencias considerables en los niveles de metilación en función con la temperatura de incubación y los inhibidores de remodeladores de la cromatina 5-azaC y TSA. Las diferencias detectadas sugieren que la acción inhibidora afecta los niveles de metilación del ADN dependiendo de la temperatura. No obstante, en contraste con las gónadas *in vivo*, donde los niveles de metilación del ADN no difieren de forma dependiente a la temperatura de incubación ni a la etapa de desarrollo, en las gónadas cultivadas se detectaron diferencias significativas aún en ausencia de los inhibidores de remodeladores de la cromatina. De manera que los resultados *in vitro*, no pueden ser interpretados en términos de su importancia para la determinación sexual por temperatura (DST). El hecho de que con la misma técnica de HPLC no se hayan detectado diferencias significativas en los niveles globales de metilación del ADN en las gónadas *in vivo*, indica que las notables diferencias encontradas en las gónadas *in vitro* parecen ser un efecto ocasionado por las condiciones de cultivo. Debido a que generalmente, la hiper-metilación y la hipo-metilación del ADN se correlacionan con la represión y activación transcripcional de genes, respectivamente (Antequera *et al.*, 1989; Boyes y Bird, 1991). Es posible que en las gónadas *in vitro* incubadas a TF y a TM la expresión de una serie de genes, de los cuales depende la viabilidad de la gónada, se reprima y active, respectivamente. Se ha demostrado que ante condiciones de estrés que ponen en peligro al organismo cambian los niveles de expresión de varios genes, lo cual protege al organismo de tales circunstancias adversas (Gracey *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2007).

No suponemos que entre los genes afectados por los niveles de metilación de las gónadas *in vitro* se encuentren genes relacionados con el control de la proliferación celular, debido a que los resultados de la medición del tamaño de las gónadas *in vitro* del presente estudio muestran que las condiciones de cultivo no afectaron su tamaño en función de la temperatura a pesar de las diferencias detectadas en el nivel global de metilación del ADN. Sin embargo, es posible que el método empleado para medir el tamaño de las gónadas, no distinga entre el número de células y el espacio ocupado por la matriz extracelular en las gónadas cultivadas. Por lo tanto, queda pendiente para una futura investigación conocer si alguno de estos dos procesos involucrados en el crecimiento de las gónadas refleja las diferencias detectadas en el nivel global de metilación del ADN.

En el presente estudio el cultivo de las gónadas se inició en la etapa 24 aisladas de embriones incubados a TF. Moreno-Mendoza *et al.* (1999) reportaron que en esta etapa las gónadas morfológicamente indiferenciadas (ver Figs. 9 y 10 del presente estudio) responden en cultivo a las temperaturas TF ó TM inhibiendo ó manteniendo la expresión de la proteína SOX9, respectivamente, tal como ocurre *in vivo*. Debido a estos resultados, en nuestro estudio esperábamos encontrar diferencias en el nivel de metilación y de distribución del anticuerpo anti-H3K18ac en las gónadas *in vitro* incubadas a TM con respecto a las incubadas a TF. Esperábamos que estas diferencias fueran un indicativo de la regulación epigenética de la expresión macho-específica de genes como *Sox9*. Sin embargo; debido a que las diferencias significativas detectadas entre las gónadas *in vivo* e *in vitro* tanto por efecto de la temperatura como por la 5-azaC parece ser un efecto exagerado por la condición experimental en que se mantuvieron; no podemos relacionar estos resultados con la expresión macho-específica de genes como *Sox9*.

Por otra parte, los efectos de la 5-azaC sobre las gónadas aportan datos interesantes para el modelo *in vitro*. El tamaño de las gónadas se redujo significativamente por la presencia del inhibidor en las gónadas cultivadas a TM con respecto a las gónadas cultivadas control. Esta diferencia también se observó en las gónadas cultivadas con 5-azaC cuando las gónadas fueron cultivadas en TF. Por lo tanto, concluimos que la 5-azaC afecta el tamaño de las gónadas en cultivo de manera independiente a la temperatura de incubación. Asimismo, el patrón de distribución del anticuerpo anti-H3K18ac difiere entre las células de la corteza y la médula de la gónada. Las células de la corteza mostraron una distribución compacta y una mayor intensidad en la señal fluorescente del anticuerpo anti-H3K18ac en tanto que las medulares tienen una distribución granular con una señal de menor intensidad. De manera sorprendente, las diferencias regionales no se vieron modificadas por la temperatura a pesar del efecto “termo-dependiente” del inhibidor sobre el tamaño de las gónadas cultivadas.

El efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre las desacetilasas de histonas (HDAC) resultó altamente tóxico en las gónadas analizadas después de 14 días de cultivo. Se encontró una muerte masiva en las células medulares a las dos temperaturas y con las dos dosis utilizadas. No obstante, al no detectarse diferencias significativas en el tamaño de las gónadas en presencia y ausencia del inhibidor, la muerte celular detectada a los 14 días parece ser un efecto acumulativo que no afectó el crecimiento inicial de las gónadas en cultivo. Queda por establecerse entonces si el efecto de la TSA sobre la expresión de genes clave para el desarrollo de la gónada puede estudiarse empleando dosis más bajas en cultivos de menor duración.

El presente estudio aporta resultados preliminares interesantes para empezar a entender el papel epigenético de la metilación del genoma en un organismo con determinación sexual por temperatura. Hasta nuestro conocimiento, este estudio es el primero en analizar los niveles globales de metilación del ADN en diferentes órganos durante el desarrollo de un reptil. Los resultados revelan importantes diferencias entre el cerebro, mesonefros y gónadas, las cuales deberán ser tomadas en consideración para realizar estudios comparativos encaminados a establecer correlaciones filogenéticas basadas en la evolución epigenética.

Por otra parte, el estudio cultivando las gónadas de *L. olivacea* revela la gran susceptibilidad de los mecanismos epigenéticos a las condiciones de manipulación experimental. En comparación con las gónadas *in vivo*, las gónadas cultivadas 14 días a TM ó TF disminuyen ó incrementan, respectivamente, sus niveles de metilación. El no haber encontrado diferencias a una u otra temperatura en las gónadas *in vivo*, sugiere un efecto “protector” del organismo para evitar cambios drásticos en los niveles de metilación de las gónadas.

