



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EPIGENÉTICA EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL DEPENDIENTE DE
TEMPERATURA DE LA TORTUGA MARINA *LEPIDOCHELYS OLIVACEA*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

DANIELA EUGENIA VENEGAS SUÁREZ PEREDO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
IIB, UNAM

DR. FELIX RECILLAS TARGA
IFC, UNAM

DR. JESUS CHIMAL MONROY
IIB, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2016



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.

Daniela Eugenia Venegas Suárez Peredo
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 15 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Epigenética en la determinación sexual dependiente de temperatura de la tortuga marina Lepidochelys olivacea**", dirigida por el/la Dr (a) **Horacio Merchant Larios**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Diana María Escalante Alcalde
VOCAL	Mayra Furlan Magaril
VOCAL	Fernando López Casillas
VOCAL	Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO	Jaime Iván Velasco Velázquez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarte un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de agosto de 2016
Coordinador Académico


Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo
SFA*lgg

Formato: dg_1
VoBo Tutor,
Revisión de tesis de doctorado

27/ 07 / 2016

Subcomité Académico

Yo Dr. Horacio Merchant Larios

Tutor (asesor de tesis) de la estudiante: Daniela Eugenia Venegas Suárez Peredo

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

"Epigenética en la determinación sexual dependiente de temperatura de la tortuga marina *Lepidochelys olivácea*."

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente



Dr. Horacio Merchant Larios

Tutor

*A mis padres, David y también a Almendrita
Por permanecer a mi lado cada día de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por su apoyo para mi formación académica y para la realización de esta tesis.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por el apoyo para estancias y congresos durante mi posgrado.

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento para este proyecto y la beca para mis estudios de posgrado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el financiamiento para este proyecto.

A los miembros de mi Comité Tutoral: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Félix Recillas Targa y Dr. Jesus Chimal Monroy.

A los miembros del Centro Mexicano de la Tortuga en Mazunte, Santa María Tonameca, Oaxaca.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por abrir las puertas de su laboratorio para la realización de este proyecto; por haberme dirigido en la planeación, realización, discusión y conclusión de esta tesis.

Al Dr. Félix Recillas Targa, por su colaboración para la dirección y planeación de este proyecto. No hubiera sido posible sin su apoyo.

Al Dr. Jesus Chimal Monroy, por su interés constante en mi formación académica y en desarrollo de este proyecto.

A Leticia García Gutierrez y Adelina González Perez del posgrado de Bioquímicas, por su excelente trabajo y paciencia apoyando a los alumnos del posgrado.

A la M. en C. Martha Harfush, por su apoyo para la colecta y transporte de huevos desde el CMT.

A Alejandro Marmolejo y Georgina Guerrero, por su apoyo y asistencia para mi formación académica y la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Doc Horacio Merchant, por haberme dado la libertad de explorar y aprender a hacer ciencia aventurándome, sin saber lo que ocurrirá. Gracias por después haberme puesto los pies en la tierra y explicarme que de vez en cuando es necesario también publicar. Es un honor haber podido estar en su laboratorio. Valoro todos los consejos, regaños y tiempo que me dedicó, especialmente durante los últimos meses de redacción, cuando pude aprender de usted como científico y ser humano.

Al Doc Félix Recillas, por haberse peleado conmigo el primer día de clases y haber hecho posible que conociera y me enamorara de la epigenética. Durante estos años lo he visto crecer como tutor, jefe de grupo, investigador, profesor y ser humano. Admiro a la persona en quien se ha convertido y estoy segura de que llegará aún más lejos. Gracias por nunca haber escatimado en su apoyo y por nunca abandonar a un alumno.

Al Dr. Georges Dreyfus. Gracias por haber confiado en mí y haberme aceptado en su laboratorio antes que nadie. Es por la confianza que usted puso en mí durante ese primer año que estoy aquí ahora 10 años después. Gracias por el apoyo que me dio a mí y a tantos biomédicos durante estos años.

A Alex Marmolejo, por tu apoyo, amistad y por la música en el laboratorio por tantos años. Gracias por haber sido un maestro, amigo, colega y en ocasiones hasta refugio a donde huir. Eres el alma del laboratorio y te debo tanto, que todos los libros de J. J. Benitez no alcanzarían a pagar.

A Geito “mamá delos pollitos” Guerrero, por cuidar siempre de todos en el laboratorio y ponernos en orden. Gracias por ser una gran amiga y dar tanto apoyo como cariño a todos en el lab por tantas generaciones.

A Tere y Javier, por ser quienes me enseñaron realmente como hacer ciencia, son lo mejor que puede pasarle a un biomédico. Gracias por ser un ejemplo de organización, rigor científico y paciencia. Si no fuera por ustedes seguro ahora sería panadera.

A Pedro, Pau, Andrea y Jesus del laboratorio del Dr. Merchant, así como a Inti, Christian, Cristian, Ernesto, Estela, Edgar, Erandy, Charis, Andrea, Ceci, Tania, Gustavo, Hober, Ximena, Carlos, Josue, Rodrigo, David, Pedro y Yael del laboratorio del Dr. Recillas, por haber compartido tanto conmigo durante estos años.

A Christian Valdes por todo lo que me enseñó como amigo, compañero, maestro y colega. Siempre fuiste un ejemplo a seguir y uno de los mejores seres humanos que conozco. Gracias por todo el apoyo y cariño que tú y tu familia me dieron siempre.

A Gianelli, por ser una amiga y ejemplo de dedicación, Si todos en la ciencia fuéramos como tú, ya no habría nada más que investigar.

A mis amigos científicos Manuel (Rempee), Alejo y Faviel, por haber compartido este viaje conmigo, porque definitivamente no lo hubiera disfrutado tanto sin ustedes.
A Xchel, Paolo y Rogelio, por enseñarme mas de lo que yo pudiera a ustedes. Muchas gracias por su tiempo, interés y amistad.

A mis amigos Valeria, Marlene, Paulina, Marysol, Jimena, Tom, Nicap, Rui, Che, Jose E., Erika Azenet, Ursula, Pada, Pecha , Fez y Jos, por todas las tardes que pasamos juntos y todo lo que nos falta por disfrutar, compartir y jugar. Gracias por hacer de mi vida una experiencia tan maravillosa. Todos ustedes son también mi familia.

A Héctor Fuentes, por todo lo que hacemos y somos juntos. Gracias por todo el apoyo, amor, paciencia y fortaleza que me has mostrado. Gracias por darme el valor para seguir mis sueños y ser mi soporte para alcanzarlos y finalmente, gracias por hacer que cada día sea el mejor de mi vida. Te amo.

A mis abuelos, tios, primos y sobrinos, porque son la mejor familia que alguien podría pedir y un soporte y fuente de confianza y cariño en cada momento.

A mi hermano, David, por ser mi mejor amigo y modelo a seguir. Porque por culpa tuya y de Beakman acabé metida en la ciencia y les estaré siempre agradecida. Gracias por hacerme reir y pensar más que nadie y por haber recorrido conmigo tantos universos distintos.

A mis papás, Maria Eugenia y Carlos, Por ser mi mayor orgullo, porque no he conocido a nadie más fuerte, compasivo, inteligente, capaz y con valores más fuertes que ustedes. Gracias por no haberse apartado de nosotros ni un solo día y por habernos enseñado a distinguir lo que es realmente importante. Gracias por ser superhéroes a mis ojos y a los de cualquiera que los llegue a conocer.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	5
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
1. DETERMINACIÓN SEXUAL.....	14
1.1- Determinación y Diferenciación Sexual.....	14
1.2- Tipos de Determinación Sexual.....	15
1.3- Desarrollo de la Gónada.....	17
1.4- Determinación y Diferenciación Sexual en Mamíferos.....	19
a) <i>Formación del testículo</i>	19
b) <i>Formación del ovario</i>	22
1.5- Determinación Sexual en otros Vertebrados con DSG.....	24
1.6- Determinación Sexual Termosensible.....	25
1.7- Mecanismos Moleculares de la Determinación Sexual Termosensible.....	28
1.8- El Papel de la Aromatasa en la Determinación Sexual Termosensible.....	31
2- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	32
2.1- Metilación y Desmetilación del DNA.....	35
2.2- <i>Modificaciones Post-transcripcionales de Histonas</i>	39
2.3- <i>Polycomb y Thrithorax</i>	42
2.4- <i>Cromatina Bivalente</i>	43
2.5- Red de Regulación Génica en la Determinación y Diferenciación Sexual.....	44
3- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA DETERMINACIÓN SEXUAL.....	46
3.1- Regulación de la expresión de <i>Sox9</i> en Mamíferos.....	46
3.2- Epigenética en la determinación sexual.....	48
ANTECEDENTES.....	52
1- TORTUGAS MARINAS.....	52
1.1- Taxonomía.....	52
2- LA TORTUGA MARINA <i>LEPIDOCHELYS OLIVACEA</i>	53
2.1- Generalidades de la Especie.....	53
2.2- Estado poblacional.....	54

2.3-	Determinación sexual.....	55
2.4-	Diferenciación sexual.....	58
JUSTIFICACIÓN:	63
HIPÓTESIS:	64
OBJETIVO GENERAL:	64
OBJETIVOS PARTICULARES:	65
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:	66
RESULTADOS	66
1-	ANÁLISIS GLOBAL DE MARCAS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA:.....	66
1.1-	Análisis global de metilación del DNA por tratamiento con endonucleasas metilosensibles.....	66
1.2-	Análisis global de patrones de metilación del DNA mediante AIMS.....	70
1.3-	Análisis global de distribución de 5mC mediante inmunofluorescencias.....	78
1.4-	Análisis de presencia de 5hmC mediante Dot Blot.....	80
1.5-	Análisis global de distribución de 5hmC mediante inmunofluorescencias.....	82
1.6-	Análisis de distribución de acetilación de histonas mediante inmunofluorescencias. 87	
1.7-	Análisis de distribución de metilación de histonas mediante inmunofluorescencia. 90	
2-	ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL DNA SOBRE EL PROMOTOR DEL GEN <i>SOX9</i> : ...	94
2.1-	Clonación del primer exón y de la región 5' de <i>Sox9</i>	94
2.2-	Validación funcional del promotor del gen <i>Sox9</i>	98
2.3-	Análisis de metilación de DNA sobre el promotor del gen <i>Sox9</i>	105
2.4-	Clonación y análisis de secuencia de un posible potenciador TES.....	106
3-	ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL DNA SOBRE EL PROMOTOR DEL GEN <i>DMRT1</i>	113
3.1-	Clonación del primer exón y la región 5' del gen <i>Dmrt1</i>	113
3.2-	Análisis de metilación de DNA sobre el promotor del gen <i>Dmrt1</i>	115
3.3-	Análisis de metilación de DNA sobre el promotor del gen <i>Dmrt1</i> durante el periodo sexualmente indeterminado.....	117
DISCUSIÓN	118
CONCLUSIONES	129
PERSPECTIVAS	130
MATERIALES Y METODOS	132
REFERENCIAS	145

ARTÍCULO

LISTA DE ABREVIATURAS

5caC.- 5 carboxil-citosina

5fC.- 5 formil-citosina

5hmC.- 5 hidroxil-metil-citosina

5mC.- 5 metil-citosina

AIMS.- Amplificación de sitios inter-metilados

Amh.- Hormona antimulleriana

ChIP.- Inmuno-precipitación de la cromatina

CK.- citoqueratina

CpG.- Dinucleótido formado por una citosina seguida de una guanina. “p” denota al grupo fosfato.

CTCF.-Factor estructural de la cromatina “CCCTC-binding factor”

CYP19A1.- Aromatasa de la familia del citocromo P.

D. E.- Desviación estandar

Dmrt1.- Factor transcripcional “double sex and mab-3 related transcription factor1”

Dnmts.- DNA metil-transferasas

DNA.- Ácido desoxirribonucleico

DSA.- Determinación sexual ambiental

DSG.- Determinación sexual genética

DST.- Determinación sexual termosensible

ECR.- Región evolutivamente conservada

FoxL2.- Factor transcripcional “forkhead box protein L2”

GFP.- Proteína verde brillante, utilizada como reportero “Green fluorescent protein”

HAT.- Acetil-transferasa de histonas

HDAC.- Desacetilasas de histonas

HpaII.- Endonucleasa metilo-sensible del DNA (CCGG)

MspI.- Endonucleasa independiente de metilación (CCGG)

PcG.- Complejo Polycomb

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

PD.- Periodo sexualmente determinado

PI.- Periodo sexualmente indeterminado

PTS.- Periodo termosensible

RFP.- Proteína roja brillante, utilizada como reportero “Red fluorescent protein”

Sox9.- factor transcripcional del tipo Sox (SRY-BOX)

SRY.- factor transcripcional “Sex determining región of the Y chromosome”.

Sssl.- Metil-transferasa del DNA

SV40.- promotor viral de expresión constitutiva

TES.- Potenciador específico de testículo. Elemento regulador de la expresión del gen *Sox9*.

TESCO.- Secuencia “core” del elemento regulador TES

TET.- Enzimas del grupo “Ten-eleven translocator”, que añaden un grupo hidroxilo a la 5mC.

TK.- Tirosin cinasa

TPH.- Temperatura promotora de hembras

TPM.- Temperatura promotora de machos

TrxG.- Complejo Thrithorax

RESUMEN

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea* presenta determinación sexual dependiente de temperatura (DST). Ésto implica que cada individuo posee todos los genes necesarios para el desarrollo, tanto de un macho como de una hembra y que las diferencias entre ambos sexos no son resultado de la presencia o ausencia de genes, sino de cambios en sus niveles de expresión. El objetivo de este proyecto es analizar el papel de los mecanismos epigenéticos en la regulación de la expresión génica durante la DST en *L. olivacea*. Identificamos un dimorfismo en los patrones de metilación del DNA global entre ovarios y testículos y comprobamos que las diferencias se originan por eventos de metilación y desmetilación. Para determinar si la desmetilación podía ocurrir por un proceso activo, decidimos buscar la marca de 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC). Encontramos que la distribución de 5hmC difiere entre células del estroma y los cordones medulares, con un patrón opuesto entre gónadas incubadas a temperaturas productoras de machos o hembras. Así mismo, evaluamos la distribución de distintas modificaciones post traduccionales de histonas, y encontrando una acumulación de trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 en algunas células de ovario. Para el análisis sobre secuencias específicas, evaluamos los patrones de metilación del DNA sobre promotores de *Sox9* y *Dmrt1*. Nuestros resultados sugieren que la regulación de la expresión de *Sox9* es independiente de la metilación del DNA en su promotor. Por otra parte, el análisis sobre el promotor de *Dmrt1* evidenció un enriquecimiento en metilación del DNA en ovarios con respecto a testículos, lo que sugiere un papel de la metilación en la regulación de la expresión de este gen. Finalmente, se clonó un posible homólogo de la secuencia TES, descrita en mamíferos como un regulador de la transcripción de *Sox9*. Resultados preliminares sugieren un efecto represivo de este elemento en la expresión génica. Nuestros resultados sugieren que los mecanismos de regulación epigenética, pueden estar involucrados en la determinación sexual termosensible de *L. olivacea* y probablemente de otras especies.

ABSTRACT

Sex determination in vertebrates depends on the expression of a highly conserved network of genes. However, the mechanisms that trigger the activation of male or female producing networks vary among species. Sea turtles as *Lepidochelys olivacea* have temperature dependent sex determination (TSD); this means that each embryo has the complete set of genes necessary to develop either as male or female. Temperature has an effect on the levels of gene expression that trigger the activation gene networks for sex determination. The aim of this project was to study some epigenetic mechanisms that might be involved in TSD. We found dimorphism in global DNA methylation patterns between embryos incubated at female- or male-producing temperatures (FPT or MPT) which differentiate ovaries or testis, respectively. Differences arised from methylation as well as demethylation events, correlated to incubation temperature. To find if an active demethylation process was involved, we looked for the presence of 5-hydroxy-methyl-cytosine (5hmC). We found opposite distribution patterns of 5hmC between stromal cells and cells of the medullary cords at FPT or MPT. Furthermore, we compared the distribution of histone modifications and found that some cells showed an accumulation of trimethylation of lysine 27 on histone H3 and trimethylation on lysine 9 of histone H3 ovaries and testis, respectively. To make a more specific analysis, we evaluated DNA methylation over putative promoter sequences of *Sox9* and *Dmrt1*. Our results suggest that DNA methylation is not directly involved in the regulation of *Sox9* expression. In contrast, the analysis of the *Dmrt1* promoter showed higher DNA methylation levels in ovary than in testis, probably related to TSD. Moreover, an homolog of the TES sequence, described in mammals as a *Sox9* transcriptional regulator, was analysed in *L. olivacea*. Results suggest that this sequence has a repressive effect on expression. Current results indicate that epigenetic mechanisms occurring in developing gonads are involved in TSD of *L. olivacea* and probably in other species with TSD.

INTRODUCCIÓN

1. DETERMINACIÓN SEXUAL.

1.1- Determinación y Diferenciación Sexual.

Para hacer posible la reproducción sexual, es necesario que existan organismos con sistemas, órganos y gametos de tipo femenino o masculino. El proceso para desarrollarse como macho o hembra incluye dos etapas: determinación y diferenciación sexual (Hughes, 2001).

La determinación sexual se refiere al evento durante el cual se establece la ruta de desarrollo para la formación de una hembra o un macho. La diferenciación sexual, por otra parte, se define como el proceso para desarrollar el fenotipo característico de cada sexo, una vez que éste se ha determinado (Hughes, 2001; Merchant-Larios y Díaz-Hernández, 2013).

La diferenciación sexual de manera general, puede dividirse en primaria y secundaria. Durante la diferenciación sexual primaria el primordio gonadal se desarrolla como un ovario o un testículo. La diferenciación sexual secundaria lleva a la masculinización o feminización del resto del organismo, incluyendo genitales externos e internos y es dependiente del establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis gónada. De manera general la estructura y función de las gónadas se encuentra altamente conservada en los vertebrados. Sin embargo, existe una gran diversidad en los mecanismos involucrados en la determinación sexual entre grupos e incluso especies (Merchant-Larios y Díaz-Hernández, 2013).

1.2- Tipos de Determinación Sexual.

En general, hay dos modalidades de determinación sexual en los vertebrados: determinación sexual genética (DSG) y determinación sexual ambiental (DSA) (Pieau, 1996; Koopman, 2001).

En organismos con DSG, el sexo de cada individuo se define por la carga genética que aportan los gametos desde el momento de la fecundación. La DSG se considera un sistema cerrado, puesto que todos los factores involucrados se encuentran contenidos en el cigoto (Merchant-Larios et al., 2010). El factor que define si un individuo será hembra o macho es la presencia o ausencia de alelos, genes o incluso cromosomas sexuales. En mamíferos, los individuos con cromosomas sexuales XX se desarrollan como hembras, mientras que los cromosomas XY generan machos (Ezaz et al., 2006). Otro ejemplo de DSG es el anfibio *Xenopus laevis*, en el cual la presencia del gen feminizante *Dm-W* es la única diferencia genética entre machos y hembras (Yoshimoto et al., 2007). La DSG se caracteriza por una descendencia cercana al 50% de individuos de cada sexo, debido a la naturaleza de la segregación de cromosomas durante la gametogénesis (Merchant-Larios et al., 2010).

En el caso de la DSA, el sexo del organismo se define durante su desarrollo por factores tales como disponibilidad de nutrientes, fotoperiodo o temperatura (Janzen y Phillips, 2006). La DSA se define como un sistema abierto por ser un proceso receptivo a factores externos al embrión (Merchant-Larios et al., 2010). En vertebrados amniotas (reptiles, aves y mamíferos), un buen número de especies de reptiles poseen determinación sexual termosensible (DST), lo que significa que el

sexo del individuo depende de la temperatura de incubación del embrión durante un periodo susceptible en el desarrollo, conocido como periodo termosensible (PTS) (Bull, 1980). Esta modalidad de determinación sexual se encuentra en algunas lagartijas, varias tortugas dulceacuícolas y en todas las tortugas marinas y caimáns (Ferguson y Joanen, 1982; Merchant-Larios et al., 1989).

En la DSA, no hay diferencias genéticas entre organismos de distinto sexo, lo que implica que cada individuo tiene el potencial de desarrollarse como un macho o como una hembra. En organismos con este tipo de determinación sexual es común encontrar camadas de un solo sexo en su mayoría, debido a las condiciones similares en que se desarrollan todos los embriones. Se ha sugerido que este tipo de determinación sexual puede resultar benéfico para los organismos de su especie al evitar la endogamia, así como ayudar a regular la proporción de machos y hembras en épocas del año específicas, cuando estos requieren distinta afluencia de recursos o tienen distintos periodos de maduración sexual (Janzen y Phillips, 2006).

Existen además organismos que dependen tanto del factor genético como del ambiental para determinar su sexo. En estos casos, el programa genético marca una predisposición en cada individuo hacia uno de los dos sexos. Sin embargo, condiciones específicas en el medio pueden sobreponerse y llevar al embrión a desarrollarse con un sexo distinto al predeterminado. Ésto se ha estudiado principalmente en algunas lagartijas y peces (Janes y Wayne, 2006; Conover y Kynard, 1981)

Pese a estas diferencias entre las dos modalidades de determinación sexual, el proceso que lleva al establecimiento y diferenciación morfológica de la gónada se encuentra altamente conservado en los vertebrados amniotas.

1.3- Desarrollo de la Gónada.

De manera general, la gonadogénesis en vertebrados comienza con el establecimiento de la cresta genital para formar primero una gónada morfológicamente indiferenciada y después la estructura típica de un ovario o un testículo (DeFalco y Capel, 2009). En vertebrados amniotas la cresta gonadal se forma en la cavidad celómica, a partir de un engrosamiento del mesotelio que recubre la superficie ventromedial del mesonefros. El mesotelio de la cresta se expande por división celular asimétrica y por reclutamiento de vasos y células mesenquimáticas provenientes del mesonefros adyacente (Díaz-Hernández et al., 2012)

La principal característica del primordio gonadal es su bipotencialidad para diferenciarse como un ovario o un testículo. Pueden distinguirse dos compartimientos en el primordio gonadal: la corteza y la médula. En la médula se encuentran varios tipos celulares: los precursores de células de soporte, los precursores de las células esteroideogénicas y las células del estroma. Las células de soporte de tipo epitelial, derivadas del mesotelio, dan origen a las células que rodean y promueven el desarrollo de las células germinales, corresponden a las células de Sertoli en el testículo y a las células granulosa en el ovario (DeFalco y Capel, 2009). En el estroma se diferencian las células esteroideogénicas de Leydig

en el testículo y células de la teca en el ovario. Entre las células del estroma, se encuentran células mesenquimales, fibroblastos y precursoras de células mioides, además de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, tanto en ovario como en testículo (Loffler y Koopman, 2002).

Después de la determinación sexual, cada compartimento en la gónada bipotencial puede generar la arquitectura de un ovario o de un testículo. En el ratón, la corteza prolifera y se engrosa para alojar a las células germinales en el ovario. En el testículo, la médula prolifera y se condensan las células de Sertoli para formar cordones seminíferos (DeFalco y Capel, 2009). Las mismas células de Sertoli son responsables de iniciar el destino de las demás células gonadales hacia el fenotipo de un testículo (Koopman et al., 1991).

Dos pares de ductos genitales (Wolff en machos y Müller en hembras) se forman a partir de la invaginación del epitelio superficial del mesonefros en ambos sexos. Sin embargo, solo un par de ellos completará su formación de acuerdo con el sexo gonadal. En el macho, los testículos producen dos reguladores endocrinos: la testosterona en células de Leydig y la hormona antimülleriana en células de Sertoli, las cuales inducen la diferenciación del ducto de Wolff y estructuras genitales internas del macho, mientras que el ducto Mülleriano sufre un proceso de atrofia (Wilhem et al., 2007). En embriones hembra, por otra parte, el ducto de Wolff sufre un proceso de degeneración y el ducto Mülleriano da origen al oviducto, el útero y la parte superior de la vagina, (Loffler y Koopman, 2002).

1.4- Determinación y Diferenciación Sexual en Mamíferos.

Además de las gónadas, los fetos de mamífero desarrollan genitales masculinos o femeninos a partir de precursores similares en los dos sexos: los ductos de Müller y Wolff, precursores de los órganos internos de hembras y machos, respectivamente, así como el seno urogenital, que constituye el primordio de los genitales externos. Décadas atrás se demostró que la presencia del testículo definía el destino del desarrollo sexual fenotípico del feto. Alfred Jost (1947) realizó cirugías de extirpación de gónadas en fetos de conejo: la extirpación de los testículos fetales llevó al desarrollo de genitales internos y externos con fenotipo femenino. Asimismo, al implantar un testículo sustituyendo al ovario, los ductos y el seno urogenital desarrollan el fenotipo propio de un macho. El mamífero más y mejor estudiado es el ratón, por lo que la mayor parte del conocimiento que tenemos sobre los procesos de determinación y diferenciación sexual provienen de esta especie. A continuación haremos una breve descripción:

a) Formación del testículo

. En organismos XY, la gónada bipotencial dará lugar a un testículo, para esto, un grupo de células de la médula provenientes de la primera división del epitelio celómico comienzan a expresar el gen *Sry* (por las siglas en inglés para “sex-determining region of the Y chromosome”), que codifica para el factor transcripcional del mismo nombre (Koopman et al., 1991). Este gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma sexual Y, por lo que no existe en el genoma de hembras XX (Kent et al., 1996). La expresión de *Sry* depende del factor

esteroidogénico 1 (*Sf1*) que se expresa en la gónada bipotencial, así como de la presencia de los factores *Wt1* (+KTS), *Gata4* y *Fog2*. Ratones con mutaciones tanto en *Gata4* como en *Fog2* no desarrollan cordones medulares ni estructuras específicas de testículo (Brennan y Capel, 2004).

Individuos XX con inserciones del gen *Sry* se desarrollan como machos, mientras que individuos XY con deleciones o mutaciones de este gen se desarrollan como hembras, demostrando que *Sry* es un gen necesario y suficiente para dirigir la determinación sexual en mamíferos hacia un destino masculinizante (Koopman et al., 1991). El tiempo que dura la expresión de *Sry* varía entre especies. En ratón dura apenas algunas horas, sin embargo, es suficiente para activar, junto con *Sf1*, la expresión del gen autosómico *Sox9* (Sekido y Lovel Badge, 2008), que también codifica para un factor transcripcional. En humanos se mantiene la expresión de *Sry* en organismos adultos, aunque la localización del factor es citoplasmática después de la determinación sexual y se desconocen otras funciones para este factor en etapas posteriores (Harley et al., 2003)

El inducir de manera artificial la expresión de *Sox9* en individuos XX lleva a su masculinización, mientras que inhibirla en individuos XY lleva a reversión sexual y formación de ovarios, demostrando que la principal función de *Sry* para determinar el sexo, es la inducir la expresión de *Sox9* (Harley et al., 2003). Una vez que se ha apagado la expresión de *Sry*, la expresión de *Sox9* se mantiene por autorregulación del mismo gen, así como por efecto de los factores *Sox8* (con estructura y funciones redundantes con *Sox9*, aunque no puede sustituir a *Sox9* en su ausencia) y *Fgf9*

(Fibroblast growth factor 9) (Chaboissier et al., 2004; Sekido et al., 2004). Sox9, junto con Fgf9 contienen contra la expresión de genes feminizantes, como *Wnt4*.

Previo a la expresión de *Sry*, la gónada bipotencial presenta bajos niveles del factor Sox9, que se encuentra principalmente en citoplasma, después de la expresión de *Sry*, los niveles de Sox9 aumentan y se acumula en núcleo (Sekido et al., 2004). Una vez en el núcleo, Sox9 inicia la cascada de eventos necesarios y suficientes para la masculinización de la gónada. Las células que expresan Sox9 pasan por un proceso de condensación para formar el epitelio de los cordones seminíferos. Estas células se convertirán en las células de Sertoli y formarán el nicho para alojar a las células germinales y permitir la espermatogénesis (Koopman, 2001).

Las células de Sertoli segregan factores, como la prostaglandina D2 que permitirán reclutar más células que expresen Sox9. El factor Sox9, en conjunto con Sf1 y GATA4, activan la expresión de la hormona antimulleriana (*Amh*), la cual es una de las principales efectoras para la regresión del conducto de Müller y masculinización del seno urogenital (Josso et al., 2005). De esta forma inicia la vascularización del testículo a partir de células que migran desde el mesonefros y se diferencian también las células de Leydig productoras de la testosterona. El factor Sf1 continúa expresándose y se acumula especialmente en células de Sertoli y de Leydig (Koopman, 2001).

Otro gen importante en el desarrollo de la gónada es *Dmrt1* (double sex and mab-3 related transcription factor-1) (Sinclair et al., 1990). Es un factor transcripcional necesario para la gametogénesis tanto en hembras como en machos. Se encuentra

en mayor dosis en testículo y se expresa principalmente en las células de Sertoli (Zarkower, 2001). En ratones XY con mutaciones en *Dmrt1*, las células Sertoli dejan de expresar *Sox9*, comienzan a expresar genes feminizantes como *FoxL2* y adoptan características propias de la granulosa en ovarios, llevando a la reversión sexual a las pocas semanas de nacimiento (Raymond et al., 2000; Matson et al., 2011). Recientemente se demostró que inducir la sobre expresión de *Dmrt1* en gónadas de ratones XX es suficiente para promover la masculinización primaria y secundaria, dirigiendo la diferenciación de las células de linaje de soporte y esteroidogénico hacia células de Sertoli y Leydig respectivamente, aunque no ocurre la condensación adecuada de los túbulos seminíferos (Zhao et al., 2015). Por lo tanto, *Dmrt1* en mamíferos no es necesario para la diferenciación inicial del testículo, sino para el mantenimiento de su identidad.

b) Formación del ovario

En mamíferos con cromosomas sexuales XX se desarrolla un ovario a partir de la gónada bipotencial, para esto no hay un evento inicial determinante como la expresión de *Sry* en testículo, sino que se continúa un lento proceso de estructuración de la gónada. Durante la diferenciación del ovario se observa apoptosis en las células de la médula e incremento en la proliferación de células en la corteza. Las células que en macho estarían destinadas a ser las células de Sertoli, se convierten en células de la granulosa. Estas células no expresan *Sox9*, pero en cambio, expresan factores transcripcionales feminizantes como “*Forkhead box protein L2*” (*FoxL2*) (Sinclair y Smith, 2009). Mutaciones en este gen llevan a la expresión de *Sox9* y a la reversión sexual parcial en ratones; en humanos, la pérdida

de función de *FoxL2* lleva a la disfunción prematura del ovario; mientras que en cabras causa la reversión total del ovario, lo que ha dificultado esclarecer el alcance de la función de este gen en mamíferos (Ulenhaut et al., 2009).

