



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *SOX9*, *DMRT1*, *CIPBR1* Y *CBX2*
DURANTE LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL
TERMOSENSIBLE EN LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ROGELIO MONTIEL MANRÍQUEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
Instituto de Fisiología Celular
DR. JESUS CHIMAL MONROY
Instituto de Investigaciones Biomédicas

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

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.

RECONOCIMIENTOS.

Este trabajo de investigación fue realizado bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por el siguiente proyecto:

PAPIIT No. IN 202115 “La tortuga marina *Lepidochelys olivacea* como modelo de determinación sexual por temperatura: mecanismos moleculares en condiciones de laboratorio y naturales”. Del Dr. Horacio Merchant Larios.

Este proyecto contó con los Permisos de Colecta Científica de huevo de tortuga *Lepidochelys olivacea* otorgado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) con Oficio Número: SGPA/DGVS/01945/13; SGPA/DGVS/02133/14 y SGPA/DGVS/03109/15.

Este trabajo se realizó con el apoyo coordinado del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Mazunte, Municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca, México. Bajo la dirección del Ing. Manuel Rodríguez Gómez y actualmente a cargo de la Coordinadora Operativa, Biól. Erika García Campos.

Parte de este proyecto se realizó en el Instituto de Bioquímica y Biofísica de la Academia Polaca de Ciencias en el laboratorio supervisado por la Dra. Edyta Kopera en el departamento de biosíntesis de proteínas, en la ciudad de Varsovia Polonia. (Part of this project was made at the Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, in the laboratory supervised by Dr. Edyta Kopera at Department of Protein Biosynthesis, Warsaw, Poland.).

El apoyo para la realización del proyecto de secuenciación del genoma de *Lepidochelys olivacea* fue otorgado por el Instituto de Bioquímica y Biofísica de la Academia Polaca de Ciencias y coordinado por el Dr. Damian Mielecki, en la ciudad de Varsovia Polonia. (The support for the project of *Lepidochelys olivacea* genome sequencing was given by the Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences in coordination with Dr. Damian Mielecki at Warsaw, Poland).

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios, Investigador Emérito del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, quien fungió como director de este trabajo de tesis, gracias por su apoyo y orientación durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la grandiosa formación académica.

Al programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

A la UNAM por los apoyos recibidos a través del programa PAEP.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de Maestría con registro número 581151 y por la beca otorgada a través del programa de becas Mixtas 2015 para una estancia de investigación en el extranjero.

A los miembros del comité tutorial integrado por el Dr. Horacio Merchant Larios, el Dr. Félix Recillas Targa y el Dr. Jesus Chimal Monroy por su valiosa dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. Félix Recillas Targa por permitirme usar el material y equipo de su laboratorio para la realización de mi proyecto de investigación.

A la Dra. Edyta Kopera, del laboratorio de Biosíntesis de Proteínas del Instituto de Bioquímica y Biofísica de la Academia Polaca de Ciencias, por su apoyo en la realización de una estancia corta de investigación en su laboratorio y por la asesoría técnica en el proceso de síntesis de proteínas durante la estancia. (To Dr. Edyta Kopera from the laboratory of protein biosynthesis at Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, for her support with the research internship in her laboratory and the support with laboratory techniques during the process of protein biosynthesis).

A la candidata a Doctora, la Lic. Daniela Venegas Suárez Peredo por su gran apoyo y asesoría en la realización de las técnicas de laboratorio de biología molecular y análisis bioinformático que me ayudaron a realizar mi proyecto de investigación.

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia por su invaluable asesoría y apoyo técnico en el suministro de material biológico, disección de órganos y extracción de gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea*.

A la M. en C. Georgina Guerrero Avendaño por su asesoría y apoyo técnico en la realización de distintas técnicas de Biología molecular: extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.

Al M. en C. Francisco Javier Carmona Aldana por su gran apoyo y asesoría en la realización de técnicas de laboratorio de biología molecular.

Al candidato a Doctor Rodrigo Arzate por su gran apoyo y asesoría en la realización de técnicas de laboratorio de biología molecular.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo otorgado por la Biol. Erika García Campos, Coordinadora Operativa del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Mazunte, Oaxaca.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo otorgado por al Ing. Manuel Rodríguez Gómez, ex director del CMT. Mazunte, Oaxaca.

A la M. en C. Martha Harfus Meléndez, investigadora del CMT, por coordinar y participar en la colecta y transporte de huevos de tortuga *L. olivacea*. Mazunte, Oaxaca.

Al Biól. Cuauhtémoc Peñaflares Salazar, jefe de campamentos del CMT por las facilidades otorgadas para la colecta en playa del material biológico. Mazunte, Oaxaca.

Al. Biól. Ángel Guillermo González Padilla por el apoyo en el campamento Morro Ayuta para la colecta de muestras biológicas. Oaxaca.

Al Biól. Andrés Mariano Alcántara, por el apoyo en el campamento Morro Ayuta para la colecta de muestras biológicas.

A la Biól. Erika Peralta Buendía, por la colecta de huevo de *L. olivacea* en la playa de la Escobilla Oaxaca.

A la Biól. Teresa Luna Medina, por la colecta de huevo de tortuga *L. olivacea*, en la playa de la Escobilla Oaxaca.

A Josué Suárez Bohorquez, por el apoyo en la colecta de huevo de tortuga.

Al técnico Ancelmo Cervantes, por el traslado y transporte de muestras de huevo de tortuga *L. olivacea*.

A la M. en C. Maria Pietrzak, a la estudiante de doctorado Agnieszka Macioła, al Dr. Konrad Zdanowski, al Dr. Damian Mielecki y al Dr. Marcin Mielecki, por su asesoría y apoyo en las técnicas de biosíntesis de proteínas durante mi estancia en el laboratorio de biosíntesis de proteínas del Instituto de Bioquímica y Biofísica de la Academia Polaca de Ciencias, Varsovia Polonia. (To Msc. Maria Pietrzak, PhD student Agnieszka Macioła, Dr Konrad Zdanowski, Dr. Damian Mielecki and Dr. Marcin Mielecki for their teaching and support in techniques of protein biosynthesis and molecular biology during my research internship at Department of protein biosynthesis, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland).

A la Dra. Verónica Díaz Hernández por su asesoría técnicas de Biología Molecular.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS.

A mis padres, Ana Luisa Manríquez García y Wenceslao Montiel Lozada, por todo su apoyo incondicional, sus consejos, su cariño y su comprensión a lo largo de mi vida, los quiero mucho, gracias por todo.

A mis hermanos, Ricardo, Rubén y Sayuri, por todo su apoyo y cariño, gracias por todos los momentos de diversión que pasamos al crecer juntos, los quiero mucho.

A toda mi familia por su apoyo, cariño y su confianza en mí.

A Alejandro Garibay, por todo el apoyo y confianza que me has brindado, por todo tu cariño y tus consejos, gracias por todos los momentos de felicidad, te quiero mucho.

A mi gran amiga Beatriz Santamaría, gracias por todo tu apoyo incondicional, por toda la diversión, por todas las risas y por la gran dicha de verte triunfar y de crecer juntos profesionalmente. Te quiero mucho.

A mis amigos Daniel Rangel, Janeth García, Luca Orue, Olivia Tabares, Diana García, Marco Morales, Aislinn Villamil, Rodolfo Dalman, Missael Guzmán, Juventino Palomera, Quetzali Angeles, Carlos Santana, Iris Reyes, Maricarmen Sierra, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por su apoyo y su comprensión.

A mis amigos Philipp Heinlein y Felix Schmidt por su hospitalidad y toda la ayuda que me brindaron durante mi estancia en Munich, Alemania cuando asistí al curso de cultivo celular en Ibidi. (To my Friends, Philipp Heinlein and Felix Schmidt for their hospitality and all the help they gave me during my stay at Munich, Germany, when I attended the course of cell culture at Ibidi.)

A François Favreau y Eva Alcázar por su hospitalidad y su apoyo durante mi estancia en Madrid, España, cuando asistí al congreso de la sociedad española de biología del desarrollo.

A mis queridos amigos Agnieszka y Leszek, muchas gracias por su hospitalidad y por toda la ayuda que me brindaron mientras estuve en Polonia, gracias por compartir conmigo su hogar, su cultura, sus amigos, gracias por todo. (To my dear Friends, Agnieszka and Leszek, thank you very much for your hospitality, for all the help you gave me during my stay at Poland, thank you for sharing with me your home, your culture, your friends, thank you for everything).

ÍNDICE.

Introducción.....	11
Generalidades de la especie.....	11
Determinación sexual en vertebrados.....	12
Determinación sexual termosensible.....	14
Determinación sexual en la tortuga marina <i>L. olivacea</i>	15
Genes involucrados en la determinación sexual termosensible.....	18
<i>Sox9</i>	19
<i>Dmrt1</i>	21
<i>Cirbp</i>	23
<i>Cbx2</i>	26
Justificación.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivos.....	32
Materiales y métodos.....	33
Animales.....	33
Registro de temperaturas.....	33
Extracción de RNA y transcripción reversa.....	33
RT-PCR.....	34
Diseño de oligonucleótidos.....	35
Secuenciación de la región 5'-UTR de <i>Dmrt1</i> y del exón 2 de <i>Dmrt1</i>	35
Secuenciación del mRNA parcial de los genes <i>Cirbp</i> y <i>Cbx2</i>	35
PCR en tiempo real.....	37
Resultados.....	38
Temperaturas de incubación.....	38
Secuencia del exón 2 del gen <i>Dmrt1</i>	39
Secuencia de 5'-UTR del gen <i>Dmrt1</i>	41
Secuencia del mRNA parcial del gen <i>Cirbp</i>	42
Secuencia del mRNA parcial del gen <i>Cbx2</i>	44
El gen <i>Dmrt1</i> tiene una expresión dimórfica en etapas posteriores al periodo de sexo indeterminado en gónadas de <i>L. olivacea</i>	48

El perfil de expresión del gen <i>Sox9</i> sugiere su relación con el proceso de diferenciación sexual.....	49
El gen <i>Cirbp</i> tiene una expresión dimórfica durante el periodo sexualmente indeterminado en gónadas de <i>L. olivacea</i>	50
El gen <i>Cbx2</i> tiene una expresión dimórfica en gónadas de <i>L. olivacea</i> durante el periodo sexualmente indeterminado.....	51
Discusión.....	52
Conclusiones.....	55
Referencias.....	56
Apéndice.....	63

INTRODUCCIÓN.

Generalidades de la especie.

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, también conocida por su nombre común como tortuga golfina, es la especie más pequeña (Seminoff et al., 2008) y la más abundante de las tortugas marinas en el planeta (Marcovaldi, 2001). Los adultos alcanzan en promedio 67.6 cm de largo de caparazón y un peso promedio de 38.1 kg (Márquez, 1996).

La tortuga golfina tiene una amplia y distribución y se le puede encontrar en casi todas las áreas oceánicas tropicales y subtropicales (Marcovaldi, 2001).

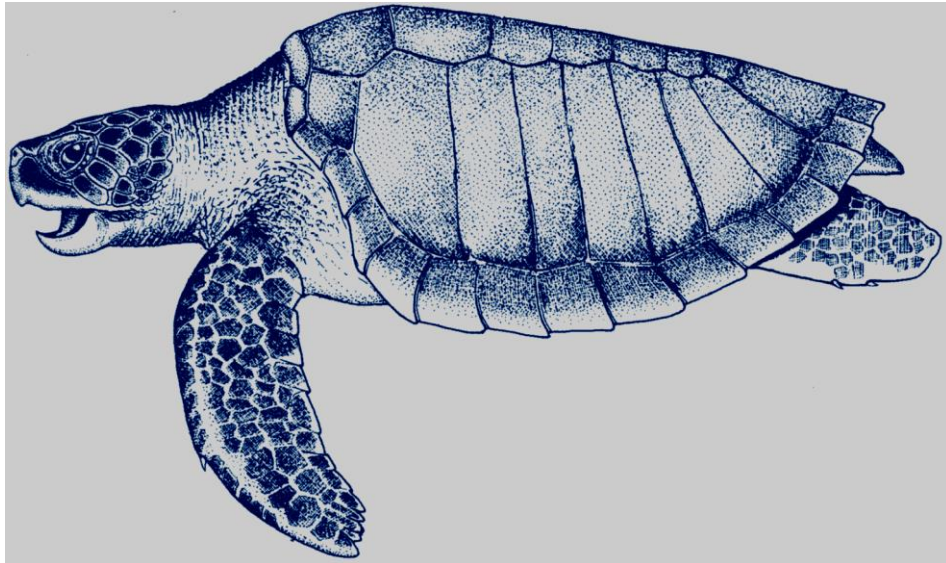


Figura A. Adulto de *L. olivacea*. (Figura modificada de Márquez, 1990).

En México, la tortuga *L. olivacea* anida en la costa del pacífico, principalmente en las playas de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Márquez et al., 1982). Las playas de anidación más importantes a nivel mundial son La Escobilla y Morro Ayuta en el estado de Oaxaca (Márquez, 1966). La Convención

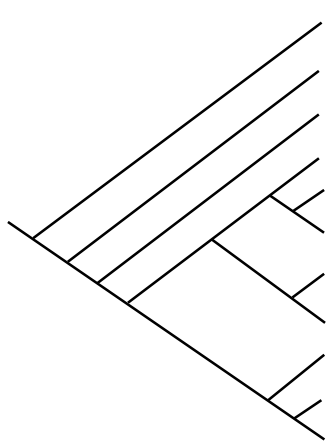
Internacional para el Tráfico de Especies (CITES) considera a la tortuga golfina como una especie amenazada pero no en peligro de extinción.

Determinación sexual en vertebrados.

Una de las características de los vertebrados es que se reproducen de manera sexual. Este tipo de reproducción involucra que en una especie existan individuos con características sexuales dimórficas, para ello durante el desarrollo embrionario ocurren procesos que dan lugar a individuos de uno u otro sexo fenotípico.

Durante el desarrollo embrionario se forman órganos especializados en la producción de gametos, ya sean óvulos o espermatozoides, que reciben el nombre de gónadas. Al inicio del desarrollo embrionario, las gónadas son indiferenciadas y bipotenciales (Merchant-Larios et al., 2011) ya que morfológicamente no se observan diferencias estructurales entre gónadas de machos y hembras, además de que en este periodo las gónadas tienen el potencial para diferenciarse indistintamente hacia ovario o testículo. Es importante enfatizar que previo a la diferenciación morfológica de la gónada, ocurre el proceso de determinación sexual definida como la decisión dentro de la gónada bipotencial para desarrollarse como un testículo o un ovario (Barske et al., 2008).

En vertebrados los mecanismos moleculares involucrados en la determinación sexual de las gónadas varían enormemente entre las especies. Principalmente se pueden dividir en 2 mecanismos distintos (Barske et al., 2008): aquellos que emplean mecanismos genéticos llamada Determinación Sexual Genotípica (DSG) y aquellos que emplean mecanismos ambientales, llamada Determinación Sexual Ambiental (DSA). En la figura B se puede observar la distribución filogenética de los distintos tipos de determinación sexual en vertebrados.



	XX/XY	ZZ/ZW	Homomórfico	Poligenico	Dependiente de densidad	DST	Otro	Sensible a hormonas externas
Peces	X		X	X	X	X		Sí
Anfibios	X	X						Sí
Tortugas	X	X	X			X		Sí
Esfenodontes						X		?
Serpientes		X						?
Lagartos	X	X	X			X	X	Sí
Cocodrilos						X		Sí
Aves	X	X						Sí
Monotremas							X	?
Marsupiales	X							Sí
Euterios	X							No

Figura B. Determinación sexual en vertebrados. (Figura modificada de Barkse et al., 2008).

En la DSG el sexo está determinado al momento de la fertilización y depende de la carga génica que los gametos aporten al cigoto (Matsumoto et al., 2012). Existen principalmente 2 sistemas: el sistema de cromosomas XX/XY (hembra/macho) presente en los mamíferos y en algunos reptiles, aves y anfibios y el sistema ZZ/ZW (macho/hembra) presente en la mayoría de las aves y en algunos anfibios y reptiles (Barske et al., 2008). En este tipo de determinación sexual un gen determinador sexual se expresa en la gónada indiferenciada de manera transitoria y dirige el desarrollo de la gónada bipotencial, dependiendo el caso, hacia un ovario o un testículo (Nakamura, 2010).

En la determinación sexual ambiental (DSA) son los factores ambientales posteriores a la fertilización los que influyen en la determinación sexual del embrión, estos factores pueden ser, por ejemplo, el fotoperiodo y la temperatura (Rhen et al., 2010), la humedad (Gutzke et al., 1883), el pH (Rubin, 1985), etc., sin embargo la forma más común de DSA es la determinación sexual termosensible (DST) (Nakamura, 2010) en la cual la temperatura de incubación del embrión durante un estadio específico del desarrollo, conocido como periodo sensible a la temperatura

(PST) determinará el sexo del embrión (Shoemaker and Crews., 2009). La DST fue descubierta primero en reptiles (revisado en: Merchant-Larios, et al., 2012), posteriormente también ha sido ampliamente estudiada en distintos tipos de organismos como peces y anfibios (Ciofi et al., 1997).

Determinación sexual Termosensible.

La determinación sexual termosensible fue reportada por primera vez en la lagartija africana *Agama agama*, por Charnier (1966) y es un ejemplo de plasticidad fenotípica ya que la diferenciación de la gónada bipotencial hacia testículo u ovario está regulada por la temperatura de incubación del embrión en desarrollo durante el periodo termosensible (PTS) (Matsumoto et al., 2012). El PTS se puede definir como el periodo mínimo del desarrollo embrionario en el cual la exposición de los embriones a temperaturas masculinizantes o feminizantes resulta en casi un 100% de machos o hembras fenotípicas (Merchant-Larios, 2001). Los patrones de DST también se caracterizan por presentar temperaturas pivote. La temperatura pivote puede definirse como la temperatura en la cual se puede obtener una proporción cercana de 1:1 de machos y hembras al ser incubados a una temperatura constante (Escobedo, 2013; Mrosovsky et al., 1991).

Desde que la DST fue reportada en el lagarto *Agama agama*, este tipo de determinación sexual ha sido ampliamente estudiada en reptiles. Se ha observado que todos los cocodrilos, los tuátaras, algunas especies de lagartijas y varias tortugas presentan determinación sexual termosensible (Shoemaker et al., 2009). Dentro de las tortugas se ha observado que este tipo de determinación sexual se encuentra en 5 especies de tortuga marina: *Eretmochelys imbricata*, *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea* y *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios et al., 1997).