El dramático efecto de la temperatura sobre el mesonefros encontrado en el presente estudio, coloca a este órgano como el principal “sensor” de temperatura entre los tres órganos estudiados. Estudios en el ratón demostraron el importante papel del mesonefros para la

morfogénesis de los cordones seminíferos en el testículo embrionario (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993). Abundantes vasos sanguíneos, células mesenquimáticas precursoras de células mioideas y de Leydig penetran a la gónada desde la región mesoneférica. El significativo incremento en la metilación del mesonefros a TM en la Et27, permite especular sobre un probable rol de las células mesoneféricas en la consolidación y diferenciación de los cordones seminíferos de *L. olivacea*. Li y Kim (2004) sugieren que el ácido retinoico actúa a través del RAR α afectando negativamente la diferenciación de las células de Sertoli, la sobrevivencia de los gonadocitos y bloquea la migración de las células mesoneféricas, lo cual lleva a la inhibición de la diferenciación de las gónadas XY de rata. Debido a que generalmente la metilación del ADN se correlaciona con la regulación negativa de la expresión genética (Antequera *et al.*, 1989; Boyes y Bird, 1991) se puede especular que el mesonefros de Et27 de TM tiene mayor cantidad de genes regulados negativamente que el mesonefros de Et27 de TF. Por lo tanto, podríamos suponer que algunos genes cuya expresión se regula positivamente mediante la metilación del ADN en el mesonefros de Et27 de TF son aquellos que se activan ante la presencia del ácido retinoico y afectan negativamente la diferenciación de las células de Sertoli y bloquean la migración de las células mesoneféricas. Sin embargo, debido a que la técnica de HPLC empleada no permite detectar diferencias en elementos reguladores de genes específicos, queda por investigarse el posible mecanismo molecular por medio del cual el mesonefros pudiera participar en la determinación y/o diferenciación de la gónada.

8. Conclusiones

Los experimentos en las gónadas cultivadas muestran resultados complejos respecto al efecto de los inhibidores de los remodeladores de la cromatina sobre la metilación del ADN ó la acetilación de histonas. La 5-azaC inhibe el crecimiento y afecta el patrón de distribución del anticuerpo anti-H3K18ac de manera independiente a la temperatura de incubación. Este resultado sugiere que la disminución del nivel de metilación del ADN afecta indirectamente el patrón de distribución *in situ* de la modificación post-traducciona en la histona H3K18ac. Además, el diferente efecto detectado entre la corteza y la medula parecen indicar que existen diferencias en la organización de la cromatina de las células de las dos regiones. Sin embargo, no se encontraron diferencias regionales ocasionadas por la temperatura de incubación. Por otro lado, la severa toxicidad de la TSA descartó la posibilidad de conocer su efecto sobre la cromatina de las gónadas en cultivo.

Los resultados del HPLC muestran que los niveles de metilación del cerebro aumentan en función al avance de su desarrollo pero es independiente de la temperatura. El mesonefros en cambio, mostró diferencias tanto dependientes de la edad como de la temperatura de incubación del embrión. Sin embargo, la técnica de HPLC no detectó diferencias significativas en los niveles globales de metilación de las gónadas *in vivo* en los dos parámetros estudiados. Las diferencias significativas detectadas entre las gónadas aisladas y cultivadas tanto por efecto de la temperatura como por la 5-azaC parecen ser un efecto exagerado por la condición experimental en que se mantuvieron.

El mesonefros juega un papel importante en la diferenciación de las gónadas. El presente hallazgo que muestra la notable influencia de la temperatura sobre sus niveles de metilación, hace razonable postular al mesonefros como el sensor que media el efecto de la temperatura en la determinación y/o diferenciación sexual de *L. olivacea*.

9. Perspectivas

En este trabajo se aportan evidencias de que la remodelación de la cromatina tiene un papel importante en la determinación sexual por temperatura de *Lepidochelys olivacea*. Incluso, proponemos que el mesonefros es el órgano sensor de la temperatura de incubación que media el efecto de la temperatura sobre la determinación y/o diferenciación sexual. Suponemos que la temperatura de incubación influye directa o indirectamente en la remodelación de la estructura de la cromatina de las células mesonefricas durante la determinación y/o diferenciación sexual de *L. olivacea*. Ésto, a su vez, regula la expresión diferencial de genes que participan en la diferenciación de las células de Sertoli y la migración de las células mesonefricas hacia la gónada. Sin embargo, para probar esta hipótesis se propone:

- Determinar los niveles globales de metilación del ADN de gónadas, cerebro y mesonefros del PST y PDS incubadas a TM y TF, a fin de corroborar nuestros datos. Para lo cual sugerimos realizar digestiones de ADN con las enzimas de restricción HpaII (sensible a la metilación) y MspI según la técnica descrita por Wahlfors *et al.* (1992).

- Determinar los patrones de distribución de modificaciones post-traduccionales de las histonas de las células gonadales, cerebrales y del mesonefros de *L. olivacea* del PST y PDS incubadas a TM y TF. Para esto se propone utilizar como marcadores modificaciones postraduccionales de las histonas H3K4me2 y H3K9me3, las cuales en otros organismos se sabe que favorecen la formación de eucromatina y heterocromatina, respectivamente. Además, se sugiere determinar la relación de los patrones de distribución de dichas modificaciones post-traduccionales de histonas con la metilación del ADN y la temperatura de incubación.

- Debido a que la técnica de HPLC que utilizamos no permite detectar cambios en los niveles de metilación de secuencias reguladoras de genes específicos, aún queda mucho por hacer. Entre otras cosas, es necesario establecer si existen cambios en los niveles de metilación de las secuencias reguladoras de genes como: *Sox9*, *Dmrt1*, *Wnt1*, *Sfl* (Díaz-Hernández *et al.*, 2008) y *Dax1* (en la gónada) y *aromatasa P450* (en el cerebro). Así mismo, es necesario establecer si la expresión de dichos genes está asociada con cambios en los patrones de distribución de específicas modificaciones post-traduccionales de histonas.

- En el mesonefros de *L. olivacea* es necesario establecer el posible mecanismo molecular por medio del cual este órgano pudiera participar en la determinación y/o diferenciación de la gónada. Para esto sugerimos investigar el efecto del ácido retinoico sobre la migración de las células mesonefricas a la gónada de *L. olivacea*. Además, de investigar qué genes participan en regular la migración y diferenciación de las células mesonefricas en la gónada de *L. olivacea*. Así mismo, determinar si la temperatura regula la expresión de dichos genes a través de patrones específicos del nivel global de metilación en sus elementos reguladores y modificaciones post-traduccionales de histonas.

- Determinar cuáles ADNMTs y HDAC, de las que se han identificado en otros vertebrados, están conservadas en *L. olivacea* y establecer si se distribuyen en cerebro, mesonefros y gónada de forma dependiente a la temperatura de incubación y la etapa de desarrollo.

- Con el objeto de establecer si las ADNMTs y HDAC remodelan la cromatina de forma dependiente a la temperatura de incubación y la etapa de desarrollo en las células gonadales, cerebrales y del mesonefros de *L. olivacea*, tratar a embriones de *L. olivacea* con inhibidores de remodeladores de cromatina como TSA y 5-azaC para determinar sus efectos en dichos órganos.