Wnt4, que inicialmente se expresa en ambos sexos, deja de expresarse en machos mientras que mantiene su expresión en mesonefros, gónada y el mesénquima que rodea los conductos de Müller en hembras. Su expresión previene la migración de células desde el mesonefros y las suprarrenales y evita la formación de vasos sanguíneos y de las células de Leydig típicas en testículo. Ratones XX mutantes en *Wnt4* presentan reversión parcial de la gónada, que conserva los ductos de Wölff y pierde los conductos de Müller; las gónadas presentan apariencia de testículos, aunque no desarrollan túbulos medulares (Vainio et al., 1999). Dobles mutantes en los genes *FoxL2* y *Wnt4* logran reversión total de ovario a testículo en ratón (Wilhelm et al., 2007).

Otro factor que de manera reciente se ha identificado como importante para la diferenciación del ovario es la R-spondina1 (*Rspo1*), un ligando capaz de regular las vías de señalización de Wnt y β -catenina (Parma et al., 2006). La acumulación de este factor es necesaria para la determinación del ovario, se ha propuesto que *Rspo1* y *Wnt4* antagonizan la función de *Sox9* y *Fgf9* en la gónada bipotencial para determinar el sexo gonadal (Di Napoli y Capel, 2008). Mutaciones en el gen de *Rspo1* llevan a la masculinización total de la gónada. Se sabe que *Wnt4* ayuda a incrementar la expresión de este gen en etapas tempranas de la diferenciación (Smith et al., 2008)

1.5- Determinación Sexual en otros Vertebrados con DSG

Aunque la presencia de *Sry* es el factor definitivo para la determinación sexual del embrión en mamíferos, no se han encontrado homólogos a este gen en otros vertebrados, sugiriendo que este mecanismo de determinación sexual evolucionó de manera reciente en este grupo, por una duplicación y modificación del gen *Sox3* (Kato y Miyata, 1999). Otras estrategias para la determinación sexual se han encontrado en otros grupos de vertebrados.

En aves, un factor determinante parece ser la dosis del gen *Dmrt1* (Smith et al., 2009). Este gen se encuentra en el cromosoma sexual Z, de modo que los machos homocigotos en este caso, con cromosomas sexuales ZZ, presentan doble dosis de este gen, mientras que las hembras heterocigotas ZW, tienen una sola copia. El número de copias de este gen tiene un efecto directo sobre los niveles del factor *Dmrt1* en organismos ZZ y ZW (Nanda et al., 2002).

La cascada de diferenciación sexual posterior a la determinación por dosis de *Dmrt1*, involucra los mismos genes que en mamíferos. Sin embargo, los genes muestran diferencias espacio-temporales en su expresión. En aves, por ejemplo, el gen *Amh* se expresa antes de *Sox9*, que inicia su expresión en testículo hasta etapas posteriores de la diferenciación sexual (Kent et al., 1996). La expresión de los genes *Sf1* y *Amh*, por otra parte, inicia en etapas previas a la determinación sexual en la gónada bipotencial y se mantiene tanto en ovario como en testículo (Pieau et al., 1999)

Un mecanismo distinto de DSG puede observarse en el anfibio *Xenopus laevis*, donde la única diferencia genética entre machos y hembras parece ser la presencia del gen *Dm-W*. Este gen surgió como producto de la duplicación de *Dmrt1* y compite con éste de manera dominante sobre genes blanco, sin tener su mismo efecto regulador sobre éstos, lo que lleva a la expresión de genes feminizantes y represión de genes masculinizantes (Yoshimoto et al., 2007).

1.6- Determinación Sexual Termosensible.

Se considera que hay determinación sexual termosensible (DST) cuando el factor determinante del sexo es la temperatura de incubación en la que se desarrolla el embrión. Se reportó por primera vez en 1966 en la lagartija africana *Agama agama* (Charnier, 1966). Dependiendo de los patrones de temperatura que determinan el sexo, la DST puede clasificarse de la siguiente manera (Bull, 1980; Pieau, 1996):

- **Ia.** Menores temperaturas determinan a los embriones como machos, mayores como hembras.
- **Ib.** Menores temperaturas determinan a los embriones como hembras, mayores como machos.
- **II.** Menores y mayores temperaturas determinan a los embriones como hembras, mientras que temperaturas intermedias los determinan como machos.

Existe un periodo específico del desarrollo durante el cual el embrión es susceptible a la temperatura para su determinación sexual. A este periodo se le conoce como periodo termosensible (PTS) y puede también definirse como el periodo durante el

cual se establecen los procesos moleculares irreversibles que inducen la diferenciación de un organismo como hembra o macho. Este periodo ocurre generalmente durante el segundo tercio del desarrollo embrionario (Mrosovsky y Pieau, 1991).

Para identificar el PTS en cada especie se realizan experimentos de intercambio de temperaturas. Éstos consisten en incubar varios embriones a temperatura promotora de hembras (TPH) o de machos (TPM) y cambiarlos a la temperatura promotora del sexo contrario en distintos momentos del desarrollo, de esta manera puede dividirse el desarrollo embrionario en 3 etapas, según el estado de determinación sexual de una población de embriones (Merchant-Larios et al., 1997):

- **Periodo Indeterminado-** Este periodo se define porque los embriones no han determinado su sexo, la temperatura no ha marcado de manera irreversible el sexo de los embriones, por lo que en experimentos de intercambio responden a la segunda temperatura de incubación.
- **Periodo Termosensible-** Es el periodo durante el cual los embriones son susceptibles a la temperatura de incubación para determinar su sexo de manera irreversible. En experimentos de intercambio algunos embriones responden al cambio de temperatura, mientras que otros ya han determinado su sexo al momento del cambio.
- **Periodo Determinado-** En este periodo los mecanismos moleculares han establecido de manera irreversible el sexo de los embriones, de manera que no

responden al intercambio de temperatura y se desarrollan de acuerdo a la temperatura inicial de incubación.

Otros parámetros importantes en organismos con DTS son el rango transicional y la temperatura pivote (Fig. 1). Rango transicional se refiere al rango de temperatura con el cual una población pasa de generar 100% de hembras a generar 100% de machos, es decir, la diferencia mínima en grados entre las temperaturas necesarias para inducir la masculinización o la feminización de la totalidad de los embriones en una población (Merchant-Larios, 1999; Wibbels, 2003). La temperatura pivote, por otra parte, se define como la temperatura de incubación con la cual se obtienen porcentajes iguales de machos y hembras en una población. Se ha reportado que la temperatura pivote puede variar incluso entre nidos de la misma especie, por lo que se cree que puede haber influencia de un factor genético en algunas especies (Mrosovsky y Pieau, 1988).

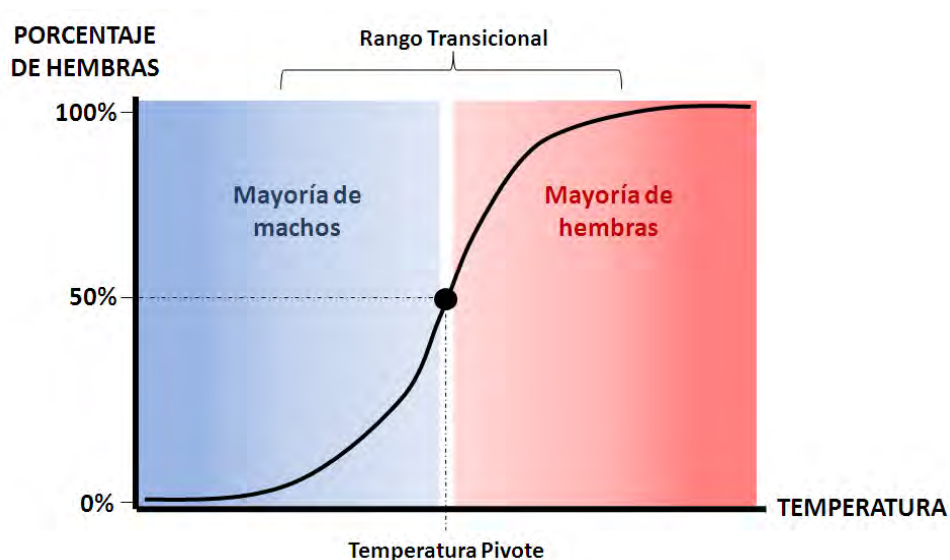


Fig. 1. Determinación sexual dependiente de temperatura. Relación entre temperatura y porcentaje de hembras. El rango transicional y la temperatura pivote se representan de manera gráfica.

1.7- Mecanismos Moleculares de la Determinación Sexual Termosensible.

Para la mayoría de los genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en mamíferos se han encontrado homólogos en vertebrados con DST. Entre estos genes se encuentran *Sf1*, *Wt1*, *Sox9*, *Dmrt1*, *Mis* (*Amh* en mamíferos), *Wnt4* y *FoxL2*. Estos genes no solo muestran conservación a nivel de secuencia, sino también en los patrones dimórficos de expresión entre machos y hembras. Sin embargo, existen algunas heterocronías en el establecimiento de los patrones de expresión entre distintas especies (Shoemaker y Crews, 2009).

Sf1 se expresa en la gónada bipotencial en reptiles como en mamíferos (Flemming et al., 1999; Western et al., 2000), sugiriendo un papel conservado en la formación de la gónada bipotencial de manera independiente a la temperatura de incubación. Sin embargo, los niveles de expresión varían después del PTS: En el lagarto americano *Alligator mississippiensis* con DTS de tipo Ib, se observa mayor expresión en ovario que en testículo (Western et al., 2000). En la tortuga dulceacuícola *Trachemys scripta* se detectan mayores niveles de expresión de *Sf1* en embriones incubados a TPM principalmente en cordones medulares, mientras que en embriones a TPH la expresión se ve disminuida y limitada a células de la corteza de la gónada (Flemming et al., 1999). De manera similar, la expresión de *Wt1* se ha confirmado en la gónada bipotencial en varias especies con DST y se corroboró la existencia de sus dos isoformas. Sin embargo, el análisis de inmunolocalización en *T. scripta* mostró que *Wt1* se detecta principalmente en cordones medulares en la gónada bipotencial, mientras que su distribución difiere después del PTS: a TPM, el

factor conserva su localización en cordones medulares, mientras que a TPH, su presencia es específica de células de la corteza (Shoemaker et al., 2007).

Después del PTS, *Sox9* se ha encontrado expresado a la alta en machos en todas las especies con DST analizadas, incluyendo 3 especies de tortugas: *T. scripta*, *L. olivacea* y *C. picta*, el caimán *Alligator mississippiensis* y el gecko *Eublepharis macularius* (Spotila et al., 1998; Moreno-Mendoza et al., 1999; Western, et al.1999).

No obstante, en caimán se detectó expresión de *Sox9* hasta etapas posteriores al PTS (Western et al., 1999). En los demás grupos analizados se observó la expresión de *Sox9* en la gónada bipotencial; los niveles de expresión aumentan en embriones determinados como machos y disminuyen en hembras después del PTS. Este es otro ejemplo de genes que, a pesar de presentar funciones y patrones de distribución conservados, muestran heterocronías durante el desarrollo.

Estudios del gen *Mis* demuestran patrones de expresión y funciones conservadas. En *T. scripta* se comprobó su acumulación en cordones medulares en testículos desde etapas tempranas de la gonadogénesis, previas al PTS. También se comprobó que los niveles de expresión bajan rápidamente en respuesta al cambio de temperatura de incubación a TPH (Shoemaker y Crews, 2009). Tanto en *T. scripta* como en *A. mississippiensis*, la expresión dimórfica de *Mis* precede la de *Sox9*, de manera similar a lo que ocurre en aves e inversa a lo que ocurre en mamíferos. En ambas especies se observa mayor expresión de *Mis* en embriones incubados a TPM que a TPH desde el periodo sexualmente indeterminado y se acentúa durante el PTS (Shoemaker y Crews, 2009). Esto hace a *Mis* un posible

candidato a ser regulado directamente por la temperatura de incubación y tener un papel importante para la determinación sexual en organismos con DST.

En *A. mississippiensis*, *L. olivacea* y *T. scripta* la expresión inicial de *Dmrt1* es monomórfica (se detectan los mismos niveles a TPM y TPH) en la gónada bipotencial; sin embargo, la expresión aumenta drásticamente a TPM y disminuye hasta niveles indetectables durante el PTS (Smith et al., 1999; Kettlewell et al., 2000, Shoemaker et al., 2007). La hibridación *in situ* en testículos de *T. scripta* mostró que la expresión de *Dmrt1* está restringida a los cordones medulares (Kettlewell et al., 2000). Su expresión mostró ser dependiente de temperatura al aumentar rápidamente en intercambios de TPH a TPM, y disminuir de TPM a TPH (Shoemaker y Crews, 2009). Por otra parte en las tortugas *T. scripta* y *L. olivacea*, la expresión de *FoxL2* aumenta considerablemente en ovario al final del PTS; mientras que *Dmrt1* presenta mayor expresión en sistema urogenital de embriones incubados a TPM desde etapas tempranas del PTS, demostrando un papel conservado de estos genes en la formación de ovarios y testículos, respectivamente (Shoemaker et al., 2007; Shoemaker y Crews, 2009).

En *T. scripta*, el gen *Rspo1* mostró patrones dimórficos de expresión desde etapas tempranas del PTS, después de lo cual la diferencia en niveles de expresión se acentúa cada vez más. *Rspo1* mostró una regulación rápida en respuesta a cambios de temperatura, mientras que *Wnt4* no mostró diferencias en su expresión entre embriones incubados a TPM o TPH hasta etapas tardías de la diferenciación gonadal. Ésto sugiere un posible papel de *Rspo1* para la determinación sexual de

embriones incubados a TPH, así como un papel de *Wnt4* para la posterior diferenciación del ovario (Smith et al., 2008).

1.8- El Papel de la Aromatasa en la Determinación Sexual Termosensible.

Desde hace varias décadas se descubrió que al suministrar estradiol a ranas *Xenopus laevis* en estadio larvario podía revertirse su sexo y generar 100% de individuos hembra (Gallien, 1953), lo que atrajo la atención al estudio de hormonas esteroides. Posteriormente se probó el mismo efecto en organismos con DST: al suministrar estradiol a embriones de reptiles produce un efecto de feminización en individuos incubados a TPM (Crews et al., 1991). De manera interesante, el suministrar testosterona también lleva a la feminización, mientras que al suministrar dihidrotestosterona, un andrógeno no aromatizable, se produce un efecto de masculinización (Johnson, 1995). Ésto se debe a la actividad de la aromatasa CYP19A1, una enzima de la familia de las citocromo p450 que cataliza la aromatización de testosterona en estradiol (Pieau, 1996).

Al demostrar que la actividad de la aromatasa incrementaba a mayor temperatura (Pieau, 1996), se planteó la posibilidad de que éste fuera el mecanismo de determinación sexual para los organismos con DST de tipo **la**, donde mayor temperatura lleva a feminización de la gónada. Apoyando a esta hipótesis se demostró que no solo la actividad, sino también los niveles de la aromatasa aumentan a TPH en las tortugas *T. scripta* (Ramsey et al., 2007) y *C. serpentina* (Rhen et al., 2007). Aunque en *T. scripta* el estradiol exógeno puede inducir la

feminización de la gónada y abatir la expresión de Sox9, únicamente si se suministra antes de que termine el PTS (Barske y Capel, 2010).

Evidencia en contra surge del modelo de *L. olivacea*, donde el estradiol exógeno logra también feminizar la gónada a TPM. Sin embargo, este efecto no mimetiza completamente el mecanismo de determinación sexual por temperatura. Las gónadas de embriones tratadas con estradiol muestran un tamaño considerablemente menor a un ovario normal de embriones incubados a TPH. Además de no mostrar una reversión total por continuar expresando el factor masculinizante Sox9. Esta evidencia sugiere un papel de la aromatasa y los niveles de estradiol para la diferenciación del ovario, atribuibles a la perturbación del desarrollo gonadal por el estradiol exógeno suministrado a TPM (Merchant-Larios y Díaz-Hernández, 2013).

En resumen, aunque se conocen varios genes que presentan expresión dimórfica, el mecanismo responsable de interpretar la temperatura de incubación y traducirla en la red de expresión génica involucrada en la determinación sexual en organismos con DST, permanece desconocido y es una de las principales interrogantes para este estudio.

2- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Pese a que todas las células de un individuo poseen la misma información genética (a excepción de algunos tipos celulares específicos), existe una gran diversidad en cuanto a forma, estructura y función entre los más de 200 distintos tipos celulares de un organismo. Esta diversidad se debe a que existen patrones de expresión génica

específicos para cada tipo celular. Las diferencias en la regulación diferencial linaje-específico se explican por cambios moleculares que ocurren a nivel de la cromatina. Como esos cambios no afectan la secuencia de nucleótidos responsable del código genético, se abrió una nueva área de investigación denominada Epigenética (Allis et al., 2008). De modo que un mismo genoma puede generar miles de epigenomas o perfiles de expresión génica, dependiendo de su ubicación espacio-temporal.

La regulación epigenética es posible debido a que el DNA en el núcleo interactúa con gran diversidad de proteínas, formando una estructura altamente organizada: la cromatina (Fig. 2). En ella se compactan casi dos metros de DNA en un núcleo de 30 a 50 micras de diámetro. De acuerdo con sus niveles de condensación intranuclear, la cromatina se organiza de dos formas: su modalidad laxa denominada eucromatina, favorece la exposición del DNA para su interacción con moléculas involucradas en el proceso de transcripción. La otra modalidad es la que tiene una estructura compacta llamada heterocromatina, en este caso la maquinaria transcripcional es poco o totalmente inaccesible al DNA (Lewin, 2008). Los genes contenidos en regiones con alto grado de compactación difícilmente podrán ser transcritos, por lo que se les considera “silenciados”.

El nivel de organización más simple de la cromatina se conoce como fibra de 10 nm o “collar de perlas” por su apariencia en el microscopio electrónico. Esta estructura comprende a la molécula de DNA en interacción con un octámero de proteínas denominadas histonas, integrando el complejo conocido como nucleosoma. Cada nucleosoma contiene 2 de cada uno de los 4 tipos de histonas H2A, H2B, H3 y H4 en contacto con 146 pb rodeando al núcleo protéico. Esta estructura se estabiliza

por la carga positiva de las histonas y la carga negativa del DNA (Felsenfeld y Groudine, 2003).

La fibra de 10 nm se pliega sobre si misma formando la fibra de 30 nm o solenoide que es estabilizada por la histona “linker” H1 que se posiciona entre los nucleosomas. La cromatina puede plegarse aun más, hasta formar la estructura del cromosoma metafásico, que es su forma más compacta (Fig. 2).

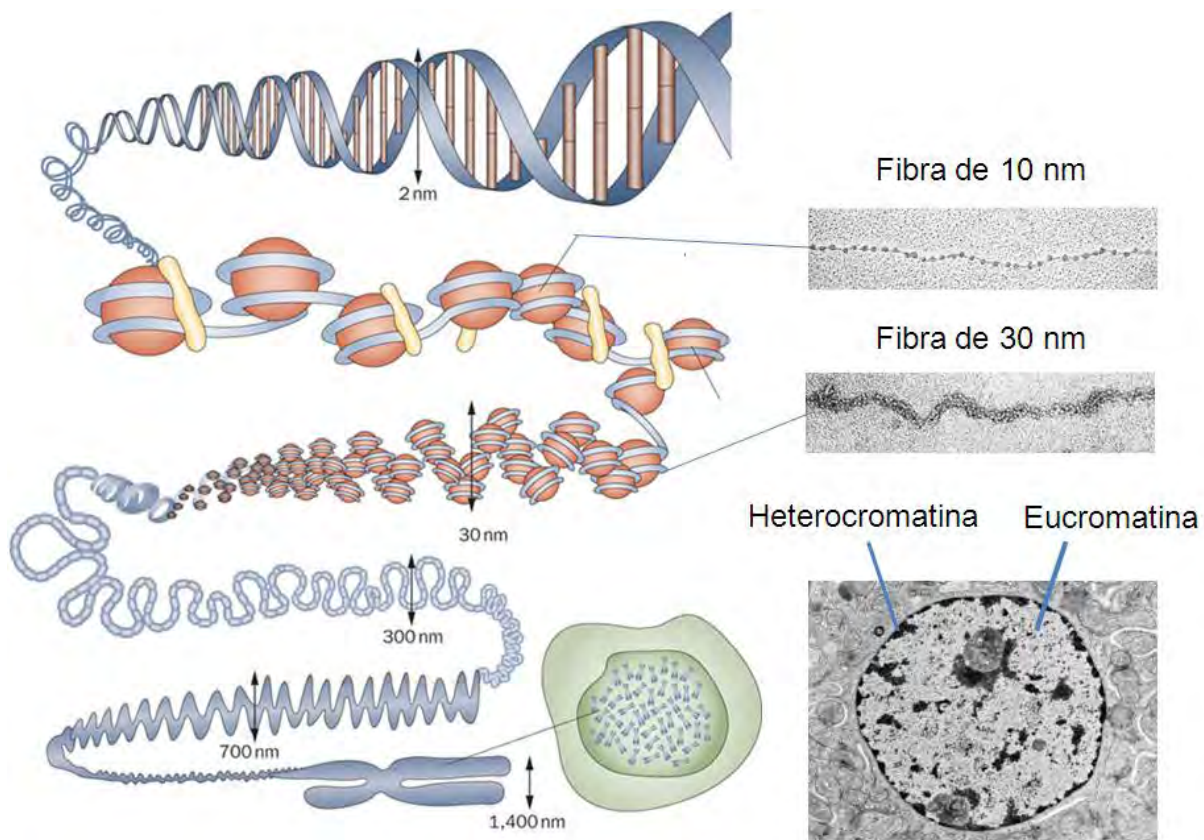


Fig. 2. Niveles de organización de la cromatina al interior del núcleo. El DNA interactúa con octámeros de histonas para generar nucleosomas y estructurar la cromatina como fibra de 10 nm o collar de perlas. Esta estructura se pliega sobre si misma para dar lugar al solenoide o fibra de 30 nm. La compactación continúa a distintos niveles hasta formar la estructura más compacta en el cromosoma metafásico. Distintos niveles de compactación de la cromatina generan regiones con distinta densidad electrónica (heterocromatina y eucromatina). Modificado de Cremer y Cremer, 2001; Beisel y Paro, 2011 y Lewin, 2008.

Distintos mecanismos epigenéticos actúan sobre la cromatina para regular la expresión génica de los genes que contiene. Dichos mecanismos epigenéticos pueden actuar modificando directamente la molécula de DNA o sobre sus proteínas asociadas para modular la accesibilidad a la maquinaria de transcripción.

2.1- Metilación y Desmetilación del DNA

Una de las modificaciones epigenéticas que actúan directamente sobre la molécula de DNA es la metilación de citosinas en el carbono 5 (5mC), que ocurre cuando un grupo metilo (CH₃) se une de manera covalente al carbono en la posición 5 de una citosina (Chen y Riggs, 2011) (Fig. 3). Esta modificación ocurre principalmente cuando una citosina es seguida por una guanina hacia el extremo 3', formando el dinucleótido CpG. La metilación de citosinas se asocia de manera general a la formación de heterocromatina y silenciamiento génico y presenta un papel evolutivamente conservado en plantas, hongos y animales, aunque no se encuentra presente en todas las especies (Lee et al., 2010).

La 5mC se considera una modificación epigenética por no alterar la secuencia nucleotídica. Pese a afectar directamente las citosinas en la molécula de DNA, las citosinas metiladas son transcritas como citosinas normales por la RNAPol II y son interpretadas como citosinas comunes en reacciones de secuenciación (Klose y Bird, 2006).

La metilación del DNA es uno de los mecanismos de regulación epigenética mas estudiados debido a su gran relevancia para la regulación de la expresión génica y el mantenimiento de la estabilidad en genomas de vertebrados. La 5mC en secuencias

repetidas es necesaria para prevenir eventos de recombinación, así como para evitar la movilidad de retrotransposones y su propagación por el genoma. La metilación del DNA es importante también para el silenciamiento de genes durante la diferenciación celular y el desarrollo, además de ser necesaria para el silenciamiento del cromosoma sexual X en mamíferos y el Z en aves (Sinclair y Smith, 2009; Simon et al., 2013). Otro proceso con el cual se ha asociado la metilación del DNA es la impronta genética, que se refiere al silenciamiento mono-alélico de un gen para reducir parcialmente su nivel de expresión (Klose y Bird, 2006).

Las enzimas encargadas de establecer y mantener la marca de 5mC son las metil-transferasas de DNA (Dnmts). En mamífero, Dnmt1 se ha caracterizado por ser una metil-transferasa de mantenimiento por su alta afinidad por DNA hemi-metilado, lo que permite restablecer los patrones de metilación después de la división celular. De manera consistente con este rol, se ha encontrado a la Dnmt1 asociada a las horquillas de replicación. Dnmt3a y Dnmt3b, por otra parte, se conocen como metil-transferasa *de novo*, tienen afinidad por CpGs no metilados y son las encargadas de establecer los patrones de metilación del DNA durante el desarrollo (Singal y Ginder, 1999; Bird, 2002).

Existe una dinámica entre el grado de conservación y los niveles de metilación en dinucleótidos CpG. De manera normal, las citosinas pueden sufrir un proceso de deaminación, que las lleva a su conversión a uracilo, evento que es rápidamente corregido. Sin embargo, la deaminación de 5mC lleva a una conversión de citosina a timina. Esta conversión, de no ser revertida, causa una sustitución gradual de

dinucleótidos CpG por TpG, lo que ha llevado a una sub-representación de CpGs a lo largo del genoma.

Las islas CpG (regiones especialmente enriquecidas en dinucleótidos CpG), por otra parte, se encuentran por lo general hipometiladas, lo que ha llevado a su conservación a nivel evolutivo y a ser consideradas como un importante criterio para encontrar posibles promotores utilizando herramientas bioinformáticas (Fig. 3). Estas regiones se han clasificado según su abundancia de CpGs en islas de alta, media y baja densidad. Análisis de metilación en genomas completos han demostrado que los promotores asociados a islas CpG de baja densidad, son aquellos susceptibles a la regulación por metilación del DNA (Weber, 2007).

Aunque hasta hace algunos años se creía que el único mecanismo para remover la metilación de las citosinas era la desmetilación pasiva dependiente del ciclo celular, recientemente se describió un proceso de desmetilación activa. Ésto permitió atribuir mayor plasticidad a los patrones de 5mC, que antes se consideraban estables.

El proceso de desmetilación activa involucra la oxidación irreversible de la 5mC en 5-hidroxi-metil-citosina (5hmC), catalizado por las enzimas ten-eleven translocator (TET) (Tahiliani, 2009). Las TET contienen un dominio CXXC de unión a CpGs muy similar al de las Dnmts; sin embargo, las TET presentan afinidad, no solo por citosinas desmetiladas, sino también por 5mC y 5hmC y se ven enriquecidas principalmente en regiones de DNA con alto contenido de CpGs, como son las islas CpG (Ficz, 2011; Williams, 2011).

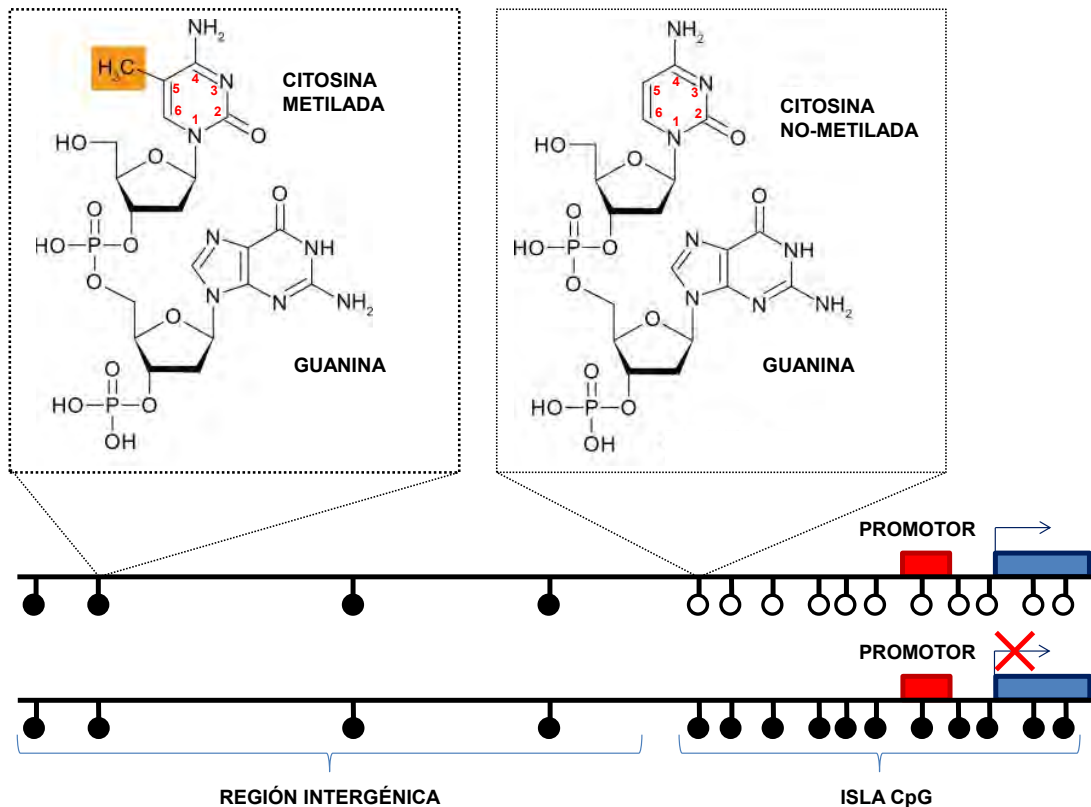


Fig. 3. Metilación del DNA. Las citosinas en contexto CpG (citosina seguida de guanina), son propensas a sufrir un proceso de metilación (cuadro naranja) en el carbono en la posición 5 de la citosina (números rojos). Las CpGs en regiones intergénicas se ven enriquecidas en metilación (círculos negros), mientras que las islas CpG suelen permanecer desmetiladas (círculos blancos). La metilación de citosinas sobre un promotor de un gen se ve asociada con represión de la transcripción. De manera general, la metilación del DNA se asocia a la formación de heterocromatina.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar la conversión de citosinas no modificadas a partir de 5hmC. El primer mecanismo sugiere la pérdida de 5hmC durante varios eventos de replicación celular, al no ser reconocida por Dnmt1, lo que sugiere un posible papel de la TET durante la desmetilación pasiva. Otros mecanismos proponen una desmetilación activa que involucran a la deaminasa inducida por activación (AID), la cual tiene una mayor afinidad por 5hmC que por

5mC y lleva a la deaminación de 5hmC en 5hmU, el cual es reconocido por el complejo de reparación por escisión de base (BER), que remueve el nucleótido para reemplazarlo por una citosina no modificada (Williams et al., 2012; Branco et al., 2012). Dada la capacidad de las TET para continuar la oxidación secuencial de 5hmC a 5-formil-citosina y 5 carboxil-citosina (5fC y 5caC), se ha sugerido también un mecanismo que involucre descarboxilasas y/o desformilasas para convertir directamente la 5fC y 5caC en citosinas no modificadas, pero se desconoce si existen enzimas con esa actividad (He, 2011). Un cuarto mecanismo propone que las mismas Dnmt3a y Dnmt3b podrían directamente convertir la 5hmC en citosina mediante su actividad como dehidroximetilasas, la cual se ha demostrado in vitro en condiciones oxidantes (Williams et al., 2012).