La respuesta a la temperatura sigue distintos patrones en las especies de reptiles que presentan DST. Según Ewert (1994) existen 3 patrones diferentes en la determinación sexual termosensible:

- I. Temperatura baja Feminizante, temperatura alta Masculinizante: FM (Presente en todos los tipos de reptiles, excepto en tortugas).
- II. Temperatura baja Masculinizante, temperatura alta Feminizante: MF (Presente solamente en tortugas).
- III. Temperatura baja Feminizante, temperatura media Masculinizante, temperatura alta Feminizante: FMF (presente en ciertas especies de todos los grupos de reptiles).

Aunque aún no se ha descrito por completo el o los mecanismos moleculares por los que la temperatura induce la determinación del sexo, se han hecho distintos experimentos que han dado origen a varias hipótesis al respecto; por ejemplo, la influencia de hormonas en la determinación sexual del embrión, principalmente estrógenos (Pieau et al., 2004), involucrados en el desarrollo del ovario. También se han realizado experimentos que involucran la expresión de genes relacionados con los procesos de determinación y diferenciación sexual termosensible como *Sox9* y *Dmrt1*, característicos de la determinación del testículo, y *Foxl1* involucrado en la determinación del ovario (Shoemaker et al., 2009).

Determinación sexual en la tortuga marina *L. olivacea*.

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, también conocida por su nombre común como tortuga golfina, presenta determinación sexual termosensible (McCoy et al., 1983). Durante el desarrollo embrionario la temperatura influye en la determinación sexual del embrión, los embriones incubados a alta temperatura (32-33°C) se desarrollan como hembras mientras que los embriones incubados a baja temperatura (26-27°C) se desarrollan como machos (Torres-Maldonado et al., 2006), este patrón de determinación sexual, de acuerdo a la clasificación de Ewert (1994), es un patrón de tipo II.

En el trabajo realizado por Merchant-Larios et al. (1997) se describió el desarrollo embrionario de *L. olivacea*. Al incubar los embriones a distintas temperaturas estos tienen una velocidad de desarrollo distinta, a temperatura feminizante (TF) de 32°C los embriones se desarrollan más rápido que a temperatura masculinizante (TM) de 27°C, esto quiere decir que los embriones en etapas de desarrollo equivalentes en TM y TF tienen edades distintas. En la figura C se muestran las etapas de desarrollo de *L. olivacea* reportadas por Merchant-Larios et al. (1997) en la que empleó la tabla de desarrollo propuesta por Miller (1985) para las tortugas marinas.

Edad en días	Etapas embrionarias a TM (27±0.5°C)	Etapas embrionarias a TF (32±0.5°C)
15	18-19	21-22
20	20-21	23-24
24	22-23	24-25
27	23-24	25-26
32	24-25	27-28
35	25-26	28-29
40	26-27	29-30
45	27-28	31

Figura C. Tabla de desarrollo embrionario de *L. olivacea* (modificada de Merchant-Larios et al., 2010).

La determinación sexual en la tortuga *L. olivacea* durante todo el desarrollo embrionario se puede dividir en 3 periodos distintos: periodo de sexo indeterminado (PI), periodo sensible a la temperatura (PS) y periodo de sexo determinado (PD) los cuales se muestran en la figura D.

Para establecer los tres periodos, Merchant-Larios et al. (1997) realizaron experimentos intercambiando huevos incubados de TM a TF y viceversa, en distintas etapas del desarrollo y estableciendo el sexo histológico de las gónadas (ovarios o testículos) al momento de la eclosión. Con base en los resultados obtenidos se pudo conocer en qué etapas los embriones ya tenían sexo determinado y en las etapas en las que el sexo aún no se había determinado. Este trabajo fue repetido por Merchant-Larios et al. (2010) pero aumentando la

temperatura feminizante de 32°C a 33°C y disminuyendo la temperatura masculinizante de 27°C a 26°C obteniendo resultados similares. En la Figura D se pueden observar los resultados publicados por Merchant-Larios et al. (2010).

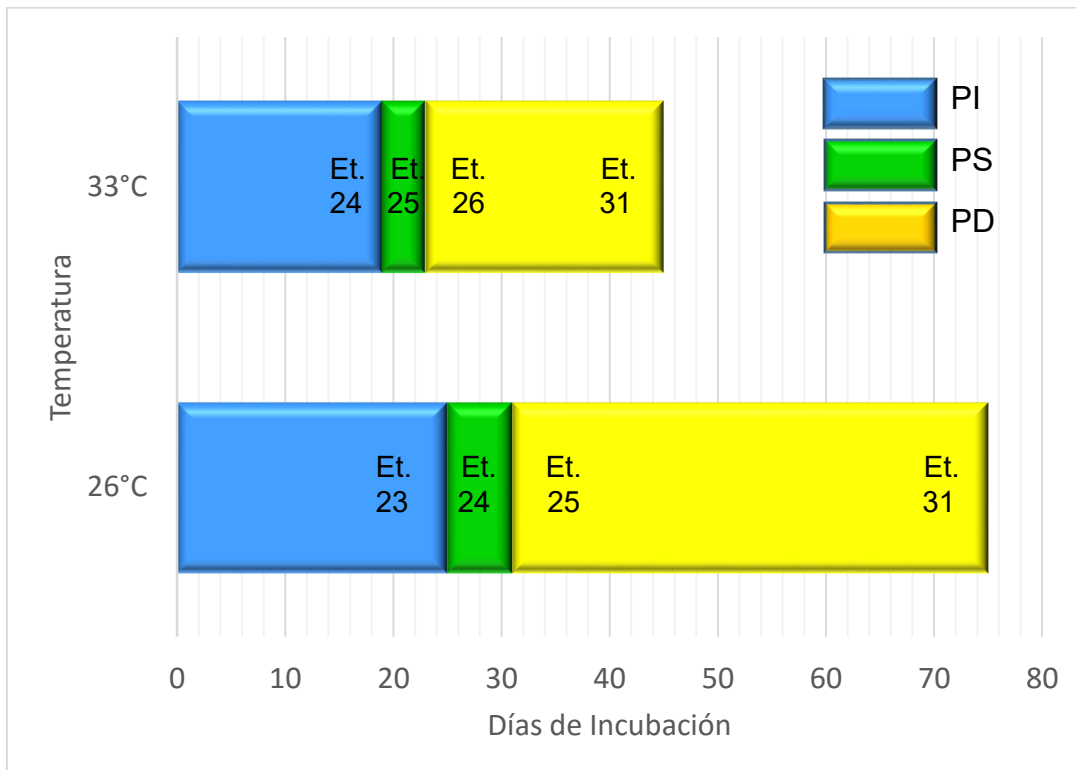


Figura D. Representación esquemática de los periodos de sexo indeterminado (PI), sensible a la temperatura (PS) y de sexo determinado (PD) en el desarrollo embrionario de *L. olivacea* incubados a TM (26°C) y TF (33°C). (Modificada de Merchant-Larios et al., 2010).

El periodo indeterminado (PI) abarca las etapas de desarrollo en las que al intercambiar los embriones de temperatura masculinizante a temperatura feminizante, o viceversa, el 100% de los embriones responden al cambio desarrollándose como hembras o como machos respectivamente; es decir, que el sexo del embrión aún no era determinado por la temperatura inicial de incubación. El periodo sensible a la temperatura (PS) abarca las etapas de desarrollo en las que

al intercambiar los embriones de TM a TF, o viceversa, de manera gradual, un número cada vez menor responde a la temperatura de intercambio. Es decir, a nivel individual, el sexo de los embriones del mismo nido se determina de forma heterogénea durante el PS. Finalmente, el periodo de sexo determinado (PD) abarca las etapas de desarrollo en las que los embriones, al ser intercambiados de TM a TF, o viceversa, el 100% ya no responden al cambio de temperatura, es decir, su sexo fue determinado por la temperatura previa de incubación en todos los embriones (Merchant-Larios et al., 2010).

Genes involucrados en la determinación sexual termosensible.

Los mecanismos de determinación sexual fueron descritos primeramente en mamíferos donde han sido ampliamente estudiados. En mamíferos placentados se encontró el gen *Sry* (sex-determining region Y) ubicado en el cromosoma Y. Este gen es un factor de transcripción de gran importancia en la determinación sexual ya que actúa en la gónada bipotencial del embrión provocando que esta se desarrolle como un testículo (Koopman et al. 1991, Fujimoto et al., 2013). El gen *Sry* provoca la activación de redes moleculares de determinación sexual en el testículo y se ha comprobado que regula positivamente la expresión del gen *Sox9* (related SRY box 9) (Sekido et al., 2008), otro factor de transcripción conservado en los vertebrados muy importante en la determinación del testículo.

Al estudiar a los organismos que presentan determinación sexual termosensible se observó que en muchos, como la tortuga *L. olivacea*, no se han identificado cromosomas sexuales dimórficos, además de que no presentan la secuencia del gen *Sry* en su genoma (Torres et al., 2002). Entonces, a diferencia de los organismos con DSG, los organismos con DST no dependen de un gen “maestro” como el *Sry* para su determinación sexual. En cambio, dependen de la temperatura para activar las redes de expresión génica para la determinación ya sea hacia macho o hembra.

Se ha encontrado que varios genes de las redes de determinación y diferenciación sexual conservados en organismos con DSG, existen en el genoma

de especies con DST. Por ejemplo, *Sox9* y *Dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1), así como genes de las redes de determinación y diferenciación del ovario como *FoxL2* (Forkhead box L2) y *Rspo1* (R-spondin1) (Shoemaker et al., 2009).

A continuación, se describen algunos genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual.

Sox9

La familia de proteínas Sox es un grupo de reguladores transcripcionales cuya característica principal es la presencia de un dominio HMG (High Mobility Group) altamente conservado (Jo et al., 2014). Los genes Sox son de gran importancia en el desarrollo de los organismos multicelulares debido a su activa participación en distintos eventos en el desarrollo (Phochanukul et al., 2010). Además son un grupo de genes altamente conservados, se les encuentra desde invertebrados hasta mamíferos. En la tortuga *Chelydra serpentina*, un organismo con DST, se han identificado al menos siete genes relacionados con la familia Sox (Torres et al., 2006) y al menos 20 distintos genes Sox han sido identificados en ratón y humano (Jo et al., 2014).

El gen *Sox9*, miembro del subgrupo SoxE de proteínas (Jo et al., 2014) es un regulador transcripcional y su rol en la determinación sexual y la formación del testículo se reconoció por primera vez al hacer el análisis genético de humanos con displasia campomélica, un desorden en el cual el 75% de los pacientes XY tiene reversión de sexo de macho a hembra (Jo et al., 2014). *Sox9* es un gen importante para el desarrollo testicular tanto en mamíferos (Li et al., 2014) como en varias especies de vertebrados con determinación sexual termosensible (Moreno-Mendoza et al., 2001).

En la tortuga marina *L. olivacea* se han realizado experimentos con inmunofluorescencia para observar la presencia de la proteína SOX9. Se ha observado que en etapas indeterminadas 22 a 24 hay expresión de la proteína en el núcleo de las células de los cordones medulares de la gónada de embriones

incubados a temperatura masculinizante y feminizante. Al llegar a la etapa 25 la mayoría de las células de la médula son negativas a SOX9 a temperatura feminizante y a partir de la etapa 26 la presencia de SOX9 es indetectable. A temperatura masculinizante la expresión de la proteína SOX9 en los cordones medulares de la gónada se mantiene durante todas las etapas de desarrollo (Moreno-Mendoza et al., 1999). También en la tortuga *L. olivacea* se ha establecido el patrón de expresión del gen *Sox9* en gónada mediante la técnica semicuantitativa de RT-PCR (Torres-Maldonado et al., 2002) donde se ha observado que el patrón de expresión de los transcritos del gen *Sox9* son muy similares a los de su proteína, SOX9. El nivel de expresión del gen *Sox9* a temperatura feminizante y masculinizante es muy similar en etapas de la 23 a la 25, mientras que a partir de la etapa 26 se ve una drástica disminución de la expresión de *Sox9* en gónadas de temperatura feminizante. En la figura E se puede observar la gráfica reportada por Torres-Maldonado et al. (2002) para la expresión de *Sox9*.

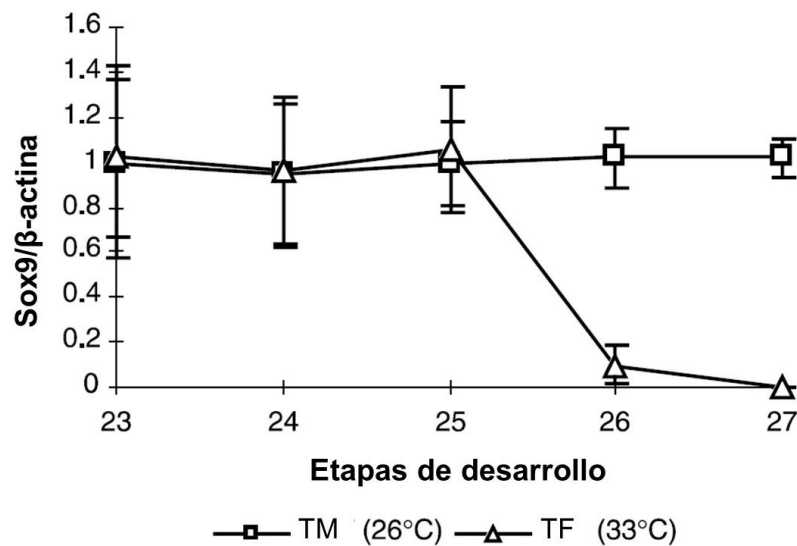


Figura E. Niveles de expresión del gen *Sox9* analizados por densitometría. Los resultados muestran la relación *Sox9/β-Actina* en gónadas incubadas a temperatura masculinizante y feminizante en etapas 23 a 27. (Figura modificada de Torres-Maldonado et al., 2002).

Dmrt1

Las proteínas DMRT son factores de transcripción en los vertebrados que contienen un dominio DM, estos dominios son de unión a DNA y fueron identificados por primera vez en dos reguladores sexuales de invertebrados: doublesex (*dsx*) y male abnormal 3 (*mab-3*) (Zarkower, 2013). *Mab-3* y *Dsx* son factores de transcripción distintos que regulan la diferenciación sexual en machos de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, respectivamente (Heckert et al., 2015).

Los genes *Dmrt* han sido ampliamente estudiados debido a que representan los principales factores de transcripción en las vías que regulan la determinación y diferenciación sexual desde nidarios hasta mamíferos (Picard et al., 2015) lo que indica que este tipo de factores de transcripción se encuentran altamente conservados evolutivamente.

Dentro de los genes *Dmrt*, el gen *Dmrt1* parece tener el papel más importante en el desarrollo sexual de los vertebrados ya que su expresión es específica de la gónada en mamíferos, aves, tortugas, ranas y peces (Hackert et al., 2015). La expresión de *Dmrt1* mantiene un perfil dimórfico durante el desarrollo de la gónada, siendo más alta la expresión en el testículo que en el ovario. Se ha demostrado que este gen regula distintos procesos en el desarrollo sexual como la diferenciación de la gónada, la gametogénesis y la determinación sexual (Zarkower, 2013).

En general se puede decir que un gen puede considerarse como un determinante sexual si la modificación en su expresión produce reversión sexual (Picard et al., 2015). Basado en esta premisa, se puede decir que el gen *Dmrt1* tiene un papel importante en la determinación sexual de varios vertebrados. En humanos se ha observado que deleciones de la región cromosómica donde se encuentra el gen *Dmrt1* (9p) se relacionan con disgenesia gonadal (Koopman, 2009). En ratones (*Mus musculus*) mutantes *Dmrt1*^{-/-} se observa un desarrollo anormal de los testículos en la etapa postnatal, mientras que en ratones adultos en los que se deleta *Dmrt1* se observa una transdiferenciación del testículo hacia un fenotipo de

ovario (Lambeth et al., 2014). Esto habla también de la importancia que tiene el gen *Dmrt1* en el mantenimiento del fenotipo testicular aún en organismos adultos.

En organismos no mamíferos, como en el pollo (*Gallus gallus*) también se ha visto asociado a la determinación sexual. En experimentos donde se abate la expresión de *Dmrt1* en embriones machos, se induce la feminización de la gónada masculina (Smith et al., 2009); mientras que, en embriones hembra, al sobre expresar *Dmrt1*, se induce la expresión de los genes de las vías masculinizantes y se antagonizan las vías feminizantes en la gónada (Lambeth et al., 2014).

En organismos con determinación sexual termosensible aún no se ha podido comprobar el papel que tiene *Dmrt1* en la determinación sexual, pero se ha descrito el patrón de expresión en gónada que tiene en distintas especies y su expresión se ha visto asociada a embriones incubados a temperatura masculinizante.

En la tortuga *Trachemys scripta*, mediante PCR en tiempo real, se ha observado que *Dmrt1* es uno de los primeros genes que manifiesta un perfil de expresión dimórfico, en etapas aún indeterminadas, se encuentra sobre expresado a temperatura masculinizante mientras que a temperatura feminizante permanece con expresión baja (Shoemaker et al., 2007). La expresión dimórfica en etapas indeterminadas puede sugerir su posible rol en la determinación sexual termosensible en *T. scripta*. Un perfil de expresión similar fue encontrado, igual mediante la técnica de PCR en tiempo real, en la tortuga *Chelydra serpentina* (Rhen et al., 2007) otro organismo con DST.

En la tortuga *L. olivacea* también se ha analizado el perfil de expresión de *Dmrt1* mediante la técnica semicuantitativa de RT-PCR (Torres-Maldonado et al., 2002) en gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante y feminizante. El perfil de expresión reportado presenta un patrón dimórfico el cual puede observarse en la gráfica reportada por Torres-Maldonado (2009) en la figura F. Desde etapas indeterminadas la expresión es más alta a temperatura masculinizante, este resultado sugiere un posible papel de este gen en el proceso de determinación sexual ya que su expresión dimórfica precede a la regulación negativa de *Sox9* en gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante.