Finalmente, como hemos mencionado la tortuga *Lepidochelys olivacea* conocida comúnmente como tortuga golfina es un excelente modelo para estudiar el desarrollo gonadal

porque se puede modificar la temperatura de incubación y saber de antemano cual será el sexo del embrión. Este trabajo aporta nuevos conocimientos sobre la termodeterminación sexual de la tortuga marina *L. olivacea*. Esta información no solo permite conocer mejor la determinación sexual de una de las especies más abundantes del Pacífico Oriental, lo cual ayuda a optimizar los trabajos de conservación que se llevan a cabo en diferentes lugares del país y el mundo. Sino que también, permite consolidar a esta especie como modelo biológico para el estudio del desarrollo embrionario, determinación y diferenciación sexual. Esto último da un motivo más para impulsar los programas de conservación de esta especie.

Literatura Citada

- Agalioti T, Chen G and D Thanos (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*. Vol. 111(3): 381-392.
- Antequera F; Macleod D and AP Bird (1989). Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei. *Cell*. Vol. 58(3): 509-517.
- Antequera F and A Bird (1993_a). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 90(24): 11995-11999.
- Antequera F and A. Bird (1993_b). CpG islands. *EXS*. Vol. 64: 169-185.
- Archer SY, Meng S, Shei A and RA Hodin (1998). p21^{WAF-1} is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 95(12): 6791-6796.
- Arney KL, Erhardt S, Drewell RA and MA Surani (2001). Epigenetic reprogramming of the genome: From the germ line to the embryo and back again. *Int. J. Dev. Biol.* Vol. 45: 533-540.
- Bachman KE; Rountree MR and SB Baylin (2001). Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* Vol. 276(34): 32282-32287.
- Bacolla A, Pradhan S, Larson JE, Roberts RJ and RD Wells (2001). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CCG.CCG sequence. *J. Biol. Chem.* Vol. 276(21): 18605-18613.
- Barr ML and EG Bertram (1949). A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*. Vol. 163: 676.
- Barlow DP, Stoger BG, Herrmann G, Saito K and N Schweifer (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Time locus. *Nature*. Vol.349: 84-87.
- Bartova E; Pachernik J; Harnicarova A; Kovarik A; Kovarikova M; Hofmanova J; Skalnikova M; Kozubek M and S Kozubek (2005). Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J. Cell. Sci.* Vol. 118(21): 5035-5046.
- Bartolomei MS and SM Tilghman (1997). Genomic imprinting in mammals. *Annu. Rev. Genet.* Vol. 31: 393-525.
- Baylin SB (1997). Tying it together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science* Vol. 277(5334): 1948-1949.
- Bell AC and G Felsenfeld (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* Vol. 405(6785): 482-485.
- Bernardi G and G Bernardi (1986). Compositional constraints and genome evolution. *J. Mol. Evol.* Vol. 24(1-2): 1-11.
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN and M Fellous (1990). Genetic evidence equating SRY and testis-determining factor. *Nature*. Vol. 348: 448-450.
- Bestor T, Laudano A, Mattaliano R and V Ingram (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol.* Vol. 203(4): 971-983.

- Bestor TH and Verdine GL (1994). DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol.* Vol. 6(3): 380-389.
- Bird AP (1978). Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. *J Mol Biol.* Vol. 118: 49-60
- Bird A (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell.* Vol. 70(1): 5-8.
- Bird AP. (1995). Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trend Genet* Vol. 11(3): 94-100.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* Vol. 16(1): 6-21.
- Biron VL, McManus K J, Hu N, Hendzel MJ and DA Underhill (2004). Distinct dynamics and distribution of histone methyl-lysine derivatives in mouse development. *Dev. Biol.* Vol. 276: 337-351.
- Boivin AJ, Momparler LF, Hurtubise A and RL Momparler (2002). Antineoplastic action of 5-aza-2(-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* Vol. 13(8): 869-874.
- Bolden AH, Nalin CM, Ward CA, Poonian MS and A Weissbach (1986). Primary DNA sequence determines sites of maintenance and *de novo* methylation by mammalian DNA methyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 6(4): 1135-1140.
- Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C, Willard HF, Avner P and A Ballabio (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature.* Vol. 351: 325-329.
- Bouchain G, Leit S, Frechette S, Khalil EA, Lavoie R, Moradei O, Woo SH, Fournel M, Yan PT, Kalita A, Trachy-Bourget MC, Beaulieu C, Li Z, Robert MF, MacLeod AR, Besterman JM and D Delorme (2003). Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem.* Vol. 46(5): 820-830.
- Boyes J and A Bird (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell.* Vol. 64: 1123-1134.
- Boyes J and A Bird (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* Vol. 11(1): 327-333.
- Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S and S Rastan (1992). The product of the mouse *Xist* gene is a 15-kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell.* Vol. 71: 515-526.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R and HF Willard (1991_a). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature.* Vol. 349: 38-44.
- Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW and HF Willard (1991_b). Localization of the X chromosome inactivation center on the human X chromosome. *Nature.* Vol. 349: 82-85.
- Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing J, Lawrence J and HF Willard (1992). The human *XIST* gene: Analysis of a 17-kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell.* Vol. 71: 527-542

- Brown CJ and HF Willard (1994). The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature*. Vol. 368: 154-156.
- Buehr M Gu S and A McLaren (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*. Vol. 117(1): 273-81.
- Bull JJ (1980). Sex Determination in Reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. Vol. 55: 3-21.
- Bull JJ, Wibbels T and D Crews (1990). Sex determining potencies vary among female incubation temperatures in a turtle. *J Exp Zool*. Vol. 256: 339-341.
- Bull JJ, Gutzke WHN and D. Crews (1998). Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 70: 425-428.
- Burtis K and B Baker B (1989). *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*. Vol. 56: 997-1010.
- Burns LJ, Glauber JG and GD Ginder (1988). Butyrate induces selective transcriptional activation of a hypomethylated embryonic globin gene in adult erythroid cells. *Blood*. Vol. 72(5): 1536-1542.
- Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA and VM Richon (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 99(18): 11700-11705.
- Cedar H (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell*. Vol. 53 (1): 3-4.
- Chaillet JR, Vogt TF, Beier DR and P Leder (1991). Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. *Cell*. Vol. 66: 77-83.
- Coomber P, Crews D and F Gonzalez-Lima (1997). Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of the brain nuclei in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *J Comp Neurol*. Vol. 380: 409-421.
- Corvetta A, Della-Bitta R, Luchetti M and G Pomponio (1991). 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases. *J Chromatogr*. Vol. 566(2): 481-491.
- Crews D, Bergeron JM, Bull JJ, Flores D, Tousignant A, Skipper JK and T Wibbels (1994). Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev Gen*. Vol. 15: 297-312.
- Crews D, Cantú AR, Bergeron JM and T Rhen (1995). The relative effectiveness of androstenedione, testosterone, and estrone precursors to estradiol, in sex reversal in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 100: 119-127.
- Crews D (1996). Temperature dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zoll Sci*. Vol. 13: 1-13.
- Cross SH and AP Bird (1995). CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*. Vol. 5(3): 309-314.
- Cross SH, Meehan RR, Nan X and A Bird (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet*. Vol. 16(3): 256-259.
- Curtin ML (2002). Current patent status of histone deacetylase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutics Patents*. Vol. 12(9): 1375-1384.