2.2- *Modificaciones Post-transcripcionales de Histonas*

Uno de los mecanismos de regulación epigenética que actúa sobre las proteínas asociadas al DNA, es la modificación post-traduccionales de histonas. Las histonas son blanco de modificaciones covalentes que afectan directamente la dinámica y estructura de la cromatina de manera específica sobre las secuencias en interacción con cada octamero de histonas (Lewin, 2008; Jenuwein y Allis, 2001).

Aunque las modificaciones post-traduccionales pueden afectar residuos distribuidos a lo largo de toda la estructura de las histonas, los extremos amino son especialmente ricos en residuos susceptibles a modificaciones covalentes, como son lisinas, argininas, treoninas y serinas. Los extremos amino protruyen del nucleosoma y son susceptibles de sufrir modificaciones como acetilación, metilación, fosforilación

y ubiquitinación, entre otras. Las modificaciones de histonas juegan un papel importante en la regulación de los procesos celulares asociados a la cromatina, como la transcripción, reparación y replicación del DNA. Distintas modificaciones de histonas pueden coexistir en un mismo nucleosoma, creando un código complejo de combinatorias con distintos efectos para la regulación de los procesos en los que se ve involucrada la cromatina como replicación, reparación y modulación de accesibilidad a factores transcripcionales (Ajiro y Allis, 2002; Murr, 2010) (Fig. 4).

La fosforilación de la serina 10 en la histona H3 (H3S10p) está relacionada con la condensación de los cromosomas durante la replicación celular. La acetilación de histonas, de manera general, promueve una configuración laxa de la cromatina al neutralizar parte de la carga positiva de las histonas y disminuir su afinidad por el DNA (Felsenfeld y Groudine, 2003). La acetilación de histonas es una de las marcas epigenéticas que muestra mayor plasticidad, viéndose asociada al desarrollo, metabolismo y ciclo celular.

Las acetil-transferasas y desacetilasas de histonas (HATs y HDACs) se encargan de establecer y mantener los patrones de acetilación en las histonas y su actividad es dependiente de la acetil-coenzima A (Sutendra et al., 2014). Aunque las HATs y HDACs no tienen dominios de reconocimiento para secuencias específicas de DNA, interactúan en complejos con factores transcripcionales y otros remodeladores de la cromatina (Carroza et al., 2003).

La metilación de histonas, a diferencia de la acetilación, no induce un cambio en las propiedades de la cromatina por sí misma, sino que tiene que ser reconocida e

interpretada por proteínas con un cromodominio y su efecto depende del residuo que afecten: mientras que la metilación en las lisinas 9 y 27 de la histona H3 (H3K9me y H3K27me) y la metilación en la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me) se asocian con heterocromatina y represión de la expresión génica, la metilación en las lisinas 4 y 36 de la histona H3 (H3K4me y H3K36me) se asocia con genes activos. Jenuwein y Allis, 2001).

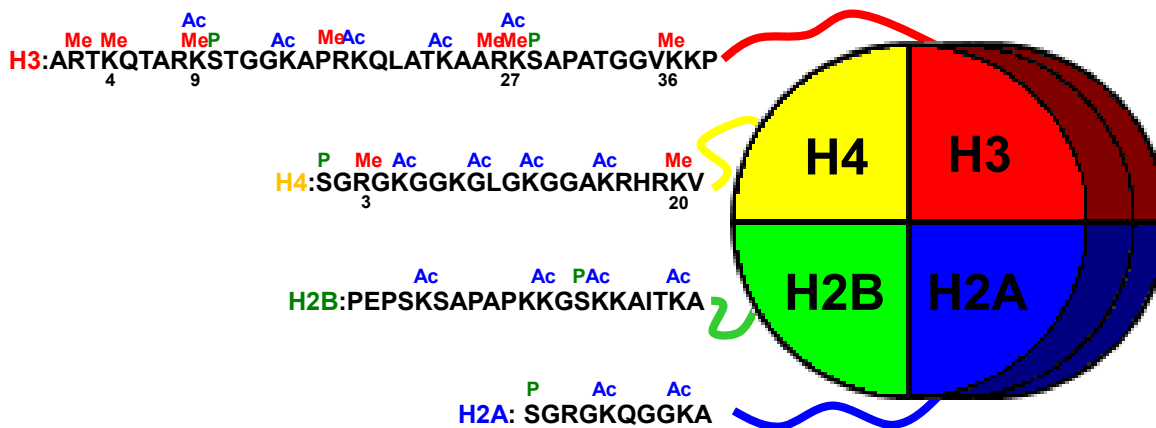


Fig. 4. Modificaciones post- traduccionales de histonas. Las histonas son blanco de distintas modificaciones covalentes y presentan distintos efectos dependiendo de los residuos que sean afectados, como es el caso de la metilación de lisinas y argininas (Me), acetilación de lisinas (Ac) y, fosforilación de serinas (P).

La metilación de histonas además, puede darse como mono, di o trimetilación (me1, me2 y me3), agregando o retirando grupos metilo de manera progresiva mediante la actividad de metil-transferasas de lisinas (KDMs) e hidroxilasas con un dominio Jumonji C (JmjC), respectivamente. Dependiendo del número de grupos metilo, la distribución y función de cada modificación puede variar: La H3K4me1 se asocia principalmente con secuencias de potenciadores, mientras que H3K4me2 se ha

relacionado con potenciadores y promotores transcripcionalmente activos y la H3K4me3 exclusivamente con promotores activos (Natoli y Andrau, 2012). La H3K9me3, por otra parte, se asocia con heterocromatina constitutiva en regiones como telómeros y centrómeros, mientras que H3K27me3 correlaciona con heterocromatina facultativa que se establece durante el desarrollo (Cao, 2002).

2.3- *Polycomb y Trithorax*

Otro ejemplo de mecanismos de regulación epigenética son los complejos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG), relacionados con la regulación transcripcional en sistemas de genes como los Hox o el silenciamiento del cromosoma X, así como de genes del ciclo celular como el retinoblastoma. Los PcG y TrxG son complejos multiprotéicos con actividad para reconocimiento de sitios de unión a DNA, modificación de la cromatina y regular la expresión génica. PcG tiene un efecto represor y se centra principalmente en el establecimiento, reconocimiento y propagación de la marca H3K27me3 y la desacetilación de histonas. Una de los principales componentes del complejo PcG es la enzima enhancer de zeste (Ezh2) con actividad de metil transferasa, que es responsable de establecer la marca de H3K27me3 (Cao, 2002). TrxG, por otra parte, tiene un efecto activador en sus genes blanco, promoviendo la estructuración de una cromatina permisiva mediante la incorporación de la marca H3K4me3, y la acetilación de histonas. Uno de los principales componentes del complejo TrxG, son las metil transferasas con dominio MLL (MLL1-4, SET1A y SET1B en humano), que se encargan de establecer la marca de H3K4me3 (Bogdanovic y Veenstta, 2009; Ong y Corces, 2012).

2.4- Cromatina Bivalente

Algunas regiones se ven enriquecidas tanto en marcas permisivas como represivas de la transcripción, por lo que se denominaron bivalentes. Se caracterizaron inicialmente por la presencia de la marca de TrxG H3K4me3, así como la marca de PcG H3K27me3 y corresponden principalmente a regiones conservadas, cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés) y secuencias reguladoras de la expresión génica (Fig. 5).

Análisis más profundos han demostrado que en general la cromatina bivalente colocaliza con islas CpG no metiladas. Se demostró incluso que al introducir islas CpG artificiales en células troncales embrionarias, éstas tienden a cubrirse de marcas de cromatina bivalente (Mendenhall et al., 2010). Los TSS cercanos a islas CpG se asocian generalmente con dos tipos de genes: genes de expresión constitutiva y genes involucrados en el establecimiento del tipo celular durante el desarrollo (Voigt et al., 2013).

Durante la diferenciación celular se observa una pérdida general de sitios con marcas bivalentes (Vastenhouw y Schier, 2012). Algunos TSS se vuelven activos y pierden la marca de H3K27me3, mientras que otros son reprimidos de manera definitiva y pierden la marca de H3K4me3. Sin embargo, durante el proceso de diferenciación aparecen algunas regiones bivalentes en células pluripotentes que no se encontraban en células troncales embrionarias (Mohn et al., 2008).

Se ha encontrado que las proteínas TET colocalizan también con regiones de cromatina bivalente. Se ha demostrado interacción de las TET con la proteína OGT

(Fig. 5), que a su vez puede reclutar al factor HCF1 del complejo TrxG, relacionando así la desmetilación de DNA con la incorporación de la marca de H3K4me3 (Voigt et al., 2013).

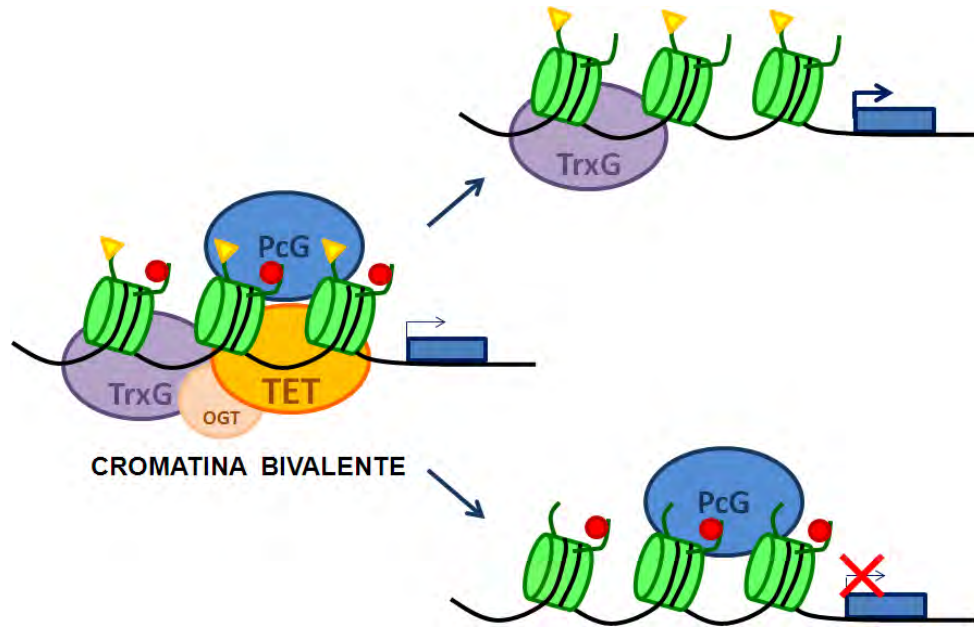


Fig. 5. Cromatina bivalente. La cromatina bivalente presenta marcas de apertura, así como de compactación, como la H3K4me3 (triángulos amarillos) y la H3K27me3 (círculos rojos), que son establecidos y mantenidos por los complejos trithorax (TrxG) y polycomb (PcG), respectivamente. Se ha comprobado también la presencia de las proteínas ten-eleven-translocator (TET) en la cromatina bivalente, interactuando con el complejo TrxG a través de la proteína OGT. Después de la diferenciación se estabiliza un estado abierto o cerrado de la cromatina.

2.5- Red de Regulación Génica en la Determinación y Diferenciación Sexual.

Los genes involucrados en la determinación sexual están conservados entre los vertebrados, sin embargo, los mecanismos que regulan su expresión varían incluso entre especies. Ésto se debe a que la red de regulación génica para la determinación y diferenciación sexual ha evolucionado, generando patrones distintos

de expresión génica y heterocronías entre diversas especies. Muchos de los genes analizados codifican para factores transcripcionales que regulan la expresión de varios genes en las diversas redes de regulación génica, de manera que existen múltiples circuitos de regulación entre ellos (Shoemaker y Crews, 2009). Un ejemplo de circuito de retroalimentación positiva se encuentra entre los genes *FoxL2* y *CYP19A1* (*aromatasa*): El factor transcripcional *FoxL2* interactúa directamente con el promotor de la aromatasa (enzima que cataliza la conversión de testosterona a estradiol), promoviendo así su expresión, mientras que el estradiol activa la expresión de *FoxL2*, cerrando así el circuito y asegurando el mantenimiento del estado activo de ambos genes. Un ejemplo de circuito negativo se encuentra entre el gen masculinizante *Sox9* y el gen feminizante *FoxL2*: los factores transcripcionales codificados por ambos genes reprimen su expresión recíprocamente, asegurando así su expresión excluyente. Mutaciones en alguno de estos genes lleva a la expresión del gen contrario y reversión parcial de la gónada (Shoemaker y Crews, 2009).

Una característica de esta clase de circuitos es que sin importar el gen que regule su expresión inicial, el efecto sobre los demás genes será el mismo. Así, el gen *FoxL2* permanecerá “apagado” mientras que *Sox9* esté “encendido”, sin importar si el evento inicial fue la regulación positiva de *Sox9* o la regulación negativa de *FoxL2*.

Esto explicaría que, aunque las redes de expresión génicas involucradas en la diferenciación sexual estén altamente conservadas en vertebrados, el factor determinante inicial podría diferir. De tal manera que, aunque el factor determinante sea la expresión de *Sox9* por efecto de *Sry* en mamíferos o la sobreexpresión de

Dmrt1 por su expresión bialélica en pollo, el efecto sobre la red de regulación génica será el mismo, es decir, la activación de la expresión de los genes masculinizantes, así como la represión de los genes feminizantes, sin importar la relación temporal de cada evento ni la pérdida de algunas de las interacciones en la red.

3- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA DETERMINACIÓN SEXUAL.

3.1- Regulación de la expresión de Sox9 en Mamíferos.

Los factores transcripcionales de tipo Sox (*SRY_BOX*) comparten el dominio HMG (high mobility group) caracterizado originalmente en el gen *Sry*. Se han identificado más de 20 factores Sox en mamíferos, la mayoría de los cuales reconocen motivos muy similares para unirse al surco menor del DNA. Sin embargo, distintos factores Sox presentan una alta variabilidad fuera del dominio HMG, lo que les permite asociarse a una gran diversidad de cofactores para reconocer sitios específicos y ejercer efectos distintos dependiendo del tipo celular (Jiang et al., 2013).

El factor transcripcional *Sox9* regula procesos en el desarrollo tan variados como la formación de células progenitoras de la cresta neural; diferenciación de melanoblastos; especificación de glía en sistema nervioso central; especificación y maduración de oligodendrocitos y astrocitos en sistema nervioso periférico; así como especificación de progenitores de cartílago, entre otros (Jo et al., 2014). Además, la expresión del gen *Sox9* juega un papel importante en la diferenciación de las células

de Sertoli en testículos de todos los grupos de vertebrados estudiados hasta ahora (Gordon et al., 2009).

La regulación de la expresión del gen *Sox9* se da en mamíferos por una serie de potenciadores específicos de cada tejido concentrados entre 350 kb río arriba y 250 kb río abajo del gen *Sox9*. Sin embargo, elementos con actividad reguladora se han encontrado hasta una Megabase (Mb) río arriba del TSS de este gen (Gordon et al., 2009).

Un potenciador específico de testículo (TES, por sus siglas en inglés) fue caracterizado en ratón, entre -13 y -10 kb con respecto al TSS. La secuencia “core” de este elemento regulador fue después acotada a un fragmento de DNA de 1.4 kb, denominada TESCO (Sekido y Lovell-Badge, 2008). La regulación de la expresión de *Sox9* en testículo puede dividirse en 3 etapas durante la diferenciación sexual en mamíferos: iniciación, sobreexpresión y mantenimiento, dependiendo de los factores unidos al elemento TESCO en cada etapa. La iniciación ocurre en la cresta gonadal indiferenciada en ambos sexos, en esta etapa SF1 se encuentra unido en varios motivos de TESCO y promueve un nivel moderado de expresión del gen *Sox9*. Posteriormente se da la sobreexpresión, exclusivamente en individuos con carga cromosómica XY. Durante esta etapa se activa la expresión de *Sry* y su producto protéico puede ser detectado en la gónada de ratón por un periodo menor a 6 horas, durante el cual interactúa con SF1 en el elemento TESCO para incrementar la expresión de *Sox9*. El factor transcripcional *Sox9* regula negativamente la expresión de *Sry*, marcando el inicio de la etapa de mantenimiento. Durante esta etapa, *Sox9* se autoregula ocupando el lugar de *Sry* en la secuencia TESCO, para promover su

propia expresión en testículos diferenciados. Ni Sry ni Sox9 por si solos pueden activar la expresión del gen Sox9 hasta los niveles observados en testículo, para ello se requiere su interacción con SF1 sobre la secuencia TESCO (Sekido y Lovell-Badge, 2008).

En ausencia de Sry en ovario, aumenta la expresión de los genes feminizantes. Se ha comprobado mediante inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP), que tanto Wt1 como FoxL2 pueden unirse al elemento TESCO. Estos factores reprimen de manera activa la expresión de Sox9, evitando así la activación de la vía masculinizante en ovario. La expresión de FoxL2 es necesaria incluso en ratones adultos para reprimir la expresión de Sox9 y evitar la masculinización de la gónada (Bagheri-Fam et al., 2010).

Análisis de genomas demostraron que existe una región del elemento TESCO de ratón evolutivamente conservada en todos los grupos de tetrápodos. Esta región de 180 pb contiene motivos de unión predichos para factores Forkhead, DMRT, SOX y GATA, por lo que la regulación de la expresión del gen Sox9 podría darse mediante un elemento TES similar al descrito en mamíferos, aun en ausencia del gen Sry (Bagheri-Fam et al., 2010).

3.2- Epigenética en la determinación sexual.

Especies con determinación sexual genética (DSG)

Un estudio en ratón, demostró que la metilación del DNA es necesaria para la formación de los túbulos seminíferos (Mizukami et al., 2008). Las gónadas en cultivo

fueron tratadas con 5-azacitidina, un análogo no metilable de la citosina que inhibe la metilación. Los resultados mostraron la reducción del tamaño de ovarios y testículos, sin embargo, los testículos no desarrollaron túbulos seminíferos. *Sox9* y *Mis* mostraron niveles normales de expresión en células de Sertoli, aunque la distribución es dispersa en la gónada y no delimitada a cordones. Los marcadores de células de Leydig, como son *Lhx9*, *Mfge8* y 3β -Hsd, mostraron también niveles normales de expresión. Encontraron, sin embargo, que la expresión de los genes *Sox8* y colágeno *Col9a3* se veía abatida en testículos tratados con la 5-azacitidina. Es interesante notar que ambos genes son regulados directamente por el gen *Sox9*; sin embargo, su activación no es posible en ausencia de metilación del DNA, sugiriendo que la represión de factores que actúan en el silenciamiento de estos genes, es necesaria para permitir su activación por *Sox9* en testículo (Mizukami et al., 2008).

Se ha demostrado también un papel importante de las modificaciones post-traduccionales de histonas para la determinación sexual, específicamente de la proteína M33, componente del complejo PcG en ratón. Más de la mitad de los ratones nulos para esta proteína mueren durante el desarrollo o durante los primeros 30 días después del nacimiento, lo que coincide con una función importante del complejo PcG en distintos procesos durante el desarrollo. De manera interesante, todos los ratones XY sobrevivientes mostraron reversión sexual parcial o total además de ser estériles. Por otra parte, todos los individuos XX mostraban fenotipo femenino, de los cuales 92% resultaron fértiles, pese a presentar defectos de desarrollo y ovarios reducidos. Estos resultados evidencian la importancia del

complejo PcG para establecer el programa determinación sexual masculinizante en mamíferos (Katoh-Fukui et al., 1998).

Estudios realizados sobre promotores de genes específicos demostraron un papel de la metilación del DNA y la metilación de histonas en la diferenciación sexual. Al caracterizar el promotor de la aromatasa *CYP19A1* en pollo, se encontró que no había sitios CpG 500pb hacia la región 5' ni 3' del TSS. Sin embargo, análisis de metilación del DNA sobre 3 dinucleótidos CpG situados en las posiciones -955, -869 y -789 con respecto al sitio de inicio de transcripción, demostraron dimorfismo entre ovarios y testículos, principalmente en la posición -869, donde se reportó 51.3% de metilación en testículo, contra 21.3% de metilación en ovarios (Ellis et al., 2012). De manera interesante, al inducir feminización de los embriones por tratamiento con estradiol, el porcentaje de metilación fue de 34.0%, pese a que los niveles de expresión del gen alcanzaron los normales observados en ovarios. De modo que los niveles de expresión no correlacionan directamente con el porcentaje de metilación del DNA. Análisis de ChIP sobre la secuencia del 5' de la aromatasa *CYP19A1*, demostraron un enriquecimiento en la marca H3K27me3 con respecto a H3K4me3 en testículo, además de que no se detectó presencia de la RNA Pol II; mientras que en ovario se encontró el patrón inverso, con enriquecimiento de H3K4me3 sobre H3K27me3 y posicionamiento de la RNA Pol II. En gonadas feminizadas mediante estradiol, el perfil de modificaciones de histonas mostró un enriquecimiento tanto en H3K27me3, como en H3K4me3, acompañado de posicionamiento de la RNA Pol II, coincidiendo con la reversión parcial en patrones de modificaciones epigenéticas observadas en la metilación del DNA (Ellis et al., 2012).

Especies con determinación sexual dependiente de temperatura (DST)

Los primeros estudios en organismos con DST mostraron que, en el pez *Dicentrarchus labrax* (lubina europea), el promotor del gen *CYP19A1*, que codifica para la aromatasa, se encuentra hipermetilado en machos, en comparación con las hembras. Este efecto mostró ser directamente dependiente de la temperatura del agua (Navarro-Martin et al., 2011).

En la tortuga *Trachemys scripta* y el caimán *Alligator mississippiensis*, se encontraron resultados dimórficos similares, sugiriendo que la regulación epigenética de la aromatasa representa un mecanismo conservado en reptiles con DST (Matsumoto et al., 2013; Parrot et al., 2014). En *T. scripta* se consiguió secuenciar aproximadamente 4000 pb de la región 5' del sitio de inicio de transcripción del gen que codifica para la aromatasa *CYP19A1*, donde se identificó una secuencia de 800 pb con elementos conservados en genomas de aves y algunos peces. La secuencia mostró bajo contenido de CpGs, además de posibles sitios de unión a factores Sf1, DM, FOX y SOX, por lo que fue considerada como el promotor putativo de la aromatasa. Análisis de metilación por tratamiento del DNA con bisulfito de sodio, demostraron que antes del PTS, los patrones de metilación eran iguales entre embriones incubados a TPH y TPM. Sin embargo, después del PTS, se observaron niveles de metilación significativamente menores en TPH que en TPM.

Análisis de metilación el pez japonés *Paralichthys olivaceus* sobre el promotor de *Dmrt1*, mostraron 0% de CpGs metiladas en testículo contra 57% de CpGs metiladas en ovario, evidenciando por primera vez un claro dimorfismo sexual en los patrones

de metilación del promotor de *Dmrt1*. Por otra parte, mostraron también el dimorfismo en el promotor de la aromatasa: 97% de CpGs metiladas en testículo contra 73% en ovario (Wen et al., 2013).

Aunque los resultados mencionados sugieren que la metilación del DNA está involucrada en la regulación de la expresión de algunos de los genes estudiados durante la determinación sexual, los mecanismos de regulación global y los tipos celulares en que ocurren son aun desconocidos.

ANTECEDENTES

1- TORTUGAS MARINAS

Los registros fósiles de las tortugas se extienden hasta 200 millones de años atrás. Las tortugas marinas presentan una distribución global, principalmente tropical y subtropical y dependen de ambientes terrestres únicamente durante el periodo de reproducción. Dentro de las principales características que las distinguen de otros reptiles están que presentan un caparazón óseo y las costillas fuera del cuerpo, no tienen dientes y exhiben un pico de queratina (Marquez, 2002).

1.1- Taxonomía

Todas las especies de tortuga marina pertenecen al reino *Animalia*; phylum *Chordata*; sub-phylum *Vertebrata*; clase *Reptilia*; orden *Testudines*, y suborden *Cryptodira*, dentro del cual existen dos familias: *Cheloniidae*, o tortugas de concha dura y *Dermochelyidae*, o tortugas de concha blanda con textura de cuero. De esta última existe únicamente una especie, la tortuga laúd *Dermochelys coriacea*. Dentro

de la familia *Cheloniidae* pueden encontrarse 7 especies: golfinas (*Lepidochelys olivacea*), lora (*Lepidochelys kempii*), carey (*Eretmochelys imbricata*), kikila o aplanada (*Natator depressus*), amarilla o caguama (*Caretta caretta*), tortuga verde (*Chelonia mydas*) y tortuga prieta (*Chelonia mydas agassizii*) (Márquez, 2002).

2- LA TORTUGA MARINA *LEPIDOCHELYS OLIVACEA*

2.1- Generalidades de la Especie.

La tortuga golfinas es la tortuga marina más pequeña, alcanza a medir 70 cm y pesar 45 kg. Es también la especie más abundante actualmente y su distribución abarca los océanos Pacífico, Índico y Atlántico. En México se observan áreas de concentración en las costas del Pacífico en el suroeste de Baja California, Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Su principal zona de nidación se encuentra en la playa de La Escobilla, Oaxaca, donde cientos de miles de tortugas depositan sus huevos cada año entre julio y febrero, con el mayor número de eventos registrado en septiembre y octubre (Márquez, 2002).

Los juveniles permanecen normalmente ocultos hasta alcanzar la edad reproductiva entre 10 y 18 años, tras lo cual se reúnen en temporada reproductiva frente a las zonas de nidación durante lo cual tienen varios eventos de apareamiento con distintos individuos. Durante la nidación, las hembras salen a la playa para depositar sus huevos en nidos de entre 30 y 55 cm de profundidad. Cada hembra coloca alrededor de 5 nidos con un promedio de 107 huevos cada uno. El periodo de incubación de los huevos varía entre 45 y 65 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad en la playa (Márquez, 2002).

Por su anatomía, la tortuga golfina se distingue de otras especies por la forma de su cráneo, más o menos triangular, ancha en su parte posterior con cortes parietales profundos. Las mandíbulas tienen forma de V ancha y no tiene crestas alveolares en el paladar. Presenta más de un par de escamas prefrontales, así como 6 o más escudos laterales y vertebrales en el caparazón y 4 escudos intramarginales con poros en el plastrón (Fig. 6). Su alimentación es variada e incluye diversas especies de crustáceos, moluscos, peces, medusas y algas (Márquez, 2002).

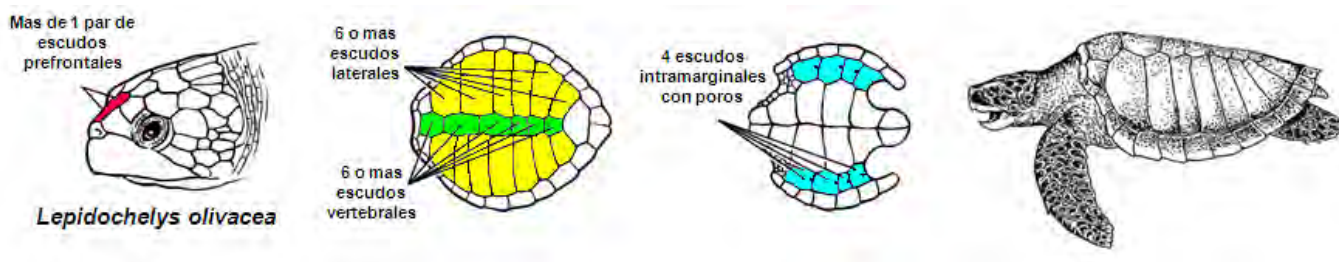


Fig. 6. Clave de identificación para organismos adultos de *Lepidochelys olivacea*. Modificada de Márquez, 2002.

2.2- Estado poblacional

La tortuga golfina está enlistada como especie vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) y como especie amenazada por el Acta de Especies Amenazadas de los Estados Unidos (USES) y la Convención Internacional para el Comercio de Especies de Flora y Fauna Silvestre Amenazada (CITES). La población anidante de *L. olivacea* a lo largo de las costas mexicanas del pacífico estuvo cerca de desaparecer tras la recolecta de huevos y comercialización de carne y piel de adultos durante las décadas de 1960 a 1980. Tras la veda absoluta establecida en México en 1990, esta población se ha recuperado de

manera exitosa. En la playa de “La Escobilla” las nidaciones se recuperaron desde su conteo más bajo con 55,000 nidos en 1988 a más de un millón en el 2000. Sin embargo, las poblaciones de tortuga golfina no se han recuperado en su totalidad y permanecen disminuidas en un 30-37% con respecto a los conteos previos a su sobreexplotación, por lo que la veda total continúa, así como diversos programas de protección en las principales zonas de nidación (Márquez et al., 1996; Abreu y Plotkin, 2008).

2.3- Determinación sexual.

L. olivacea, presenta DST de tipo **1a**, donde la incubación a TPH de $33^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ resulta por lo general en un 100% de individuos que se desarrollan como hembras, mientras que a TPM de $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ se desarrollan como machos. Temperaturas por arriba de la TPH o por debajo de la TPM reducen la viabilidad del embrión (Merchant-Larios et al., 1997).