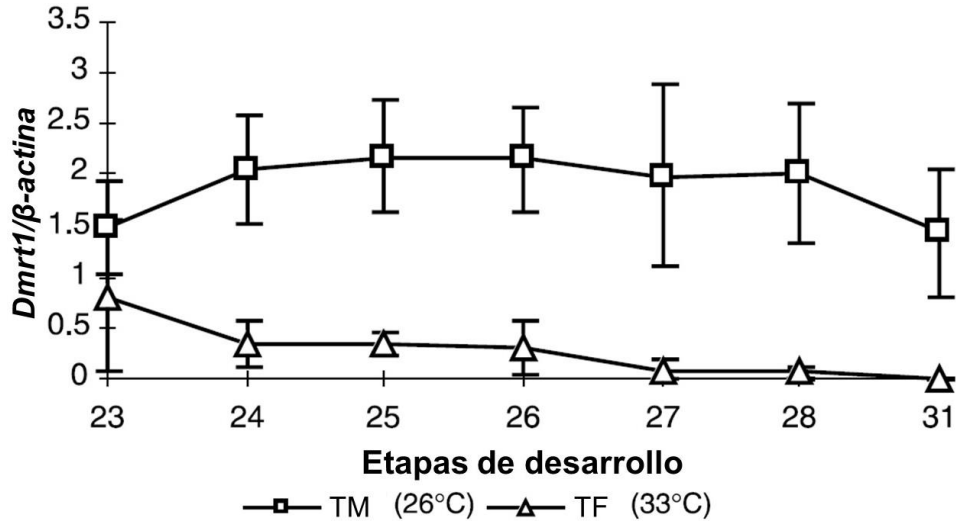


Figura F. Niveles de expresión del gen *Dmrt1* analizados por densitometría. Los resultados muestran la relación *Dmrt1/β-Actina* en gónadas incubadas a temperatura masculinizante y feminizante en etapas 23 a 27. (Figura modificada de Torres-Maldonado et al., 2002).

Cirbp

La proteína “Cold-inducible RNA-binding protein” (CIRBP) codificada por el gen *Cirbp* es una proteína de unión a RNA rica en glicina que se encuentra altamente conservada en distintos grupos de vertebrados (Xia et al., 2012), la proteína se caracteriza por tener un dominio de unión a RNA en la región amino terminal y un dominio rico en glicina en la región carboxilo terminal.

La proteína CIRBP fue descubierta al buscar transcritos inducidos después de dañar al DNA con radiación ultra violeta (UV), siendo una de las proteínas inducidas como consecuencia de la radiación UV. Posteriormente se descubrió que también se inducía su expresión después de un leve shock térmico con baja temperatura (32°C) en distintos tipos de cultivos celulares de mamífero (LLeonart, 2010). También fue la primera proteína de shock frío (Cold-Shock Protein, CSP) identificada en mamíferos (Masuda et al., 2012). A pesar de los estudios realizados, hasta ahora la función exacta de CIRBP no se conoce por completo, pero se cree

que funciona como chaperona de RNA, facilitando la traducción de mRNA (Mohamed et al., 2009).

La proteína CIRBP es una proteína que se expresa constitutivamente en el testículo (Xia et al., 2012), un órgano muy sensible a la temperatura. En ratón se ha observado que su expresión en testículos se induce a baja temperatura (32°C) (Masuda et al., 2012) mientras que con un shock térmico a alta temperatura (37°C) su expresión disminuye notablemente (Xia et al., 2012). Los niveles de mRNA de *Cirbp* también se ven afectados después del shock térmico a 37°C, el nivel de expresión del transcrito en testículos de ratón disminuye después del shock térmico (Nishiyama et al., 1998).

En organismos con determinación sexual termosensible se ha estudiado muy poco el papel de CIRBP, empezando por el hecho de que este gen aún no ha sido secuenciado en diversas especies, incluyendo a la tortuga *L. olivacea*. Hasta el momento los trabajos publicados con respecto a este gen en organismos con DST se enfocan solamente en los perfiles de expresión y no aún a elucidar la función que esta proteína tiene en la determinación sexual termosensible.

En la tortuga *Chelydra serpentina*, también conocida por su nombre común como tortuga lagarto, los experimentos de Rehn et al. (2010) han sido de gran importancia. Su equipo logró secuenciar el gen *Cirbp*, se analizó su expresión, por PCR en tiempo real, en gónadas de embriones incubados a TM (26.5°C) y en gónadas de embriones en un experimento de intercambio. Para el experimento de intercambio se incubaron los embriones hasta etapa 16 a TM y se cambiaron a TF (31°C) por 6 días, posteriormente se regresó a los embriones a TM y se analizó la expresión de *Cirbp* en días posteriores. Todos los embriones en el experimento de intercambio se desarrollaron como hembras y el nivel de expresión de *Cirbp* fue más alto en los embriones expuestos al intercambio, la temperatura indujo el cambio en la expresión de *Cirbp*. La gráfica con los resultados reportados por Rehn et al. (2010) se puede observar en la figura G.

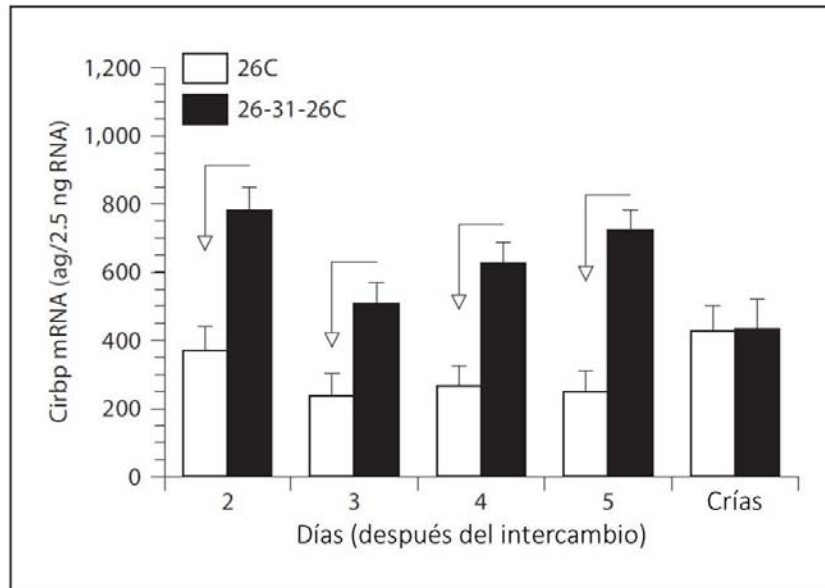


Figura G. Expresión de *Cirbp* en gónadas de embriones de tortuga lagarto (*Chelydra serpentina*) y en crías. Temperatura masculinizante (26 °C), experimento de intercambio: 26 °C hasta etapa 16, cambio 6 días a temperatura feminizante (31 °C) y regreso a 26 °C (26-31-26C). Se analiza la expresión 2, 3, 4 y 5 días después del experimento de intercambio. (Rehn et al., 2010).

En el Caimán americano (*Alligator mississippiensis*) también se logró secuenciar el gen *Cirbp*. El equipo de Kohno et al. (2009) hizo un análisis de expresión de distintas proteínas de shock térmico, incluyendo a CIRBP. Mediante PCR en tiempo real, se analizó la expresión del gen *Cirbp* en gónada, glándula adrenal y mesonefros de machos y hembras de crías de *Alligator mississippiensis* de un mes de edad. En su análisis no encontraron diferencias significativas en los tres órganos analizados en esta edad. En la figura H se puede observar la gráfica reportada por Kohno et al. (2009).

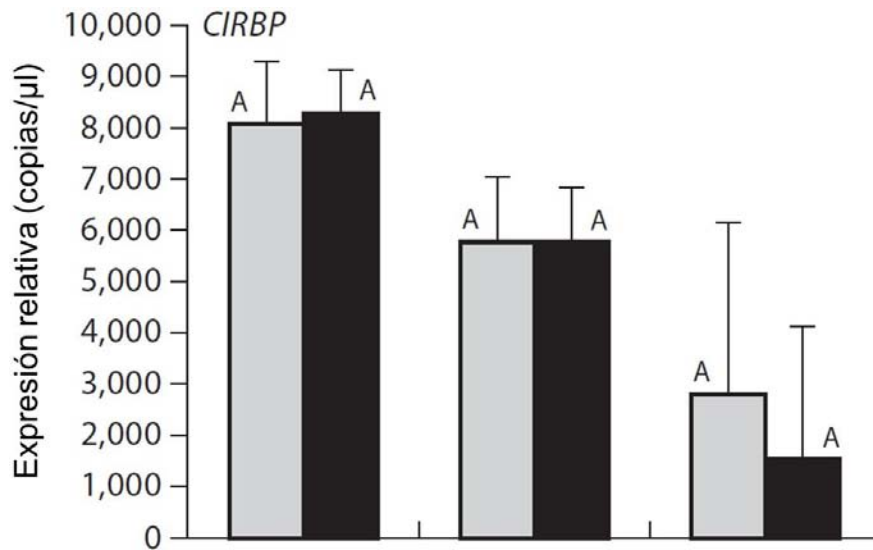


Figura H. Análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de *Cirbp* en gónada (izquierda), glándula adrenal (en medio) y mesonefros (derecha) de crías de *Alligator mississippiensis*. Modificada de Kohno et al. (2009).

En la totuga marina *L. olivacea* aún no se ha publicado la secuencia del gen *Cirbp*, tampoco se han hecho trabajos para establecer el perfil de expresión de este gen en gónadas. Es importante reportar la secuencia de este gen en la tortuga golfina para poder hacer experimentos de expresión en las gónadas de este organismo, para poder ver si está involucrado en la determinación o diferenciación sexual termosensible.

Cbx2

CBX2 es una proteína que pertenece al grupo de proteínas Polycomb (PcG) el cual fue identificado como un grupo de proteínas reguladoras de los genes *Hox* en *Drosophila melanogaster*, se ha comprobado que están conservados en Metazoarios, desde invertebrados hasta mamíferos, así como en plantas (Henning et al, 2009).

En mamíferos las proteínas Polycomb funcionan en 2 principales complejos: PRC1 (Polycomb-Repressive complex 1) y PRC2 (Polycomb-Repressive complex 2) (Kato-Fukui et al., 2012), ambos regulan la expresión de genes involucrados en

proliferación y desarrollo (Tardat et al., 2015) mediante la actividad enzimática que poseen para la modificación de histonas (Zehn et al., 2014). PRC1 cataliza la monoubiquitinación de la histona H2A en la lisina 19 (H2AK119ub1) y el complejo PRC2 cataliza la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3) (Tardat et al., 2015).

La composición de los complejos PRC1 y PRC2 es muy diversa, el complejo PRC1 está compuesto por cuatro diferentes ortólogos: CBX (polycomb), PCGF (polycomb group factor), HPH (human polyhomeotic homolog) y la ligasa E-3 (RING) (Gil et al., 2014). A su vez estas proteínas tienen varios ortólogos lo que resulta en una composición muy diversa en los complejos PRC1, en la figura I se puede observar una representación del complejo PRC1.

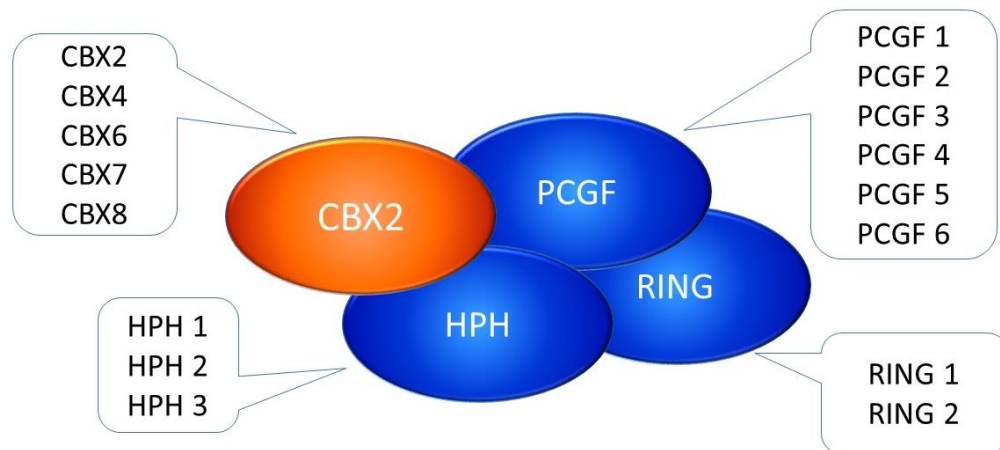


Figura I. Componentes del complejo PRC1 canónico en mamíferos. El componente principal son las proteínas CBX2 (modificada de Gil et al., 2014)

El componente principal de los complejos PRC1 son las proteínas CBX las cuales son responsables de que este complejo pueda unirse a la cromatina. Las proteínas CBX interactúan físicamente, mediante su cromodominio, con H3K27me3 para reclutar a PRC1 en regiones específicas de la cromatina (Ma et al., 2014) y se cree que cada proteína CBX tiene una función biológica distinta (Vandamme et al., 2011).

Dentro de las proteínas CBX se encuentra la proteína CBX2 (Chromobox Protein Homolog 2) y en comparación con el resto de las proteínas CBX, CBX2 parece tener un papel muy importante en el desarrollo ya que el genotipo *Cbx2*^{-/-} produce el fenotipo más severo (Gil et al., 2014), además se ha demostrado, en zigotos de ratón, que el mecanismo de unión de PRC-1 a la cromatina depende de CBX2 y su cromodominio (Tardat et al., 2015).

Las funciones de esta proteína se han estudiado principalmente en ratones knockout o en pacientes humanos con mutaciones en este gen. En ratones knockout de *Cbx2* se observan distintas anomalías en el desarrollo (MA et al., 2014), una de las más relevantes es la reversión de sexo de macho a hembra, además de la presencia de gónadas hipoplásicas, estos datos indican que *Cbx2* tiene un papel importante en la determinación y diferenciación sexual. En hembras, se observan ovarios pequeños en comparación con los ovarios del fenotipo silvestre y en algunos casos ausencia de los mismos (Gil et al., 2014). En humanos se ha observado un fenotipo similar, en una mujer, con útero y ovarios histológicamente normales, se encontró un cariotipo XY con 2 mutaciones puntuales en el gen *Cbx2* (Biaison-Lauber et al., 2009) lo cual también sugiere su importancia en la determinación sexual en humanos.

La proteína CBX2 tiene un papel importante en el desarrollo de las células germinales, se ha identificado que tiene funciones importantes en el inicio de la meiosis y en la sinapsis de cromosomas homólogos en la línea germinal de mamíferos (MA et al., 2014). En el trabajo realizado por Katoh-Fukui et al. (2012) se observó que CBX2 tiene un papel muy importante en la expresión del gen *Sry* en testículos de ratón, los ratones Knock out de *Cbx2* tuvieron una importante disminución en la expresión de *Sry* en testículo, así como de otros genes involucrados en la diferenciación y determinación de la gónada como *Gata4* y *Dax1*.

En algunos organismos con determinación sexual termosensible ya se ha reportado la secuencia del gen *Cbx2* como en la tortuga marina *Chelonia mydas* pero aún no se han publicado trabajos con respecto al perfil de expresión de este gen. En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* aún no se reporta la secuencia de

este gen, por lo cual es importante realizar experimentos para encontrar esta secuencia en el genoma de la tortuga golfina y ver si este gen está involucrado en la determinación y diferenciación sexual en este organismo.

JUSTIFICACIÓN.

La importancia de estudiar los patrones de expresión génica en gónadas durante la determinación sexual termosensible en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* radica en la necesidad de establecer una red molecular de este evento biológico ya que aún no se ha identificado con claridad el factor responsable de la respuesta a la temperatura durante este proceso.

Los genes *Dmrt1*, *Sox9*, *Cirbp* y *Cbx2* están involucrados en la diferenciación y determinación sexual de mamíferos y otros organismos y sus secuencias no han sido reportadas en la tortuga marina *L. olivacea*. Es importante buscar las secuencias de estos 4 genes en este organismo para poder establecer, mediante métodos cuantitativos, un perfil de expresión en gónadas durante el desarrollo embrionario de la tortuga golfina y determinar si están involucrados o no en los procesos de determinación o diferenciación sexual en este organismo.

HIPÓTESIS.

En *L. olivacea* la expresión diferencial de los genes *Dmrt1*, *Sox9*, *Cirbp* y *Cbx2* en la gónada está relacionada con el proceso de diferenciación y determinación sexual termosensible en esta especie.

OBJETIVO GENERAL.

Relacionar los perfiles de expresión en gónada de genes *Dmrt1*, *Sox9*, *Cirbp* y *Cbx2* con la determinación y diferenciación sexual termosensible en la tortuga marina *L. olivacea*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Buscar e identificar las secuencias de los genes *Dmrt1*, *Cirbp* y *Cbx2* en el genoma de *L. olivacea*.
2. Establecer el perfil de expresión de los genes *Dmrt1*, *Sox9*, *Cirbp* y *Cbx2* en gónadas de *L. olivacea* durante etapas embrionarias sexualmente indeterminadas (23 y 24) en el periodo termosensible (25) y en etapas sexualmente determinadas (26, 27 y 28) mediante PCR en tiempo real.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales.

Se recolectaron 5 nidos de tortuga *L. olivacea* en la playa la escobilla, Oaxaca, México. Dos nidos fueron colectados el día 10 de abril del año 2014 y 3 nidos fueron colectados el día 22 de Diciembre del año 2014. Al llegar al laboratorio cada nido fue dividido al azar en 2 lotes, un lote de cada nido se incubó a temperatura masculinizante, TM (26°C) y el lote restante se incubó a temperatura feminizante, TF (33°C). Se extrajeron las gónadas mediante disección de los embriones en etapas sexualmente indeterminadas (24 y 23) y en etapas sexualmente determinadas (24 a 28) tanto para embriones incubados a TM como para TF. Se usó la edad del embrión en días post-desove (DPD) y la temperatura de incubación para predecir la etapa de desarrollo de acuerdo a la tabla 1 del apéndice. El número de embriones utilizados por etapa para la extracción de RNA se indica en la tabla 2 del apéndice

Registro de temperaturas.

El registro de temperaturas en las incubadoras tanto de temperatura masculinizante (26°C) como de temperatura feminizante (33°C) se llevó a cabo introduciendo en cada incubadora un dispositivo medidor de temperatura HOBO 64K Pendant® (Onset®), el dispositivo registró las temperaturas desde el inicio de la incubación. Se programó para registrar la temperatura cada 30 minutos durante toda la incubación y los datos fueron recolectados cada 20 días hasta el término de la incubación.

Extracción de RNA y transcripción reversa.

Las gónadas de los embriones fueron colocadas en RNAlater® Stabilization Solution (ambion by Life Technologies) a 4°C y procesadas un día después de la disección. La extracción de RNA total fue realizada con TRIzol® Reagent (Life

technologies, Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Cada una de las muestras de RNA fueron tratadas con 2U de TURBO DNA-free™ (ambion by Life Technologies) para evitar la contaminación con DNA genómico, se siguió el protocolo descrito por el proveedor modificando únicamente el tiempo de incubación, cada muestra se incubó 50 minutos a 37 °C. La concentración de las muestras de RNA fue medida usando el equipo NanoDrop (Thermo Scientific) y la integridad del RNA se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% usando 300 ng de RNA total, un ejemplo de los geles de RNA se pueden observar en el apéndice en la Imagen 1, se puede observar la integridad del RNA extraído. La transcripción reversa se realizó con la enzima Transcriptor Reverse Transcriptasa (Roche) usando oligo dT (18) de Thermo Scientific. Se utilizó 1µg de RNA total para la síntesis de cDNA siguiéndose el protocolo especificado en el kit de la enzima.