- Dasari V K, Deng D, Perinchery G, Yeh, CC and R Dahiya (2002). DNA Methylation Regulates the Expression of Y Chromosome specific Genes in Prostate Cancer. *The Journal of Urology*. Vol. 167(1): 335-338.
- DeChiara TM, Robertson EJ and A Efstratiadis (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. Vol. 64: 894-859.
- De Ruijter AJ, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S and AB Van Kuilenburg (2003). Histone deacetylases: characterisation of the classical HDAC family. *Biochem J*. Vol. 370(3): 737-749.
- Desvages G, Girondot M and C Pieau (1993). Sensitive stages for effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermodochelys coriacea*. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 92: 54-61.
- Díaz-Hernández V, León-del-Río A, Zamora M and Merchant-Larios H (2008). Expression profiles of SRY and Sox9 in rabbit gonads: the classical model of mammalian sex differentiation. *Sex.Dev*. Vol. 2(3): 152-166.
- Doerksen T and JM Trasler (1996). Developmental Exposure of Male Germ Cells to 5-Azacytidine Results in Abnormal Preimplantation Development in Rats. *Biology of Reproduction*. Vol. 55(5): 1155-1162.
- Dorizzi M, Mignot T-M, Guichard A, Desvages G and C Pieau (1991). Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation*. Vol. 47: 9-17.
- Dorizzi M, Richard-Mercier N, Desvages G, Girondot M and C Pieau (1994). Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*. Vol. 58: 1-8.
- Driscoll DJ and BR Migeon (1990). Sex difference in methylation of single-copy genes in human meiotic germ cells: Implications for X chromosome inactivation, parental imprinting, and the origin of PGC mutations. *Somat. Cell. Mol. Genet*. Vol. 16: 267-268.
- Erdman S and K Burtis (1993). The *Drosophila* double sex proteins share a novel zinc-finger-related DNA-binding domain. *EMBO J*. Vol. 12: 527-535.
- Felsenfeld G and M Groudine (2003). Controlling the double helix. *Nature*. Vol. 421(6921): 448-453.
- Ferguson-Smith AC and AM Surani (2001). Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*. Vol. 293: 1086-1089.
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R and NP Pavletich (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. Vol. 401(6749): 188-193.
- Francis NJ and RE Kingston (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. Vol. 2(6): 409-421.
- Frey RR, Wada CK, Garland RB, Curtin ML, Michaelides MR, Li J, Pease LJ, Glaser KB, Marcotte PA, Bouska JJ, Murphy SS and SK Davidsen (2002). Trifluoromethyl ketones as inhibitors of histone deacetylase. *Bioorg Med Chem Lett*. Vol. 12(23):3443-3447.
- Fuks F; Hurd PJ; Wolf D; Nan X; Bird AP and T Kouzarides (2003_a). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem*. Vol. 278(6): 4035-4040.
- Fuks F; Hurd PJ; Deplus R and T Kouzarides (2003_b). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*. Vol. 31(9): 2305-2312.

- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M and S Horinouchi (2001). Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 98(1): 87-92.
- Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M and S Horinouchi (2002). FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res*. Vol. 62(17): 4916-4921.
- Gabbara S and AS Bhagwat (1995). The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5-)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor. *Biochem J*. Vol. 307(1): 87-92.
- Gilbert J-M, Peronnet F and C Schlötterer (2007). Phenotypic Plasticity in *Drosophila* Pigmentation Caused by Temperature Sensitivity of a Chromatin Regulator Network. *PLoS Genetics*. Vol. 3(2): 0266-0280.
- Ginder GD and JD McGhee (1981). DNA Methylation in the Chicken Adult β -Globin Gene: A Relationship with Gene Expression: Organization and Expression of Globin Genes. New York, NY, Liss. 191pp.
- Ginder GD, Whitters MJ and JK Pohlman (1984). Activation of a chicken embryonic globin gene in adult erythroid cells by 5-azacytidine and sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 81(13): 3954-3958.
- Goodfellow PN and Camerino G (1999). "DAX-1, an 'antitestis' gene." *Cell. Mol. Life Sci*. Vol. 55(6-7): 857-63.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S and S Khochbin (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem*. Vol. 271(17): 3459-3469.
- Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J, Brass A and AR Cossins AR (2004). Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. Vol. 101(48): 16970-16975.
- Grønbaek K, Hother C and PA Jones. (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. Vol. 115: 1039-1059.
- Grosschedl R, Giese K and J Pagel (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*. Vol.10: 94-100.
- Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D and SL Schreiber (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the Sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem*. Vol. 276(42): 38837-38843.
- Grozinger CM and SL Schreiber (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol*. Vol. 9(1): 3-16.
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H and A Razin (1981). Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett*. Vol. 124(1): 67-71.
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM and SM Tilghman (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature*. Vol. 405(6785): 486-489.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K and SJ Elledge (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. Vol. 75(4): 805-816
- Hay CW and EP Candido (1983). Histone deacetylase. Association with a nuclease resistant, high molecular weight fraction of HeLa cell chromatin. *J. Biol. Chem*. Vol. 258(6): 3726-3734.