La tasa de desarrollo de los embriones es afectada de manera directamente proporcional a la temperatura de incubación, de modo que en condiciones controladas de incubación a TPH y TPM el desarrollo embrionario tarda 45 y 75 días en completarse, respectivamente. Por lo tanto, la relación entre tiempo de incubación y etapa de desarrollo varía entre embriones incubados a TPH y TPM, así como el tiempo necesario para pasar de una etapa a otra, lo que dificulta el definir el PTS. De manera general el PTS en *L. olivacea* dura alrededor de 7 días, tiene lugar durante el segundo tercio del desarrollo embrionario y abarca 4 estadios de desarrollo 23-26, aunque existen diferencias importantes al definir este parámetro a TPH y TPM

(Merchant-Larios et al., 2010) (Fig. 7). Los experimentos de intercambio de temperaturas demuestran que el 100% de los embriones incubados inicialmente a TPH responden al cambio de temperatura hasta el estadio 24, mientras que en estadio 25 lo hace únicamente el 30% y para la etapa 26 se han determinado ya el sexo de los embriones, por lo que 0% responden al cambio. Por otra parte, cuando los huevos son incubados inicialmente a TPM, 100% de los embriones responden al cambio de temperatura hasta el estadio 23, mientras que para la etapa 24 únicamente responde el 35% y 0% en la etapa 25. De modo que el 100% de los embriones incubados a TPM se determinan de manera irreversible como machos para la etapa 25, mientras que cuando son incubados a TPH la determinación sexual ocurre hasta la etapa 26. Diferencias histológicas entre gónadas incubadas a TPH y TPM pueden observarse desde la etapa 26 y es hasta la etapa 27 que puede distinguirse la estructura clásica de ovarios y testículos (Merchant-Larios et al., 2010) (Fig. 7).

Estudios previos en el laboratorio demostraron que la gónada por sí misma puede determinar su sexo de manera dependiente de la temperatura sin necesidad de ningún otro tejido. Esto se demostró separando las gónadas de un mismo embrión y colocándolas aisladas en cultivo a TPH Y TPM. Las gónadas desarrollaron la estructura histológica y patrones de expresión génica esperados por la temperatura de incubación en cada caso (Moreno-Mendoza et al., 2001). Estos resultados centraron el estudio de determinación sexual en organismos con DST directamente en las gónadas, quitando la atención sobre otros tejidos que se pensaba podrían

tener alguna función en la traducción de la temperatura en señales fisiológicas, como otras estructuras del sistema urogenital o el sistema nervioso central.

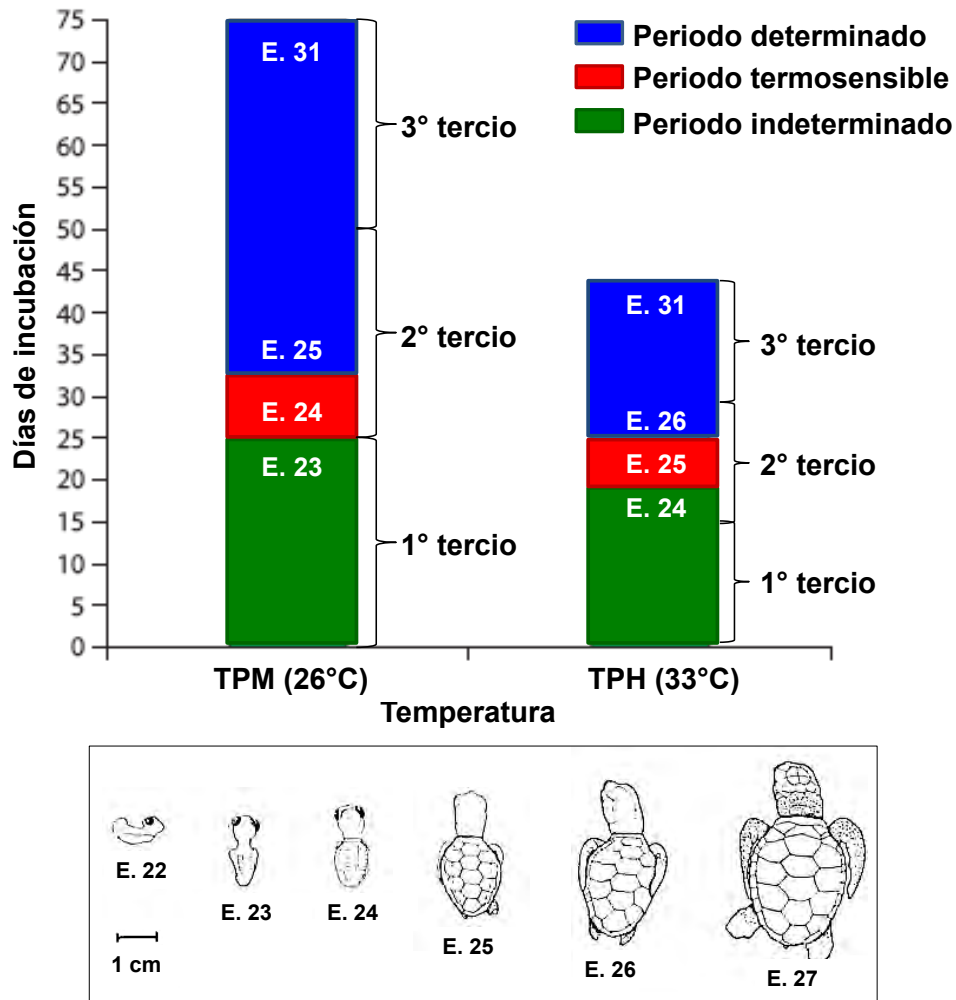


Fig. 7. Identificación del periodo termosensible por experimentos de intercambio de temperatura. Embriones de *L. olivacea* incubados inicialmente a TPH o TPM fueron intercambiados en distintos tiempos de incubación para evaluar su respuesta termosensible dependiendo de la etapa de desarrollo. Se identificaron 3 periodos en la determinación sexual. Durante el periodo indeterminado (verde), los embriones no han determinado su sexo, por lo que el 100% responde a la temperatura de intercambio. Durante el periodo determinado (azul) los embriones han establecido su sexo de manera irreversible, por lo que se desarrollan de acuerdo a la temperatura inicial de incubación. Durante el periodo termosensible (rojo), algunos embriones han determinado su sexo, mientras que otros responden aun a la temperatura de intercambio. (Modificado de Merchant-Larios et al., 2010). Se muestran además, las etapas (E) relacionadas con cada periodo (Miller, 1985).

2.4 Formación de la gónada bipotencial

En *L. olivacea*, las crestas gonadales se originan a partir de las células epiteliales de la parte superior del mesenterio dorsal que se extiende hacia la zona ventromedial, que bordea a los mesonefros a ambos lados, formando un dominio con forma de T. Este dominio es evidente desde la etapa 20 de desarrollo embrionario y se puede identificar con anticuerpos contra citoqueratina (CK: AE1/AE3+8), N-caderina y Sox9 (Díaz-Hernández et al., 2011). Durante el estadio 21-22, se da un engrosamiento del mesenterio que forma este dominio y pueden identificarse las células que darán origen a la cresta gonadal como CK+, Sox9+. Para la etapa 24 puede apreciarse la estructura de la gónada bipotencial establecida con un compartimiento cortical y uno medular. El compartimiento cortical pierde la expresión de Sox9, la cual se limita al compartimiento medular. Se ha sugerido que para esta segregación de tipos celulares, el mesenterio engrosado en estadio 21 sufre divisiones celulares asimétricas, generando células CK+ Sox9- que permanece en la corteza y células CK+ Sox9+ que se posicionan en la médula y formarán posteriormente los cordones medulares. A partir de la etapa 23, la proliferación celular se da de manera autónoma en los compartimientos cortical y medular (Fig. 11) (Díaz-Hernández et al., 2011).

2.4- Diferenciación sexual

Las diferencias histológicas entre ovarios y testículos pueden apreciarse hasta la etapa 26, cuando la acumulación gradual de lámina basal ayuda a condensar las células epiteliales en cordones medulares y aislarlas del estroma, constituido

principalmente por células endoteliales en los vasos sanguíneos y tejido conectivo. En embriones incubados a TPM, los cordones se consolidan como túbulos seminíferos claramente definidos en la etapa 27, mientras que a TPH, los cordones comienzan a fragmentarse y la corteza se engrosa por proliferación celular, formando un epitelio de varias capas celulares.

Algunos cambios a nivel molecular pueden identificarse también en estas etapas, generando los dimorfismos de expresión génica que definen ovarios y testículos. *Sox9*, cuya expresión era evidente en gónadas bipotenciales hasta etapa 23, continúa expresándose en cordones medulares y posteriormente en túbulos seminíferos en embriones incubados a TPM. La expresión de este gen define a identidad de las células pre-Sertoli y posteriormente las células de Sertoli en testículo. En gónadas incubadas a TPH, por otra parte, la expresión de *Sox9* se abate en los cordones medulares cuando comienzan a fragmentarse; pocas células son *Sox9+* en etapa 25 y prácticamente ninguna en etapa 26. Análisis de expresión del mRNA de *Sox9* demuestran que entre etapa 25 y 26 ocurre una rápida disminución en gónadas de embriones incubadas a TPH, desde niveles comparables a los observados a TPM en etapa 25, hasta llegar a una expresión prácticamente nula en etapa 26 (Moreno-Mendoza et al., 2001).

Experimentos de intercambio de temperaturas demostraron que después de 12 días de cambiar la temperatura de incubación de TPM a TPH, los embriones reducen la expresión de *Sox9*, ajustándola a la nueva temperatura de incubación. Este efecto se mantiene en gónadas aisladas incubadas a TPM o TPH: experimentos de cambio de temperatura tanto de TPM a TPH, como de TPH a TPM tienen un efecto en la

modificación de niveles de Sox9 en reducción e incremento respectivamente (Moreno Mendoza et al., 2001; Montiel-Manríquez, no publicado) (Fig. 9).

Se demostró recientemente que *Dmrt1* establece también su dimorfismo durante el PTS. Mientras en etapa 23 y 24 no existen diferencias significativas entre embriones incubados a TPH y TPM, en etapa 25 disminuye la expresión en gónadas de embriones incubados a TPH y sus niveles se vuelven casi indetectables desde la etapa 26. Mientras que a TPM, los niveles del mRNA de *Dmrt1* incrementan gradualmente entre las etapas 25 y 28 (Montiel-Manríquez, no publicado) (Fig. 10). Por otra parte, la *Amh*, cuya expresión es específica de las células de Sertoli, presenta patrones que sugieren que su expresión es dependiente de los niveles de Sox9 (Torres-Maldonado et al., 2002).

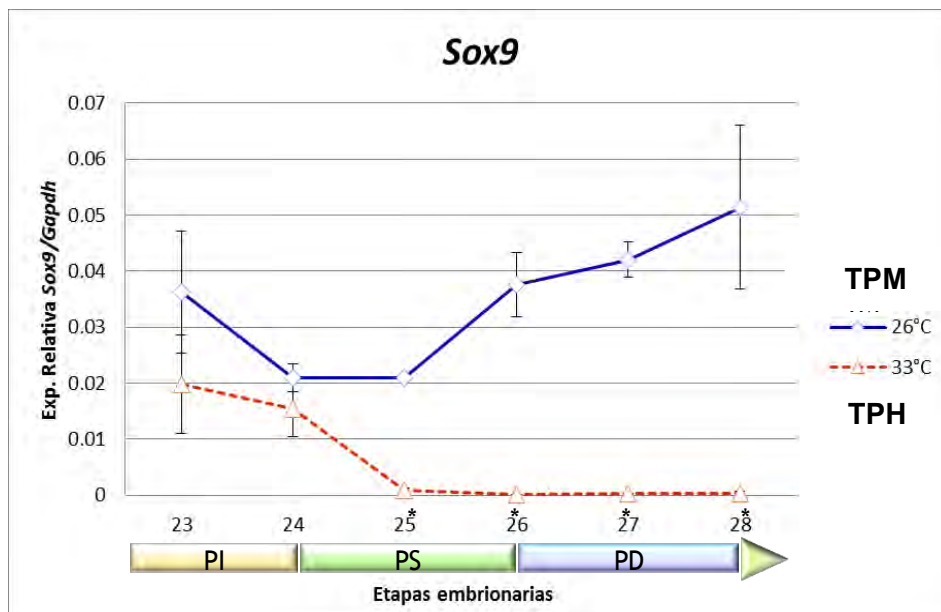


Fig. 9. Análisis de expresión de Sox9 por PCR en tiempo real. Cuanificación de mRNA de Sox9 por PCR en tiempo real. Comparación entre gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (línea azul) y feminizante (línea roja) en distintas etapas de la diferenciación sexual: periodo indeterminado (PI), periodo termosensible (PS) y periodo determinado (PD). Los asteriscos marcan las etapas que muestran diferencias significativas (Montiel-Manríquez, no publicado)

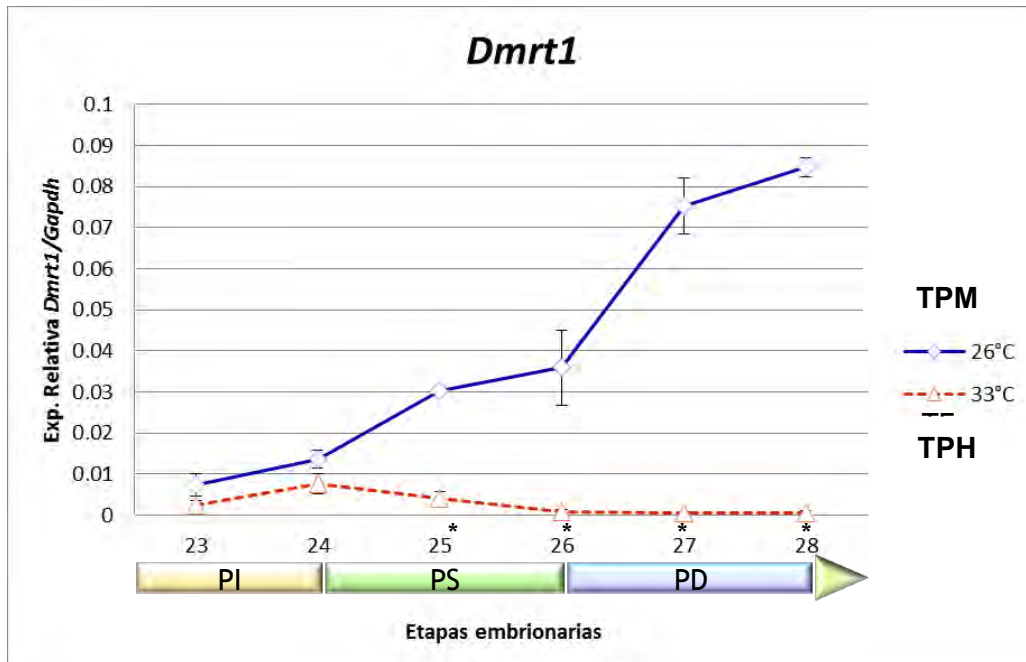


Fig. 10. Análisis de expresión de Dmrt1 por PCR en tiempo real. Cuantificación de mRNA de Dmrt1 por PCR en tiempo real. Comparación entre gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (línea azul) y feminizante (línea roja) en distintas etapas de la diferenciación sexual: periodo indeterminado (PI), periodo termosensible (PS) y periodo determinado (PD). Los asteriscos marcan las etapas donde se encontraron diferencias significativas (Montiel-Manríquez, no publicado).

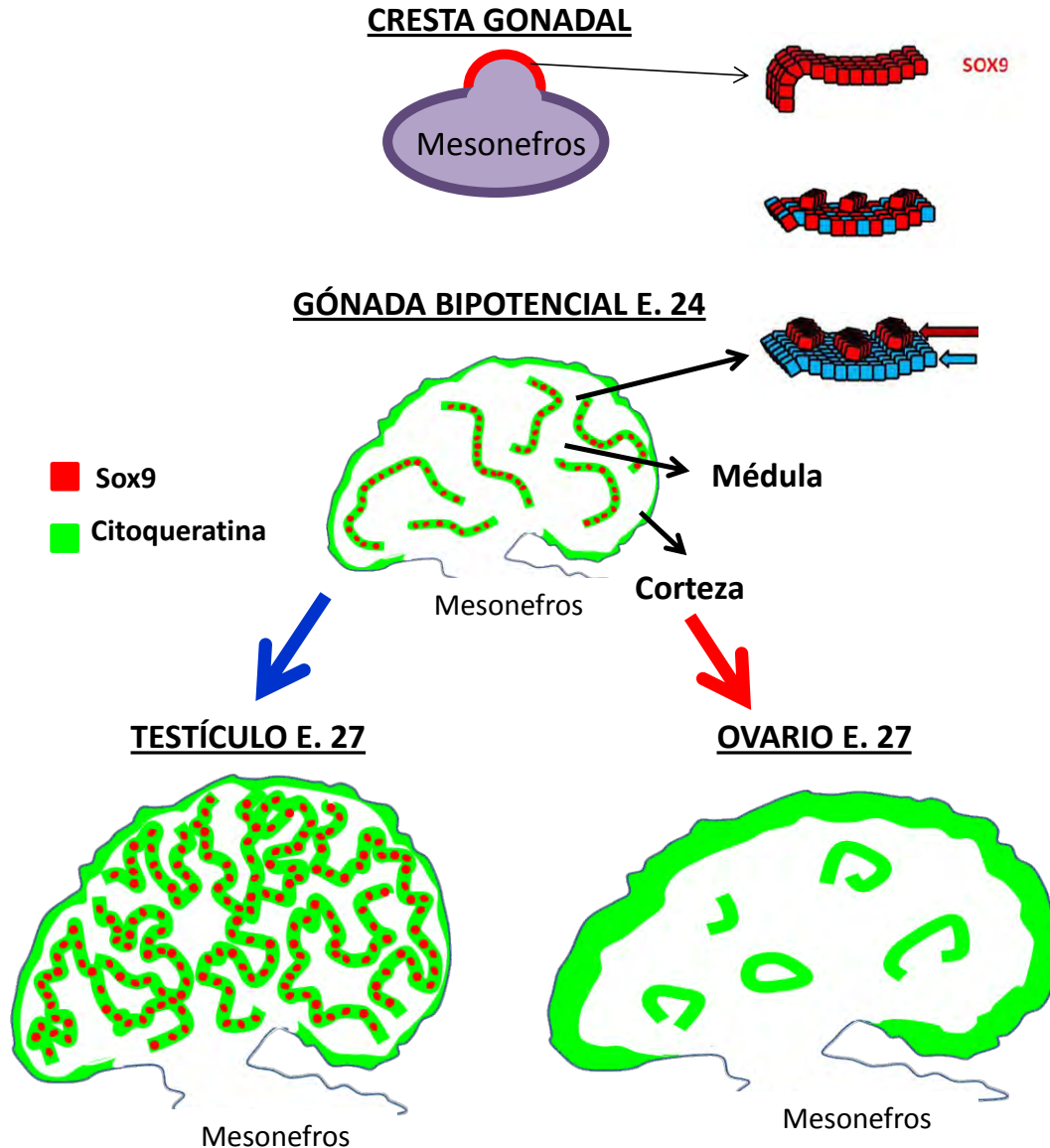


Fig. 11. Desarrollo gonadal en *L. olivacea*. La formación de la cresta gonadal se da en *L. olivacea* a partir de un engrosamiento del mesenterio en la zona ventromedial del mesonefros (células Sox9+). A través de un proceso de división asimétrica y segregación de células Sox9+ (cordones medulares) y Sox9- (corteza), así como de la migración de células desde el mesonefros y tejidos aledaños (estroma), se comienza a formar la estructura de la gónada bipotencia: corteza (CK+), médula y cordones medulares (Sox9+, CK+). Después del PTS inicia la diferenciación sexual para la formación de un ovario o testículo. (Modificado de Díaz-Hernández et al., 2011)

JUSTIFICACIÓN:

Las singularidades en la determinación sexual de la tortuga *L. olivacea* brindan una oportunidad invaluable para el estudio de los mecanismos epigenéticos por varios motivos: en primera instancia, se trata de una tortuga marina que anida abundantemente en las playas del estado de Oaxaca, por lo que es fácilmente accesible y el pequeño número de nidos necesarios para este estudio impacta mínimamente en la supervivencia de la especie. Por otra parte, las heterocronías particulares de la especie ofrecen un lapso más amplio para el estudio de eventos en el desarrollo gonadal, que en mamíferos pueden llevarse a cabo en periodos de tan solo unas cuantas horas. El modelo de *L. olivacea* permite, por lo tanto, un análisis más profundo de los eventos que tienen lugar durante cada proceso desde la formación de la gónada bipotencial, hasta el establecimiento de la estructura y función propias de un ovario o testículo; por otra parte, el estudio de organismos con DST, nos permite estudiar la regulación de dos vías epigenéticas opuestas mediante la manipulación de una sola variable como es la temperatura. *L. olivacea* constituye por lo tanto un excelente modelo para el estudio de los procesos epigenéticos que tienen lugar durante la determinación y diferenciación sexual en vertebrados.

HIPÓTESIS:

La determinación sexual por temperatura involucra la regulación diferencial de procesos epigenéticos que llevan al establecimiento de patrones dimórficos de metilación del DNA de manera global y sobre los promotores de los genes *Sox9* y *Dmrt1* durante la diferenciación de la gónada bipotencial.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar los cambios diferenciales en la metilación del DNA que ocurren de manera global y sobre los promotores de los genes *Sox9* y *Dmrt1* durante la determinación sexual por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Análisis global de marcas de regulación epigenética:

Comparar los niveles y patrones de distribución globales de metilación del DNA y modificaciones post traduccionales de histonas entre gónadas de embriones de *L. olivacea* incubados a TPH y TPM en distintas etapas del desarrollo gonadal.

2.- Análisis de metilación del DNA sobre el promotor del gen *Sox9*:

Caracterizar de manera funcional el promotor del gen *Sox9* y comparar sus niveles de metilación del DNA entre embriones de *L. olivacea* incubados a TPH y TPM.

3.- Análisis de metilación del DNA sobre el promotor del gen *Dmrt1*:

Caracterizar el promotor del gen *Dmrt1* y comparar sus niveles de metilación del DNA entre embriones de *L. olivacea* incubados a TPH y TPM.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

La estrategia experimental se centra en buscar evidencia de procesos epigenéticos que actúan de manera dimórfica a temperatura promotora de machos (26°C) y temperatura promotora de hembras (33°C). Para ello, se compararon primero las modificaciones de DNA e histonas entre ovarios y testículos en etapa 27 de desarrollo. Como en esta etapa el 100% de los embriones muestran ya ovarios y testículo histológicamente diferenciados, supusimos que las posibles modificaciones epigenéticas, necesarias para la determinación sexual, están ya establecidas. Los dimorfismos encontrados, se compararon con los patrones mostrados por las gónadas bipotenciales (etapas 23 y 24) y en transición (etapas 25).

RESULTADOS

1- ANÁLISIS GLOBAL DE MARCAS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA:

Entre los mecanismos de regulación epigenética, los procesos de metilación y desmetilación del DNA han mostrado ser de gran importancia para el establecimiento de patrones de expresión génica durante el desarrollo en vertebrados. Por esta razón se consideró comparar inicialmente los niveles globales de metilación del DNA entre gónadas de embriones incubados a TPH o TPM, en distintas etapas del desarrollo gonadal.

1.1- Análisis global de metilación del DNA por tratamiento con endonucleasas metilosensibles.

Para comparar los niveles globales de metilación del DNA se realizaron tratamientos con la endonucleasa metilo-sensible *HpaII*. Para este análisis, el DNA es sometido a un

tratamiento exhaustivo con la endonucleasa *HpaII*, que hidroliza el DNA entre las 2 citosinas de la secuencia CCGG en contexto no metilado o con la endonucleasa *MspI*, que reconoce la misma secuencia e hidroliza el DNA de manera independiente de metilación. Los patrones de digestión generados se analizan en geles de agarosa. Aunque ésta es una técnica de baja resolución, permite evidenciar diferencias en los niveles de metilación del DNA cuando son significativas.

Para medir los alcances de esta técnica, así como la eficiencia de las enzimas utilizadas, se utilizó DNA de células HeLa (una línea celular epitelial de cáncer cérvico uterino que presenta hipometilación global del DNA). Una muestra del DNA obtenido fue metilada *in vitro* mediante la metil-transferasa *SssI*. Posteriormente, el DNA con y sin tratamiento de metilación fue sometido a hidrólisis con endonucleasa *HpaII* o *MspI*.

Después de los tratamientos enzimáticos, el DNA fue corrido por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y teñido con Bromuro de Etidio para revelar los patrones generados en un transiluminador de luz UV. (Fig. 12)

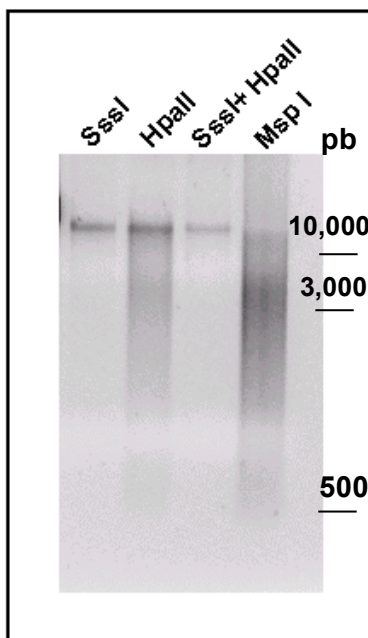


Fig. 12. Control de tratamiento con endonucleasas en DNA de células HeLa. *SssI*: DNA metilado *in vitro*; *HpaII*: DNA tratado con endonucleasa metilo-sensible; *SssI+HpaII*: DNA metilado *in vitro*, tratado con endonucleasa metilosensible; *MspI*: DNA tratado con endonucleasa no-sensible a metilación, sin metilación previa con *SssI*.

Los resultados mostraron que el tratamiento con la endonucleasa metilosensible (***HpaII***) genera un patrón de barrido al hidrolizar el DNA de células HeLa en fragmentos de distintos tamaños. Por otra parte, al ser metilado *in vitro*, el DNA se mantiene como una banda de alto peso molecular (***SssI***), incluso después de un tratamiento con la endonucleasa metilosensible (***SssI+HpaII***), demostrando que la actividad enzimática de *HpaII* es dependiente del estado de metilación del DNA y es inhibida por la metilación *in vitro*.

El tratamiento con la endonucleasa no sensible a metilación (***MspI***) hidrolizó el DNA en un mayor número de sitios, de manera que se genera un barrido y se pierde la banda de alto peso molecular que se mantenía en el tratamiento con *HpaII*. Esto demuestra la eficiencia del tratamiento con las endonucleasas *HpaII* y *MspI*, además de comprobar que esta técnica permite identificar diferencias entre muestras con distintos niveles de metilación cuando son significativas.

Una vez comprobada la eficiencia de la técnica, se realizó el análisis de metilación en muestras de DNA obtenido de gónadas de *L. olivacea*. Se compararon muestras de embriones incubados a TPH y TPM en etapas 23-24, 25 y 27 de desarrollo. Se analizaron también muestras de DNA del mesonefros, por ser un órgano sometido a las mismas temperaturas que las gónadas, pero no involucrado en la determinación sexual primaria del embrión (Fig. 13).

Los resultados demostraron que tanto el DNA de gónada como el de mesonefros presentan poca accesibilidad al corte por la enzima metilosensible *HpaII*. El patrón de

bandeo es similar al de las muestras que no fueron sometidas a la reacción de digestión, indicando altos niveles de metilación.

No se detectaron cambios en los niveles de metilación durante el desarrollo de la gónada. Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias entre muestras de embriones incubados a TPM y TPH en DNA de gónadas ni mesonefros. Las posibles diferencias en niveles de metilación entre las dos temperaturas de incubación o en diferentes etapas del desarrollo gonadal no son detectables mediante esta técnica.

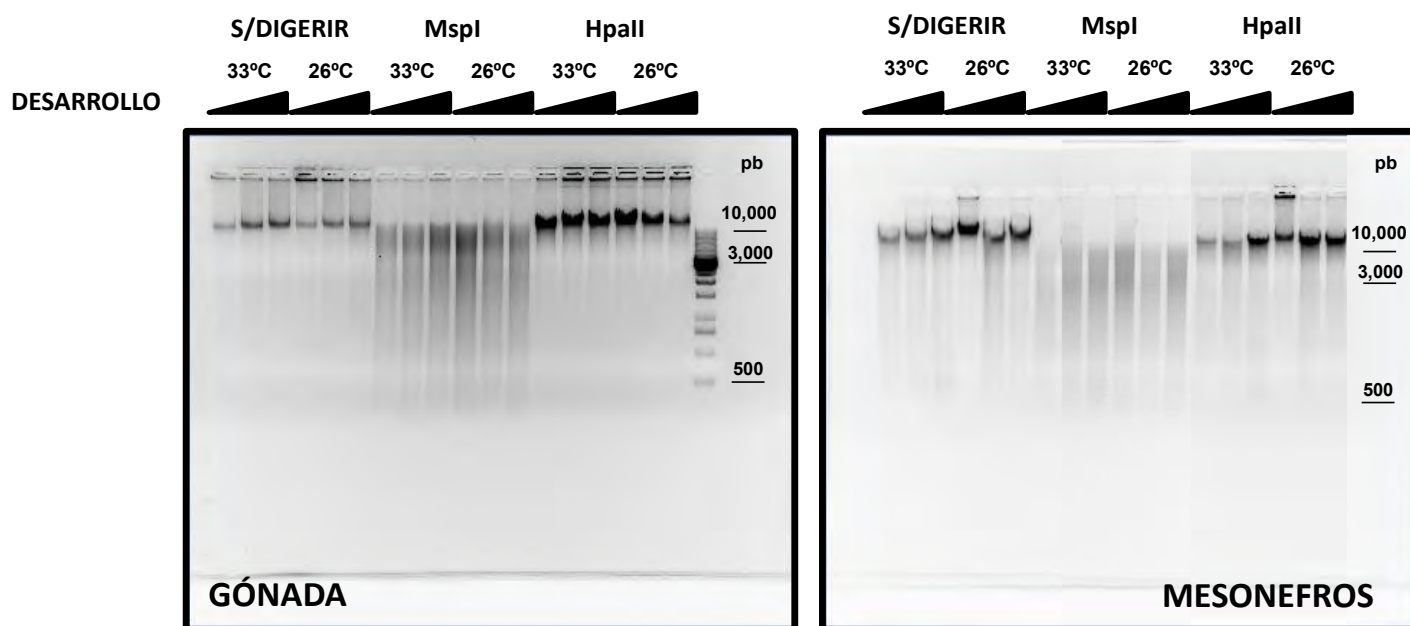


Fig. 13. Análisis de metilación por tratamiento con endonucleasas en DNA de gónada y mesonefros. DNA de gónadas y mesonefros de *L. olivacea* de distintas etapas de desarrollo: Etapa 23/24, 25 y 27, incubadas a TPH (33°C) o TPM (26°C), con distintos tratamientos: (s/digerir) DNA purificado, sin tratamiento con endonucleasas; (MspI) DNA tratado con endonucleasa no sensible a metilación; (HpaII) DNA tratado con endonucleasa metilosensible. 2µg de DNA por muestra.