Se sintetizaron 3 cDNAs diferentes para TM y TF:

- cDNA 1. Sintetizado a partir del RNA extraído de las gónadas de los embriones del nido recolectado abril del 2014.
- cDNA 2. Sintetizado a partir del RNA extraído de las gónadas de los embriones de los nidos 1 y 2 recolectados en diciembre de 2014.
- cDNA 3. Sintetizado a partir del RNA extraído de las gónadas de los embriones de los nidos 1 y 3 recolectados en diciembre de 2014.

RT-PCR.

Para comprobar que la retrotranscripción se llevó a cabo adecuadamente se realizó una reacción de PCR para amplificar GAPDH por cada una de las muestras de cDNA obtenidas. Para las reacciones se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de amplificación se hicieron en un volumen de 20µL (dNTP 0.2mM cada uno, MgCl₂ 3mM, Oligonucleótidos 0.2 mM cada uno, cDNA 0.8µL (40 µg), Polimerasa 0.4U y Buffer de reacción 1X el cual contiene en concentración 10X: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM NaCl, 2 mM Sodium

Phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizers, 50% (v/v) glycerol). Las condiciones de amplificación para cada gen se encuentran en la tabla 3 del apéndice.

Diseño de oligonucleótidos.

Al no haber secuencias reportadas para los genes *Dmrt1*, *Cirbp*, *Cbx2* y *Gapdh*, en *L. olivacea*, los oligonucleótidos para amplificar estos genes fueron diseñados alineando secuencias ya reportadas de distintos organismos emparentados con *L. olivacea* (*Chelonia mydas*, *Chrysemys picta*, *Trachemys scripta*, *Pelodiscus sinensis*), los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las regiones más conservadas. Los alineamientos se hicieron con el programa bioinformático “Clustal Omega” (Link: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), los alineamientos usados para cada gen se muestran en la sección de alineamientos del Apéndice.

Para el diseño de los oligonucleótidos para amplificar *Sox9* se usó la secuencia reportada para la tortuga *L. olivacea* en GenBank. Las secuencias de los oligonucleótidos y sus condiciones de amplificación se encuentran en la tabla 4 del apéndice. Los oligonucleótidos se mandaron a sintetizar en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Secuenciación para la región 5'-UTR de *Dmrt1* y exón 2 de *Dmrt1*.

Se realizó una amplificación por PCR de la región 5'-UTR de *Dmrt1* y del exón 2 de *Dmrt1* con la enzima Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) en reacciones de amplificación de 25µL (dNTP 0.2mM cada uno, MgCl₂ 1.5mM, oligonucleótidos 0.2 mM cada uno, DNA genómico 500ng, Polimerasa 0.5U y Buffer de reacción 1X el cual en concentración 10X contiene: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM NaCl, 2 mM Sodium Phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizers, 50% (v/v) glycerol). Los oligonucleótidos utilizados y sus condiciones de reacción se encuentran descritos en la tabla 3 del apéndice. Las reacciones se corrieron por 30

minutos en un gel de agarosa al 1%, se purificó la banda del amplificado de PCR con el kit QIAquick PCR Purification (Quiagen). El producto de PCR purificado se clonó en el vector pGEM®-T (promega) utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (promega) siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Se realizó la transformación de bacterias *E. coli* top10 quimiocompetentes con el producto de la ligación, se sembraron en agar LB (Luria-Bertani) sólido adicionado con ampicilina (100µg/ml), previo a la siembra de las bacterias transformadas, al agar sólido se distribuyó en la superficie 100µl de IPTG 100mM y 20µl de X-Gal 50mg/ml, después de inocular el medio con las bacterias transformadas, se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron 6 colonias blancas para la región 5'-UTR y para el exón 2, cada colonia se utilizó para inocular un tubo con 3mL de medio LB líquido, se dejó incubar en agitación constante toda la noche. Para extraer los plásmidos de las bacterias se utilizó el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche) siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Para cerciorar que el inserto se encontraba presente en los plásmidos, se hizo una doble digestión con las enzimas SacI y NcoI (New England Biolabs) para liberar el inserto, la digestión se dejó a 37 °C toda la noche y se corrió en un gel de agarosa al 1% por 30 minutos. Las muestras con inserto se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se analizaron las secuencias obtenidas con la herramienta BLAST del NCBI para comprobar su identidad.

Secuenciación del mRNA parcial de los genes *Cirbp* y *Cbx2*.

Para cada gen se realizó una amplificación por PCR usando los oligonucleótidos la enzima Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) en reacciones de amplificación de 20µL con las mismas condiciones para ambos genes (dNTP 0.2mM cada uno, MgCl₂ 3mM, Oligonucleótidos 0.2mM cada uno, cDNA 1µL, Polimerasa 0.4U y Buffer de reacción 1X el cual en concentración 10X contiene: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM NaCl, 2 mM Sodium Phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizers, 50% (v/v) glycerol)). Los oligonucleótidos utilizados y sus condiciones de amplificación se encuentran en la tabla 3 del apéndice, para el gen

Cirbp se usaron los de amplicón de 200 pares de bases, para Cbx2 se usaron los de amplicón de 469 pares de bases. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.5 % durante 30 minutos, el amplicón se purificó usando el kit QIAquick PCR Purification (Quiagen). El producto de PCR purificado se envió a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con la herramienta BLAST del NCBI para comprobar su identidad.

PCR en tiempo real.

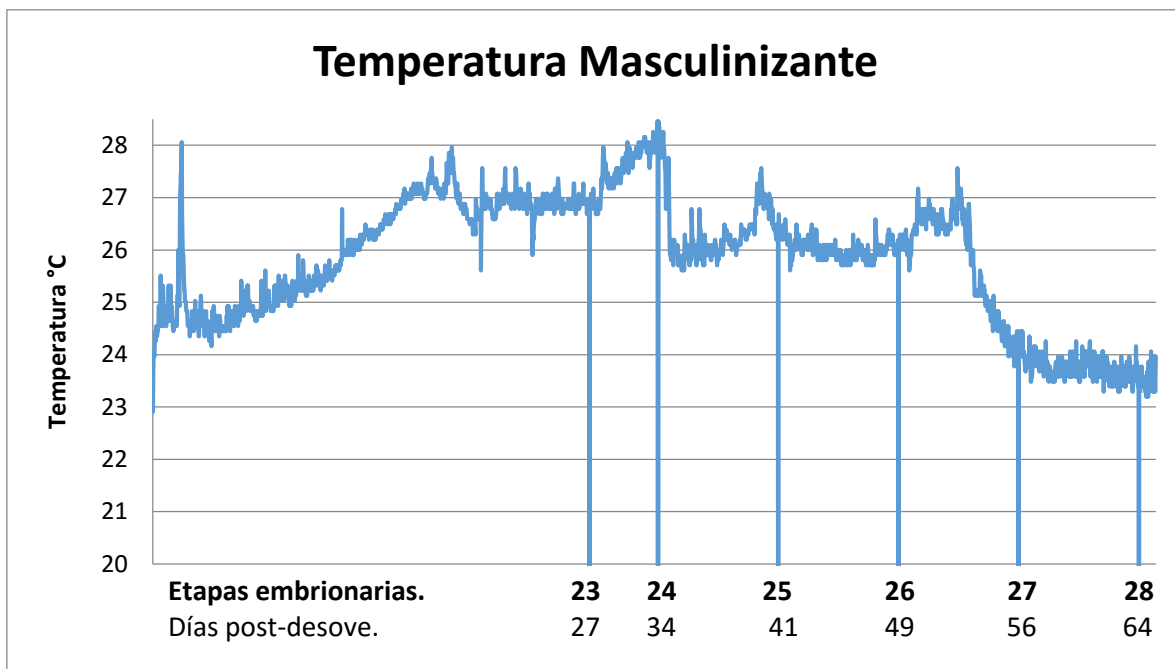
Para estandarizar las mejores condiciones de reacción, para cada gen se probaron 3 concentraciones diferentes de oligonucleótidos (0.2 μ M, 0.4 μ M y 0.8 μ M) y 3 condiciones de cDNA (1 μ L, 2 μ L y 3 μ L de cDNA total en la reacción que respectivamente corresponden a 50, 100 y 150 μ g de cDNA) en reacciones de PCR de 25 μ L, se usó SYBR® Green (Sigma Aldrich) como fluoróforo. Las condiciones óptimas para cada gen se encuentran en la tabla 5 del apéndice.

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR en tiempo real para los genes *Dmrt1*, *Sox9*, *Cirbp* y *Cbx2* para Temperatura Masculinizante y Feminizante, usando como control endógeno la expresión de *Gapdh*. Para la amplificación se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Las reacciones se hicieron en un volumen de 25 μ L (Buffer de reacción 1X, dNTPs 0.2mM cada uno, MgCl₂ 3mM, cDNA 1 μ L, Polimerasa 0.4U, SYBR Green 0.16x). La expresión relativa de los genes *Dmrt1*, *Sox9*, *Cirbp* y *Cbx2* fue cuantificada por el método de comparación de Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Las condiciones de amplificación de cada gen se encuentran indicadas en la tabla 3 del apéndice, se realizaron 40 ciclos de amplificación para todos los genes. Se realizaron experimentos con 2 cDNAs diferentes para cada gen, con cada cDNA se hicieron experimentos por triplicado quedando 6 datos por cada etapa de desarrollo muestreada. Ejemplos de las curvas de disociación y de la curva de amplificación pueden observarse en las imágenes 2 y 3 del apéndice.

RESULTADOS.

Temperaturas de incubación.

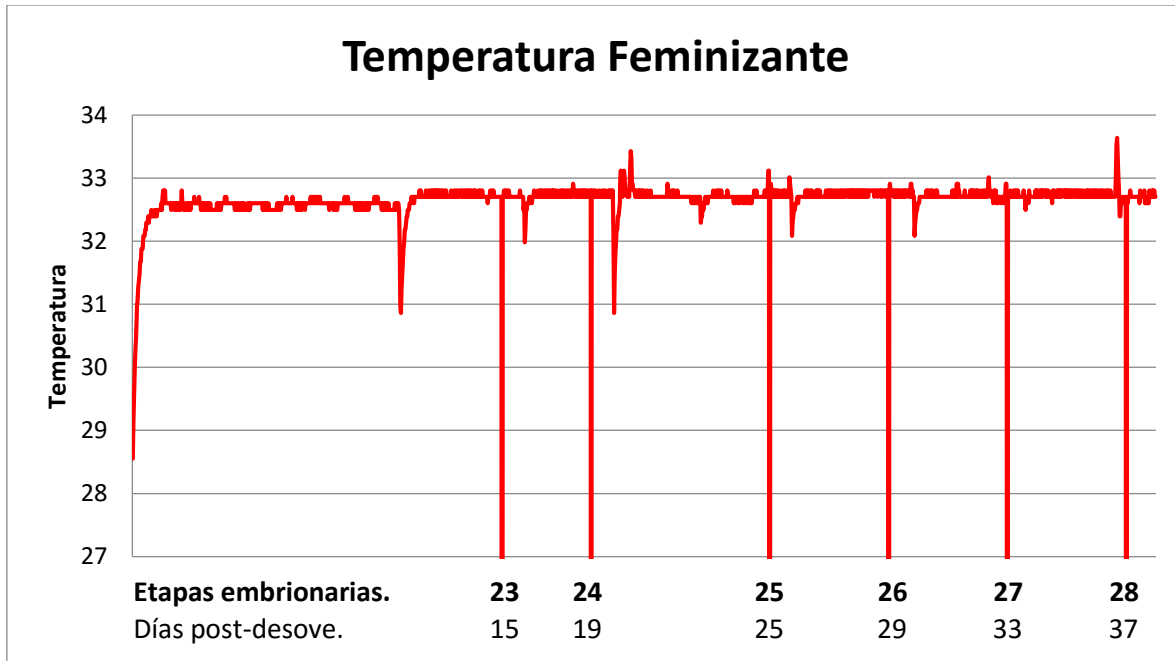
La temperatura de incubación durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea* es muy importante ya que en base a las temperaturas registradas de las incubadoras a TM y a TF se puede asegurar que los embriones se están desarrollando como machos o como hembras respectivamente. En la gráfica 1 se pueden observar las temperaturas de la incubadora de temperatura masculinizante. Las temperaturas oscilaron alrededor de los 26°C. El promedio de temperatura de toda la incubación fue 25.7°C. Se puede asegurar que los embriones se desarrollaron como machos ya que la temperatura nunca alcanzó la temperatura pivote (30-31°C).



Gráfica 1. Registro temperatura masculinizante. Temperaturas registradas del día de incubación 1 hasta el 68; las líneas verticales indican la fecha en la que se realizó la disección para cada etapa, de la etapa 23 a la etapa 28.

En la gráfica 2 se observa el registro de temperaturas en la incubadora de temperatura feminizante, las temperaturas oscilaron alrededor de los 33°C. La

temperatura promedio en la incubación fue de 32.5°C. Se puede asegurar que los embriones se desarrollaron como hembras ya que la temperatura nunca se acercó a la temperatura pivote (30-31°C).



Gráfica 2. Registro de temperatura feminizante. Temperaturas registradas del día de incubación 1 hasta el 40; las líneas verticales indican la fecha en la que se realizó la disección para cada etapa, de la etapa 23 a la etapa 28.

Secuencia del exón 2 de *Dmrt1*.

Se obtuvo una secuencia de 140 pares de bases del exón 2 de *Dmrt1*, la cual se puede encontrar en la sección de secuencias del apéndice. Esta secuencia se analizó con la herramienta BLAST® del NCBI. Los resultados arrojaron similitudes de casi del 100% de identidad como se puede observar en la figura 2. Se muestran las identidades de la secuencia reportada del gen *Dmrt1* con otras secuencias de este gen reportadas en otros organismos, incluyendo reptiles con determinación sexual termosensible como las tortugas *Chrysemys picta* (Jandegain et al., 2015) y *Chelonia mydas* (Rowena et al., 2013), se incluyen los primeros 5 resultados arrojados por BLAST, la tabla original se encuentra en la tabla 3 del apéndice.

Description	Ident	Accession
PREDICTED: <i>Chelonia mydas</i> doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	99%	XM_007065580.1
<i>Lepidochelys olivacea</i> doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt-1) mRNA, partial cds	99%	AF335421.1
PREDICTED: <i>Chrysemys picta bellii</i> doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	98%	XM_005296762.1
<i>Chrysemys picta</i> doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt1) mRNA	98%	FJ791118.1
PREDICTED: <i>Pelodiscus sinensis</i> doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (LOC102462572), mRNA	97%	XM_006137866.2

Figura 2. Análisis de la secuencia del exón 2 de *Dmrt1* con BLAST®.

De la secuencia obtenida del exón 2 del gen *Dmrt1* se hizo la traducción con el programa DNAMAN de Lynnon Biosoft, se obtuvo una secuencia de 46 aminoácidos:

>DMRT1, *L. olivacea*.

VALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPELFVKKENNGGSSCLLLESSS

Con esta secuencia reportada se hizo un alineamiento de con las proteínas DMRT1 reportadas para las tortugas *Chelonia mydas*, *Chrisemys picta* y *Pelodiscus sinensis*. Como se puede observar en el alineamiento del cuadro 1, la identidad es casi del 100% con las especies comparadas.

Cuadro 1. alineamientos de la proteína DMRT1	
L. olivacea	VALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPELFVKKENNGGSSCLLLESSS
C. mydas	VALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPELFVKKENNGGSSCLLENSS
C. picta	VALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPELFVKKENNGGSSCLLLESSS
P. sinensis	VALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAPELFVKKENNGGSSCLLLESSS
	*****. **

Se hizo un análisis de la secuencia de aminoácidos con la herramienta BLAST® del NCBI. Se encontraron identidades de más del 98 % comparada con secuencias de la proteína DMRT1 en otras tortugas como se puede observar en la figura 3. Se encuentran identidades de la secuencia obtenida con secuencias reportadas de la proteína DMRT1 en otros organismos, se incluyen los primeros 5 resultados arrojados por BLAST, la tabla original se encuentra en la tabla 6 del apéndice.

Description	Ident	Accession
Dmrt1 [Podocnemis expansa]	100%	AJC64536.1
Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Chrysemys picta]	100%	ACY71138.1
Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Apalone mutica]	100%	ACY71139.1
Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Staurotypus triporcatus]	98%	BAM99005.1
RecName: Full=Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1	98%	P57690.1

Figura3. Análisis de la traducción del exón 2 del gen *Dmrt1*.

Secuencia de 5'-UTR del gen *Dmrt1*.

Se obtuvo una secuencia de 972 pares de bases de la región 5'-UTR del gen *Dmrt1* en la tortuga *L. olivacea*, la cual se puede consultar en el apéndice en la sección de secuencias.

Al hacer el análisis con la herramienta BLAST® (Figura 4) se encontró una identidad del 90% con la región promotora del gen *Dmrt1* reportada para *Trachemys scripta elegans*, una tortuga con determinación sexual termosensible (Shoemaker et al., 2009). Además, también se encontraron identidades de más del 80% con secuencias del mRNA reportadas para otros organismos con determinación sexual termosensible como las tortugas *Chrysemys picta* (Jandegain et al., 2015) y *Chelonia mydas* (Rowena et al., 2013), se incluyen los primeros 5 resultados arrojados por BLAST, la tabla original se encuentra en la tabla 7 del apéndice.

Description	Ident	Accesion
Trachemys scripta elegans Dmrt1 (Dmrt1) gene, promoter region and partial cds	90%	KJ583239.1
PREDICTED: Chelonia mydas doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	98%	XM_007065580.1
Mauremys reevesii DMRT1 mRNA for doublesex- and mab-3 related transcription factor 1, complete cds	92%	AB365876.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	96%	XM_005296762.1
Pelodiscus sinensis doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (LOC102462572), mRNA	84%	NM_001317047.1

Figura 4. Análisis de la secuencia de la región 5'-UTR del gen *Dmrt1* con BLAST®.

Secuencia del mRNA parcial del gen *Cirbp*.