- Heard EC, Rougeulle D, Arnaud P, Avner CD, Allis and DL Spector (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*. Vol. 107: 727-738.
- Hensel H (1973). Neural processes in thermoregulation. *Physiol Rev*. Vol. 53: 948-1017.
- Hitchler MJ and FE Domann (2007). An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 43(7): 1023-1036.
- Holliday R and JE Pugh (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. Vol. 187(4173): 226-232.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN and J Bartley (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet*. Vol. 87: 349–53.
- Issa JP (2000). CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. Vol. 249: 101-118.
- Ito N, Sawa H, Nagane M, Noguchi A, Hara M and I Saito (2001). Inhibitory effects of sodium butyrate on proliferation and invasiveness of human glioma cells. *Neurosurgery*. Vol. 49(2): 430-437.
- Jabbari K, Cacciò S, Pais de Barros JP, Desgres J and Bernardi G (1997). Evolutionary changes in CpG and methylation levels in the genome of vertebrates. *Gene* Vol. 205(1-2): 109-118.
- Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ and R Jaenisch (1997). Mutagenicity of 5-aza-2-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. Vol. 94(9): 4681-4685.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X and SE Jacobsen (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* Vol. 416 (6880): 556-560.
- Jaenish R and A Bird (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. Vol. 33: 245-254.
- Jähner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Löhler J, Simon I and R Jaenisch (1982). *De novo* methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature*. Vol. 298(5875): 623-628.
- Jäger RJ, Anvret M, Hall K and G Scherer (1990). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene *SRY*. *Nature*. Vol. 348: 452-454.
- Jenuwein T and CD Allis (2001). Translating the histone code. *Science*. Vol. 293 (5532): 1074-1080.
- Jessen C and ET Mayer (1971). Spinal cord and hypothalamus as core sensors of temperature in the conscious dog: equivalence of responses. *Plügers Arch*. Vol. 324: 189-209.
- Jessen C, Mclean JA, Calvert DT and JD Findlay (1972). Balanced and unbalanced temperature signals generated in spinal cord of the ox. *Am J Physiol*. Vol. 222: 1343-1347.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J and AP Wolffe (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. Vol. 19(2): 187-91.
- Jones P and SB Baylin (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. Vol. 3(6): 415-428.
- Jeppesen P and BM Turner (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*. Vol. 74: 281-289.

- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H and A Razin (1992). Development pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev.* Vol. 6: 705-715.
- Kautiainen TL and PA Jones (1985). DNA methylation in mammalian nuclei. *Biochemistry* Vol. 24(20): 5575-5581.
- Kass SU, Pruss D and AP Wolffe (1997_a). How does DNA methylation repress transcription?. *Trends Genet.* Vol. 13(11): 444-449.
- Kass SU, Landsberger N and AP Wolffe (1997_b). DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol.* Vol. 7(3): 157-165.
- Keith DH, Singersam J and AD Riggs (1986). Active X-chromosome DNA is unmethylated at eight CCGG sites dustered in a guanine-plus-cytosine-rich island at the 5' end of the gene for phosphoglycerate kinase. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 6: 4122-4125.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H and P. Koopman (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* Vol. 122(9): 2813-2822.
- Keshet I, Lieman-Hurwitz J and H Cedar (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell.* Vol. 44(4): 535-543.
- Kettlewell JR, Raymond CS and D Zarkower (2000). Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis.* Vol. 26(3): 174-178.
- Khochbin S, Verdel A, Lemercier C and D Seigneurin-Berny (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev.* Vol.11 (2): 162-166.
- Khorasanizadeh S (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell.* Vol. 116(2): 259-272.
- Klose RJ; Kallin E and MY Zhang (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev., Genet.* Vol.7: 715–727.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P. and R Lovell-Badge (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature.* Vol. 351: 117-121.
- Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM Jr., Lalande M and SA Latt (1989). Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in the parental origin of the deletion. *Am. J. Med. Genet.* Vol. 32: 285-290.
- Krupitza G, Grill S, Harant H, Hulla W, Szekeres T, Huber H and C Dittrich (1996). Genes related to growth and invasiveness are repressed by sodium butyrate in ovarian carcinoma cells. *Br J Cancer.* Vol. 73(4): 433-438
- Laayoun A and SS Smith (1995). Methylation of slipped duplexes, snapbacks and cruciforms by human DNA (cytosine-5) methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* Vol. 23(9): 1584-1589.
- Lachner M; O'Carroll D; Rea S; Mechtler K and T Jenuwein (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* Vol. 410(6824): 116–120.
- Lance VA and MH Bogart (1991). Tamoxifen “sex reverses” alligator embryos at male producing temperature, but is an antiestrogen in female hatchlings. *Experientia.* Vol.47: 263-266.
- Lance VA (1997). Sex determination in reptiles: an update. *Am Zool.* Vol. 37: 504-513.
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T and C Seiser (2002). Essential function of histone

- deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* Vol. 21(11): 2672-2681.
- Lavoie R, Bouchain G, Frechette S, Woo SH, Abou-Khalil E, Leit S, Fournel M, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Beaulieu C, Li Z, Besterman J and D Delorme (2001). Design and synthesis of a novel class of histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* Vol. 11(21): 2847-2850.
 - Li H and KH Kim (2004). Retinoic Acid Inhibits Rat XY Gonad Development by Blocking Mesonephric Cell Migration and Decreasing the Number of Gonocytes. *Biology of Reproduction.* Vol. 70: 687-693
 - Libby PR (1970). Activity of histone deacetylase in rat liver and Novikoff hepatoma. *Biochim Biophys. Acta.* Vol. 213(1): 234-236.
 - Lieb JD, Beck S, Bulyk ML, Farnham P, Hattori N, Henikoff S, Liu XS, Okumura K, Shiota K, Ushijima T and JM Grealley (2006). Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. *Cytogenet Genome Res.* Vol. 114(1): 1-15.
 - Liu K; Wang YF; Cantemir C and MT Muller (2003). Endogenous assays of DNA methyltransferases: evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol.* Vol. 23(8): 2709-2719.
 - Loennechen T, Prytz PS and J Aarbakke (1989). DNA-methylation in HL-60 cells treated with 3-deaza-(+/-)-aristeromycin and 3-deazaadenosine. *Biochem Pharmacol.* Vol. 38(16): 2748-51.
 - López MC1, Olivares M, González CI, Martín F, García-Pérez JL y MC Thomas (1999). Elementos móviles: ¿Ventaja evolutiva o parasitismo molecular?. *Ars Pharmaceutica.* Vol. 40(1): 5-24.
 - Luger K; Mader AW; Richmond RK; Sargent DF and TJ Richmond (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* Vol. 389(6648): 251-260.
 - Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T and WK Kelly (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* Vol. 1(3): 194-202.
 - Marks P, Miller T and VM Richon (2003). Histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology.* Vol. 3(4): 344-351.
 - McArthur M and JO Thomas (1996). A preference of histone H1 for methylated DNA. *EMBO J.* Vol. 15: 1705-1715.
 - McGhee JD and GD Ginder (1979). Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes. *Nature.* Vol. 280(5721): 419-420.
 - McKinsey TA, Zhang CL and EN Olson (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev.* Vol. 11(5): 497-504.
 - Meehan R, Lewis J, Cross S, Nan X, Jeppesen P and A Bird (1992). Transcriptional repression by methylation of CpG. *J Cell Sci Suppl.* Vol. 16: 9-14.
 - Mercer JB and E Simon (1984). A comparison between total body thermosensitivity and local thermosensitivity in mammals and birds. *Pflügers Arch.* Vol. 400: 228- 234.
 - Merchant-Larios H, Popova L and M Reyss-Brion (1984). Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. *Develop. Growth Diff.* Vol. 26: 403-417.
 - Merchant-Larios H, Villalpando-Fierro I and B Centeno-Urruiza (1989). Gonadal Morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs.* Vol. 3: 43-61
 - Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N and M Buehr (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol.* Vol. 37(3): 407-15.