1.2- Análisis global de patrones de metilación del DNA mediante AIMS.

Para continuar con el análisis global de metilación, se utilizó la técnica de Amplificación de Sitios Intermetilados (AIMS), que permite generar patrones específicos de bandeo en geles de secuenciación, a partir de patrones de metilación del DNA. La técnica de AIMS consiste en una digestión con endonucleasa metilo-sensible *HpaII*, seguida de un tratamiento con la enzima Klenow para dejar extremo rasos. A continuación se realiza una digestión con endonucleasa *MspI* con actividad independiente de metilación, por lo que reconoce los sitios metilados inaccesibles para *HpaII*. Posteriormente se lleva a cabo una ligación de adaptadores de secuencia conocida sobre los extremos cohesivos generados por la digestión con *MspI*. Mediante PCR sobre la secuencia de los adaptadores permite amplificar fragmentos de DNA que se encontraban entre sitios metilados. Los patrones de metilación se revelan mediante autorradiografías de los productos de PCR en geles de secuenciación.

Para estandarizar y validar la técnica, se realizaron controles para verificar la eficiencia de cada paso en el procedimiento. Además de los controles previos sobre las enzimas *HpaII* y *MspI*, se estandarizó la reacción de la enzima Klenow para dejar extremos rasos de manera eficiente y evitar la unión de los adaptadores en sitios de corte de la enzima *HpaII*. Se estandarizaron también las condiciones para ligación de los adaptadores de secuencia específica en los extremos cohesivos. Finalmente, se verificó que la reacción de amplificación por PCR fuera específica y se llevara a cabo únicamente sobre los adaptadores de secuencia específica (Fig. 14).

Se realizaron, además, pruebas de amplificación para determinar el número de nucleótidos aleatorios más conveniente para los oligonucleótidos utilizados durante la PCR, que permitieran obtener el mayor número posible de bandas independientes en la autorradiografía. Un mayor número de nucleótidos hace que la amplificación sea más específica, reduciendo el número de bandas obtenidas, con lo que disminuye el número de posibles sitios analizados. Por otra parte, un menor número de nucleótidos reduce la especificidad, de modo que la reacción puede amplificar un mayor número de sitios en el genoma, con lo que se corre el riesgo de perder la resolución de bandas en el gel de secuenciación y generar un barrido. Las pruebas con 4 nucleótidos aleatorios generaron un número excesivo de bandas, lo que hizo difícil identificarlas de manera independiente. Al utilizar 5 nucleótidos aleatorios disminuyó el número de bandas, permitiendo hacer análisis comparativos específicos. Se comprobó que los patrones de bandeo generados son dependientes de los nucleótidos aleatorios añadidos en los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR. Después de estas pruebas se decidió utilizar una mezcla de 2 oligonucleótidos con 5 nucleótidos aleatorios cada uno. (B1 +B2). (Fig. 14)

Una vez estandarizada la técnica, se realizó el análisis de AIMS utilizando DNA de gónadas de embriones incubados a TPH o TPM en etapa 27 de desarrollo. Los resultados demostraron que la mayoría de las bandas amplificadas se mantienen constantes en muestras de ovario y testículo; sin embargo, algunas bandas mostraron intensidad dimórfica entre ovarios y testículos.

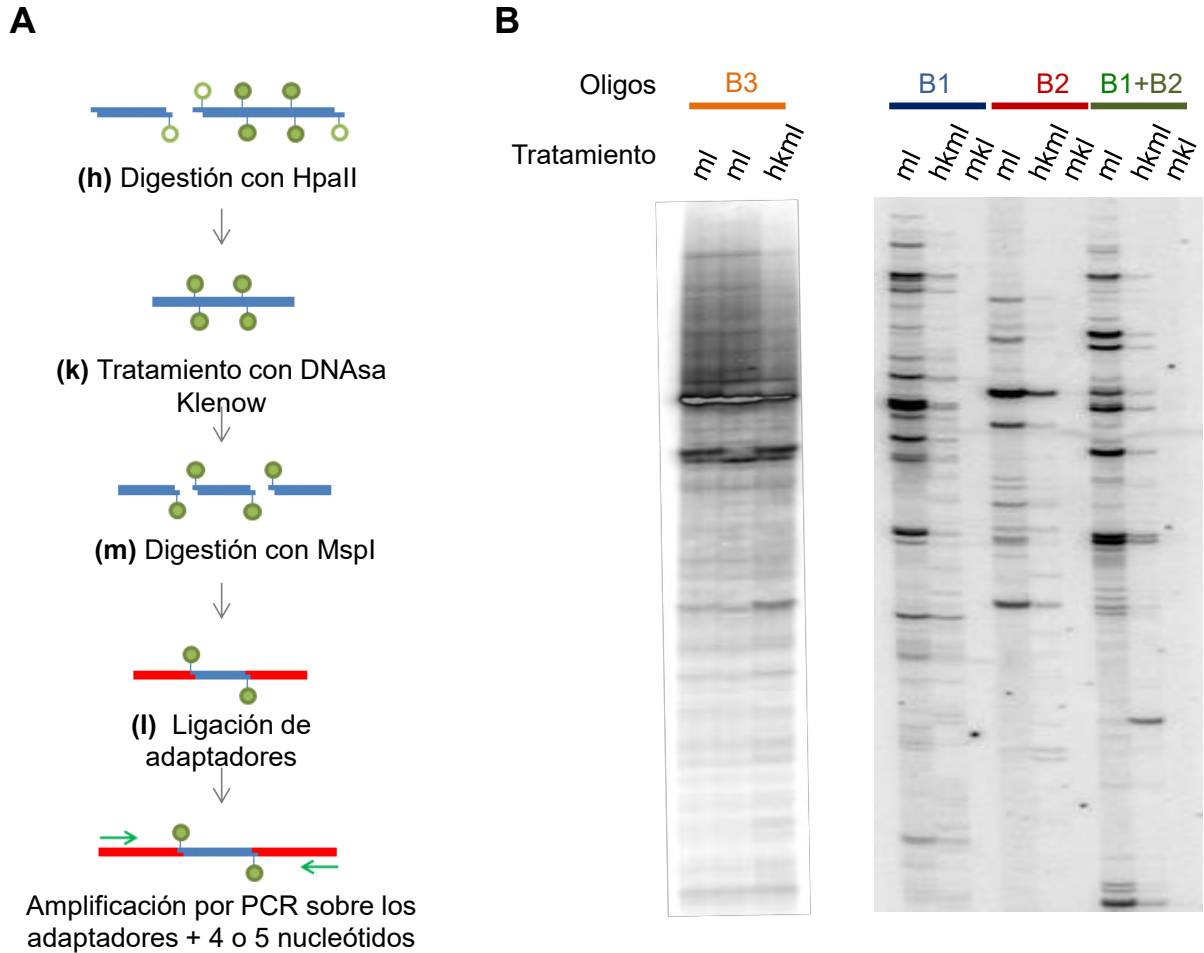


Fig. 14. Técnica y controles de amplificación de sitios intermetilados. A) Técnica de AIMS. Se representa un fragmento de DNA genómico en azul. Los círculos verdes representan sitios CpG metilados (círculos llenos) o desmetilados (círculos vacíos). Los adaptadores de se muestran en rojo. B) Controles para la estandarización de la técnica de AIMS, utilizando oligonucleótidos con 4 (izquierda) o 5 (derecha) nucleótidos aleatorios. Cada carril representa distintos tratamientos, cantidades de DNA utilizado en la PCR u oligonucleótidos empleado: m=MspI; k=Polimerasa Klenow; l=Ligación de Adaptadores, h= Tratamiento completo con enzimas HpaII, Klenow, MspI y Ligación de adaptadores. Se usaron 2 oligonucleótidos distintos de 5 nucleótidos aleatorios para la PCR (B1 y B2) de manera independiente o en conjunto. Se utilizó DNA de mesonefros de embriones incubados a TPH, de periodo PD.

Se identificaron algunas bandas con mayor intensidad en ovarios, mientras que otras se veían incrementadas en testículos, indicando que el efecto no se debe a errores de cargado ni manipulación de las muestras.

El incremento en la intensidad de una banda es interpretado como un mayor porcentaje de metilación en el fragmento de DNA representado. Así, la técnica evidenció patrones diferenciales de metilación global del DNA entre ovarios y testículos (Fig. 15). Los patrones de bandeo generados mostraron ser reproducibles tanto entre distintas reacciones de PCR del mismo DNA tratado, como entre DNA de distintas 2 distintas muestras biológicas (gónadas de 10 embriones de etapa 27 en cada muestra). Estos resultados sugieren que la metilación diferencial del DNA está involucrada en los procesos de determinación y/o diferenciación sexual en *L. olivacea*.

Para continuar con el análisis, se buscó identificar la secuencia de los fragmentos de DNA que mostraron variaciones en la metilación dependientes del sexo gonadal. Se cortaron las bandas 2, 3, 4 y 5 (Fig. 16 A) y el DNA fue eluido y purificado. Fue necesario hacer una segunda reacción de amplificación por PCR, utilizando los mismos oligonucleótidos usados en la amplificación inicial de AIMS (B1+B2) para enriquecer el DNA de cada una de las bandas (Fig. 16 B-C). Se comprobó por electroforesis en gel de agarosa que los tamaños de las bandas corresponden con lo esperado por su migración en el gel de AIMS y que van de 250 a 850 pb.

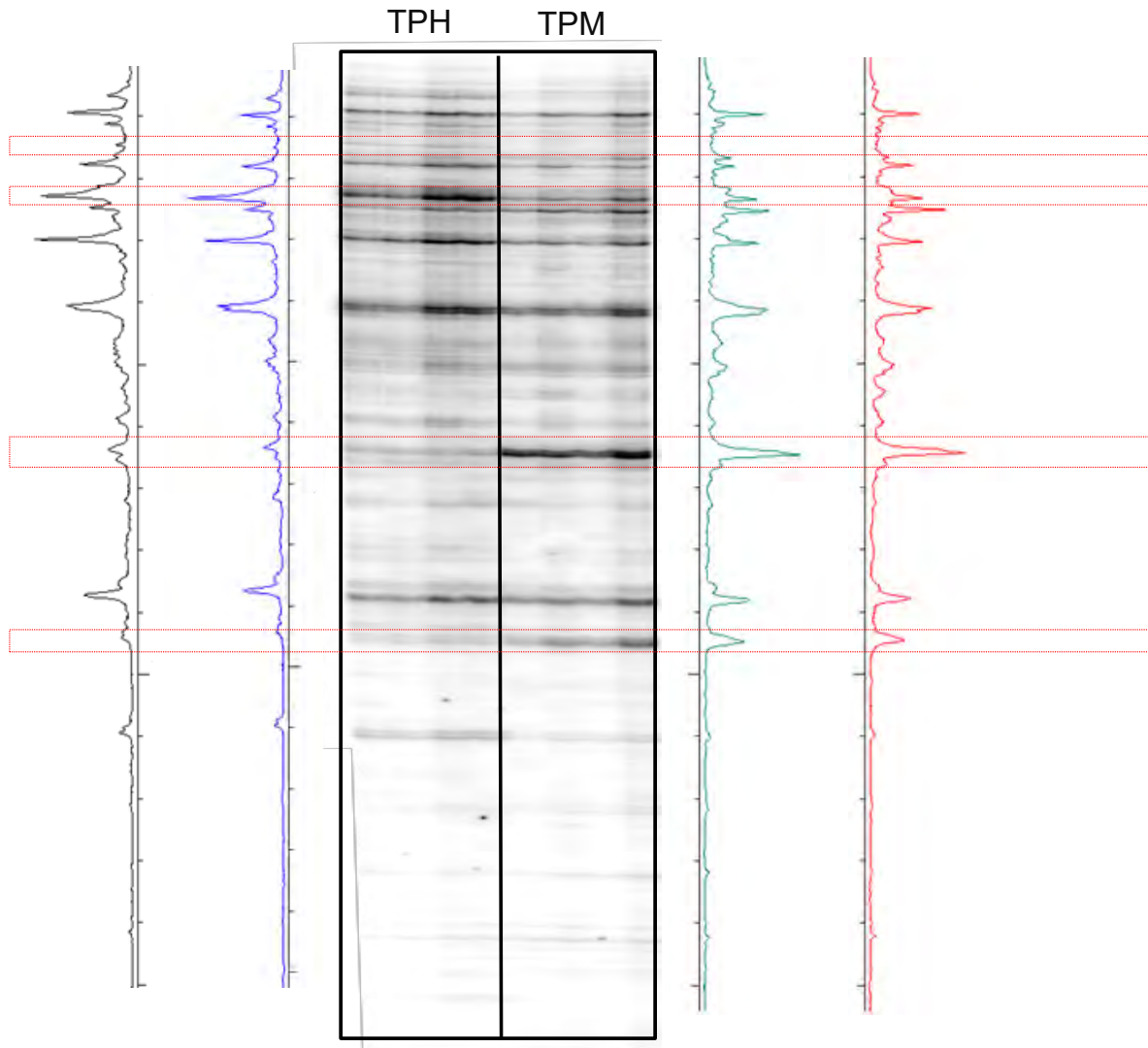


Fig. 15. Amplificación de Sitios Intermetilados. Gel comparativo de AIMS entre gónadas de embriones de etapa 27 incubados a TPH (33°C) y TPM (26°C), utilizando oligos B1 + B2. La imagen muestra 4 carriles de cada temperatura, con reacciones de PCR independientes utilizando distintas cantidades de DNA, para descartar cambios debidos a diferencias de concentración de DNA en las reacciones de PCR. Los histogramas muestran variaciones dependientes del sexo gonadal de acuerdo con la temperatura de incubación. Se muestran 2 de los 4 histogramas generados para cada temperatura. Las cajas rojas enmarcan bandas que muestran variaciones dependientes de temperatura.

Las bandas fueron clonadas y secuenciadas. Sin embargo, los análisis revelaron la presencia de varias secuencias distintas en cada banda aislada. Las secuencias identificadas en cada banda eran del mismo tamaño, por lo que migraron juntas en el gel y fueron aisladas y re-amplificadas en conjunto, dificultando identificar las secuencias que presentan metilación diferencial mediante este análisis.

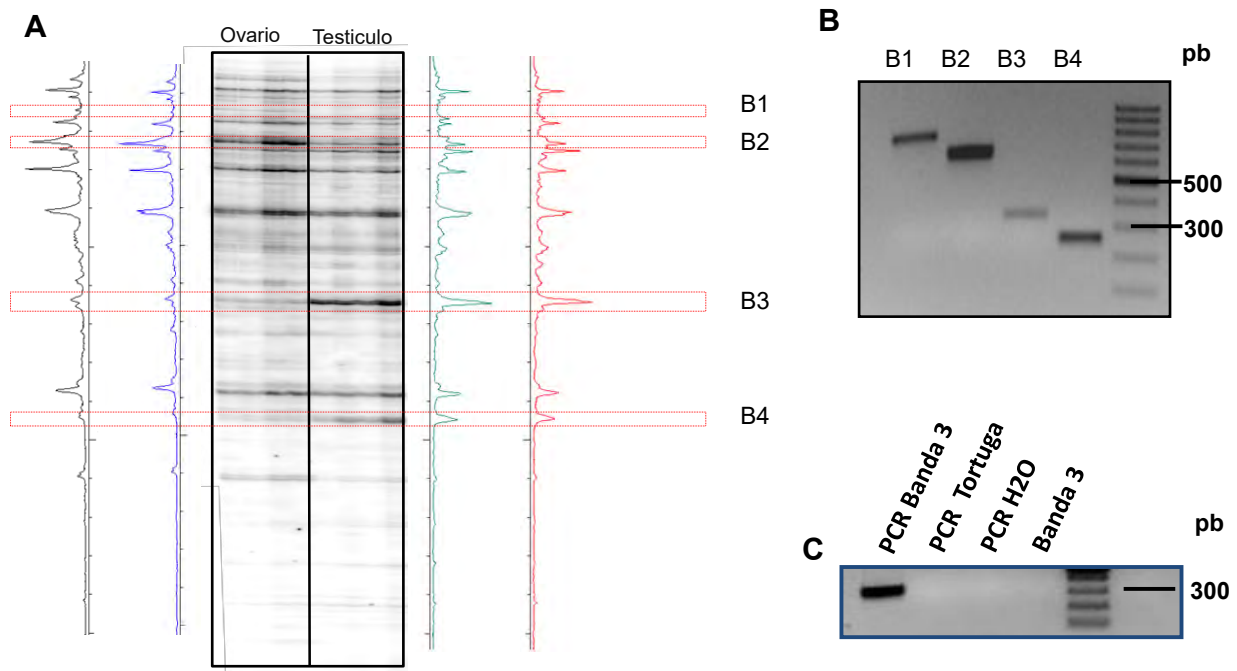


Fig. 16. Re-amplificación de bandas de AIMS. A) Gel comparativo de AIMS entre embriones de etapa 27 incubados a TPH (33°C) o TPM (26°C) sexualmente determinados. Los cuadros rojos enmarcan 4 bandas que muestran variaciones dependientes del sexo gonadal de acuerdo con la temperatura de incubación. B) Gel de agarosa, mostrando las bandas 1-4 cortadas y reamplificadas por PCR, junto al marcador de peso molecular 100pb. C) Gel de agarosa mostrando la especificidad de la reamplificación por PCR de la Banda 3 (PCR Banda 3) a partir de DNA eluido del gel de acrilamida de AIMS (Banda 3). No hubo producto de amplificación al utilizar DNA genómico de tortuga como molde (PCR Tortuga), ni al realizar la PCR sin DNA molde, únicamente con los oligonucleótidos (PCR H2O).

Para determinar si las diferencias en los patrones de metilación del DNA surgen como un proceso de metilación o desmetilación, se extendió el análisis de AIMS sobre muestras de gónadas de embriones incubados a TPH y TPM extraídas durante el periodo sexualmente indeterminado (Etapas 23-24). Las muestras fueron procesadas como se describió previamente y el producto final de amplificación por PCR fue corrido en geles de secuenciación (Fig. 17).

Los geles demuestran que, antes de la determinación sexual, los patrones de bandeo resultaron muy similares entre embriones incubados a TPH y TPM, en contraste con las diferencias en los patrones de metilación del DNA observadas en ovarios y testículos diferenciados. Ésto sugiere que las diferencias en los patrones de metilación surgen en el periodo sensible a la temperatura (PTS) durante el proceso de determinación y/o al inicio de la diferenciación sexual.

De manera interesante, se encontró que algunas de las diferencias surgen por un proceso de metilación en alguno de los dos sexos, partiendo de un estado previamente desmetilado en la gónada bipotencial, mientras que otras regiones mostraron desmetilación diferencial a partir de un estado previamente metilado. Estos resultados evidencian no solo un proceso de metilación diferencial, sino también de desmetilación en algunas secuencias, a partir de un patrón de metilación independiente de la temperatura de incubación en gónadas bipotenciales (Fig. 17).

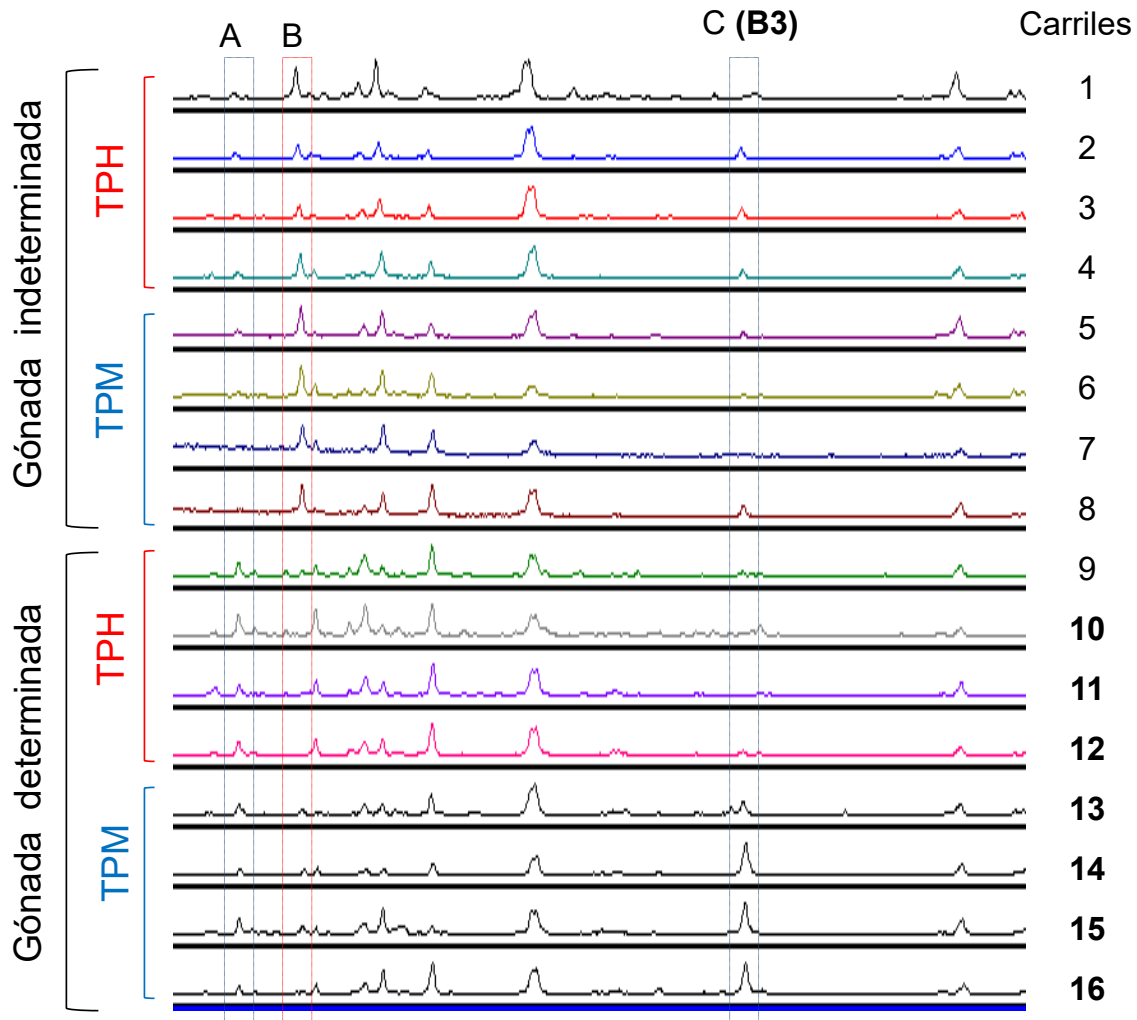


Fig. 17. Análisis de AIMS durante la determinación sexual.

El análisis de AIMS demostró que los patrones de metilación en gónadas indeterminadas son muy similares entre embriones incubados a TPH y TPM (**carriles 1-4 y 5-8, respectivamente**). Sin embargo, los patrones de metilación cambian después del PTS, dependiendo si la gónada se determina como un ovario o testículo (**carriles 9-12 y 13-16, respectivamente**). Algunas secuencias mostraron una ganancia en metilación del DNA durante la determinación sexual (**A**) mientras que otras muestran desmetilación (**B**). Algunas secuencias adquirieron patrones dimórficos de metilación dependiendo de la temperatura de incubación (**C**).

1.3- Análisis global de distribución de 5mC mediante inmunofluorescencias.

Una vez determinado el perfil temporal de metilación del DNA a nivel molecular, decidimos analizar su patrón espacial a nivel celular y tisular en ovarios y testículos diferenciados bajo el efecto de la temperatura de incubación en *L. olivacea*. Se extrajeron complejos gonáda-mesonefros de embriones incubados a TPH o TPM; el tejido fue fijado con paraformaldehído y congelado a -80°C. Los cortes obtenidos en un criostato fueron procesados para inmunofluorescencia con microscopía confocal (Fig. 18). Se utilizaron embriones en etapa 27 de desarrollo, donde previamente se encontraron diferencias en los patrones de metilación mediante la técnica de AIMS (Fig. 15).

Para identificar los tipos celulares en los cortes se utilizaron anticuerpos contra marcadores específicos. En cortes de testículo se utilizó un anticuerpo contra la proteína Sox9, que es específica de las células de Sertoli en los cordones medulares. En muestras de ovario no pudo utilizarse Sox9 como marcador, debido a que en Etapa 27 la expresión de Sox9 ha sido silenciada en embriones incubados a TPH, por lo tanto, se utilizó un anticuerpo contra laminina, componente de lámina basal que rodea las células epiteliales tanto de los cordones medulares como del epitelio cortical.

Las inmunofluorescencias mostraron una mayor intensidad de la marca de 5mC en células de la corteza, a comparación de las células ubicadas en la médula. Esta diferencia pudo observarse tanto en ovarios como testículos, sugiriendo que se establece por el proceso de formación gonadal y no por la diferenciación de la gónada en ovario o testículo.

No se encontró diferencia en la intensidad de la señal de la 5mC entre células mesenquimales y epiteliales en la médula (túbulos seminíferos en testículo y vestigios de cordones medulares en ovario) (Fig. 18).

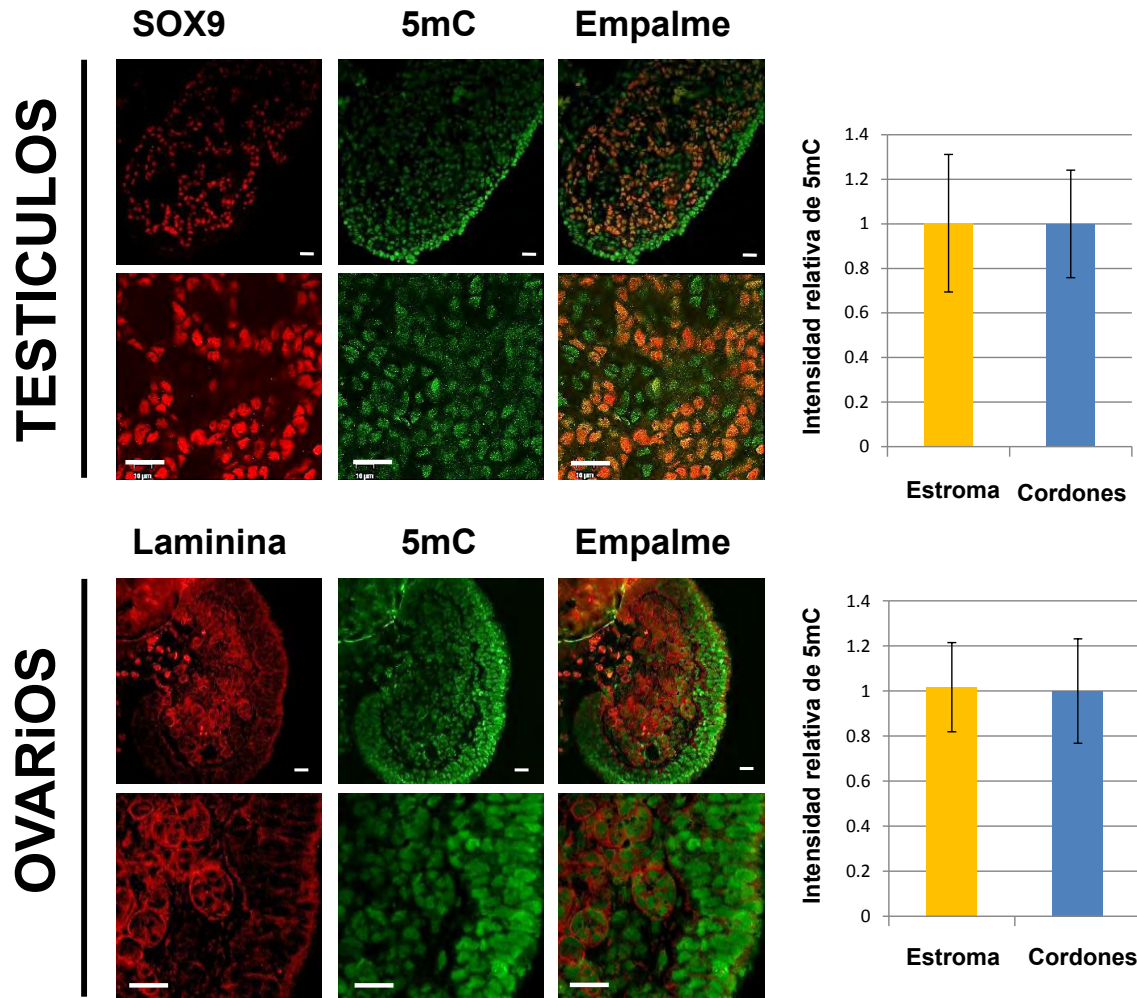


Fig. 18. Análisis de distribución de 5mC por inmunofluorescencias. Las inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo contra 5mC no mostraron diferencias en los niveles de esta modificación del DNA entre células de cordones medulares y células mesenquimales del estroma en testículos ni ovarios (verde). Un anticuerpo contra Sox9 se utilizó para identificar las células en los cordones medulares en testículo (rojo). Un anticuerpo contra laminina se utilizó para identificar células epiteliales en ovario (rojo). Las graficas muestran el promedio normalizado de intensidad en núcleos de células de estroma o cordones en varias micrografías y muestras biológicas n=3. No se encontraron diferencias significativas entre cordones y estroma en ovarios ni testículos mediante una prueba t de Student $p < 0.05$ (La cuantificación de inmunofluorescencias se explica en la Fig. 43). Las micrografías muestran imágenes representativas. Barra de escala = 20 μm .

Los resultados muestran que los cambios en los patrones de metilación que definen el destino de los diversos tipos celulares en la gónada bipotencial, no pueden ser detectados mediante la técnica de inmunofluorescencia contra la marca de 5mC. El actual resultado podría explicarse por el alto porcentaje de metilación en las gónadas de *L. olivacea* detectado mediante el corte con endonucleasas metilosensibles: los altos niveles de metilación del DNA pueden enmascarar los cambios finos en secuencias específicas identificados mediante la técnica de AIMS.