Se obtuvo una secuencia de 201 pares de bases del mRNA parcial del gen *Cirbp* de *L. olivacea*, la cual se puede consultar en el apéndice, en la sección de secuencias. Esta secuencia se analizó con BLAST® (Figura 5) y se encontraron identidades de más del 90% con secuencias reportadas para el gen *Cirbp* en otros organismos, incluyendo tortugas con determinación sexual termosensible *Chrysemys picta* (Jandegain et al., 2015) y *Chelonia mydas* (Rowena et al., 2013).

Description	Ident	Accesion
PREDICTED: Chelonia mydas cold-inducible RNA-binding protein-like (LOC102943926), mRNA	99%	XM_007057938.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X2, mRNA	98%	XM_005302337.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X1, mRNA	98%	XM_005302336.1
PREDICTED: Pelodiscus sinensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X2, mRNA	96%	XM_014574548.1
Pelodiscus sinensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X1, mRNA	96%	XM_006124966.2

Figura 5. Análisis de la secuencia del mRNA parcial de *Cirbp* de *L. olivacea* con BLAST®. (La tabla original se encuentra en la tabla 8 del apéndice).

La secuencia obtenida del mRNA parcial del gen *Cirbp* fue traducida con el programa DNAMAN de Lynnon Biosoft, se tradujo una secuencia de 67 aminoácidos.

>CIRBP, *L. olivacea*.

DTNEQSLEQVFSKYGQISEVVVVKDRETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNG
KSVDGRQIRVDQA

Con la secuencia reportada en *L. olivacea* se hizo un alineamiento de con las proteínas CIRBP reportadas para las tortugas *Chelonia mydas*, *Chisemys picta* y *Pelodiscus sinensis*. Como se puede observar en el alineamiento del cuadro 2, la identidad es del 100% con las especies comparadas.

Cuadro 2. Alineamientos de la proteína CIRBP	
L.olivacea	DTNEQSLEQVFSKYGQISEVVVVKDRETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGKSVDGR
C.mydas	DTNEQSLEQVFSKYGQISEVVVVKDRETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGKSVDGR
C.picta	DTNEQSLEQVFSKYGQISEVVVVKDRETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGKSVDGR
P.sinensis	DTNEQSLEQVFSKYGQISEVVVVKDRETQRSRGFGFVTFENIDDAKDAMMAMNGKSVDGR

L.olivacea	QIRVDQA
C.mydas	QIRVDQA
C.picta	QIRVDQA
P.sinensis	QIRVDQA

Se hizo un análisis de la secuencia con la herramienta BLAST® del NCBI. Se encontraron similitudes del 100% entre la secuencia de aminoácidos encontrada y las reportadas de distintos organismos para la proteína CIRBP, se incluyen los primeros 5 resultados arrojados por BLAST, la tabla original se encuentra en la tabla 9 del apéndice.

Description	Ident	Accesion
Chain A, Solution Structure Of Rrm Domain In A18 Hnrnp	100%	1X5S_A
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X3 [Merops nubicus]	100%	XP_008940554.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein [Camelus ferus]	100%	XP_006195343.2
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X2 [Ornithorhynchus anatinus]	100%	XP_007657983.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X1 [Anolis carolinensis]	100%	XP_003230040.1

Figura 6. Análisis con BLAST® de la secuencia traducida a partir del mRNA parcial del gen *Cirbp*.

Además de encontrar similitudes con otras secuencias reportadas de la proteína CIRBP en otros organismos, el análisis con BLAST® encontró en la secuencia de aminoácidos un dominio conservado (Figura 7), perteneciente a la familia de motivos de reconocimiento de RNA (RRM, por sus siglas en inglés, RNA Recognition Motif).

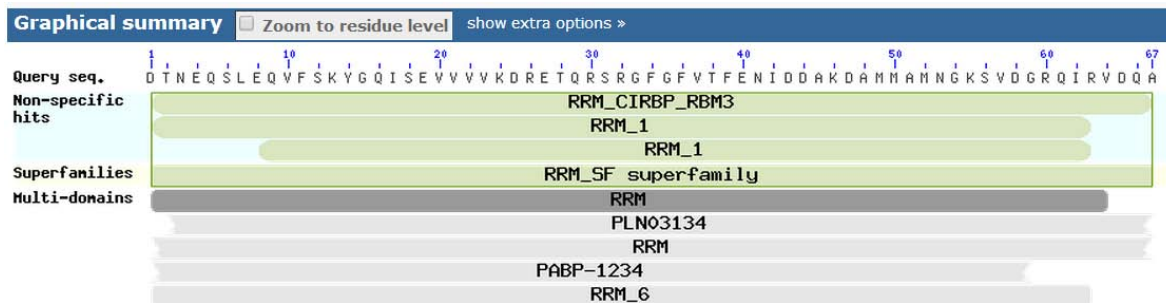


Figura 7. Dominios conservados encontrados en la secuencia reportada de la proteína CIRBP de *L. olivacea*.

Secuencia del mRNA parcial del gen *Cbx2*.

Se obtuvo una secuencia de 429 pares de bases del mRNA parcial del gen *Cbx2* de *L. olivacea* la cual se puede consultar en el apéndice en la sección de secuencias. La secuencia obtenida fue analizada con BLAST® (Figura 8), se encontraron similitudes con secuencias reportadas del gen *Cbx2* de distintos organismos,

incluyendo tres tortugas con determinación sexual termosensible: *Chrysemys picta*, *Chelonia mydas* y *Pelodiscus sinensis*.

Description	Ident	Accesion
PREDICTED: Chelonia mydas chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	99%	XM_007056062.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	97%	XM_005283137.1
PREDICTED: Pelodiscus sinensis chromobox homolog 2 (CBX2), partial mRNA	87%	XM_014572072.1
PREDICTED: Gavia stellata chromobox protein homolog 2-like (LOC104254060), partial mRNA	84%	XM_009807709.1
PREDICTED: Fulmarus glacialis chromobox protein homolog 2-like (LOC104077366), partial mRNA	84%	XM_009578569.1

Figura 8. Análisis de la secuencia del mRNA parcide *Cbx2* de *L. olivacea* con BLAST®. La tabla original se encuentra en la tabla 10 del apéndice.

Se tradujo la secuencia del mRNA parcial del gen *Cbx2* con el programa DNAMAN de Lynnon Biosoft obteniéndose una secuencia de 142 aminoácidos.

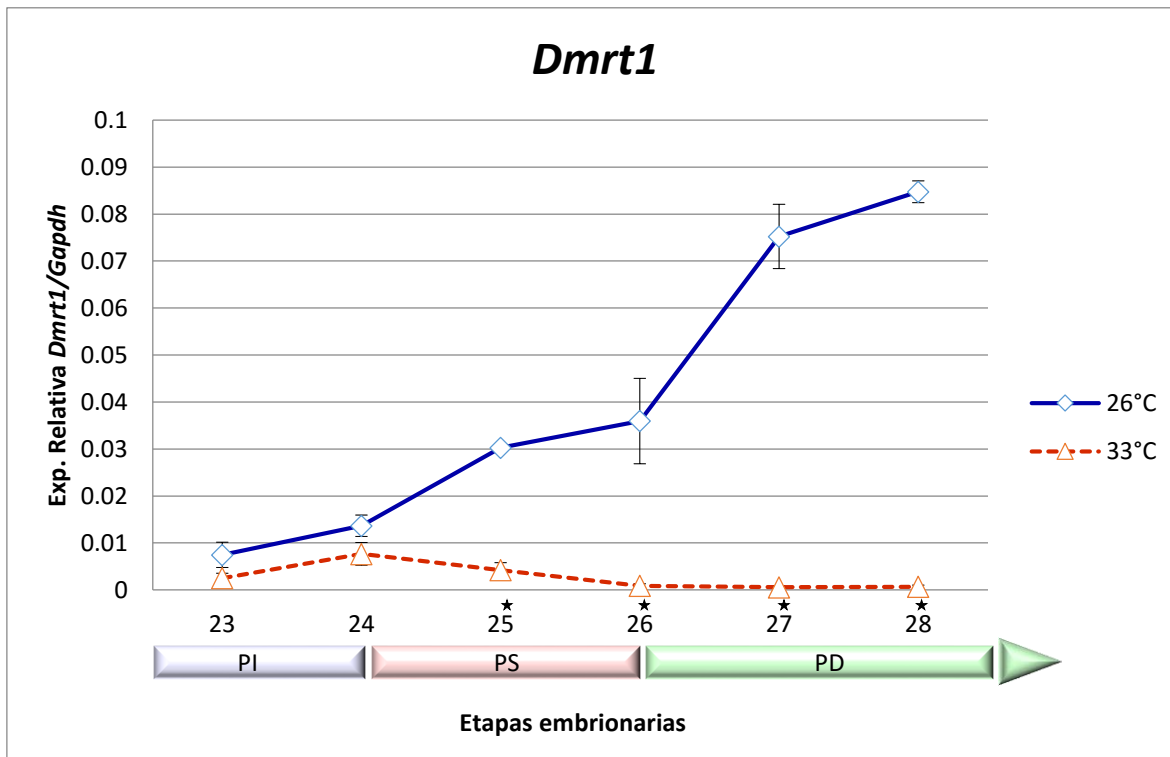
>CBX2, *L. olivacea*.

```
IKSSSSSSSTSSSSSSSDEEDESLEAKRGPRSRETHPVPQKKAQILVAKPEIKDP
VRKKRGRKPLPPEQKAARRTMNVAKVLKTTTRKETGGGSKLMGKLQPQHNAQGS
GIAVLKSNVKEPQSALSGLGPGGLSAENLPNIR
```

Se hizo un alineamiento de esta secuencia con las proteínas CBX2 reportadas para las tortugas *Chelonia mydas*, *Chrysemys picta* y *Pelodiscus sinensis* (Cuadro 3) en el que se observó un alineamiento de con más del 85% de similitudes.

El gen *Dmrt1* tiene una expresión dimórfica en etapas posteriores al periodo de sexo indeterminado en gónadas de *L. olivacea*.

La gráfica 3 muestra el perfil de expresión del gen *Dmrt1* en gónadas de *L. olivacea* realizado mediante PCR en tiempo real en 6 etapas del desarrollo embrionario en TM y TF. Se utilizó la prueba de Tukey como análisis estadístico, con una significancia del 5%, en cada etapa entre TM y TF. En etapas con sexo indeterminado: 23 y 24, el nivel de expresión de *Dmrt1* es similar en ambas temperaturas, no se encontraron diferencias significativas. Posteriormente a partir de la etapa 25 la expresión aumenta significativamente a TM y continúa aumentando hasta la etapa 28 donde alcanza la mayor expresión. Por el contrario, a TF el nivel de expresión va disminuyendo a partir de la etapa 25 y sigue disminuyendo en etapas posteriores. Estos resultados parecen indicar que el gen *Dmrt1* no participa en la determinación sexual en esta especie sino en la diferenciación sexual.

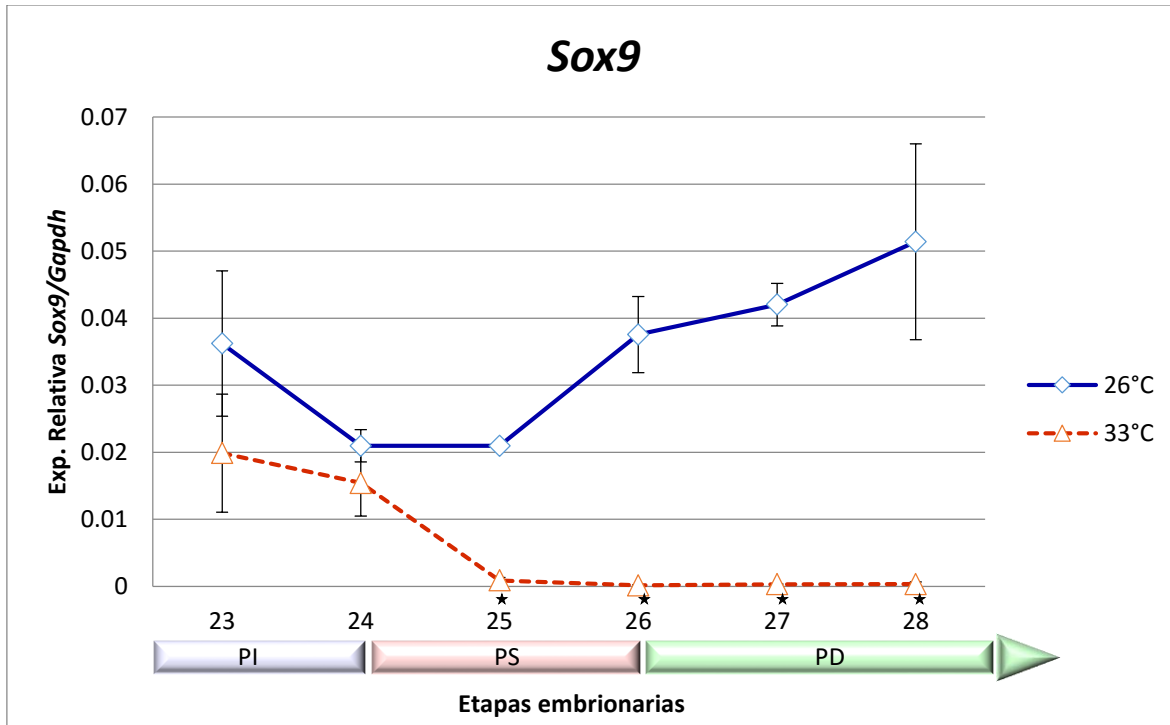


Gráfica 3. Perfil de expresión del gen *Dmrt1* en gónadas de embriones de *L. olivacea* incubados a TM 26°C (línea continua) y embriones incubados a TF 33°C (línea punteada). Las barras de error representan la desviación estándar. Se marcan con estrellas las etapas con diferencias significativas en la expresión entre TM y TF de acuerdo a la prueba de Tukey con significancia del 5%.

El perfil de expresión del gen *Sox9* sugiere su relación con el proceso de diferenciación sexual.

En la gráfica 4 se observa el perfil de expresión del gen *Sox9* realizado por PCR en tiempo real en gónadas de *L. olivacea* en 6 etapas embrionarias a TM y TF. En la etapa 23 y 24 el nivel de expresión es similar en TM y TF, posteriormente a TF a partir de la etapa 25 el nivel desciende drásticamente casi a cero, mientras que a TM la expresión de *Sox9* aumenta gradualmente hasta la etapa 28. Usando la prueba estadística de Tukey, con una significancia del 5%, se buscaron diferencias significativas en el nivel de expresión del gen *Sox9* entre TM y TF por cada etapa. En las etapas 23 y 24 no se encontraron diferencias significativas, mientras que en

las 5 etapas a partir del periodo sensible sí se encontraron diferencias, estos resultados sugieren que este gen está más relacionado con la diferenciación sexual que con la determinación sexual en esta especie.

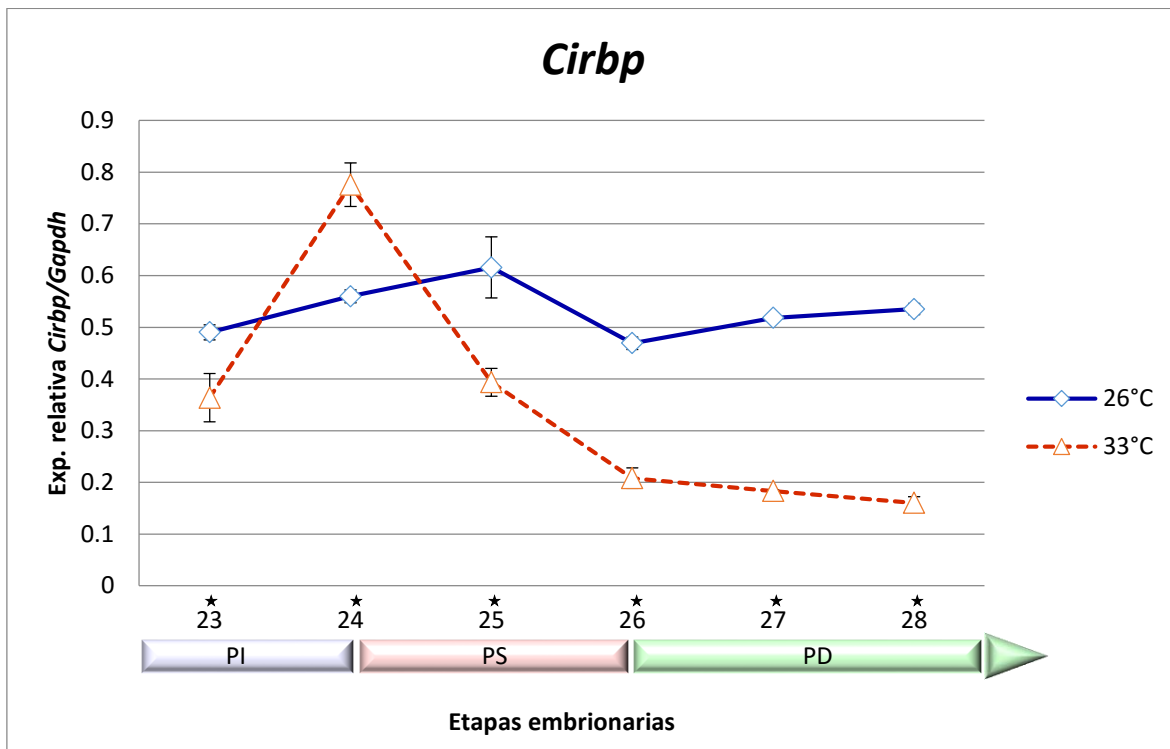


Gráfica 4. Perfil de expresión del gen *Sox9* en gónadas de embriones de *L. olivacea* incubados a TM 26°C (línea continua) y embriones incubados TF a 33°C (línea punteada). Las barras de error representan la desviación estándar. Se marcan con estrellas las etapas con diferencias significativas en la expresión entre TM y TF de acuerdo a la prueba de Tukey con significancia del 5%.

El gen *Cirbp* tiene una expresión dimórfica durante el periodo sexualmente indeterminado en gónadas de *L. olivacea*.

En la gráfica 5 se muestra el perfil de expresión del gen *Cirbp* en las 6 etapas embrionarias muestreadas de *L. olivacea*, el perfil fue realizado por PCR en tiempo real. Usando la prueba de Tuckey con una significancia del 5% se buscaron diferencias significativas en el nivel de expresión del gen *Cirbp* entre TM y TF, se encontraron diferencias significativas en las 6 etapas. El nivel de expresión a TM se

mantiene relativamente constante a lo largo del desarrollo, mientras que a TF presenta variaciones más notorias. A TF la expresión de *Cirbp* en etapa 23 es similar a la registrada para TM pero aumenta drásticamente en la etapa 24. Posteriormente la expresión disminuye gradualmente conforme avanza el desarrollo embrionario a TF llegando al nivel más bajo en etapa 28.