- Merchant-Larios H, Ruiz-Ramírez S, Moreno-Mendoza N and A Marmolejo-Valencia (1997). Correlation among thermosensitive period, estradiol response and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen and Comp Endocrinol.* 197(3): 373-385.
- Merchant-Larios H and N Moreno-Mendoza (1998). Mesonephric Stromal Cells Differentiate into Leydig Cells in the Mouse Fetal Testis. *Experimental Cell Research.* Vol. 244: 230–238
- Merchant-Larios H (2001). Temperature sex determination in reptiles: The third strategy. *J Reprod Dev.* Vol. 47(5): 245-252.
- Mermoud JE, Popova B, Peters AH, Jenuwein T and N Brockdorff (2002). Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr. Biol.* Vol. 12: 247-251.
- Migeon BR and K Jelalian (1977). Evidence for two active X chromosomes in germ cells of female before meiotic entry. *Nature.* Vol. 269: 242-243.
- Monk M., Boubelik M and S Lehnert (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic, and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development.* Vol. 99: 371-382.
- Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD and HH Kazazian Jr (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell.* Vol. 87(5): 917-927.
- Moreno-Mendoza N, Harley VR and H Merchant-Larios (1999). Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* at Male- or Female-Promoting Temperatures. *J Exp Zool.* Vol. 284(6): 705-710.
- Moreno-Mendoza N, Harley VR and H Merchant-Larios H (2001). Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Dev Biol.* Vol. 229(2): 319-26.
- Mrosovsky N and PCH Pritchard (1971). Body temperatures of *Dermochelys coriacea* and other sea turtles. *Copeia.* Vol. 4: 624–631.
- Mizukami T, Fujisawa M, Kanai Y, Kurohmaru M and Y Hayashi (2004). Effects of trichostatin a, a histone deacetylase inhibitor, on mouse gonadal development *in vitro*. *J Reprod Dev.* Vol. 50(2): 227-235.
- Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, Orita T, Yoshino T and Y Okuyama (1997). Butyrate activates the WAF1/Cip1 promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem.* Vol. 272: 22199-22206.
- Nan X, Campoy FJ and A Bird (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* Vol. 88(4): 471-481.
- Nan XS, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN and A Bird. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein Mecp2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* Vol. 393(6683): 386-389.
- Nanda I, Shan Z, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Nothwang HG, Grützner F, Paton IR, Windsor D, Dunn I, Engel W, Staeheli P, Mizuno S, Haaf T and M Schmid (1999). 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet.* Vol. 21: 258-259.
- Neissa JI y C Guerrero (2004). Actualización del código genético al código epigenético: Nuevas estrategias terapéuticas. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* Vol. 52(4).
- Nelson DO, Heath JE and CL Prosser (1984). Evolution of temperature regulatory mechanisms. *Am Zool.* Vol. 24: 791-807.
- Nicholls RD (1998). Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet.* Vol. 14: 194-2000.

- Nishino K, Hattori N; Tanaka S and K Shiota (2004). DNA Methylation-mediated Control of *Sry* Gene Expression in Mouse Gonadal Development. *J Biol Chem.* Vol. 279(21): 22306–22313.
- Noland BJ; Hardin JM and GR Shepherd (1971). Histone acetyltransferase activity in synchronized mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 246 (2): 263–268.
- Norris DP, Patel D, Kay GF, Penny GD, Brockdorff N, Sheardown SA and S Rastan (1994). Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell.* Vol. 77: 41-51.
- Ohno S (1967). In: Sex chromosomes and sex linked chromosomes. Book Review. *Springer Verlag.* Berlin, Heidelberg, New York. 192 pp.
- Ohgane J, Yagi S and K. Shiota (2008). Epigenetics: The DNA Methylation Profile of Tissue-Dependent and Differentially Methylated Regions in Cell. *Placenta.* Vol. 29(1): 29-35.
- Okano M, Xie S and E Li (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* Vol. 19(3): 219–220.
- Okano M, Bell DW, Haber DA and E Li (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* Vol. 99(3): 247–257.
- Orlando V (2003). Polycomb, epigenomes and control of cell identity. *Cell.* Vol. 112: 599-606.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA and PS Klein (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* Vol. 276(39): 36734-36741.
- Pieau C, Mignot T-M, Dorizzi M and A Guichard (1982). Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L.: a preliminary study in embryos, hatchlings, and young as a function of the incubation temperature of eggs. *Gen Comp Endocrinol.* Vol. 47: 392-398.
- Pirrotta V (1998). Polycomb the genome: PcG, TrxG and chromatin silencing. *Cell.* Vol. 93: 333-336.
- Pitchard PC y JA Mortimer (1999). Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies. En Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. KL Eckert, KA Bjorndal, FA Abreu-Grobois y M Donnelly (Editores). UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación No. 4.
- Pritchard P, Bacon P, Berry F, Carr A, Fletemeyer J, Gallagher R, Hopkins S, Lankford R, Márquez RM, Ogren L, Pringle W Jr., Reichart H and R. Witham (1983). Manual of Sea Turtle Research and Conservation Techniques, Second Edition. KA Bjorndal y GH Balazs (Editores), Center for Environmental Education, Washington D.C. 126 pp.
- Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y, Leshkowitz D, Croce CM, and E Canaani (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 92(26): 12160-12164.
- Prakash S, Foster BJ, Meyer M, Wozniak A, Heilbrun LK, Flaherty L, Zalupski M, Radulovic L, Valdivieso M and PM LoRusso (2001). Chronic oral administration of CI-994: a phase 1 study. *Invest New Drugs.* Vol. 19(1): 1-11.
- Racey LA and P Byvoet (1971). Histone acetyltransferase in chromatin. Evidence for in vitro enzymatic transfer of acetate from acetyl-coenzyme A to histones. *Exp. Cell Res.* Vol. 64(2): 366–370.