1.4- Análisis de presencia de 5hmC mediante Dot Blot

La marca de 5hmC se ha visto asociada recientemente al proceso de desmetilación activa del DNA, principalmente en células troncales embrionarias y en cerebro de mamíferos. Por ello, para continuar con el análisis se planteó evaluar la posible participación del proceso de desmetilación vía 5hmC en la determinación sexual de *L. olivacea*.

Inicialmente se determinó analizar la presencia de 5hmC en DNA de *L. olivacea*, utilizando un anticuerpo específico para detectar esta marca mediante la técnica de Dot Blot. Como control positivo se utilizó DNA de cerebro de ratón macho recién nacido de la cepa CD-1, donde se ha reportado abundancia de esta marca.

El análisis por Dot blot evidenció altos niveles de 5hmC en todas las muestras de cerebro y gónada de *L. olivacea*, incluyendo todas las etapas de desarrollo. Los niveles fueron similares a los encontrados en el control positivo de cerebro de ratón (Fig. 19).

La presencia de altos niveles de 5hmC en gónadas de *L. olivacea*, sugiere el papel de esta marca como intermediario en un proceso activo de desmetilación durante la determinación y/o la diferenciación sexual de las gónadas en *L. olivacea*.

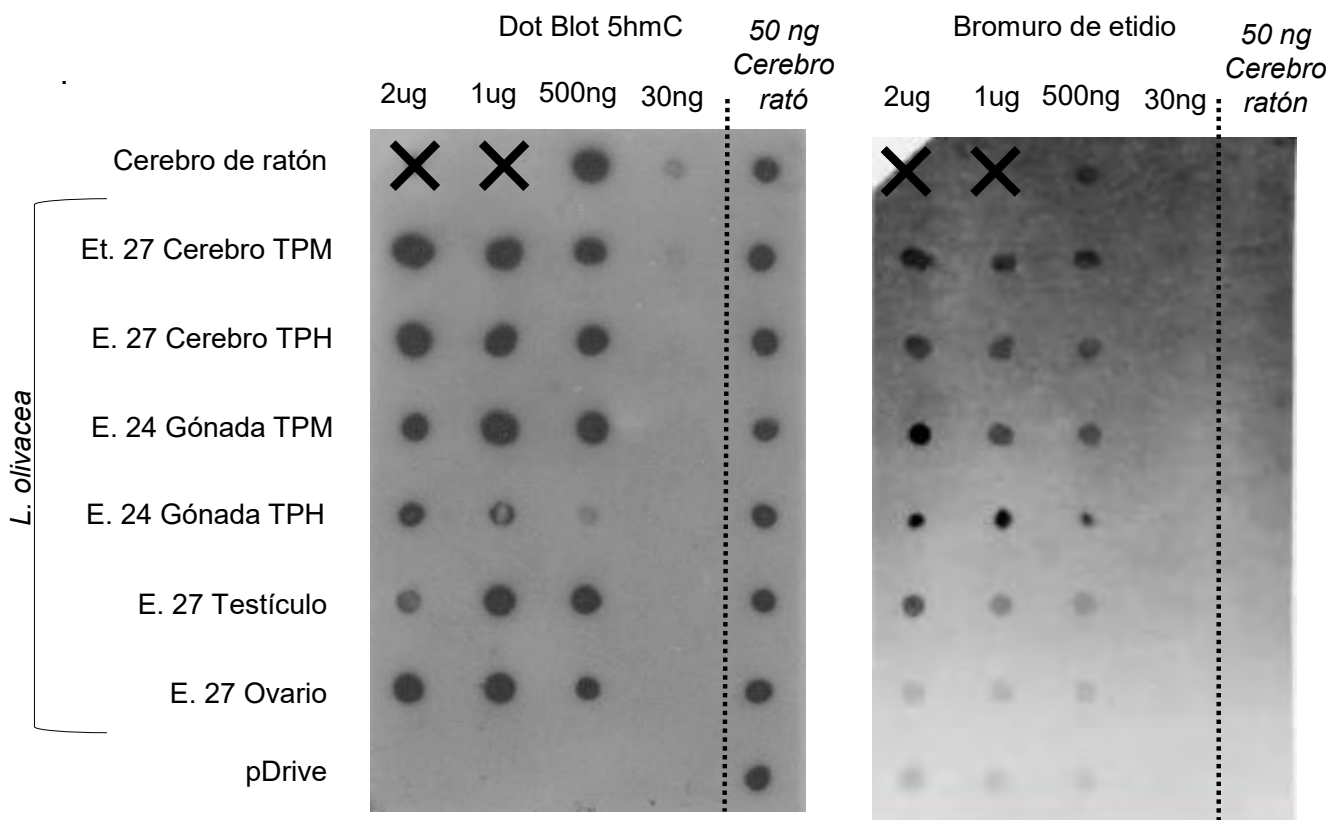


Fig. 19. Evaluación de presencia de 5hmC en DNA de *L. olivacea* mediante Dot Blot. A) Dot Blot utilizando un anticuerpo contra la marca de 5hmC en DNA de distintos tejidos. Se evidencia la presencia de la marca en DNA de cerebro y gónada de *L. olivacea*. Como control positivo se utilizó DNA de cerebro de ratón, como control negativo se utilizó el plasmido pDrive. B) Tinción de la membrana con bromuro de etidio muestra que las diferencias observadas en la señal del Dot Blot no son atribuibles a diferencias en el cargado de DNA.

1.5- Análisis global de distribución de 5hmC mediante inmunofluorescencias.

Una vez determinada la presencia de altos niveles de 5hmC en gónadas, se decidió evaluar su distribución en los distintos tipos celulares de ovarios y testículos. Se utilizó inmunofluorescencia confocal con un anticuerpo contra 5hmC. Las muestras fueron procesadas como se describió anteriormente y para identificar los distintos tipos celulares se utilizó un anticuerpo contra varias formas de citoqueratina (CK), un filamento intermedio importante en la formación de uniones intercelulares en tejido epitelial. De modo que las células de la corteza y los cordones medulares de la gónada fueron identificadas por la presencia de CK (Fig. 20).

De manera interesante, las imágenes mostraron diferencias en la distribución de la marca de 5hmC entre ovario y testículo: en ovario, los remanentes de los cordones medulares mostraron una mayor intensidad de la señal de 5hmC que las células en el estroma. Por otra parte, en testículo las células de los cordones medulares, ahora llamados cordones testiculares, mostraron menor señal de 5hmC en comparación con las células del estroma. Esta distribución tisular inversa de la marca de 5hmC sugiere la existencia de un proceso epigenético dimórfico involucrado en la morfogénesis de ovarios y testículos por efecto de la temperatura (Fig. 20).

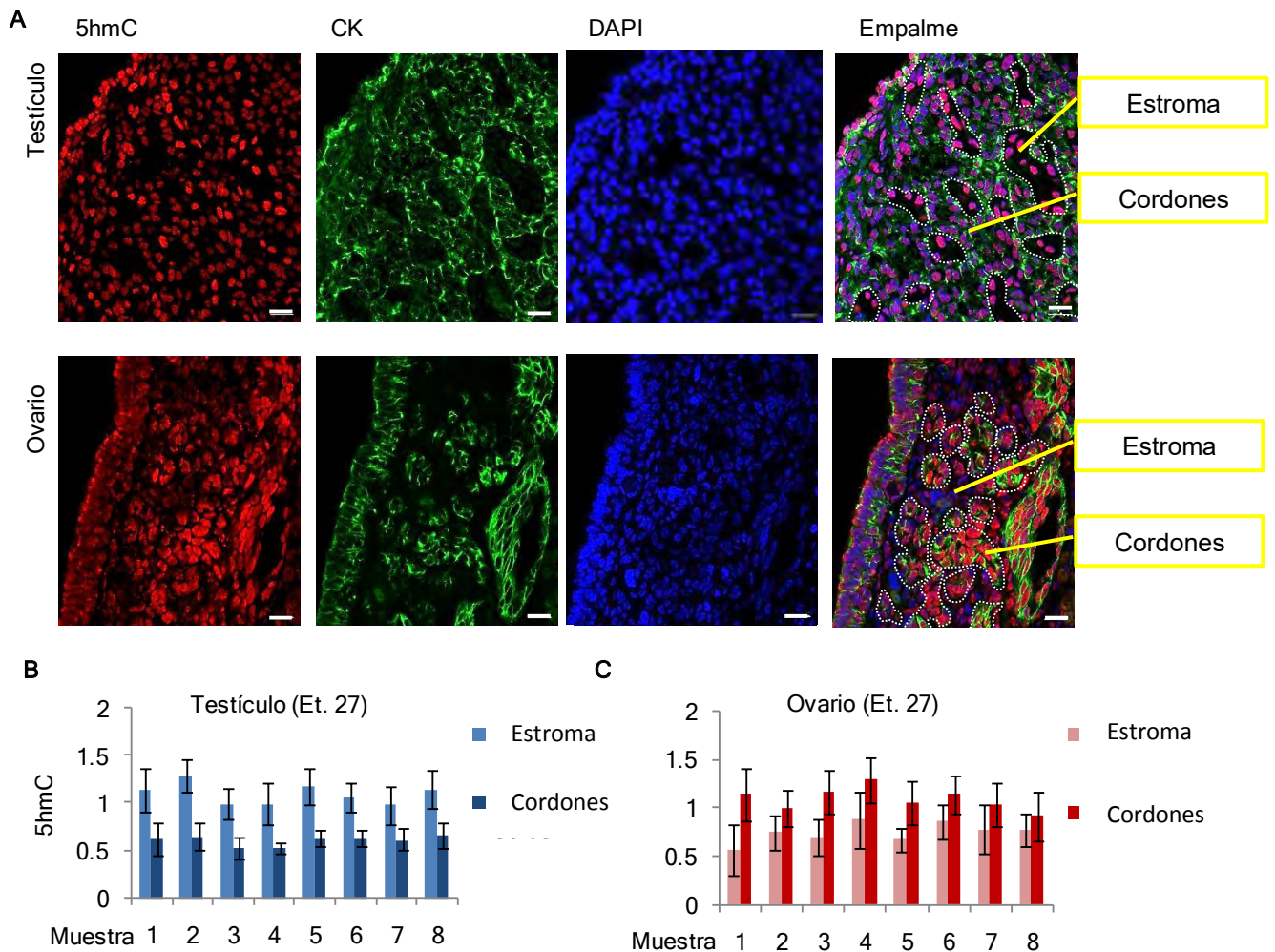


Fig. 20. Análisis de distribución de 5hmC por inmunofluorescencias. Se encontraron diferencias en la distribución de la modificación del DNA 5hmC entre ovarios y testículos de *L. olivacea* (rojo). En testículos las células mesenquimales del estroma mostraron mayor intensidad en la señal de 5hmC que las células de los cordones medulares, mientras que una distribución opuesta se observó en ovarios. Se muestra la división entre células del estroma y los cordones (línea punteada). Se utilizó un anticuerpo contra CK para identificar las células epiteliales (verde). DAPI identifica los núcleos (azul). Las gráficas muestran intensidad promedio de 5hmC en los núcleos cuantificados ($n > 50$) en las células de estroma y cordones medulares, normalizados con la media de intensidad de núcleos en la micrografía. Se utilizaron muestras de 8 organismos distintos para cada temperatura de incubación (Promedio \pm D.E.). El análisis estadístico de estos resultados se incluye en la Figura 23. Barra de escala = 20 μ m.

Para comprobar si estas diferencias vienen de un enriquecimiento o pérdida en los niveles de 5hmC, realizamos inmunofluorescencias en cortes de distintas etapas durante el desarrollo gonadal, abarcando los 3 periodos de la determinación sexual, PI, PTS y PD, muestreando gónadas de embriones incubados a TPH o TPM en etapas 24, 25 y 26 del desarrollo embrionario.

Las imágenes mostraron que en la etapa 24 la intensidad de la 5hmC es similar en todas las células de la médula gonadal. En esta etapa la mayoría de las células de la médula constituyen los cordones medulares y fue difícil identificar células del estroma. Las imágenes de etapas 25 y 26 (Figs. 21 y 22, respectivamente) mostraron diferencias en la distribución de 5hmC similares a las encontradas en ovarios y testículos claramente diferenciados. Esto resulta evidente, principalmente en los cordones testiculares de embriones incubados a TPM, donde la marca de 5hmC disminuye gradualmente de la etapa 25 en adelante (Fig. 23). De manera interesante, se encontraron algunos cúmulos de células epiteliales que aún mostraban altos niveles de 5hmC en testículos en etapa 26, confirmando que las diferencias entre distintos tipos celulares observadas en etapas posteriores, son debidas a la disminución de 5hmC en el DNA de las células que forman los cordones testiculares.

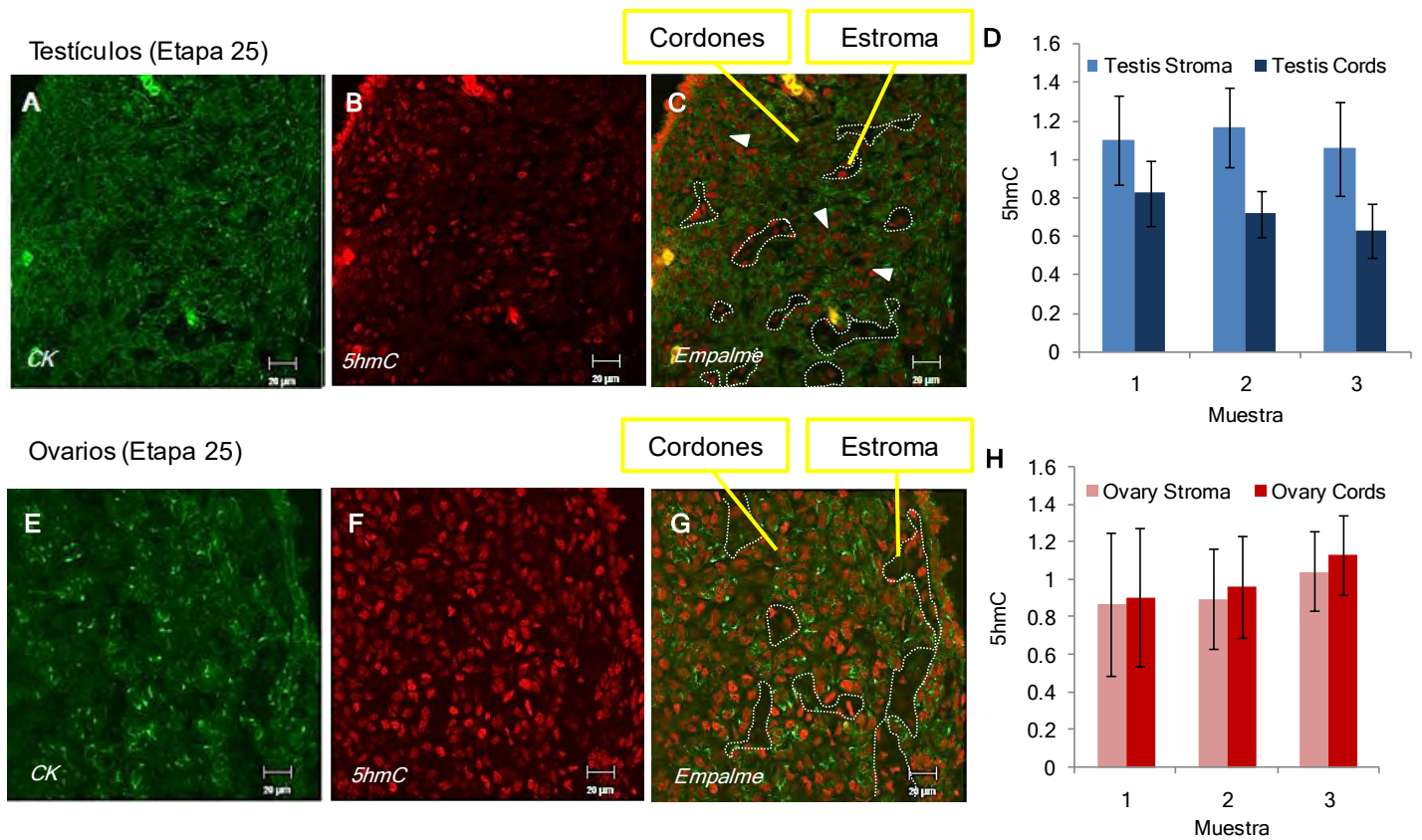


Fig. 21. Análisis de distribución de 5hmC por inmunofluorescencias en Etapa 25. Distribución de la modificación del DNA 5hmC (rojo) entre gónadas incubadas a TPH y TPM en etapa 25 de desarrollo. Un anticuerpo contra citoqueratina CK se utilizó para identificar los cordones medulares (verde). La línea punteada marca la división entre los cordones medulares y el estroma. Las flechas señalan cúmulos de células epiteliales en gónadas incubadas a TPM que aun muestran una señal alta de 5hmC, lo que no ocurre en etapas posteriores; esto demuestra que ocurre una pérdida de 5hmC en estas células durante el desarrollo. Las gráficas muestran intensidad de 5hmC en los núcleos cuantificados ($n > 10$) en las células de estroma y cordones medulares, normalizados con la media de intensidad de núcleos en la micrografía que les corresponde. Se utilizaron muestras de 3 organismos distintos para cada temperatura de incubación (Promedio \pm D.E.). El análisis estadístico de estos resultados se incluye en la Figura 22. Barra de escala = 20 μ m.

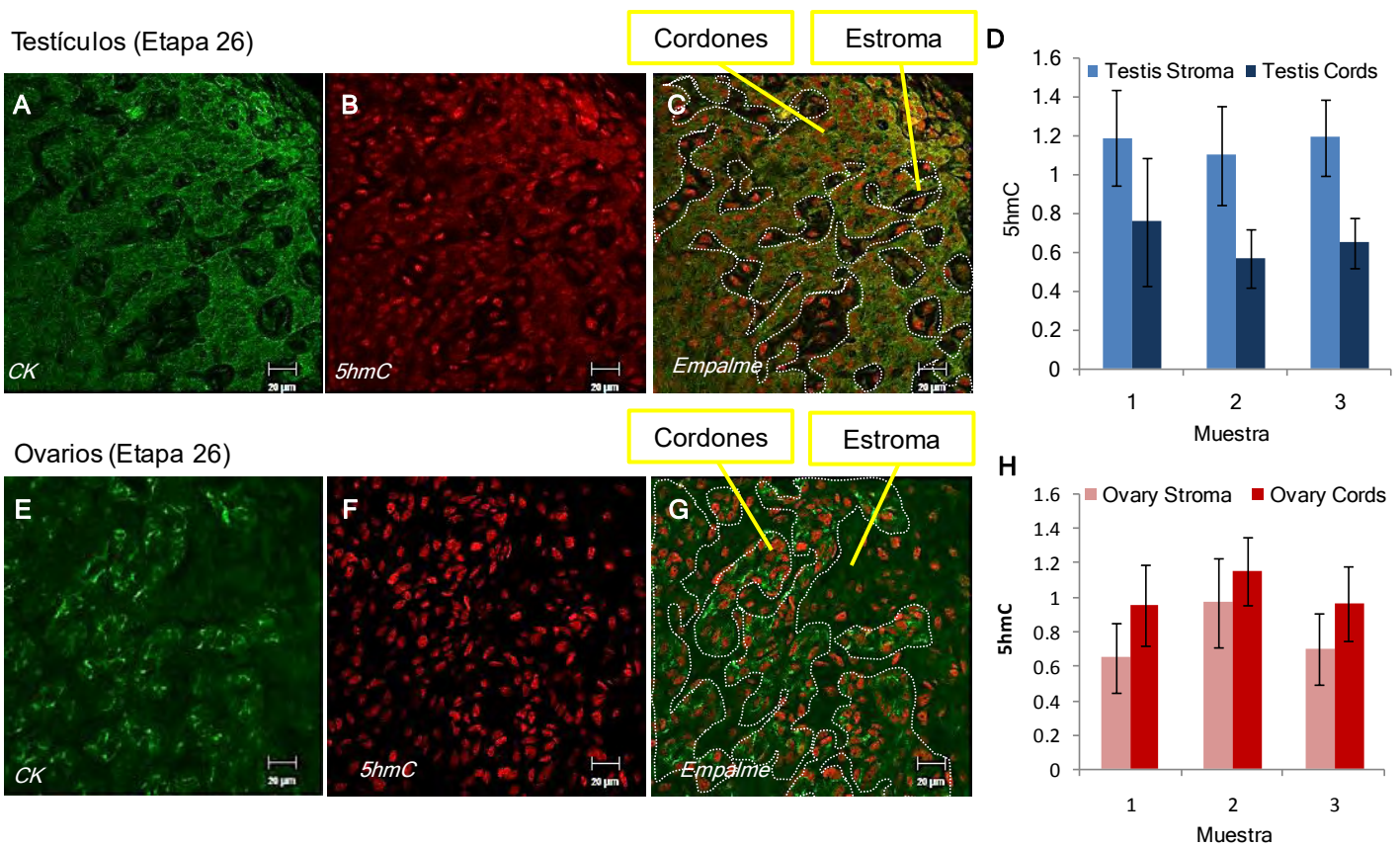


Fig. 22. Análisis de distribución de 5hmC por inmunofluorescencias en Etapa 26. Distribución de la modificación del DNA 5hmC (rojo) entre gónadas incubadas a TPH y TPM en etapa 25 de desarrollo. Un anticuerpo contra citoqueratina CK se utilizó para identificar los cordones medulares (verde). La línea punteada marca la división entre los cordones medulares y el estroma. Las gráficas muestran intensidad promedio de 5hmC en los núcleos cuantificados ($n > 10$) en las células de estroma y cordones medulares, normalizados con la media de intensidad de núcleos en la micrografía que les corresponde. Se utilizaron muestras de 3 organismos distintos para cada temperatura de incubación (Promedio \pm D.E.). El análisis estadístico de estos resultados se incluye en la Figura 22. Barra de escala = 20 μ m

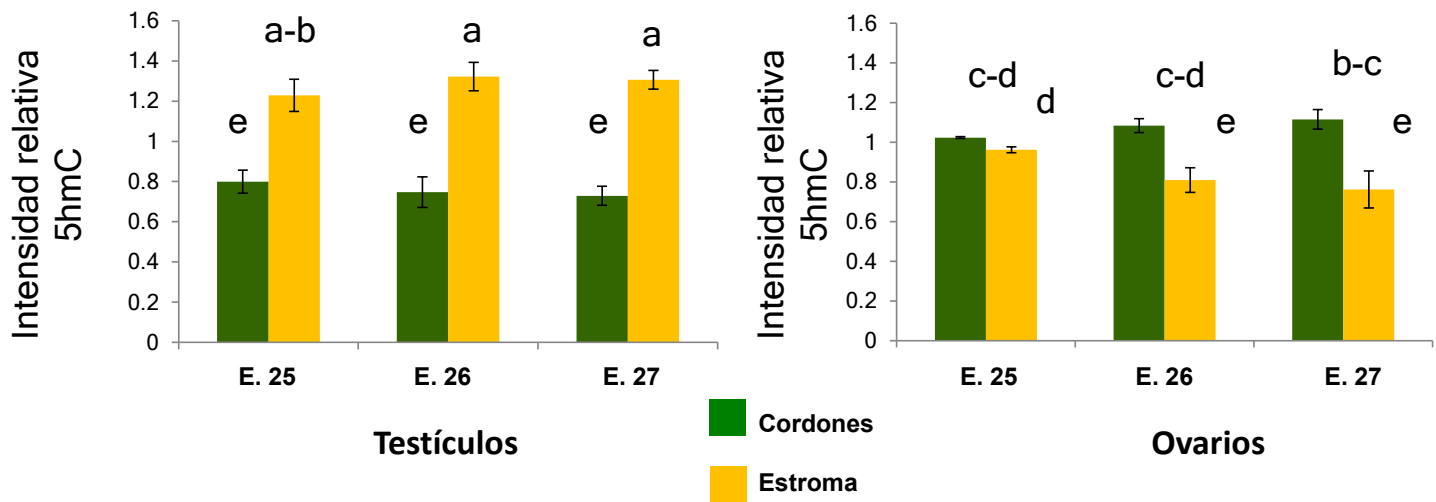


Fig. 23. Análisis de distribución de 5hmC por inmunofluorescencias durante el desarrollo. Las gráficas muestran el promedio de intensidad de la marca de 5hmC en células de estroma y cordones de gónadas incubadas a TPH o TPM. (Promedio \pm D.E.). Para etapas 25 y 26, $n=3$. Para etapa 27 $n=8$. La diferencia en la intensidad de la marca de 5hmC entre cordones y estroma se incrementa durante el desarrollo entre etapas 25 y 27 en testículo; mientras que en ovario no se aprecian diferencias en los niveles de intensidad de 5hmC entre cordones medulares y estroma, hasta la etapa 26, a partir de la cuál se observa mayor intensidad en cordones que en estroma. Un análisis de varianza con agrupación RGEWQ (a-d) muestra diferencia significativa entre grupos identificados por distintas letras ($P < 0.05$).

1.6- Análisis de distribución de acetilación de histonas mediante inmunofluorescencias.

Para este estudio utilizamos gónadas de embriones incubados a TPH o TPM en etapa 27 del desarrollo. Para la inmunolocalización se utilizaron tres anticuerpos para marcas de acetilación: i. contra diversos residuos acetilados de la histona H4 (panH4), ii. contra diversos residuos acetilados de la histona H3 (panH3) y iii. un anticuerpo que reconoce

la acetilación de la lisina 18 de la histona H3 (H3K18ac), que se ha visto asociada con la activación de la expresión génica, de manera dependiente de receptores nucleares de hormonas (Jin et al., 2011) (Fig. 24).

Las micrografías obtenidas utilizando los tres anticuerpos generaron valores y resultados muy similares entre sí, probando la reproducibilidad de la técnica. Como se esperaba, la señal fue específica de núcleos celulares utilizando cualquiera de los tres anticuerpos. Las imágenes mostraron una gran variación en la intensidad de la señal producida por la inmunolocalización. Sin embargo, los distintos niveles en la intensidad no correlacionan con los diversos tipos celulares, se encontraron núcleos mostrando una fuerte acumulación de la marca tanto en células epiteliales como del estroma. Estos resultados se ven reflejados en la graficas de intensidad de fluorescencia, donde no solo no se encuentran diferencias significativas entre células del estroma y los cordones medulares en ninguno de los casos, sino que los promedios de intensidad en uno u otro tipo celular son muy similares y las barras de error muestran una gran variación entre los valores de cada muestra (Fig. 24).

Resultados similares se observaron tanto gónadas incubadas a TPH como TPM. No encontramos diferencias significativas entre la concentración de marcas de acetilación en los distintos tipos celulares de ovarios ni testículos. Por lo tanto, el proceso de diferenciación sexual no se ve asociado a cambios globales en los niveles de acetilación de histonas que puedan ser detectados mediante análisis de inmunofluorescencias.

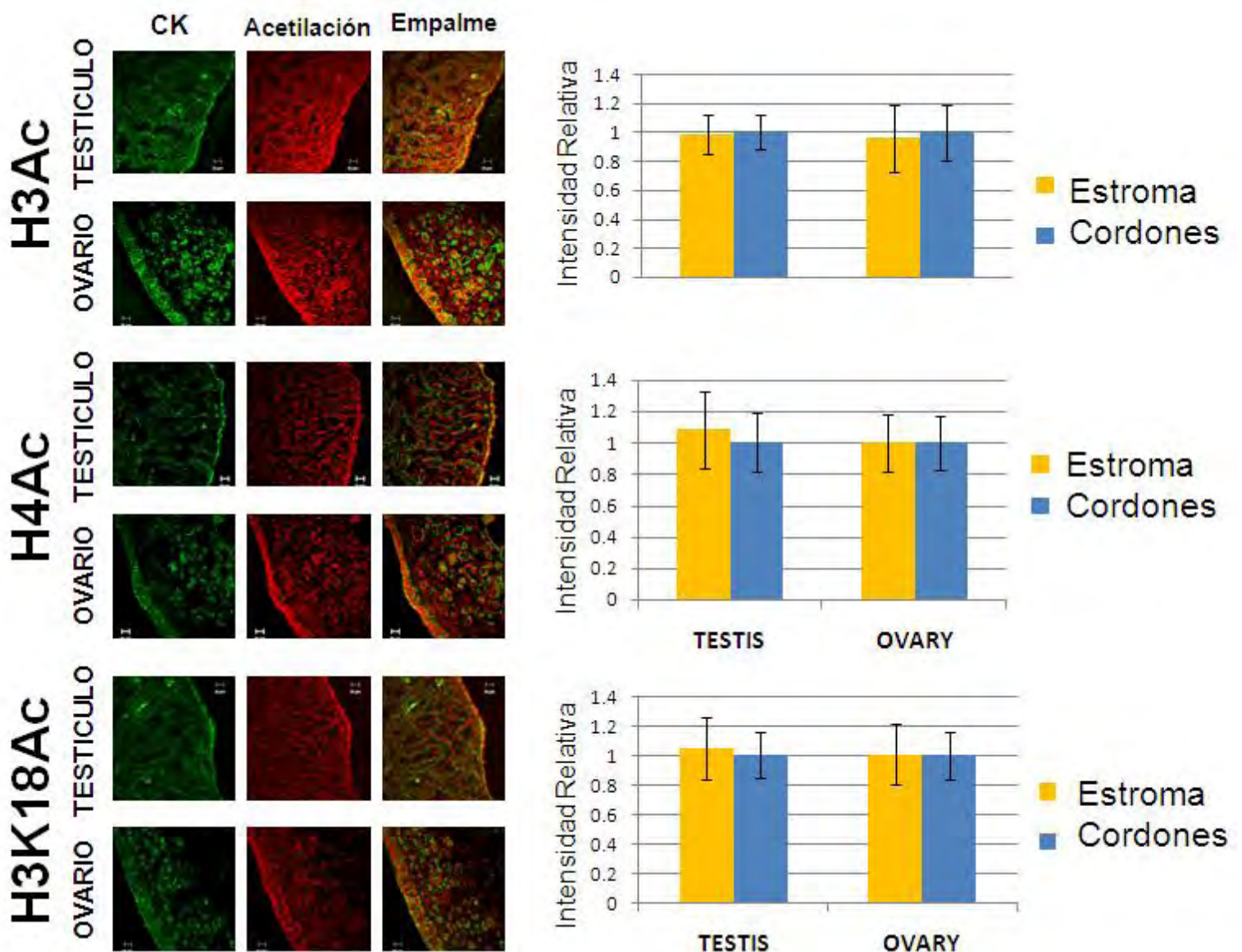


Fig. 24. Análisis de distribución de acetilación de histonas por inmunofluorescencias. Las inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo contra H3Ac, H4Ac y H3K18Ac, no mostraron diferencias en los niveles de esta modificación de la cromatina entre células de cordones medulares y células mesenquimales del estroma en testículos ni en ovarios (rojo). Un anticuerpo contra CK se utilizó para identificar las células epiteliales en los cordones (verde). Las graficas muestran el promedio normalizado de intensidad en núcleos de células de estroma o cordones en varias microfotografías y muestras biológicas $n=3$. No se encontraron diferencias significativas entre cordones y estroma en ovarios ni testículos mediante una prueba de Student $p<0.05$ (La cuantificación de inmunofluorescencias se explica en la Fig. 43). Las microfotografías muestran imágenes representativas. Barra de escala = 20 μm .