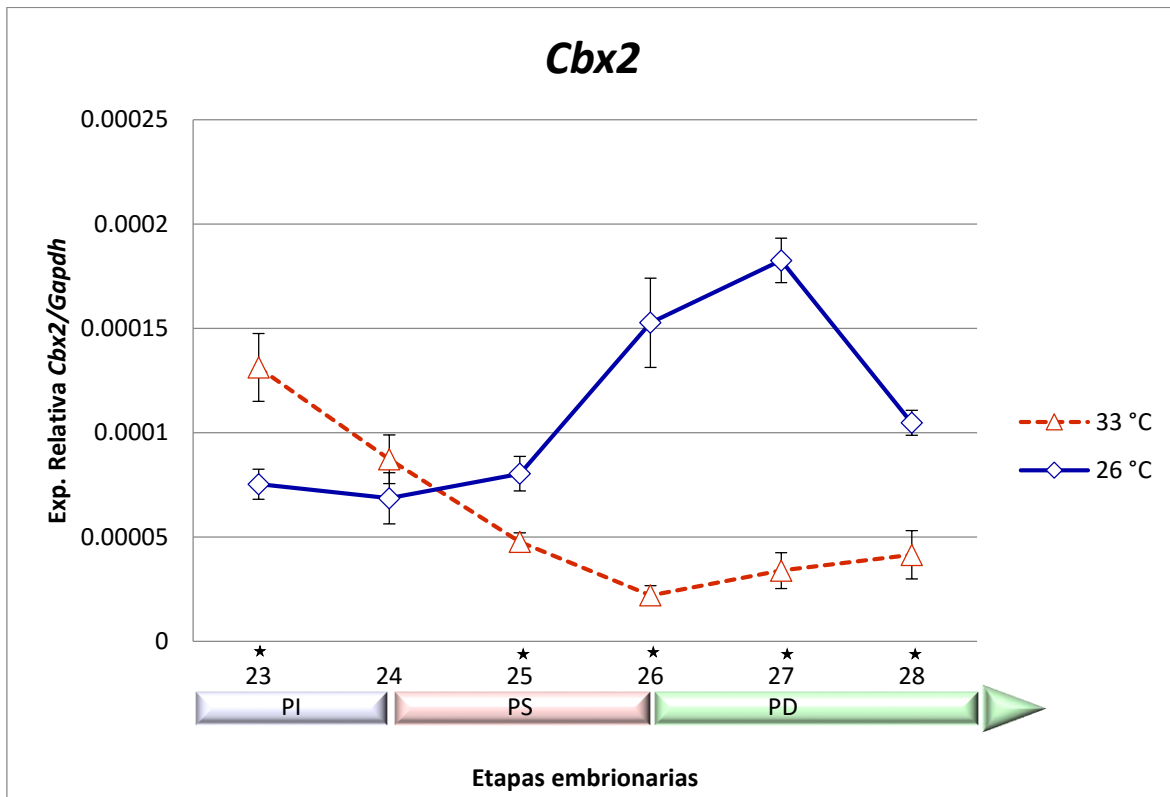


Gráfica 5. Perfil de expresión del gen *Cirbp* en gónadas de embriones de *L. olivacea* incubados a TM, 26°C, (línea continua) y embriones incubados a TF, 33°C, (línea punteada). Las barras de error representan la desviación estándar. Se marcan con estrellas las etapas con diferencias significativas en la expresión entre TM y TF de acuerdo a la prueba de Tukey con significancia del 5%.

El gen Cbx2 tiene una expresión dimórfica en gónadas de *L. olivacea* durante el periodo sexualmente indeterminado.

En la gráfica 6 se muestra el perfil de expresión del gen *Cbx2* realizado por PCR en tiempo real en las 6 etapas del desarrollo embrionario muestreadas en *L. olivacea*.

La expresión en etapa 23 es dimórfica, al igual que en las etapas 25 a 28. Diferencias significativas fueron encontradas en estas 5 etapas entre TM y TF usando la prueba de Tuckey con una significancia del 5%. En la etapa 24 no se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *Cbx2* entre TM y TF. Aunque las diferencias sean significativas en 5 de las 6 etapas muestreadas, el perfil de expresión dimórfico es más evidente en las etapas 26 a 28.



Gráfica 6. Perfil de expresión del gen *Cbx2* en gónadas de embriones de *L. olivacea* incubados a TM, 26°C, (línea continua) y embriones incubados a TF, 33°C, (línea punteada). Las barras de error representan la desviación estándar. Se marcan con estrellas las etapas con diferencias significativas en la expresión entre TM y TF de acuerdo a la prueba de Tukey con significancia del 5%.

DISCUSIÓN.

El proceso de determinación sexual termosensible (DST) es un evento biológico complejo y hasta ahora poco se sabe del mecanismo molecular que responde a la temperatura. Como todos los procesos del desarrollo embrionario de cada órgano, la DST es resultado de una compleja red espacio-temporal de regulación de la expresión génica.

El perfil de expresión del gen *Dmrt1* en gónadas de *L. olivacea*, encontrado en el presente estudio mostró un perfil de expresión dimórfico, teniendo una mayor expresión en gónadas de embriones incubados a TM lo que concuerda con los reportes de este gen en otros organismos donde tiene un papel importante en el desarrollo del testículo (Heckert et al., 2015; Zarkower, 2013). En contraste con un estudio anterior (Torres-Maldonado et al. 2002) en donde se reportó un perfil dimórfico de expresión de *Dmrt1* desde las etapas indeterminadas 23 y 24, nuestros actuales resultados mostraron que la expresión dimórfica de *Dmrt1* se detecta hasta la etapa 25, correspondiente a la transición de la gónada indiferenciada hacia ovario o testículo dependiendo de la temperatura de incubación. La explicación a la inconsistencia entre los presentes resultados y los reportados anteriormente, puede deberse a la mayor sensibilidad de la actual técnica cuantitativa de PCR comparada con la RT-PCR usada en el pasado reporte de Torres-Maldonado et al. (2002).

La expresión no dimórfica del gen *Dmrt1* en las gónadas indiferenciadas encontrada en el presente trabajo, sugieren que este gen no responde a la temperatura de incubación durante el periodo de determinación sexual de *L. olivacea*. La diferencia en los niveles de expresión del *Dmrt1* coincide con el inicio de los cambios estructurales de la gónada en la etapa 25 y con el paso hacia la diferenciación irreversible de ovario o testículo que se consolidan en etapas subsecuentes. Por la tanto, el gen *Dmrt1* probablemente forme parte de la red de expresión involucrada en los procesos de diferenciación gonadal, posteriores al período sensible a la temperatura (PST) de la gónada bipotencial.

La regulación dimórfica del gen *Sox9* se ha visto involucrado en la determinación sexual de las gónadas embrionarias en varias especies de

vertebrados Amniota. *L. olivacea* no es la excepción, mediante técnicas no cuantitativas, Torres-Maldonado et al. (2002), reportaron un perfil de expresión dimórfico en gónadas en etapas ya determinadas, siendo más alta la expresión a TM y una muy baja expresión a TF. En etapas del periodo indeterminado la expresión reportada de *Sox9* fue similar a TF y TM. En el presente estudio, la PCR cuantitativa confirmó de manera general el perfil del *Sox9* previamente reportado empleando la técnica de RT-PCR. El perfil aquí confirmado sugiere que *Sox9* participa en la red de diferenciación sexual de la gónada más que en temprana red de determinación sexual de la tortuga golfina. Los niveles de expresión del gen *Sox9* concuerdan con la detección por inmunofluorescencia de la proteína previamente reportada (Moreno-Mendoza et al. 2001; Merchant-Larios and Díaz-Hernández, 2012).

De acuerdo a los resultados del actual estudio, posiblemente sea válido asumir que en esta especie, el *Dmrt1* y el *Sox9* formen parte de la red molecular involucrada en el proceso que controla la diferenciación de la gónada, posterior a la red que responde a la temperatura en la gónada morfológicamente indiferenciada.

En esta tesis por primera vez se reporta una secuencia de 201 pares de bases del mRNA del gen *Cirbp* en *L. olivacea*. El perfil de expresión que este gen mostró diferencias significativas dependiendo de la temperatura de incubación, estas diferencias significativas fueron establecidas mediante la prueba estadística de Tuekey con una significancia del 5%.

El perfil de expresión de *Cirbp* en las gónadas embrionarias de la tortuga golfina encontrado en el estudio actual, resultó de particular interés comparándolo con lo reportado en la tortuga de agua dulce *Chelydra serpentina* (Rehn et al. 2010). En la tortuga dulceacuícola, embriones incubados a temperatura masculinizante (TM) fueron intercambiados a temperatura feminizante (TF). El experimento mostró que las gónadas de los embriones controles mantenidos cinco días en TM la expresión de *Cirbp* fue menor en relación con la de las gónadas de los embriones intercambiados a TF (Figura G). Sin embargo; los niveles de expresión resultaron muy similares en ovarios y testículos después de la eclosión (Rehn et al., 2010).

Aunque a primera vista nuestros resultados en *L. olivacea* parecen contrastar con los reportados en *C. serpentina*, resulta importante considerar la escala de tiempo y las etapas de desarrollo empleadas en cada estudio. En la tortuga dulceacuícola los niveles de *Cirbp* fueron tomados en un período de cinco días después de intercambiar embriones de TM a TF en la etapa 16, cuando la gónada es bipotencial y morfológicamente indiferenciada. En las tortugas marinas, la etapa 24 corresponde al mismo estado de desarrollo gonadal, también dentro del periodo sensible a la temperatura (PST). Como el paso de la etapa 24 a la 25 dura alrededor de 10 días, es posible asumir que la medición de mayores niveles relativos de *Cirbp* a TF en *L. olivacea* sea similar al reportado en *C. serpentina* durante cinco días después del intercambio. Si este resultado llegara a ser correcto en un experimento de intercambio en la tortuga golfina, se podría asumir la importancia de *Cirbp* como un posible sensor directo de la temperatura.

El gen *Cbx2* codifica para la proteína CBX2 la cual es un componente del complejo represivo de polycomb 1 (PRC1). En esta tesis por primera vez se reporta la secuencia parcial de este gen en *L. olivacea*, un fragmento de 429 bp del mRNA del gen *Cbx2*. Y también por primera vez se reporta, en un organismo con determinación sexual termosensible, el perfil de expresión de este gen en gónadas de *L. olivacea* (gráfica 6). La expresión de este gen es dimórfica durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea*, ya que presenta una expresión diferencial entre TF y TM en la etapa 23, en la cual el sexo aún no está determinado, este gen podría estar involucrado en una red de determinación sexual y ser parte del mecanismo sensor de la temperatura en esta especie y también podría estar regulando otros eventos biológicos como la diferenciación sexual ya que también presenta un perfil de expresión dimórfico en etapas embrionarias en vías de determinación sexual.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se reportan por primera vez las secuencias parciales de los genes *Dmrt1*, *Cirbp* y *Cbx2* en el genoma de la tortuga marina *L. olivacea*.

Los perfiles de expresión de los genes *Dmrt1* y *Sox9* muestran que estos genes están más relacionados con la diferenciación sexual en la tortuga *L. olivacea*. Por otro lado, pueden no estar tan fuertemente asociados al proceso de determinación sexual ya que su nivel de expresión no tiene diferencias significativas entre ambas temperaturas en etapas con sexo indeterminado.

Se reportó por primera vez el perfil de expresión de los genes *Cirbp* y *Cbx2*. Presentan un perfil dimórfico en etapas indeterminadas sexualmente en gónadas de *L. olivacea* por lo que pueden estar asociados a una red de determinación sexual en este organismo.

REFERENCIAS.

- Barske, L., Capel, B. (2008). Blurring the edges in vertebrate sex determination. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18:499–505.
- Biason-Lauber, A., Konrad, D., Meyer, M., deBeaufort, C., Schoenle, E. (2009). Ovaries and female phenotype in a girl with 46, XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 84(5):658-663. doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.016
- Bumann, C., De La Fuente, R. (2011). Role of Polycomb Group Protein Cbx2/M33 in Meiosis Onset and Maintenance of Chromosome Stability in the Mammalian Germline. *Genes*, 2, 59-80; doi:10.3390/genes2010059.
- Ciofi, C., Swingland, I. (1997). Environmental sex determination in reptiles. *Applied Animal Behaviour Science* 51, 251-265.
- Charnier, M. (1966). Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'Agama agama (Agamidae, Lacertilien). (Abstract). *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie de l'Ouest Africain* 160:620-622.
- Crews, D., Bull, J., Wibbels, T. (1991). Estrogen and Sex Reversal in Turtles: A Dose-Dependent Phenomenon. *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY* 81, 357-364.
- Escobedo, A. (2013). Temperature-dependent sex determination in an uncertain world: advances and perspectives. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 727-730. DOI: 10.7550/rmb.32441.
- Ewert, M., Jackson, D., Nelson, C. (1994). Patterns of Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles. *The Journal of experimental zoology* 270~3-15.
- Gil, J., O'Loghlen, A. (2014). PRC1 complex diversity: where is it taking us? *Trends in Cell Biology*, Vol. 24, No. 11.
- Gutzke, W., Paukstis, G. (1983). Influence of the hydric environment on sexual differentiation of turtles (abstract). *J. Exp. Zool.*, 226: 467–469. doi: 10.1002/jez.1402260317.
- Heckert, L., Agbor, V. (2015). Capítulo 5: DMRT1 and the road to masculinity. En Griswold, M (editor). *Sertoli Cell Biology (Second Edition)*. Pp.123 – 174.

Holanda, Amsterdam. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00005-3>.

- Henning, L., Derkacheva, M. (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players?. Cell Press, Trends in Genetics Vol.25 No.9.
- Jandegian, C., Deem, S., Bhandari, R., Holliday, S., Nicks, D., Rosenfeld, C., Selcer, K., Tillitt, D., S. vom Saal, F., Vélez-Rivera, V., Yang, Y., Holliday, D. (2015). Developmental exposure to bisphenol A (BPA) alters sexual differentiation in painted turtles (*Chrysemys picta*). General and Comparative Endocrinology 216, 77–85.
- Jo, A., Denduluri, S., Zhang, B., Wang, Z., Yin, L., Yan, Z., Kang, R., Shi, L., Mok, J., Lee, M., Haydon, R. (2014). The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. Genes & Diseases 1, 149 – 161.
- Katoh-Fukui, Y., Miyabayashi, K., Komatsu, T., Owaki, A., Baba, T., Shima, Y., Kidokoro, T., Kanai, Y., Schedl, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Okuno, Y., Morohashi, K. (2012). Cbx2, a Polycomb Group Gene, Is Required for Sry Gene Expression in Mice. Endocrinology, 153(2):913–924
- Kohno, S., Katsu, Y., Urushitani, H., Ohta, Y., Iguchi, T., Guillette, L. (2010). Potential Contributions of Heat Shock Proteins to Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator. Sex Dev 4:73–87. DOI: 10.1159/000260374
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351, 117 - 121; doi:10.1038/351117a0.
- Koopman, P. (2009). Sex determination: the power of DMRT1. Trends in Genetics Vol.25 No.11.
- Lambeth, L., Raymond, C., Roeszler, K., Kuroiwa, A., Nakata, T., Zarkower, D., Smith, C. (2014). Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. Developmental Biology 389, 160–172.

- Li, Y., Zheng, M., Lau, Y. (2014). The Sex-Determining Factors SRY and SOX9 Regulate Similar Target Genes and Promote Testis Cord Formation during Testicular Differentiation. *Cell Reports* 8, 723–733.
- LLeonard, M. (2010). A new generation of proto-oncogenes: Cold-inducible RNA binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1805, 43–52.
- Ma, R., Zhang, Y., Sun, T., Cheng, B. (2014). Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 15(5):412-428.
- Marcovaldi, M. (2001). Status and Distribution of the Olive Ridley Turtle, *Lepidochelys olivacea*, in the Western Atlantic Ocean. *Memorias de la reunion “Marine Turtle Conservation in the Wider Caribbean Region - A Dialogue for Effective Regional Management”*, Santo Domingo, 16–18 November 1999.
- Márquez, R., Villanueva, A., Peñaflores, C., Ríos, D. (1982). Situación actual y recomendaciones para el manejo de las tortugas marinas de la costa occidental mexicana, en especial la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*. *Ciencia Pesquera Inst. Nal. Pesca. Sría. Pesca México* (3): 83-91.
- Márquez, R. (1990) FAO species catalogue. Vol.11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Vol. 11. Rome, FAO. 81 p
- Márquez, R. (1996). *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. México, DF. Fondo de Cultura Económica.
- Masuda, T., Itoha, K., Higashitsujia, H., Higashitsujia, H., Nakazawaa, N., Sakuraia, T., Liua, Y., Tokuchia, H., Fujitaa, T., Zhaoa, Y., Nishiyamab, H., Tanakac, T., Fukumotod, M., Ikawae, M., Okabee, M., Fujita, J. (2012). Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *PNAS*, vol. 109, no. 27, 10885–10890.
- Matsumoto, Y., Crews, D. (2012). Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 354, 103–110.

- McCoy, C., Vogt, R., Censky, E. (1983). Temperature-controlled sex determination in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology* Vol. 17, No. 4, pp. 404-406.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 107, 373–385
- Merchant-Larios, H. (2001). Temperature sex determination in reptiles: The Thirth Strategy. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 47, No. 5.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A. (2010). Gonadal morphogenesis and gene expression in reptiles with temperature-dependent sex determination. *Sex Dev.* 4(1-2):50-61. doi: 10.1159/000276768.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V. (2011). Chapter 4, Gonadal Development. En Chimal, J. (Editor) *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis* (pp. 75-91). India. Transworld Research Network.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V. (2012). Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles. *Sex Dev.* DOI: 10.1159/000341936
- Miller, J. (1985). Embryology of marine turtles. En: Gans, C., Billet, F., Maderson, P. (Eds.) *Biology of the reptilian*, Vol. 14. New York Wiley-Interscience. 269-328.
- Mohamed, B., Al-Fageeh., Smales, M. (2009). Cold-inducible RNA binding protein (CIRP) expression is modulated by alternative mRNAs. *RNA*, 15:1164–1176. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H. (1999). Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* at Male- or Female-Promoting Temperatures. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* 284:705–710
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H. (2001). Temperature Regulates SOX9 Expression in Cultured Gonads of *Lepidochelys olivacea*, a

Species with Temperature Sex Determination. *Developmental Biology* 229, 319–326.