- Raymond C, Shamu C, Shen M, Seifert K, Hirsch B, Hodgking and D Zarkower (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*. Vol. 391(6668): 691–695.
- Raymond CS, Parker E, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B and D. Zarkower (1999). A region of the human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet*. Vol. 8(6): 989–996.
- Raymond CS, Murphy MW, O’Sullivan MG, Bardwell VJ and D Zarkower (2000). *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*. Vol. 14 (20): 2587–2595.
- Razin A and H. Cedar (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*. Vol. 55(3): 451-458.
- Rea S; Eisenhaber F, O’Carroll D; Strahl BD; Sun ZW; Schmid M; Opravil S; Mechtler K; Ponting CP; Allis CD and T Jenuwein (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. Vol. 406(6796): 593–599.
- Recillas-Targa F y M Escamilla-del Arenal (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. En Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez-Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, Vol. XXVIII: 173-201. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México.
- Rhen TR and JW Lang (1994). Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: manipulation of the embryonic sex steroid environment. *Gen Com Endocrinol*. Vol. 96: 243-254.
- Richards EJ and SC Elgin (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*. Vol. 108 (4):489-500.
- Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA and PA Marks (1998). A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 95(6): 3003-3007.
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA and PA Marks (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 97(18): 10014-10019.
- Riggs AD (1975). X inactivation, differentiation, and DNAmethylation. *Cytogenet Cell Genet*. Vol. 14(1): 9-25.
- Roberts CWM and SH Orkin (2004). The SWI/SNF complex-chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*. Vol. 4: 133-142.
- Rodemer ES, Ihmer A and H Wartenberg (1986). Gonadal development of the chick embryo following microsurgically caused agenesis of the mesonephros and using interspecific quail-chick chimaeras. *J. Embryol. Exp. Morph*. Vol. 98: 269-285.
- Rogione F, Crinite V and V Della-Pietra (2001). Genes modulated by histone -acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett*. Vol. 499(3): 199-204.
- Rountree MR and EU Selker (1997). DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Dev*. 11(18): 2383 - 2395.
- Russo U, Martienssen R and AD Riggs (1997). Epigenetics mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 692pp.
- Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T and O Nakanishi (1999). A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 96 (8): 4592-4597.

- Salame-Méndez A, Herrera-Muñoz J, Moreno-Mendoza N and H Merchant-Larios (1998). Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J Exp Zool*. Vol. 280(4): 304-313.
- Sambucetti LC, Fischer DD, Zabudoff S, Kwon PO, Chamberlin H, Trogani N, Xu H and D Cohen (1999). Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem*. Vol. 274(49): 34940-34947.
- Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM and J Rossant (1987). Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev*. Vol. 1: 1039-1046.
- Satinoff E (1978). Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science*. Vol. 201: 16-22.
- Sawa H, Murakami H, Oshima Y, Sugino T, Nakajyo T, Kisanuki T, Tamura Y, Satone A, Ide W, Hashimoto I and H Kamada (2001). Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol*. Vol. 18: 109-114.
- Schmid CW. (1996) Alu: Structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. Vol. 53: 283-319.
- Sheardown SA, Duthie SM, Johnston CM, Newall AE, Formstone EJ, Arkell RM, Nesterova TB, Alghisi GC, Rastan S, Brockdorff N (1997). Stabilization of Xist RNA mediates initiation of X chromosome inactivation. *Cell*. Vol. 91: 99–107.
- Shen M and J Hodgkin (1988). *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell*. Vol. 54: 1019-1031.
- Shen JC, Rideout WM and PA Jones (1994). The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*. Vol. 22(6): 972-976.
- Shoemaker C, Ramsey M, Queen J and D Crews (2007). Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the Gonad of a Species with Temperature-Dependent Sex Determination. *Dev Dyn*. Vol. 236(4): 1055–1063.
- Siavoshian S, Blottiere HM, Cherbut C and JP Galmiche (1997). Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 232(1): 169-172.
- Sinclair A-H, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R and PN Goodfellow (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. Vol. 346(6281): 240-244.
- Singal R, Ferris R, Little JA, Wang SZ and GD Ginder (1997). Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 94(25): 13724-13729.
- Singal R and GD Ginder (1999). DNA Methylation. *Blood*. Vol 93(12): 4059-4070.
- Singh SB, Zink DL, Liesch JM, Mosley RT, Dombrowski AW, Bills GF, Darkin-Rattray SJ, Schmatz DM and MA Goetz (2002). Structure and chemistry of apicidins, a class of novel cyclic tetrapeptides without a terminal alpha-keto epoxide as inhibitors of histone deacetylase with potent antiprotozoal activities. *J Org Chem*. Vol. 67(3): 815-825.
- Skreb N, Bulic-Jakus F, Crnek V, Stepic J and M Vlahovic (1993). Differentiation and growth of rat egg-cylinders cultured in vitro in a serum-free and protein-free medium. *Int J Dev Biol*. Vol. 37(1): 151-154.

- Smith C, McClive PJ, Western PS, Reed KJ and AH Sinclair (1999). Conservation of a sex determining gene. *Nature*. Vol. 402(6762): 601–602.
- Spotswood HT and BM Turner (2002). An increasingly complex code. *J Clin Invest*. Vol. 110(5): 577-582.
- Spotila JR, Spotila LD and NF Kaufer (1994). Molecular mechanisms of TSD in reptiles: A search for the magic bullet. *J Exp Zool*. Vol. 279: 117-127.
- Spotila LD, Spotila JR and S Hall (1998). Sequence and expression analysis of *Wtl* and *Sox9* in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J Exp Zool*. Vol. 281(5): 417-427.
- Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J and PN Goodfellow (1993). *SOX3* is an X-linked gene related to SRY. *Hum. Mol. Genet*. Vol. 2: 2013-2018.
- Strahl BD. and CD Allis (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* Vol. 403 (6765): 41–45.
- Sullivan CH, Norman JT, Borrás T and RM Grainger (1989). Developmental regulation of hypomethylation of delta-crystallin genes in chicken embryo lens cells. *Mol Cell Biol*. Vol. 9(7): 3132-3135.
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG and SB Baylin (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylases inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* Vol. 31(2): 141-149.
- Tagaki N and K Abe (1990). Detrimental effects of two active X chromosomes on early mouse development. *Development*. Vol. 189-201.
- Tate PH and AP Bird (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. Vol. 3(2): 226 - 231.
- Tate P, Skarnes W and A Bird (1996). The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet*. Vol 12(2): 205-208.
- Tawa R, Ono T, Kurishita A, Okada S and S Hirose. (1990) Changes of DNA methylation level during pre- and postnatal periods in mice. *Differentiation*. Vol. 45: 44-48.
- Taylor SM and PA Jones (1979). Multiple New Phenotypes Induced in 10T(1/2) and 3T3 Cells Treated with 5-Azacytidine. *Cell*. Vol. 78(4): 771-779
- Tazi J and A Bird (1990). Alternative chromatin structure al CpG islands. *Cell*. Vol 60(6): 909-920.
- Timmermann S, Lehrmann H, Poleskaya A and A Harel-Bellan (2001). Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci*. Vol. 58(5-6): 728-736.
- Torres-Maldonado LC (2001). Aspectos moleculares involucrados en la determinación del sexo por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Asesor: H. Merchant-Larios. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 77pp.
- Torres-Maldonado LC, Landa-Piedra A, Moreno-Mendoza N and H Merchant-Larios (2001). Timing of SOX9 downregulation and female sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 290 (5): 498-503.
- Torres-Maldonado LC, Landa-Piedra A, Moreno-Mendoza N, Marmolejo A, Meza-Martínez A and H Merchant-Larios (2002). Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1* and *SOX9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 129(1): 20-26
- Turner BM (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell*. Vol. 111(3): 285-291.
- Umlauf D, Goto Y, Cao R, Cerqueira F, Wagschal A, Zhang Y, Feil R (2004) Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone

- methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* Vol. 36: 1296–1300.
- Upadhyay S, Luciani JM and L Zamboni (1979). The role of the mesonephros in the development of indifferent gonads and ovaries of the mouse. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.* Vol.19: 1179-1196.
 - Upadhyay S, Luciani J-M and L Zamboni (1981). The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In *Development and Function of Reproductive Organs* (eds AG Byskov and H Peters). *Excerpta Medica, Amsterdam.* 18-27 pp.
 - Van Lint C, Emiliani S and E Verdin (1996). The expression of a small fraction of cellular gene is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* Vol. 15(5): 245-254.
 - Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienka KJ, Sewalt RGAB, Otte AP, Rubin MA and AM Chinnaiyan (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* Vol. 419: 624-629.
 - Varriale A and G Bernardi (2006). DNA methylation and body temperatures in fishes. *Gene.* Vol. 385: 111–121.
 - Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, Ehinger M, Fisher PB and S Grant (1999). Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* Vol. 18 (50): 7016-7025.
 - Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, Hamalainen E, Alhonen L and J Janne (1992) Genomic Hypomethylation in Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* Vol. 80(8): 2074-208.
 - Wang H; Cao R; Xia L; Erdjument-Bromage H; Borchers C; Tempst P and Y Zhang (2001_a). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell.* Vol. 8(6): 1207–1217.
 - Wang C, Fu M, Mani S, Wadler S, Senderowicz AM and RG Pestell RG (2001_b). Histone acetylation and the cell-cycle in cancer. *Front Biosci.* Vol. 6: D610-629.
 - Wartenberg H (1981). Differentiation and development of the testes. In *The Testis* (eds H Burger and D de Kreiser). *Raven Press, New York.* 39-79 pp.
 - Wartenberg H, Kinsky I, Viebahn C and C Schmolke (1991). Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J. ElectronMicroscop. Techn.* Vol. 19: 133-157.
 - Weintraub H, Flint SJ, Leffak IM, Groudine M and RM Grainger (1978). The generation and propagation of variegated chromosome structures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* Vol. 42: 401–407.
 - Weisenberger DJ, Velicescu M, Preciado-Lopez MA, Gonzales FA, Tsai YC, Liang G and PA Jones (2002). Identification and characterization of alternatively spliced variants of DNA methyltransferase 3a in mammalian cells. *Gene.* Vol. 298(1): 91–99.
 - Western PS, Harry JL, Graves JAM and AW Sinclair (1999). Temperature-dependent sex determination: Upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev Dyn.* Vol. 214(3): 171-177.
 - Western P, Harry J, Marshal-Graves J. and A Sinclair (2000). Temperature-dependent sex determination in the *American alligator*: Expression of *SF1*, *WT1* and *DAX1* during gonadogenesis. *Gene.* Vol. 241(2): 223–232.

- Wibbels T, Bull JJ and D Crews (1991). Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination? *J Exp Zool.* Vol. 260: 130-134.
- Wibbels T, Bull JJ and D Crews (1992). Steroid-induced male sex determination in an amniotic vertebrate. *J Exp Zool.* Vol. 262: 454-457.
- Wibbels T, Gideon P, Bull JJ and D Crews (1993). Estrogen- and temperature-induced medullary cord regression during gonadal differentiation in a turtle. *Differentiaton.* Vol. 53: 149-153.
- Wibbels T, Bull JJ and D Crews (1994). Temperature-dependent sex determination: A mechanistic approach. *J Exp Zool.* Vol. 270: 71-78.
- Wolf SF, Dintgis S, Toniolo D, Persico G, Lunnen KD, Axelman J and BR Migeon (1984). Complete concordance between glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and hypomethylation of 3'CpG clusters: Implication for X chromosome dosage compensation. *Nucleic Acids Res.* Vol 12: 9333-9348.
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K and E Li (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene.* Vol. 236(1): 87-95.
- Yamamoto I, Matsunaga T, Sakata K, Nakamura Y, Doi S and F Hanmyou (1996). Histone hyperacetylation plays a role in augmentation of IL-4-induced IgE production in LPS-stimulated murine B-lymphocytes by sodium butyrate. *J Biochem (Tokyo).* Vol. 119: 1056-1061
- Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Furuyama J, Tamaoki T and T Hashimoto-Tamaoki (1998). Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer.* Vol. 76(6): 897-902
- Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P and SB Baylin (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* Vol. 20(9): 2287-2291.
- Yoder JA, Walsh CP and TH Bestor TH (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* Vol. 13(8): 335-340.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M and T Beppu (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem.* Vol. 265(28): 17174-17179.
- Young ID, Zuccollo JM, Maltby EL and NJ Broderick (1992). Campomelic dysplasia associated with a de novo 2q;17q reciprocal translocation. *J Med Genet* Vol. 29: 251–252.
- Yu R, Ito M and L Jameson. (1998). The murine *Dax1* promoter is stimulated by Sf-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUPTF (chicken ovoalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol. Endocrinol.* Vol. 12(7): 1010–1022.
- Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA and DS Schrupp (2002). Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst.* Vol. 94(7): 504-513.
- Zamboni L and S Upadhyay (1982). The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. *Am. J. Anat.* Vol. 165: 339-356.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P and G Camerino. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature.* Vol. 372: 635–641
- Zetterqvist H (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. thesis, Karolinska, Stockholm

- Zeleznik-Le NJ, Harden AM and JD Rowley JD (1994). 11q23 translocations split the “AT-hook” cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixedlineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 91(22): 10610- 10614.
- Zesching MB, Schmitz B., Dittrich K, Buiting B, Horsthemke B and W Doerfler (1997). Imprinted segments in the human genome: Different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum. Mol. Genet.* Vol. 6: 387-395.
- Zhang Y and D Reinberg (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* Vol. 15(18): 2343-2360.
- Zhang X; Yang Z; Khan SI; Horton JR; Tamaru H; Selker EU and X Cheng (2003). Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol. Cell.* Vol. 12(1): 177–185.
- Zing JM and PA Jones (1997). Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. Vol.18 (5): 869 -882.