1.7- Análisis de distribución de metilación de histonas mediante inmunofluorescencia.

De manera inicial se analizó la marca de H3K27me₃, que es establecida por el complejo PcG durante el desarrollo y se asocia con silenciamiento de los genes. Se realizó un análisis de inmunofluorescencia utilizando gónadas de embriones incubados a TPH o TPM de embriones en etapa 27. La detección de H3K27me₃ resultó nuclear, como se esperaba de un anticuerpo específico contra modificaciones post-traduccionales de histonas.

A TPM, la mayor concentración de H3K27me₃ se encontró en las células de la corteza. Sin embargo, se encontraron algunas células en las gónadas incubadas a TPH que mostraban mayor intensidad fluorescente que el resto de las células en la gónada. El histograma muestra los picos de intensidad en ovarios y testículos, haciendo más claras las diferencias (Fig. 25). Las células que mostraron mayor intensidad en ovarios coinciden con la marca de CK (Fig. 26), indicando que corresponden a los remanentes de cordones medulares que han dejado de expresar *Sox9*. Sin embargo, esta acumulación de marca de H3K27me₃ no se encontró en todas las células de los cordones medulares remanentes en ovario, por lo que el análisis estadístico de la intensidad fluorescente entre células epiteliales y mesenquimales no mostró diferencias significativas. Por otra parte, las gráficas muestran la barra de error de los cordones medulares en ovarios, alcanzando niveles más altos que los observados en las células mesenquimales, esto se debe a los valores de fluorescencia de las células epiteliales que mostraron mayor intensidad y están incluidas en la cuantificación general de las células de los cordones medulares (Fig. 26).

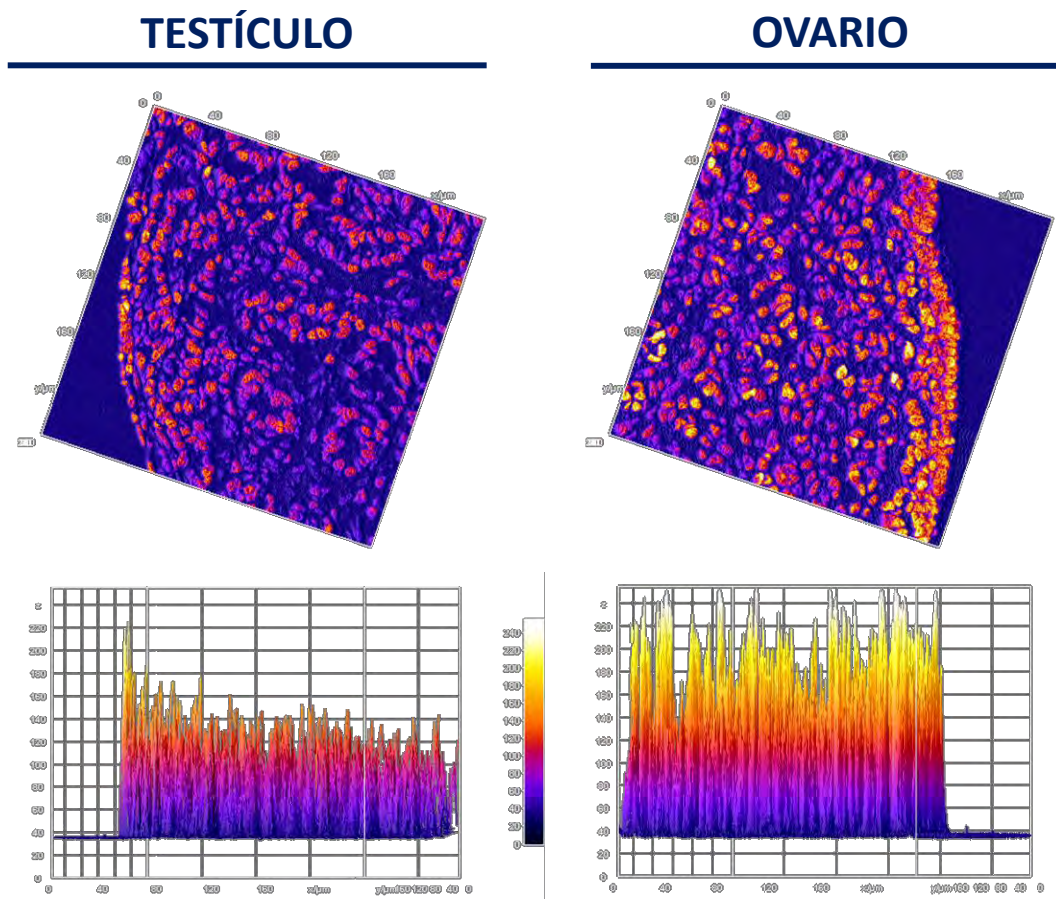


Fig. 25. Histogramas 3D de distribución de la marca de H3k27me3. Histogramas 3D de la marca de H3K27me3 registrada en inmunofluorescencias en etapa 27. Se evidencia la población de células en ovario que muestran mayor acumulación de esta modificación de histona que las células de la corteza. El histograma en testículo muestra la mayor intensidad de fluorescencia en las células del epitelio celómico. En ovario, por otra parte, las células con mayor intensidad (blanco) se encuentran dispersas en la médula.

Posteriormente analizamos la modificación de H3K9me2 asociada a la compactación de cromatina y silenciamiento génico. Algunas de las células del estroma de gónadas de embriones incubados a TPM mostraron mayor intensidad de fluorescencia que el resto de células en la gónada, en contraste con la baja intensidad del estroma en embriones incubados a TPH (Fig. 25).

Los resultados muestran mayor señal de la modificación post-traducciona de histonas asociada a silenciamiento H3K27me3 en algunas células epiteliales en los vestigios de cordones medulares en ovario (Fig. 25-26), así como una mayor concentración de la marca asociada a silenciamiento H3K9me2 (en algunas células mesenquimales del estroma en testículo; Fig. 26). Ésto sugiere distintos mecanismos epigenéticos actuando en el silenciamiento génico en distintos tipos celulares de la gónada en desarrollo, de manera dimórfica dependiendo de la temperatura de incubación.

Para continuar con el estudio de marcas post traduccionales de histonas se analizó la distribución de la H3K4me3. Esta marca es establecida por el complejo TrxG y se asocia a promotores de genes transcripcionalmete activos. No se encontraron diferencias significativas en la intensidad de la marca entre células epiteliales ni mesenquimales en la médula gonadal de embriones incubados a TPH ni a TPM. Más aún, la intensidad en la señal de H3K4me3 también mostro poca variación entre células de un mismo compartimento dentro de la gónada (Fig. 26). Este resultado sugiere que no hay diferencias globales significativas en los niveles de H3H4me3 establecidas durante el proceso de determinación y/o diferenciación sexual en *L. olivacea*.

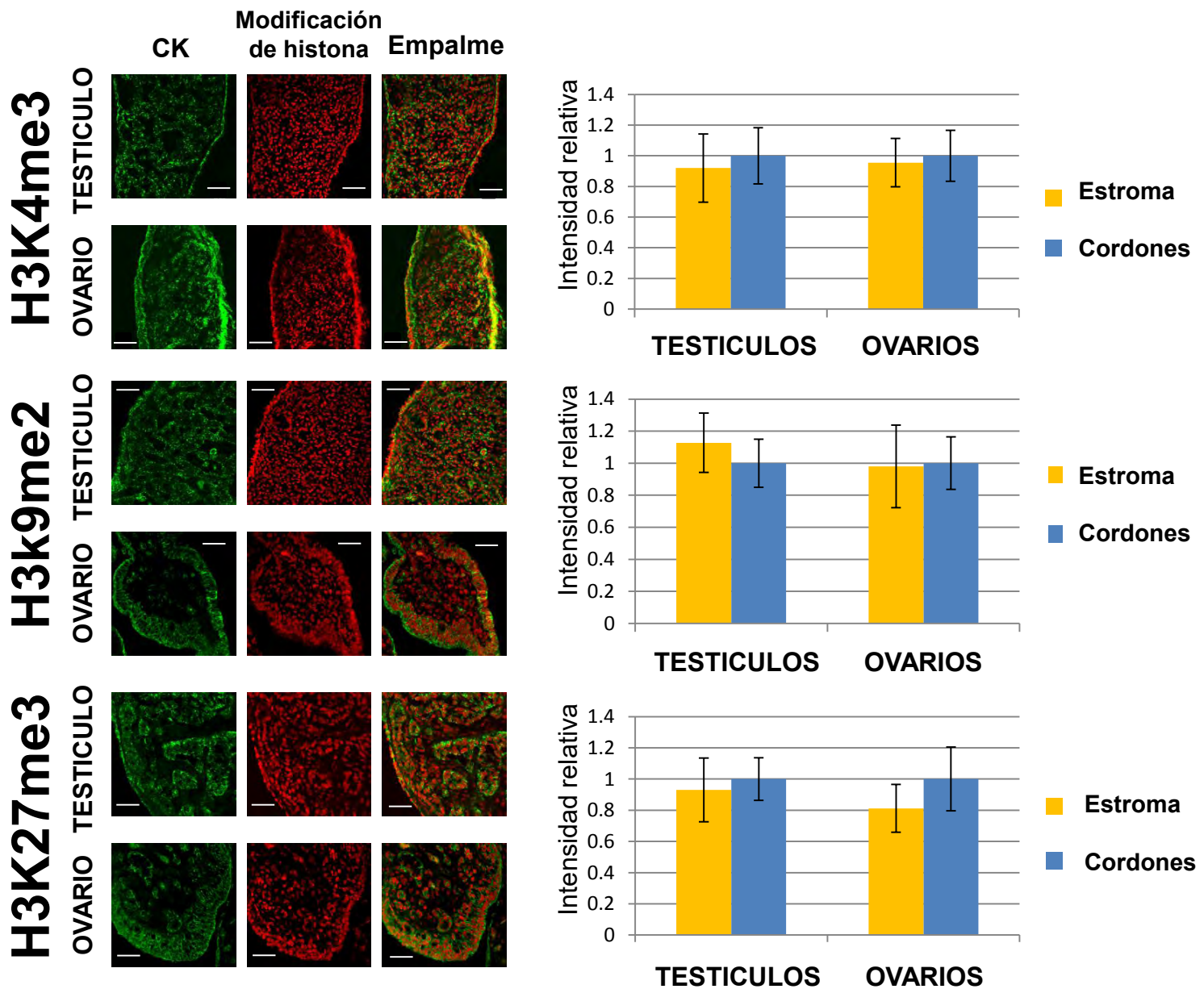


Fig. 26. Análisis de distribución de metilación de histonas por inmunofluorescencias. Inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo contra H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 (rojo). Un anticuerpo contra CK se utilizó para identificar las células epiteliales en los cordones (verde). Las graficas muestran el promedio normalizado de intensidad en núcleos de células de estroma o cordones en varias micrografías y muestras biológicas $n=3$. No se encontraron diferencias significativas entre cordones y estroma en ovarios ni testículos mediante una prueba de Student $p<0.05$ (La cuantificación de inmunofluorescencias se explica en la Fig. 43). Las micrografías muestran imágenes representativas. Barra de escala = 50 μm .

2- ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL DNA SOBRE EL PROMOTOR DEL GEN

SOX9:

Se planteó realizar la caracterización de las secuencias promotoras de genes involucrados en el proceso de determinación sexual en *L. olivacea*, para posteriormente poder evaluar los mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de su expresión. Se decidió caracterizar, en primer lugar, al promotor del gen Sox9, que codifica para el factor transcripcional del mismo nombre. La expresión de este gen es necesaria para la determinación sexual de machos en los vertebrados; sin embargo, el mecanismo de regulación de su expresión no está conservado entre especies.

2.1- Clonación del primer exón y de la región 5' de Sox9

Se inició la clonación y secuenciación del gen Sox9 a partir de una región del primer exón altamente conservada entre mamíferos y aves. Se diseñaron oligonucleótidos a partir de alineamientos de la secuencia génica entre *Mus musculus* (ratón), *Gallus gallus* (pollo) y *Homo sapiens sapiens* (humano) y se utilizaron en una reacción de PCR con DNA purificado de sangre de *L. olivacea* como molde. Se amplificó un fragmento de 354 pb que posteriormente fue insertado en el vector pGEM-T Easy, transformado y amplificado en bacterias *E. coli* y secuenciado. La secuencia obtenida presenta 21 sitios CpG, lo que la califica como una isla CpG.

Para clonar la región 5' del gen Sox9 de *L. olivacea*, se utilizó PCR inversa a partir del fragmento previamente secuenciado del primer exón. Se obtuvo una secuencia de 2284 pb de la región 5' del TSS predicho por alineamientos con la tortuga *T. scripta*.

Un análisis de tipo Blast en la base de datos de GeneBank mostró que la región de *Sox9* correspondiente al primer exón mantiene un alto porcentaje de similitud (97-80%) con respecto a los genes homólogos en diversos grupos de vertebrados, en particular reptiles y aves. Esta región incluye un sitio ATG de inicio de traducción conservado en varias especies (Fig. 27).

Se encontró además una región que presenta 93% de similitud con la secuencia reportada del RNAm completo de *Sox9* en la tortuga *Trachemis scripta*, lo que marca un posible sitio de inicio de transcripción para *L. olivacea*. El análisis reveló que la similitud del gen de *L. olivacea* con el de *Anolis carolinensis* (el único reptil completamente secuenciado) es menor que con *G.gallus* y otras aves, lo cual resultó evidente desde los alineamientos para diseño de oligonucleótidos (Fig. 27).

En la secuencia obtenida se encontraron 3 elementos conservados entre los promotores caracterizados de pollo ratón y humano. Estos elementos corresponden a 2 sitios CAAT y una caja TATA-like. Además, 750 pb río arriba de estos elementos, se encontraron 2 cajas TATA, distanciadas entre sí por 30 pb.

Un análisis *in silico* de sitios de unión a factores transcripcionales mediante el programa Genomatix v2.3, mostró 2 posibles sitios de unión a factores DMRT: el primero en la región de elementos conservados y el segundo en la región de las cajas TATA. Así mismo, se encontró un posible sitio de unión a la proteína CTCF (organizador de cromatina) y a factores transcripcionales NF-Y (de unión a cajas CAAT), en la región correspondiente a los elementos conservados (Figs. 28 y 29).

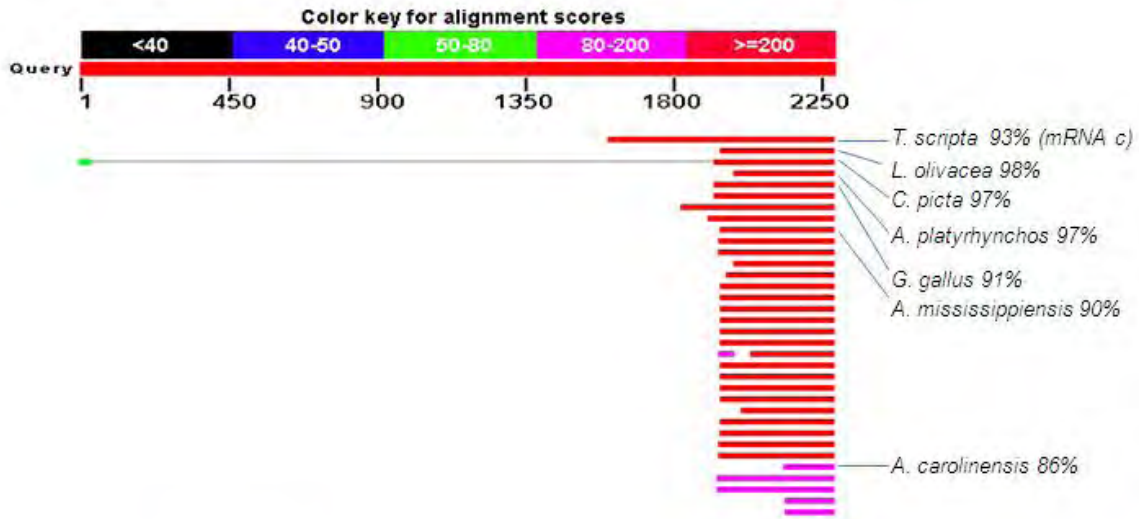


Fig. 27. Análisis tipo BLAST de la secuencia clonada del gen Sox9. Resultado del análisis tipo BLAST en la base de datos de GeneBank. La región que corresponde al primer exón presenta un alto porcentaje de similitud con el gen homólogo en varias especies de reptiles y aves, especialmente con la secuencia reportada del mRNA completo de la tortuga *T. scripta* (mRNA c). Se muestra la posición de la secuencia que presenta similitud con respecto al fragmento analizado de *L. olivacea* (Query), así como el número de pares de bases que coinciden en el alineamiento (código de colores). Las imágenes en la parte inferior muestran algunos de los organismos que mostraron similitud en el análisis: *L. olivacea*, *C. picta*, *T. scripta*, *A. platyrhynchos*, *G. gallus*, *A. mississippiensis* y *A. carolinensis*.

El análisis de contenido de sitios CpG demostró la presencia de dos islas CpG en la secuencia analizada. La primera, como se había descrito, inicia cerca del sitio 350 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. La otra isla CpG se encontró de la posición -1500 hasta -500 aproximadamente, en la región 5' del gen (Fig. 28).



Fig. 28. Análisis de la secuencia 5' del gen Sox9. (página anterior, abajo). Secuencia obtenida de la región 5' del gen Sox9, en donde se encuentra la secuencia correspondiente al posible promotor de Sox9 y los motivos conservados en otros vertebrados (verde) y las cajas TATA (rojo.) El primer exón predicho se muestra sombreado en azul y amarillo. El fragmento del primer exón a partir del cuál se realizó la PCR inversa se muestra en amarillo. A la derecha se muestra gráficamente la distribución de sitios CpG.

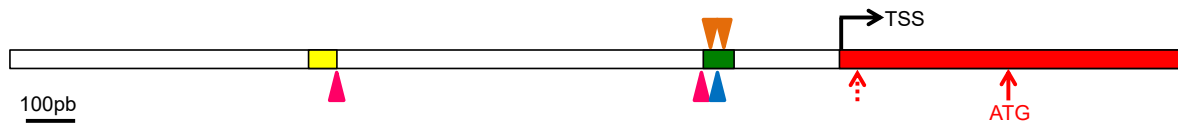


Fig. 29. Región 5' del gen Sox9. (página anterior, arriba).

Representación gráfica de la secuencia clonada de la región 5' del gen Sox9. Se muestra el fragmento que contiene los elementos conservados con los promotores de Sox9 en ratón, pollo y humano (verde) y las cajas TATA río arriba (amarillo). Se muestran también los posibles sitios de unión a factores Dmrt (rosa), NF-Y (naranja) y CTCF (azul). Se muestra también la localización del TSS (flecha negra) y el sitio ATG de inicio de traducción predichos por alineamientos entre vertebrados (flecha roja). Un sitio ATG fuera de fase en la posición 33 se muestra con una flecha punteada.

2.2- Validación funcional del promotor del gen Sox9

La estrategia para la validación funcional de una secuencia promotora consiste en demostrar capacidad para inducir la expresión de un transgen. Para identificar al promotor del gen Sox9, se realizaron construcciones que contienen distintos fragmentos de la secuencia clonada de la región 5' del gen Sox9, además del gen reportero *GFP* que codifica para la proteína verde fluorescente. Las construcciones fueron diseñadas para contener o no a las cajas TATA y para incluir o no un fragmento del primer exón del gen. De manera que se planearon 4 distintas construcciones:

pS9-T1-GFP: Abarca las cajas TATA en el extremo 5' . Incluye el ATG de inicio de traducción en el extremo 3' .

pS9-T2-GFP: Abarca las cajas TATA en el extremo 5' . Incluye las primeras pares de bases del probable mensajero, sin llegar hasta el primer ATG que está fuera de fase.

pS9-1-GFP: No abarca las cajas TATA en el extremo 5' . Incluye el ATG de inicio de traducción en el extremo 3' .

pS9-2-GFP: No abarca las cajas TATA en el extremo 5' . Incluye las primeras pares de bases del probable mensajero, sin llegar hasta el primer ATG que está fuera de fase.

Cada una de estas construcciones se generó en orientación Forward (Fw) y Reverse (Rv), dependiendo si contienen el fragmento de *Sox9* en dirección sentido o antisentido en relación a la orientación del gen reportero *GFP*. Por lo tanto se generaron en total 8 construcciones independientes.

Una vez estandarizado el protocolo de disgregación y cultivo celular, se evaluó la actividad promotora de las construcciones de *Sox9* mediante transfecciones con Lipofectamina en células disgregadas de testículos de *L.olivacea*. El resultado fue que las 2 construcciones Cortas lograron inducir la expresión del gen reportero, mientras que las construcciones largas fallaron al inducir su expresión. Atribuimos este resultado a que las construcciones largas, al contener un fragmento de la secuencia del mRNA, pueden cambiar el marco de lectura de gen reportero y fallar con esto a generar la proteína GFP detectable por su fluorescencia, pese a que el único sitio ATG

de inicio de traducción reportado para este gen, no está incluido en estas construcciones.

Mediante esta técnica pudo comprobarse que la secuencia de 450 pb que abarca los sitios conservados con otros promotores de Sox9, además de los sitios de unión a factores Dmrt y CTCF poseen actividad promotora independiente de las cajas TATA situada río arriba, comprobando que esta región contiene al promotor del gen Sox9 (Fig. 30)

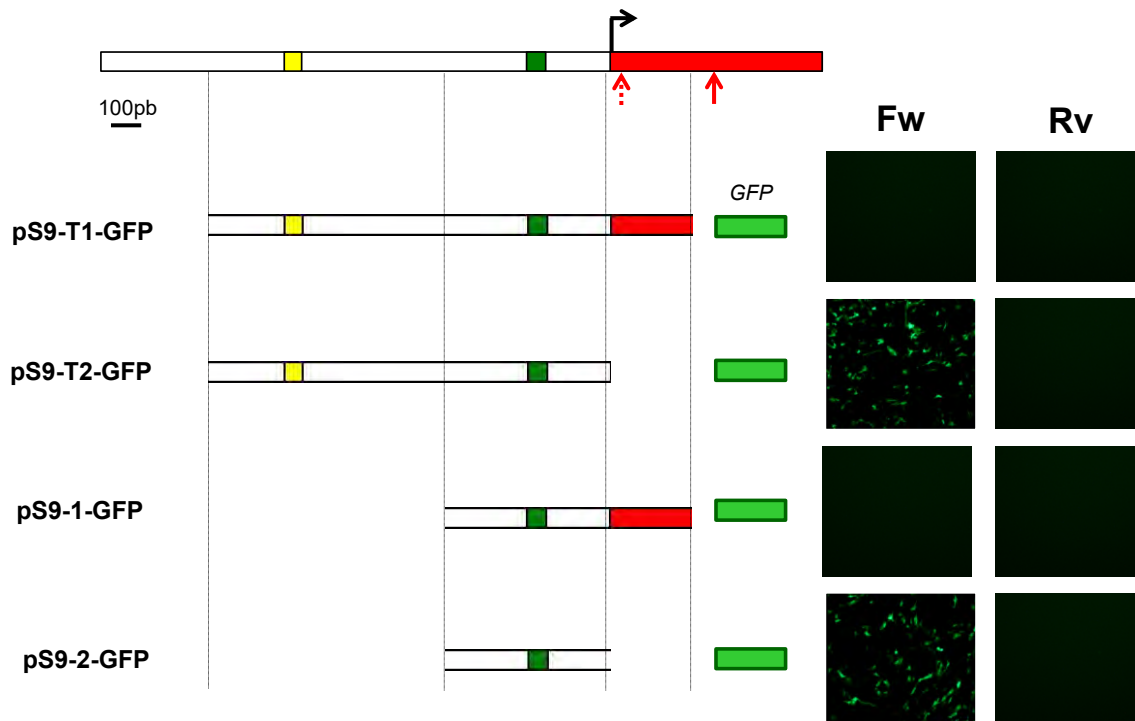


Fig. 30. Validación funcional del promotor del gen Sox9.

Se tomaron distintos fragmentos de la región 5' del gen Sox9 y se probó su actividad promotora sobre el gen reportero GFP. Se encontró el fragmento mínimo necesario para inducir expresión del gen (pS9-2-GFP). Las construcciones se transfectaron en cultivos de células disgregadas de testículo de *L. olivacea* utilizando vesículas liposolubles de Lipofectamina. La actividad del promotor fue evaluada 24h después de realizar la transfección. Como control negativo se muestran transfecciones de las secuencias analizadas en orientación reversa (Rv) con respecto al gen reportero.

Una vez identificada la secuencia promotora del gen *Sox9*, tratamos de definir si la expresión inducida por esta secuencia era dependiente de tipo celular, por lo que se decidió estandarizar la transfección por electroporación en cultivo de gónada completa. Para ello, fue necesario primero identificar las condiciones óptimas para la microinyección, electroporación y cultivo de las gónadas. Se realizó entonces la transfección de la construcción **pS9-T2-GFP** en testículo de *L. olivacea*. Se encontró que el plásmido es capaz de inducir la expresión de *GFP* en el tejido (Fig. 31), aunque también genera una lesión en la gónada en la zona perforada por la micropipeta, lo que altera la estructura de la gónada y dificulta la identificación de los cordones medulares en el tejido.

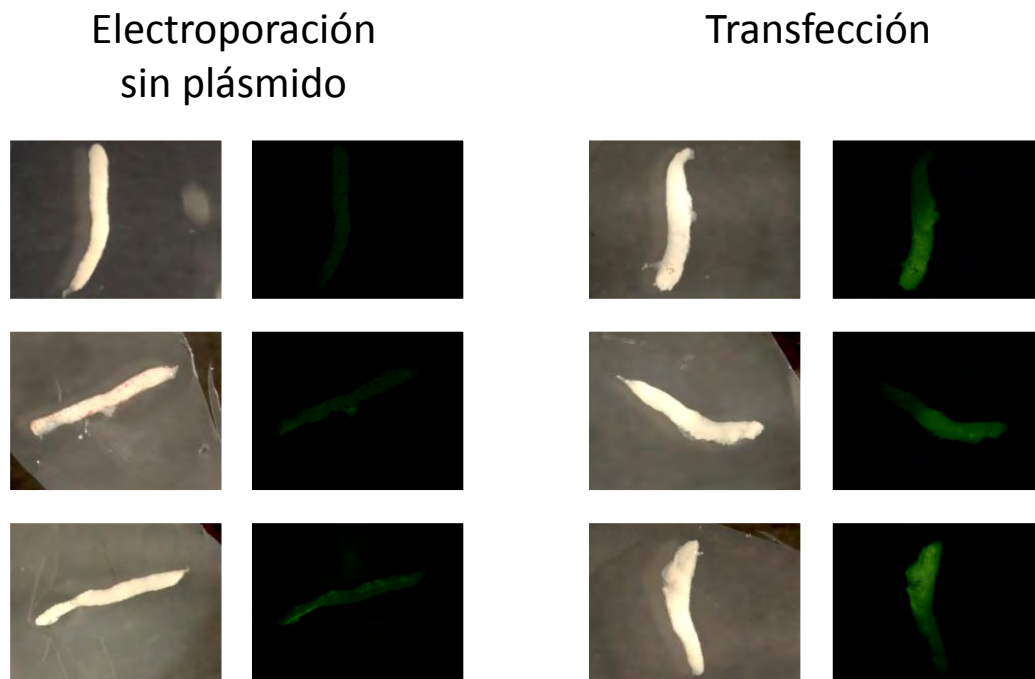


Fig. 31. Estandarización de protocolo para transfección de gónadas por electroporación. Las micrografías muestran gónadas en cultivo después de 24 horas de haber sido aisladas. Las gónadas de la derecha fueron transfectadas mediante electroporación, utilizando 7 pulsos de 50 mseg a 50 mV. Las gónadas de la izquierda fueron electroporadas, aunque no se realizó en ellas ninguna microinyección. Podemos observar que aunque las gónadas control muestran cierta fluorescencia, las gónadas transfectadas presentan una clara expresión de *GFP* en la región inyectada con el plásmido pS9-T2-GFP. La región de las gónadas opuesta al sitio de la microinyección no presenta expresión de *GFP*.

Por la cantidad de organismos necesarios para realizar todas las pruebas y controles necesarios en cultivos de gónada completa, así como por la alteración del tejido dentro de la gónada después de la microinyección, se decidió continuar los análisis del promotor en cultivos de células disgregadas de gónada.

Posteriormente, se decidió evaluar si la secuencia promotora encontrada modificaba su actividad en presencia de la región que contiene las cajas TATA y si la actividad del promotor era dependiente del sexo gonadal. Para ello se realizaron nuevamente transfecciones en cultivo de gónadas disgregadas, utilizando ovarios o testículos de *L. olivacea* post eclosión. Los plásmidos utilizados fueron **pS9-T2-GFP** y **pS9-2 -GFP**, las cuales presentaron actividad promotora en células disgregadas de testículo, además de la versión Rv de **pS9-T2-GFP**, para probar la actividad unidireccional de este promotor (Fig. 32).

Como control negativo se utilizó el vector vacío de pEGFP-1, que contiene al gen reportero *GFP* sin un promotor.

Para poder hacer un análisis cuantitativo, se incluyó un plásmido control de expresión constitutiva en cada transfección. Se utilizó con este propósito el plásmido comercial pRFP-N1, que contiene al gen reportero *RFP* que codifica para la proteína roja brillante, bajo control del promotor viral de expresión constitutiva SV40. El DNA del plásmido de cada muestra se mezcló en vesículas liposolubles de lipofectamina junto con el plásmido control en proporción 1:1 (500 ng de cada plásmido), de modo que todas las células transfectadas presentaras expresión de la proteína roja brillante, mientras que

la expresión de la proteína verde brillante en las mismas células estaría condicionada a la actividad promotora de la secuencia analizada.