- Mrosovsky, N., Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia – Reptilia* 12: 169-179.
- Muñoz, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez, G., Contreras, J., Murillo, S., Rodríguez, A., Varela, I., Ruberte, J., Collado, M., Serrano, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 155, 1104–1118.
- Nacher, V., Carretero, A., Navarro, M., Armengol, C., Llombart, C., Rodríguez, A., Herrero-Fresneda, I., Ayuso, E., Ruberte, J. (2006). The quail mesonephros: a new model for renal senescence? *Journal of Vascular Research*, Vol. 43, No. 6.
- Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor? *J. Exp. Zool.* 313A:381–398.
- Nishiyama, H., Danno, J., Kaneko, Y., Itoh, K., Yokoi H., Fukumoto, M., Okuno, H., Millan, J., Matsuda, T., Yoshida, O., Fujita, J. (1998). Decreased Expression of Cold-Inducible RNA Binding Protein (CIRP) in Male Germ Cells at Elevated Temperature. *American Journal of Pathology*, Vol. 152, No. 1.
- Phochanukul, N., Russell, S. (2010). No backbone but lots of Sox: Invertebrate Sox genes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 453 - 464.
- Picard, M., Cosseau, C., Mouahid, G., Duval, D., Grunau, C., Toulza, E., Allienne, J., Boissier, J. (2015). The roles of Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom. *C. R. Biologie* 338, 451–462.
- Pieau, C., Dorizzi, M. (2004). Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *Journal of Endocrinology* 181, 367–377.

- Rhen, T., Metzger, K., Schroeder, A., Woodward, R. (2007). Expression of Putative Sex-Determining Genes during the Thermosensitive Period of Gonad Development in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. *Sex Dev*;1: 255–270. DOI: 10.1159/000104775.
- Rhen, T., Schroeder, A. (2010). Molecular Mechanisms of Sex Determination in Reptiles. *Sex Dev*; 4:16–28.
- Rowena, K., Wan-Hwa, C., Cheng-Tsung, T., Hochang, C., I-Jiunn C. (2013). Estimating the sex ratio of green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Taiwan by the nest temperature and histological methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 445, 140–147.
- Rubin, D. (1985). Effect of pH on Sex Ratio in Cichlids and a Poeciliid (Teleostei). *Copeia*, Vol. 1985, No. 1, pp. 233-235.
- Sekido, R., Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453, 930-934 (12 June 2008). doi:10.1038/nature06944.
- Shoemaker, C., Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 293–303.
- Seminoff, J., Reséndiz-Hidalgo, A., Jiménez, B., Nichols, W., Todd-Jones, T. (2008). Capítulo 16, Tortugas Marinas. En Danemann, G., Ezcurra, E. (Eds.). *En Bahía de los ángeles, recursos naturales y comunidad*. (pp. 457-494). México, DF. Instituto Nacional de Ecología (INE) y Secretaría de Marina y Recursos Naturales (SEMARNAT). ISBN: 978-968-817-891-1.
- Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., Crews, D. (2007). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the Gonad of a Species with Temperature-Dependent Sex Determination. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 236:1055–1063.
- Shoemaker, C., Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 293–303.

- Smith, C., Roeszler, K., Ohnesorg, T., Cummins, D., Farlie, P., Doran, T., Sinclair, A. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267–271.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., Keyes, W. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* 155, 1119–1130, Elsevier Inc.
- Tardat, T., Albert, M., Kunzmann, R., Liu, Z., Kaustov, L., Thierry, R., Duan, S., Brykczynska, U., Arrowsmith, C., Peters, A. (2015). Cbx2 Targets PRC1 to Constitutive Heterochromatin in Mouse Zygotes in a Parent-of-Origin-Dependent Manner. *Molecular Cell* 58, 157–171
- Torres-Maldonado, L., Landa, A., Moreno, N., Marmolejo, A., Meza, A., Merchant-Larios, H. (2002). Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 129, 20–26.
- Torres-Maldonado, L., Merchant-Larios, H. (2006). Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas. *Ciencia Ergo Sum*, julio-octubre, 176-182.
- Vandamme, J., Ikel, P., Rosnoblet, P., Le Faou, P., Angrand, P. (2011). Interaction Proteomics Analysis of Polycomb Proteins Defines Distinct PRC1 Complexes in Mammalian Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (4).
- Xia, Z., Zheng, X., Zheng, H., Liu, X., Yang, Z., Wang, X. (2012). Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis. *FEBS Letters* 586, 3299–3308.
- Zarkower, D. (2013). Chapter 12: DMRT Genes in Vertebrate Gametogenesis. En: Wassarman, P. (Editor), *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 102: Gametogenesis (pp. 327 – 356). Holanda, Amsterdam. ISBN: 978-0-12-416024-8.
- Zhen, C.Y., Duc, H., Kokotovic, M., Phiel, C., Ren, X. (2014). Cbx2 stably associates with mitotic chromosomes via a PRC2- or PRC1-independent mechanism and is needed for recruiting PRC1 complex to mitotic chromosomes. *Molecular Biology of the Cell*, Volume 25.

APÉNDICE.

Tabla 1. Etapas de incubación a temperaturas controladas para la tortuga *L. olivacea*.

Temperatura Masculinizante 26±1 °C.		Temperatura Feminizante 33±0.5 °C.	
Etapa embrionaria	Días post desove	Etapa embrionaria	Días post desove
23	27	23	15
24	34	24	19
25	41	25	25
26	49	26	29
27	56	27	33
28	64	28	37

Tabla 2. Número de embriones utilizados para la extracción de RNA de gónadas

Etapa	Embriones utilizados para Temperatura Masculinizante	Embriones utilizados para Temperatura Feminizante.
23	20	25
24	20	22
25	15	18
26	10	15
27	8	8
28	10	10

Tabla 3. Análisis de la secuencia del exón 2 de *Dmrt1* con BLAST®.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Chelonia mydas doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	254	254	100%	4e-64	99%	XM_007065580.1
<input type="checkbox"/> Lepidochelys olivacea doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt-1), mRNA, partial cds	248	248	100%	2e-62	99%	AF335421.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Chrysemys picta bellii doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	243	243	100%	8e-61	98%	XM_005296762.1
<input type="checkbox"/> Chrysemys picta doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt1), mRNA, partial cds	243	243	100%	8e-61	98%	FJ791118.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pelodiscus sinensis doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (LOC102462572), mRNA	237	237	100%	4e-59	97%	XM_006137866.2
<input type="checkbox"/> Pelodiscus sinensis DMRT1 mRNA for doublesex and mab-3 related transcription factor 1, partial cds	237	237	100%	4e-59	97%	AB179697.1
<input type="checkbox"/> Trachemys scripta doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt1), mRNA, partial cds	237	237	100%	4e-59	97%	AF201387.1
<input type="checkbox"/> Pelodiscus sinensis doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (LOC102462572), mRNA	231	231	100%	2e-57	96%	NM_001317047.1
<input type="checkbox"/> Apalone mutica doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt1), mRNA, partial cds	231	231	100%	2e-57	96%	FJ791119.1
<input type="checkbox"/> Mauremys reevesii DMRT1 mRNA for doublesex- and mab-3 related transcription factor 1, complete cds	231	231	97%	2e-57	97%	AB365876.1
<input type="checkbox"/> Podocnemis expansa voucher PodExp-DV Dmrt1 (Dmrt1) gene, partial cds	209	209	100%	8e-51	94%	KP109550.1

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados. Se incluye la clave de referencia de GenBank de las secuencias utilizadas para el alineamiento. Para la región 5'-UTR la clave indica la posición en el genoma de la tortuga *Chrysemys picta* en Genome Browser que se usó para el diseño de los oligos. (S: sentido, AS: antisentido)

Gen	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del amplificado	Condiciones de amplificación	Secuencias alineadas para el diseño.
<i>Gapdh</i>	S: ACCCGTTTCATTGACCTCAAC AS: ACAACATACTCTGCTCCAGC	184	94°C-20s 60°C-20s 72°C-20s	<i>C.picta</i> (XM_005291303.2) <i>T. scripta</i> (FR716831.1) <i>C. mydas</i> (XM_007061386.1)
<i>Sox9</i>	S: TGCACAACGCAGAGCTCAG AS: TACTTGTAGTCGGGATGGTC	133	94°C-20s 60°C-20s 72°C-20s	<i>L. olivacea</i> (GQ258676.1)
<i>Dmrt1</i> exon 2	S: GTTGCATTGAGAAGGCAGC AS: GGGCTGCTGCTTTCCAAC	140	94°C-20s 58°C-20s 72°C-20s	<i>C.picta</i> (XM_005296762.1) <i>C. mydas</i> (XM_007065580.1) <i>P. sinensis</i> (NM_001317047.1)
<i>Dmrt1</i> 5'-UTR	S: TCAGGCAGCTGGTGTACG AS: CATGCAGAACCTCTTGTGC	969	94°C-25s 58°C-30s 72°C-60s	<i>C.picta</i> (JH584680:11,570,776-11,577,103)
<i>Cirbp</i>	S: GATACCAATGAACAGTCACTG AS: TCCATTCATAGCCATCATTGC	162	94°C-20s 60°C-20s 72°C-20s	<i>P. sinensis</i> (XM_006124966.1) <i>C.picta</i> (XM_005302336.1) <i>C. mydas</i> (XM_007057938.1)
	S: GATACCAATGAACAGTCACTG AS: GCCTGGTCAACTCTAATCTG	200	94°C-20s 60°C-20s 72°C-20s	
<i>Cbx2</i>	S: AATCAAGTCAAGTAGCTCCTC AS: CTTCGCAACCAGAATCTGAG	151	94°C-20s 60°C-20s 72°C-20s	<i>C.picta</i> (XM_005283137.1) <i>P. sinensis</i> (XM_006120233.1) <i>C. mydas</i> (XM_007056062.1)
	S: AATCAAGTCAAGTAGCTCCTC AS: CTGCCAGCTGATCCCGTG	469	94°C-20s 60°C-20s 72°C-30s	

Tabla 5. Condiciones óptimas de oligonucleótidos y cDNA de cada gen para PCR en tiempo real.

Gen	Concentración óptima de oligonucleótido en la reacción	Cantidad de cDNA por reacción de 25 µL
<i>Gapdh</i>	0.4µM cada uno.	1 µL
<i>Sox9</i>	0.4µM cada uno.	1 µL
<i>Dmrt1</i>	0.4µM cada uno.	1 µL
<i>Cirbp</i>	0.4µM cada uno.	1 µL
<i>Cbx2</i>	0.2µM cada uno.	1 µL

Tabla 6. Análisis de la traducción del exón 2 del gen *Dmrt1* con BLAST.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Dmrt1 [Podocnemis expansa]	95.1	95.1	100%	7e-24	100%	AJC64536.1
doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Chrysemys picta]	95.9	95.9	100%	4e-23	100%	ACY71138.1
doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Apalone mutica]	95.5	95.5	100%	5e-23	100%	ACY71139.1
doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Staurotypus triporcatus]	95.1	95.1	100%	2e-22	98%	BAM99005.1
RecName: Full=Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1	94.4	94.4	100%	3e-22	98%	P57690.1
doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Pelodiscus sinensis]	95.1	95.1	100%	7e-22	100%	BAD99160.1
PREDICTED: doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 [Chrysemys picta bellii]	95.1	95.1	100%	7e-22	100%	XP_005296819.1
doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 [Pelodiscus sinensis]	94.7	94.7	100%	9e-22	100%	NP_001303976.1
PREDICTED: doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 [Pelodiscus sinensis]	94.7	94.7	100%	1e-21	100%	XP_006137928.2
Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 [Chelonia mydas]	93.2	93.2	100%	1e-21	98%	EMP30456.1
PREDICTED: doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 [Chelonia mydas]	94.0	94.0	100%	2e-21	98%	XP_007065642.1

Tabla 7. Análisis de la secuencia de la región 5'-UTR del gen *Dmrt1* con BLAST®.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Trachemys scripta elegans Dmrt1 (Dmrt1) gene, promoter region and partial cds	1009	1009	80%	0.0	90%	KJ583239.1
PREDICTED: Chelonia mydas doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	649	649	38%	0.0	98%	XM_007065580.1
Mauremys reevesii DMRT1 mRNA for doublesex- and mab-3 related transcription factor 1, complete cds	606	606	43%	2e-169	92%	AB365876.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), mRNA	411	411	26%	2e-110	96%	XM_005296762.1
Pelodiscus sinensis doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (LOC102462572), mRNA	403	403	44%	3e-108	84%	NM_001317047.1
Pelodiscus sinensis DMRT1 mRNA for doublesex and mab-3 related transcription factor 1, partial cds	403	403	44%	3e-108	84%	AB179697.1
PREDICTED: Pelodiscus sinensis doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (LOC102462572), mRNA	315	315	25%	1e-81	90%	XM_006137866.2
PREDICTED: Anolis carolinensis doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (dmrt1), mRNA	100	100	8%	5e-17	87%	XM_003216553.2
Rana livida double sex and Mab 3-related transcription factor 1b (DMRT1b) mRNA, partial cds	89.8	89.8	6%	1e-13	93%	EU418494.1

Tabla 8. Análisis de la secuencia del mRNA parcide *Cirbp* de *L. olivacea* con BLAST®.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Chelonia mydas cold-inducible RNA-binding protein-like (LOC102943926). mRNA	368	368	100%	2e-98	99%	XM_007057938.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X2, mRNA	346	346	100%	1e-91	98%	XM_005302337.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X1, mRNA	346	346	100%	1e-91	98%	XM_005302336.1
PREDICTED: Pelodiscus sinensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X2, mRNA	324	324	100%	4e-85	96%	XM_014574548.1
PREDICTED: Pelodiscus sinensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X1, mRNA	324	324	100%	4e-85	96%	XM_006124966.2
PREDICTED: Alligator mississippiensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X4, mRNA	272	272	99%	2e-69	91%	XM_006272503.2
PREDICTED: Alligator mississippiensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X3, mRNA	272	272	99%	2e-69	91%	XM_014604796.1
PREDICTED: Alligator mississippiensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X2, mRNA	272	272	99%	2e-69	91%	XM_006272501.2
PREDICTED: Alligator mississippiensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X1, mRNA	272	272	99%	2e-69	91%	XM_014604794.1
Alligator mississippiensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), mRNA	272	272	99%	2e-69	91%	NM_001287301.1
PREDICTED: Alligator sinensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X4, mRNA	255	255	99%	2e-64	90%	XM_014528028.1
PREDICTED: Alligator sinensis cold inducible RNA binding protein (CIRBP), transcript variant X3, mRNA	255	255	99%	2e-64	90%	XM_014528027.1

Tabla 9. Análisis de la traducción del mRNA parcial gen *Cirbp* con BLAST.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Chain A, Solution Structure Of Rrm Domain In A18 Hrmp	136	136	100%	3e-39	100%	1X5S_A
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X3 [Merops nubicus]	137	137	100%	4e-39	100%	XP_008940554.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein [Camelus ferus]	135	135	100%	4e-39	100%	XP_006195343.2
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X2 [Ornithorhynchus anatinus]	137	137	100%	5e-39	100%	XP_007657983.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X1 [Anolis carolinensis]	138	138	100%	5e-39	100%	XP_003230040.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X1 [Ornithorhynchus anatinus]	137	137	100%	5e-39	100%	XP_007657982.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein [Camelus bactrianus]	137	137	100%	5e-39	100%	XP_010964936.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X3 [Sus scrofa]	137	137	100%	5e-39	100%	XP_005661438.1
Cold-inducible RNA-binding protein [Heterocephalus glaber]	137	137	100%	6e-39	100%	EHR02467.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X1 [Odobenus rosmarus divergens]	138	138	100%	6e-39	100%	XP_012416090.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein [Heterocephalus glaber]	137	137	100%	6e-39	100%	XP_004866021.1
PREDICTED: cold-inducible RNA-binding protein isoform X1 [Leptonychotes weddellii]	138	138	100%	6e-39	100%	XP_006740840.1

Tabla 10. Análisis de la la secuencia del mRNA parcide *Cbx2* de *L. olivacea* con BLAST®.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Chelonia mydas chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	763	763	99%	0.0	99%	XM_007056062.1
PREDICTED: Chrysemys picta bellii chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	719	719	99%	0.0	97%	XM_005283137.1
PREDICTED: Pelodiscus sinensis chromobox homolog 2 (CBX2), partial mRNA	492	492	99%	3e-135	87%	XM_014572072.1
PREDICTED: Gavia stellata chromobox protein homolog 2-like (LOC104254060), partial mRNA	331	331	78%	6e-87	84%	XM_009807709.1
PREDICTED: Fulmarus glacialis chromobox protein homolog 2-like (LOC104077366), partial mRNA	326	326	78%	3e-85	84%	XM_009578569.1
PREDICTED: Phalacrocorax carbo chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	326	326	78%	3e-85	84%	XM_009501603.1
PREDICTED: Aptenodytes forsteri chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	320	320	78%	1e-83	84%	XM_009276805.1
PREDICTED: Manacus vitellinus chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	320	320	78%	1e-83	84%	XM_008921842.1
PREDICTED: Cariama cristata chromobox homolog 2 (CBX2), partial mRNA	316	316	79%	2e-82	84%	XM_009695394.1
PREDICTED: Pygoscelis adeliae chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	315	315	75%	6e-82	84%	XM_009324537.1
PREDICTED: Phaethon lepturus chromobox homolog 2 (CBX2), partial mRNA	309	309	78%	3e-80	83%	XM_010283419.1
PREDICTED: Columba livia chromobox homolog 2 (CBX2), mRNA	309	309	75%	3e-80	84%	XM_005508339.1

Tabla 11. Análisis con BLAST® de la secuencia traducida a partir del mRNA parcial del gen *Cirbp*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: chromobox protein homolog 2 [Chelonia mydas]	275	275	99%	4e-87	100%	XP_007056124.1
PREDICTED: chromobox protein homolog 2 [Chrysemys picta bellii]	269	269	99%	2e-84	98%	XP_005283194.1
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 7 [Chelonia mydas]	278	278	99%	4e-84	100%	EMP39286.1
Chromobox protein 2 [Phoenicopterus ruber ruber]	181	181	82%	9e-55	79%	KFG78499.1
PREDICTED: chromobox protein homolog 2, partial [Balearica regulorum gibbericeps]	184	184	82%	1e-54	79%	XP_010301748.1
Chromobox protein 2, partial [Balearica regulorum gibbericeps]	184	184	82%	1e-54	79%	KF011355.1
Chromobox protein 2 [Cariama cristata]	184	184	82%	1e-54	79%	KFP56759.1
PREDICTED: chromobox protein homolog 2 [Cariama cristata]	184	184	82%	1e-54	79%	XP_009693696.1
Chromobox protein 2 [Cathartes aura]	181	181	82%	3e-54	78%	KFP46835.1
Chromobox protein 2 [Charadrius vociferus]	179	179	83%	5e-54	77%	KGL89830.1
Chromobox protein 2 [Podiceps cristatus]	181	181	82%	5e-54	79%	KFZ65906.1
Chromobox protein 2 [Fulmarus glacialis]	180	180	82%	7e-54	78%	KFW05579.1
PREDICTED: chromobox protein homolog 2 [Charadrius vociferus]	181	181	83%	1e-53	77%	XP_009879112.1
Chromobox protein 2 [Tauraco erythrolophus]	177	177	82%	1e-53	78%	KFV03329.1
PREDICTED: chromobox protein homolog 2-like [Haliaeetus albicilla]	177	177	82%	3e-53	78%	XP_009920463.1
Chromobox protein 2 [Haliaeetus albicilla]	177	177	82%	3e-53	78%	KFP92755.1
PREDICTED: chromobox protein homolog 2-like [Fulmarus glacialis]	179	179	82%	2e-52	78%	XP_009576864.1

Alineamientos

- *Gapdh*.

Alineamiento de las secuencias reportadas del mRNA del gen *Gapdh* en las tortugas *Chelonia mydas*, *Trachemys scripta* y *Chisemys picta*. Las regiones sombreadas representan las regiones de donde se obtuvieron los primers.

```
C.mydas.      AGAGCTGCCTTCATCTCTGGCAAATCCAGATTGTAGCAATCAATGACCCGTTTCATTGAC
T.scripta    AGAGCTGCCTTCACCTCTGGCAAAGTCCAGATTGTAGCAATCAATGACCCGTTTCATTGAC
C.picta      AGAGCTGCCTTCACCTCTGGCAAAGTCCAGATTGTAGCAATCAATGACCCGTTTCATTGAC
*****

C.mydas.      CTCAACTACATGGCTTACATGTTCAAATACGACTCCACTCATGGTCGTTTTTCATGGCACT
T.scripta    CTCAACTACATGGTTTACATGTTCAAATATGACTCCACTCACGGTCGTTTTTCATGGCACT
C.picta      CTCAACTACATGGTTTACATGTTCAAATATGACTCCACTCACGGTCGTTTTTCATGGTACT
*****

C.mydas.      GTCAAGGCTGAAAATGGAAAACCTTGATAAATGGAAACCAAATTACCATTTTCCAGGAG
T.scripta    GTCAAGGCTGAAAATGGAAAACCTTGATTAATGGAAATCAAATTACCATTTTCCAGGAG
C.picta      GTCAAGGCTGAAAATGGAAAACCTTGATTAATGGAAATCAAATTACCATTTTCCAGGAA
*****

C.mydas.      CGTGATCCTGCTAACATCAAGTGGGGAGATGCTGGAGCAGAGTATGTTGTAGAATCCACT
T.scripta    CGTGATCCCGCTAACATCAAGTGGGGAGATGCTGGAGCAGAGTATGTTGTAGAGTCCACT
C.picta      CGTGATCCCGCCAACATCAAGTGGGGAGATGCTGGAGCAGAGTATGTTGTAGAGTCCACT
*****
```

- *Dmrt1*.

Alineamiento de las secuencias reportadas del mRNA del gen *Dmrt1* en las tortugas *Chelonia mydas*, *Pelodiscus sinensis* y *Chisemys picta*. Las regiones sombreadas representan las regiones de donde se obtuvieron los primers.

```
C.mydas      -----ATGCAGCCTGATCGCAGAGCGGCAGCGGGTGTATGGCAGCCC
P.sinensis   GGGACTGCCAGTGTAAAAAATGCAGCCTGATCGCCGAGAGGCAGCGGGTGTATGGCAGCCC
C.picta      -----AAGAAGTGCAGCCTGATCGCAGAGCGGCAGCGGGTGTATGGCAGCGC
*****

C.mydas      AGGTTGCATTGAGAAGGCAGCAGGCCAAGAAGAAGAGCTGGGGATCAGCCATCCCATCC
P.sinensis   AGGTTGCATTGAGAAGGCAGCAGGCCAAGAAGAAGAGCTGGGGATCAGCCATCCCATCC
C.picta      AGGTTGCATTGAGAAGGCAGCAGGCCAAGAAGAAGAGCTGGGGATCAGCCATCCCATCC
*****

C.mydas      CTCTGCCAAGTGCCCCGAGCTCTTCTGTTAAGAAGGAAAACAATGGTGGCAGCTCCTGTT
P.sinensis   CTCTCCCAGTGCCCCAGAGCTCTTGTAAAGAAGGAAAACAATGGTGGCAGCTCCTGTT
C.picta      CTCTGCCAAGTGCCCCGAGCTCTTCTGTTAAGAAGGAAAACAATGGTGGCAGCTCCTGTT
**** *

C.mydas      TATTGTTGGAAAACAGCAGCCCCGACACATTCAACAAACACAGCAACTACAGCATCCACCA
P.sinensis   TATTGTTGGAAAGCAGCAGCCCCGACACATTCAACAAACACGGCAACTACGGCATCCAGCA
C.picta      TATTGTTGGAAAGCAGCAGCCCCAACACATTCAACAAACACAGCAACTACAGCATCCACCA
*****
```

- *Cirbp*.

Alineamiento de las secuencias reportadas del mRNA del gen *Cirbp* en las tortugas *Chelonia mydas*, *Pelodiscus sinensis* y *Chrysemys picta*. Las regiones sombreadas representan las regiones de donde se obtuvieron los primers.

```

P.sinensis      TTTTGATACCAATGAACAGTCACTGGAGCAAGTTTTTTCTAAATATGGACAGATATCAGA
C.picta         TTTTGATACCAATGAACAGTCACTGGAGCAAGTCTTTTCTAAATACGGACAGATATCTGA
C.mydas         TTTTGATACCAATGAACAGTCACTGGAGCAAGTTTTTTCTAAATACGGACAGATATCTGA
                *****
P.sinensis      AGTTGTGGTGGTGAAAGACAGGGAGACCCAGAGATCCAGAGGCTTTGGATTGTGTCAGTT
C.picta         AGTTGTGGTGGTGAAAGACAGAGAGACCCAGAGGTCAGAGGCTTTGGGTTTGTCACTTT
C.mydas         AGTTGTGGTGGTGAAAGACCCAGAGGTCAGAGGCTTTGGGTTTGTCACTTT
                *** *
P.sinensis      TGAGAACATAGATGATGCTAAAGATGCAATGATGGCTATGAATGGAAGTCTGTTGATGG
C.picta         TGAGAACATAGATGATGCTAAAGATGCAATGATGGCTATGAATGGAAGTCTGTTGATGG
C.mydas         TGAGAACATAGATGATGCTAAAGATGCAATGATGGCTATGAATGGAAGTCTGTTGATGG
                *****
P.sinensis      GCGTCAGATTAGAGTTGACCAGGCAGGTAAATCATCTGAAAACCGATCCCGTGGATACAG
C.picta         GCGTCAGATTAGAGTTGACCAGGCAGGTAAATCATCCGAAAACAGATCCCGTGGATACAG
C.mydas         GCGTCAGATTAGAGTTGACCAGGCAGGTAAATCATCCGAAAACAGATCCCGTGGATACAG
                *****

```

- *Cbx2*.

Alineamiento de las secuencias reportadas del mRNA del gen *Cbx2* en las tortugas *Chelonia mydas*, *Pelodiscus sinensis* y *Chrysemys picta*. Las regiones sombreadas representan las regiones de donde se obtuvieron los primers.

```

P.sinensis      AGGCGCCTCCAAAATCAAGTCAAGTAGCTCCTCCTCCTCCAGCTCCTCTTCCTCCTCCT
C.mydas         AGGTGCCTCCAAAATCAAGTCAAGTAGCTCCTCATCCTCTACCTCTTCATCTTCCTCCT
C.picta         AGGTGCCTCCAAAATCAAGTCAAGTAGCTCCTCATCCTCCACCTCTTCATCTTCCTCCT
                *** *****
P.sinensis      CCTCTGATGAAGAGGATGAGAGCGACTGGAGGCAAAGCGAGGTCCCGGAGTCGAGAGA
C.mydas         CCTCTGATGAAGAGGATGAGAGTGACCTGGAGGCAAAGAGAGGTCCCGGAGCAGAGAGA
C.picta         CCTCTGATGAAGAGGATGAGAGTGACCTGGAGGCAAAGAGAGGTCCCGGAGCAGAGAGA
                *****
P.sinensis      CCCACCCTGTGCCACAGAAGAAAGCTCAGATTCTGGTGGCGAAGCCGGACCTGAAAGACC
C.mydas         CTCACCCAGTGCCGACAGAAGAAAGCTCAGATTCTGGTGGCGAAGCCGGAAATAAAGACC
C.picta         CTCACCCAGTGCCACAGAAGAAAGCTCAGATTCTGGTGGCGAAGCCAGAAATAAAGACC
                * *****
P.sinensis      CTGTCAGGAAGAAGCGGGGGCGGAAACCGCTGCCTCCGGAGCAGAAGGCCGCCCGCAGGA
C.mydas         CCGTCAGGAAGAAGCGTGGGCGGAAACCTCTGCCTCCGGAGCAGAAGGCAGCCAGAAGGA
C.picta         CTGTCAGGAAGAAGCGTGGGCGGAAACCTCTGCCTCCGGAGCAGAAGGCAGCCAGAAGGA
                * *****

```

Imágenes.

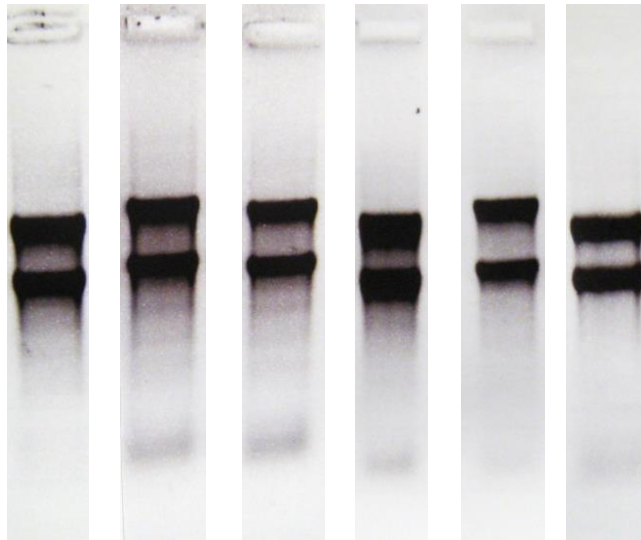


Imagen 1. Geles de RNA de distintas etapas (23 a 28) temperatura Feminizante. RNA proveniente de gónadas de embriones de *L. olivacea*. Se presentan distintas fotos ya que cada RNA se extrajo el día de la disección del embrión y cada RNA se corrió en un gel distinto.

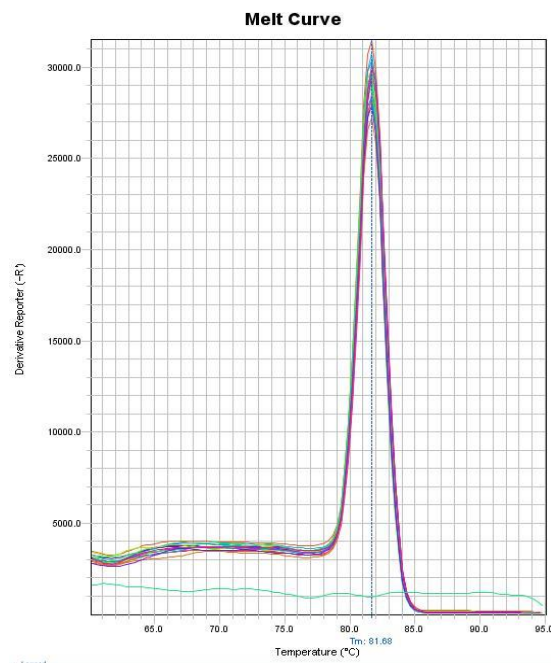


Imagen 2. Curva de disociación de PCR en tiempo real. La línea azul representa al control sin templado.

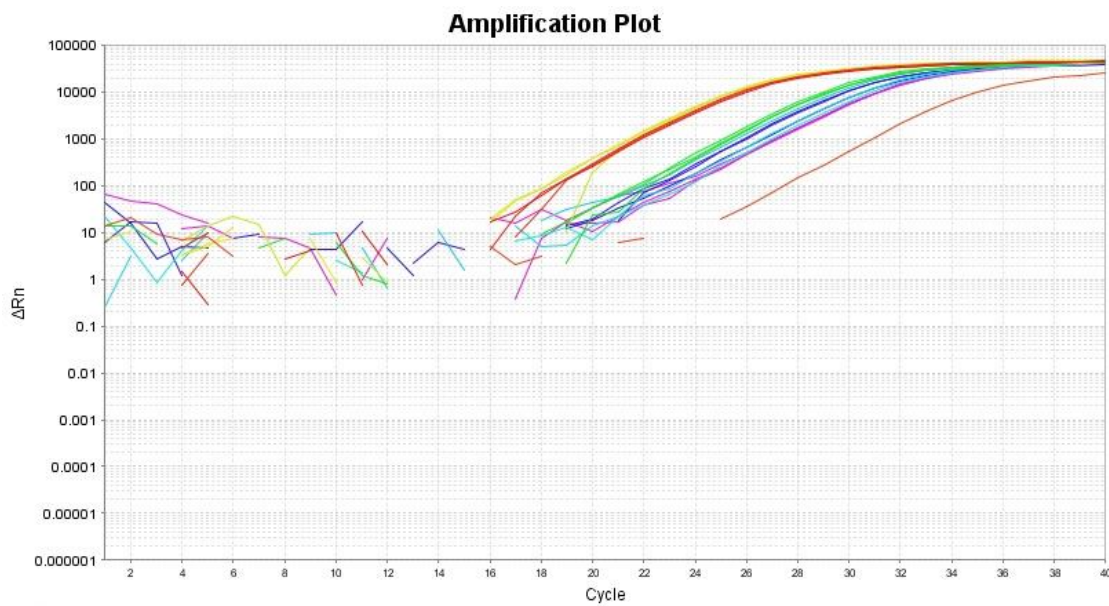


Imagen 3. Curva de amplificación de PCR en tiempo real.

Secuencias.

Las secuencias se encuentran en dirección 5'-3'.

>Dmrt1 exon 2, *L. olivacea*.

```
GTTGCATTGAGAAGGCAGCAGGCCCAAGAAGAAGAGCTGGGGATCAGCCAT
CCCATCCCTCTGCCAAGTGCCCCGGAGCTCTTCGTTAAGAAGGAAAACAATG
GTGGCAGCTCCTGTTTATTGTTGGAAAGCAGCAGCCC
```

>Dmrt1 5'-UTR, *L. olivacea*.

TCAGGCAGCTGGTGTACGTGTAAATCCTGTCAATGAGCAGGTTTCAGCTGAGT
CCCTGAGACATAATAACATGGCACCCCAAATGGTATTTTTATTGTGGGACT
CTTAAAAAAGAGCTGAAATGCAGTTTAAAATGCAACTCTCTCTCCATCCCCAA
GGGACCTGCTACCCGAGATTTGTAAATCAACTTCCTCTTGGATTTTTGTGTAAT
ATCTTATTTAGATTGTCTCACTTCTTCCCAGCCCTGGAGCCAAGGCGGCATGG
ACCTGGTCTGCTCAGCGCCCTGGGCCCTGCAGCAGCAGCTGGCCGGGCGG
GAAGAAGGGGGAGGAGCTGGCAGGGAGAGGCCGGGGTTTGCTACGCTTTCT
CTCTCCTCCCGGGGAACGTTCCAAAAAGTATCCAGCGTTCTGAAAAAGTAGC
GAATGTTCCAAACCTGCAGCAGCCCGCCCGCCAAAACCTCAGCCAACACAGGG
GGCAGGAGCTGGTGTGGCCAGTGTTACTCCCGCTGCTGCTGCGGCAACCGC
AGCTTCCAACCTGGGCAAAGGTGGGGGCAGCTGTCTTGTTTGGGCCGCATCG
CAGCGACTCCTTCTGATGCAGCAGGAATTGGCTAATACGTGTTAGCCGAACC
TCTCTTCTCCCAGCCACACCCAGCCCTGAAACATTAACCTCCTTCCCCCGTC
CCTAACTGTGCGGGCGAGCCAACCGGTCCGGGACGATGCCCAATGACTCATT
CAACAAGCCCTCGGCTTCTTCGGACCATCATGCCCAGGGGGGTAAGATGAGC
AGCTTCGGGAAAGCCGCCGTTCTGATGGCTGCTACTACTCCTGCCGGAGGTG
GAGGGGGTGCCGGGGTCTTGGCTCAAGCCGCCGCCACCGCCGCCTCGGGA
AAGAAGTCTCCCCGTCTCCCCAAGTGTGCCCGGTGCAGGAACCACGGCTACT
CCTCGCCACTGAAAGGGCACAAGAGGTTCTGCATG

>*Cirbp*, mRNA parcial, *L. olivacea*.

TGATACCAATGAACAGTCACTGGAGCAAGTTTTTTCTAAATACGGCCAGATAT
CTGAAGTTGTCGTGGTGAAGACCGAGAGACCCAGAGGTCCAGAGGCTTTGG
GTTTGTCACTTTTGAGAACATAGATGATGCTAAAGATGCAATGATGGCTATGA
ATGGAAAGTCTGTTGATGGGCGTCAGATTAGAGTTGACCAGGCA

>Cbx2, mRNA parcial, *L. olivacea*.

TAATCAAGTCAAGTAGCTCCTCATCCTCTACCTCTTCATCTTCCTCCTCCTCTG
ATGAAGAGGATGAGAGTGACCTGGAGGCAAAGAGAGGTCCCCGGAGCAGAG
AGACTCACCCAGTGCCACAGAAGAAAGCTCAGATTCTGGTTGCGAAGCCGGA
AATAAAAGACCCTGTCAGGAAGAAGCGTGGGCGGAAACCTCTGCCTCCGGAG
CAGAAGGCAGCCAGAAGGACCATGAATGTGGCCAAGGTGCTGAAAACCACC
CGAAAGGAGACGGGGGGAGGTTCTAAACTAATGGGGAAATTACAGCCCCAAC
ACAATGCTCAGGGCTCAGGTATTGCTGTGCTTAAATCTAATGTGAAAGAGCCC
CAAAGTGCACTGAGTGGGCTTGGTCCAGGGGGCTTATCTGCTGAGAACCTGC
CCAATATACGAA