Mediante este análisis se encontró que la actividad del promotor de *Sox9* induce niveles elevados de expresión, similares a los observados en el promotor viral SV40. Se encontró además que estos niveles de expresión no varían entre cultivos de ovario y testículo, demostrando que este promotor tiene actividad basal independiente del sexo gonadal del organismo.

Se encontró que la región que contiene las cajas TATA no parece tener un efecto sobre los niveles de expresión del transgen. La versión con orientación Rv de este plásmido, por otra parte, no induce la expresión del gen reportero, tanto en cultivos de ovario como de testículo, comprobando la actividad unidireccional esperada de un promotor. Los niveles de expresión observados a partir de este plásmido fueron incluso menores a las reportadas en transfecciones del vector vacío sin promotor (Fig. 32).

Como análisis adicional, se realizó la transfección de las construcciones **pS9-T2-GFP** y **pS9-2 -GFP** en células en cultivo de la línea HD3, correspondiente a células eritroides de pollo que no expresan *Sox9*. Se comprobó que en estas células el promotor de *Sox9* es también capaz de inducir expresión del gen reportero, demostrando que este promotor tampoco tiene actividad dependiente de tipo celular (imágenes no mostradas).

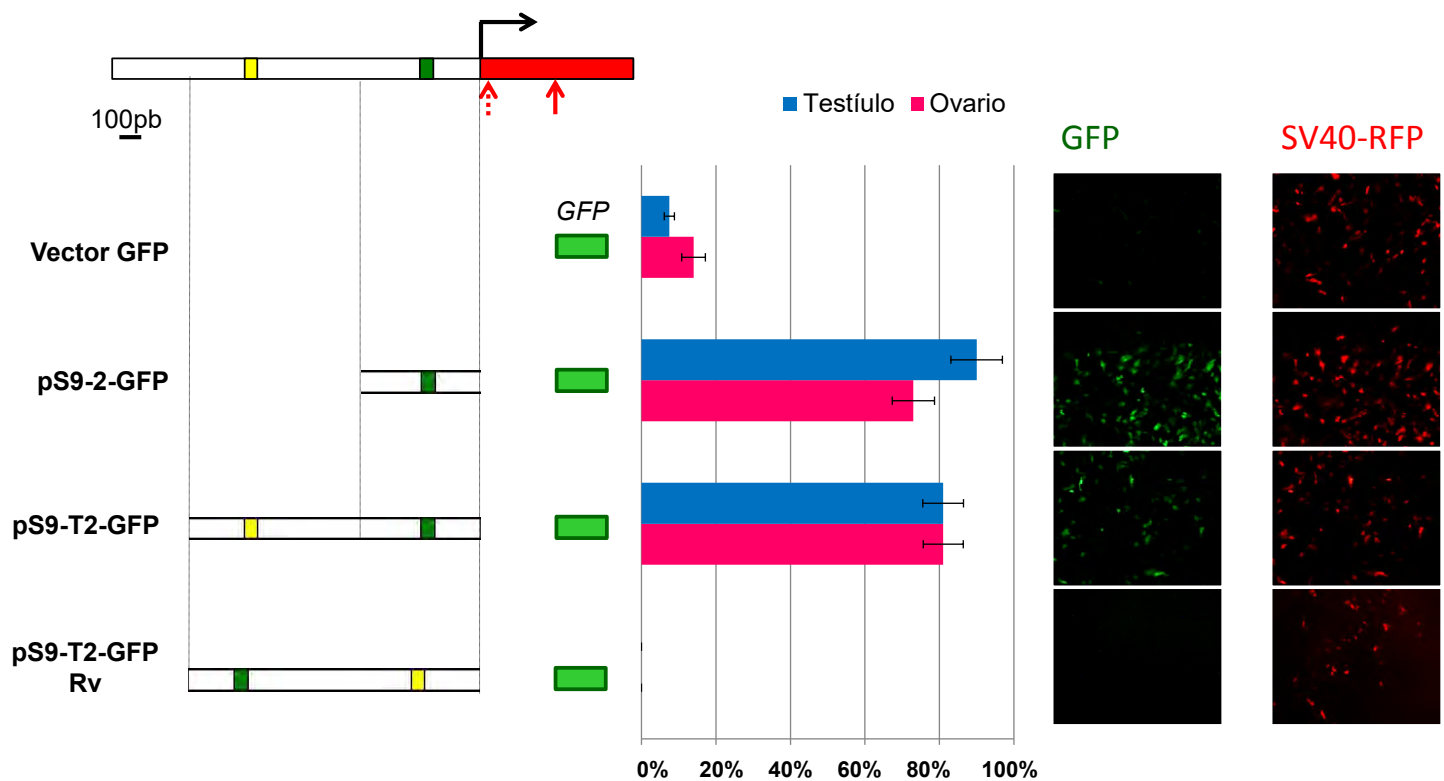


Fig. 32. Evaluación de la actividad del promotor de Sox9 en transfecciones transitorias. Análisis de actividad promotora de distintos fragmentos de la secuencia 5' del gen Sox9 que abarcan al fragmento que contiene elementos conservados con promotores de Sox9 en vertebrados (verde) e incluyen o no a las cajas TATA (cuadro amarillo). La actividad promotora se calcula como el porcentaje de células transfectadas: positivas a RFP bajo regulación del promotor de expresión constitutiva SV40 (SV40-RFP), que presentan también expresión de GFP. Los resultados de expresión en cultivos de testículo se muestran en azul, mientras que los resultados obtenidos en ovario se muestran en rosa. El vector vacío sin promotor para GFP y la secuencia 5' con las cajas TATA en orientación invertida (Rv) se utilizaron como controles negativos. Promedio \pm D.E. (n=4).

2.3- Análisis de metilación de DNA sobre el promotor del gen Sox9

Una vez identificada la secuencia correspondiente al promotor basal del gen *Sox9*, realizamos un análisis de metilación del DNA, para determinar su silenciamiento está relacionado a un proceso de metilación diferencial. Se utilizó la técnica de conversión del DNA por tratamiento con bisulfito de sodio y se dividió la región a analizar en 5 fragmentos, que abarcaran de manera continua: la isla CpG del primer exón, las 500 pb del promotor basal y hasta 500 pb río arriba de éste. El análisis se realizó en DNA de gónadas de embriones incubados a TPH y TPM en etapa 27. Se decidió utilizar esta etapa debido a que en este momento del desarrollo se ha apagado completamente la expresión de *Sox9* en ovarios, mientras que la mayoría de las células en la médula del testículo constituyen los cordones seminíferos y mantienen una alta expresión de este gen. Otro motivo es que en muestras de etapa 27 encontramos diferencias claras en los patrones de metilación del DNA por análisis de AIMS y en la distribución de la marca de 5hmC por inmunofluorescencia.

El análisis de metilación sobre el promotor del gen *Sox9* evidenció una hipometilación general, incluyendo el primer exón y la región correspondiente al promotor basal. El porcentaje de metilación en cada sitio CpG fue cercano a 0%, tanto en gónadas de embriones incubados a TPH como a TPM (Fig. 33). Nuestros resultados sugieren que aunque *Sox9* apaga su expresión en ovarios, su promotor se mantiene desmetilado. Por lo que podemos concluir que la metilación del DNA no juega un papel importante para el silenciamiento del *Sox9*.

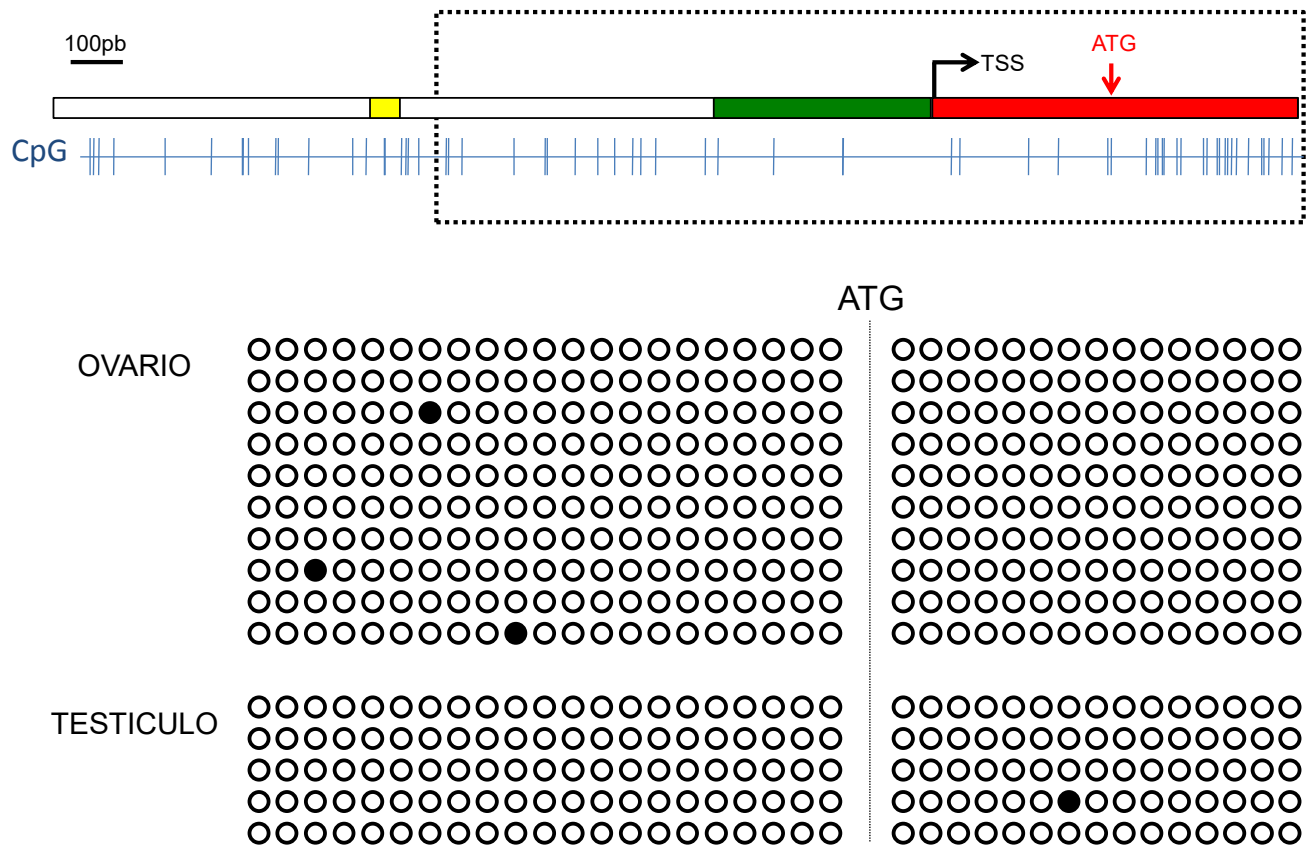


Fig. 33. Análisis de metilación del DNA sobre el promotor del gen Sox9 por tratamiento con bisulfito de sodio. El diagrama muestra el área que fue incluida en el análisis de metilación del DNA (caja punteada), abarcando el promotor de Sox9 (barra verde) y el TSS (flecha negra). La distribución de sitios CpG se muestra en líneas azules debajo del diagrama. Cada columna muestra el estado de metilación en un sitio CpG específico. Las hileras corresponden a distintas clonas evaluadas para ovario o testículo, respectivamente. Los círculos blancos representan CpGs no metiladas, mientras que los círculos negros representan CpGs metiladas. Los resultados muestran un estado general de hipometilación sobre esta región tanto en DNA de ovarios como de testículos.

2.4- Clonación y análisis de secuencia de un posible potenciador TES

Después de que se descubriera la importancia del potenciador TES (Testis-Specific Enhancer) como sitio de unión al factor Sry para activar la expresión de Sox9 en testículo (Sekido y Lovell-Badge, 2008), se encontró una secuencia evolutivamente

conservada (*ECR*, *Evolutionary Conserved Region*) de 180 pb en la región 5' del gen *Sox9* (Bagheri-Fam, 2010). Esta secuencia ECR contiene módulos conservados predichos para la unión de factores Dmrt, Sox, GATA y FRKH (grupo de factores al que pertenece *FoxL2*). La distancia entre el sitio de inicio de transcripción del gen *Sox9* y la secuencia ECR varía entre los vertebrados y va de 8 a 13 Kb (Bagheri-Fam, 2010).

A partir de la secuencia *ECR* reportada en vertebrados y de alineamientos tomando como base el genoma de pollo (por ser el genoma secuenciado y ensamblado más cercano al de la tortuga marina), diseñamos oligonucleótidos degenerados sobre sitios conservados para intentar amplificar la secuencia *ECR* en *L. olivacea*, para localizar una región homóloga al TES. Se obtuvo un fragmento de 1805 pb, que coincide con el tamaño esperado. Este fragmento amplificado fue clonado y secuenciado (Fig. 34).

Dentro de las 1805 pb secuenciadas, se identificó un fragmento de 300 pb que contiene la mayoría de los módulos conservados en la *ECR* reportada por Bagheri-Fam et al., 2010. Se encontraron posibles sitios de unión a factores Sox, FRKH y GATA. Los fragmentos mostraron además sintenia, es decir, que se encontraban en el mismo orden en la secuencia analizada a la distribución en otros vertebrados (Fig. 34). Por lo que el fragmento de DNA obtenido podría ser el equivalente a la secuencia ECR en *L. olivacea*. No obstante, su ubicación con respecto al gen *Sox9* no pudo determinarse debido a que las secuencias reportadas de genomas de tortugas no han sido completamente ensambladas en estas regiones.

GTCACCTTTTCTGCCAGGACAA**CGGG**CAAAAGTCCAGCCAATACCCAAA**CGCT**GTGTG**CGCT**TACC
 ATTTCTCAGACCTTCTCCCAAACTTCCGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAATCCCATCACATAC
GTCTGCAGGACTCCTGCACAGAAAGTCAAAC**CG**TCCTAGTAACCCGGCAAGCTGATC**CGCT**TGG
 GAAGAGAGGCCAGCTCAG**CGCT**TGGGTCAATTTACAGGATAGTTTATCAGTAATATTATGGCAATGCCT
 CAGGACCCACCATGGACCAGGGCCCCATTGTGCGGGTGTGTGCACACACATGGGAAGACATGCC
CGTGGGGGCCAGGGAC**CG**GCCACACTGCAGCTGGCAGTG**CG**CCCCCAGCC**CG**GGCAGACAGAC
 TTACACCAGTGAGGCTCAAGCCAGCA**CGCT**AAAAATAGCAG**CG**TGGGCC**TCGC**AGCTCCAGAAGAG
 ACTCCAG**CG**AGCCACC TGGGCTCAGACCCAGGGGTCAAGTGGGCTGGAGGACCCAAATTATGGT**CC**
GAGCCACAACAGCTACATGGCTACTGGTAGCATGCTAGCT**CG**AGCCCTGTGAGCATGATTCTGTCTAC
 CCAGGC**CG**GGAGGCTGCTGCCAGCTGCTGTGTAGACATAGCCAAAGAGTTCACAGTTTAAGTATGAG
 AGAAGAGACCATGTCCTGCATTTGTGTAGTACCAGCAAAGGAGAAAGTTCAAATTAGAATAGCAG
 AGATTTTCTACTCCCTGTGCATTGGTGTAC TGACCATGCAAGTGCAGGGCAC TGGTGTATGTC**CGGC**
 AGAGTTAGGAAGGCAGGTGCAGCCTTACACCATATAATGGCAGACAGCTAAAA**CG**TGACACATTTTAT
 AAGTGGCAGTATACAAATGCTAGAC**CG**TATAATAATAAGATGGGTGAAAAGGACTGTATGGTATTAAT
 GAGGATAGTGATATAACAGGCATCACAGATGTGACCAG**CG**CC TATCATGA**CG**ACCAACAGAGTTTTGT
CCGTTTCTTGTGTTCTTAC**CG**GCTGGGTC TCAATGTC TCTTCTCATACTTAAAC TGTGAAC TCTTTG
 GCTATGTC TACACAGCAGCTGGCAGCAGCCTCC**CG**GCCTGGGTAGACAGAATCATGCTCACAGGGC
TCGAGCTAGCATGCTACCAGTAGCCATGTAGCTGTTTGGCT**CG**GACCATAATTTGGGTCCTCCAGCC
 CACCTGACCCCTGGGTC TGAGCCAGGTGGCT**CG**CTGGAGTC TCTTCTGGAGCTG**CG**AGGCC**CCAG**
 CTGC TATTTTTAG**CG**TGC TGGCTTGAGCC TCACTGGTGTAAAGTC TGTCTGCC**CG**GGC TGGGGGG**CGC**
 ACTGCCAGCTGCAGTGTGGC**CG**GTCCTGGCCCCA**CG**GGCATGTCTTCCCATGTGTGTGCACAGC
 ACC**CGC****ACAAT**GGGGCCCTGGTCCATGGTGGGGTCCTGAGGCAT**TGCCA**TAAATTA**CTGATAA**ACTA
 TCCTG TAAATGACCCAAG**CGC**TGAGCTGGCCTCTCTTCCAAG**CG**GATCAGCTGCCTAGGGTTACT
 AGGA**CG**GTTTGGACTTTC TGTGCAGGAGTCC TGCAGA**CG**TATG TGATGGGATTAC TTTTTTTTTTTTT
 TTTTTAACAGGAAGTTTGGGAGAAGGTCTGAGAAATGG TAG**CG**CACAGCAG**CG**TTTGGGTATTGGC
 TGGACTTTTGCC**CG**TTGTCT**TCGGCAGGAAAGGTGAC**

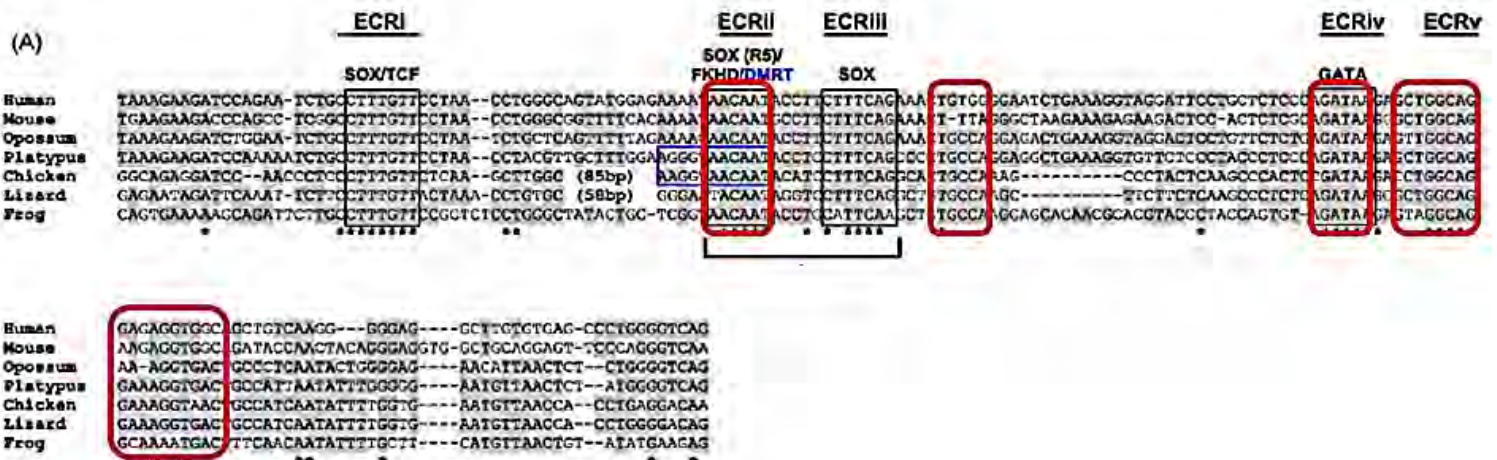


Fig. 34. Análisis de secuencia del posible elemento TES en *L. olivacea*. Secuencia del posible elemento regulador TES en *L. olivacea* (arriba). Los sitios CpG se marcan en naranja. Las secuencias correspondientes a elementos conservados en posibles elementos TES en vertebrados se marcan en rojo. Alineamiento de posibles elementos TES en vertebrados (modificado de Bagheri-Fam et al., 2010) (abajo). Los elementos evolutivamente conservados (ECR) están indicados. Los módulos conservados en *L. olivacea* se marcaron en cajas rojas.

Posteriormente, se decidió evaluar si la secuencia del posible regulador TES encontrado podía modificar la actividad del promotor de *Sox9* de manera dependiente del sexo gonadal promovido por la temperatura. Para ello se generó un nuevo plásmido **pTES-S9-GFP**, insertando la posible secuencia TES río arriba del promotor de *Sox9* y el gen reportero *GFP*.

El plásmido fue transfectado en cultivos de ovarios o testículos disgregados para evaluar su actividad reguladora de la expresión (Fig. 35). Para poder hacer un análisis cuantitativo, se incluyó un plásmido control pRFP-N1 con el promotor SV40 de expresión constitutiva en cada transfección.

La expresión observada al transfectar los plásmidos control, recapituló los resultados obtenidos previamente, lo que probó nuevamente la reproducibilidad de esta técnica. Por otra parte, al incluir la posible secuencia TES en el plásmido, se observó una disminución en los niveles de expresión del gen reportero GFP tanto en cultivos de células de ovarios como de testículos, disminuyendo de un 80% de expresión aproximadamente, a un 60% y 40% de expresión en testículo y ovarios respectivamente. Estos resultados sugieren un efecto de la posible secuencia TES obtenida en *L. olivacea*, sobre la regulación de la actividad del promotor de *Sox9* para regular la expresión. Sin embargo, este resultado no es concluyente al haber disminuido la expresión tanto en ovarios como en testículos (Fig. 35).

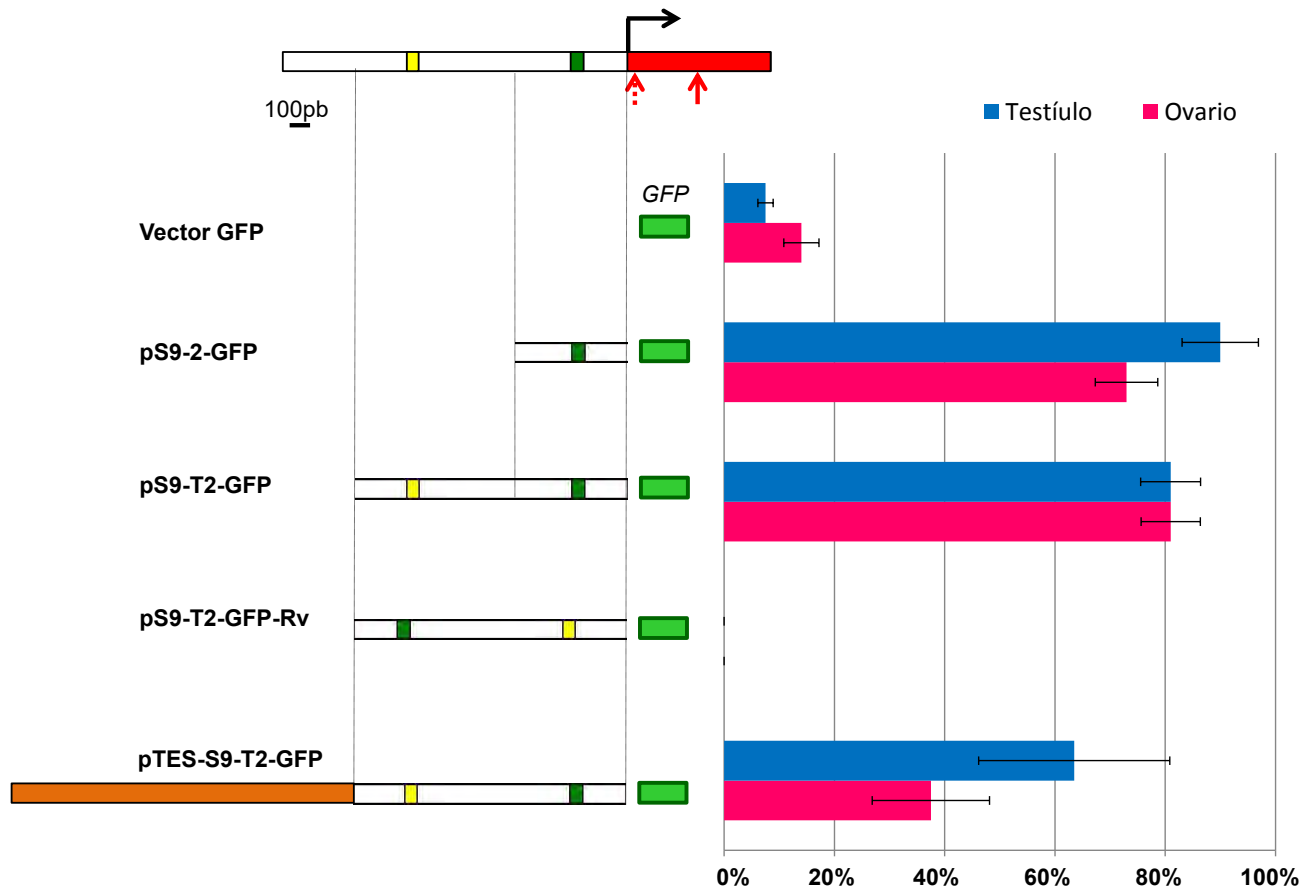


Fig. 35. Evaluación del efecto regulador del posible elemento TES en transfecciones transitorias. Análisis de actividad reguladora del posible elemento TES sobre la secuencia promotora del gen Sox9. La actividad promotora se calcula como el porcentaje de células transfectadas (positivas a RFP) que presentan también expresión de GFP. Los resultados de expresión en cultivos de testículo se muestran en azul, mientras que los resultados obtenidos en ovario se muestran en rosa. El vector vacío sin promotor para GFP (Vector GFP) y la secuencia 5' con las cajas TATA en orientación invertida (Rv) se utilizaron como controles negativos. Se evaluaron los cambios en niveles de expresión al incluir al posible elemento TES (**amarillo**) en construcciones con el promotor de Sox9. Promedio \pm D.E. (n=4 para las construcciones sin TES).

Para estudiar mejor el efecto regulador de la expresión del posible elemento TES, evaluamos su efecto sobre un promotor más débil que el del gen Sox9. Utilizamos el plásmido el promotor de la Tirocin Cinasa (TK). Nuevamente realizamos

transfecciones en cultivos de ovarios y testículos disgregados con el plásmido TK-GFP y TES-TK-GFP (Fig. 36), para probar el efecto del posible elemento TES sobre el promotor de la TK. Como control positivo, se transfectó en conjunto el plásmido de expresión constitutiva pRFP-N1.

Después de 15 días de incubación de la transfección, se detectó la señal de la GFP en células transfectadas con el vector del promotor de TK. Por otra parte, los niveles de GFP detectados en transfecciones realizadas con el vector que incluye al posible elemento TES fueron mucho menores que sin este elemento (Fig. 36).

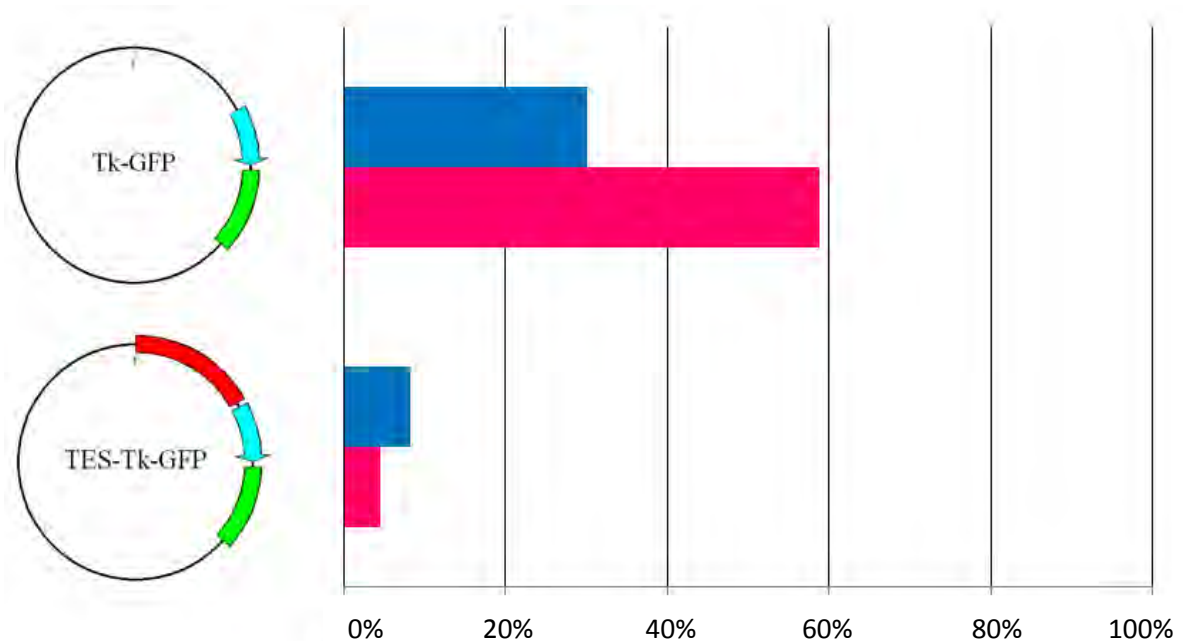


Fig. 36. Evaluación del efecto regulador del posible elemento TES sobre el promotor de TK. Análisis de actividad reguladora del posible elemento TES sobre el promotor débil de TK en transfecciones transitorias de cultivos de gónadas disgregadas mediante vesículas liposolubles de lipofectamina. La actividad promotora se evaluó después de 72h de transfección y se calcula como el porcentaje de células transfectadas (positivas a RFP) que presentan también expresión de GFP. Los resultados de expresión en cultivos de testículo se muestran en azul, mientras que los resultados obtenidos en ovario se muestran en rosa. El vector sin el elemento TES se probó para evaluar la actividad del promotor de TK por sí mismo (n=1).

Tratando de aclarar el efecto de la posible secuencia TES, realizamos análisis de inmunofluorescencia en ovarios y testículos disgregados, para definir si presentaban expresión de Sox9 endógeno. El porcentaje de células de testículo con expresión de Sox9 fue menor al 5%, lo cual puede atribuirse a la pérdida de expresión en las condiciones de cultivo o a que el protocolo de disgregación utilizado enriquece el cultivo en células Sox9 negativas (Fig. 37).

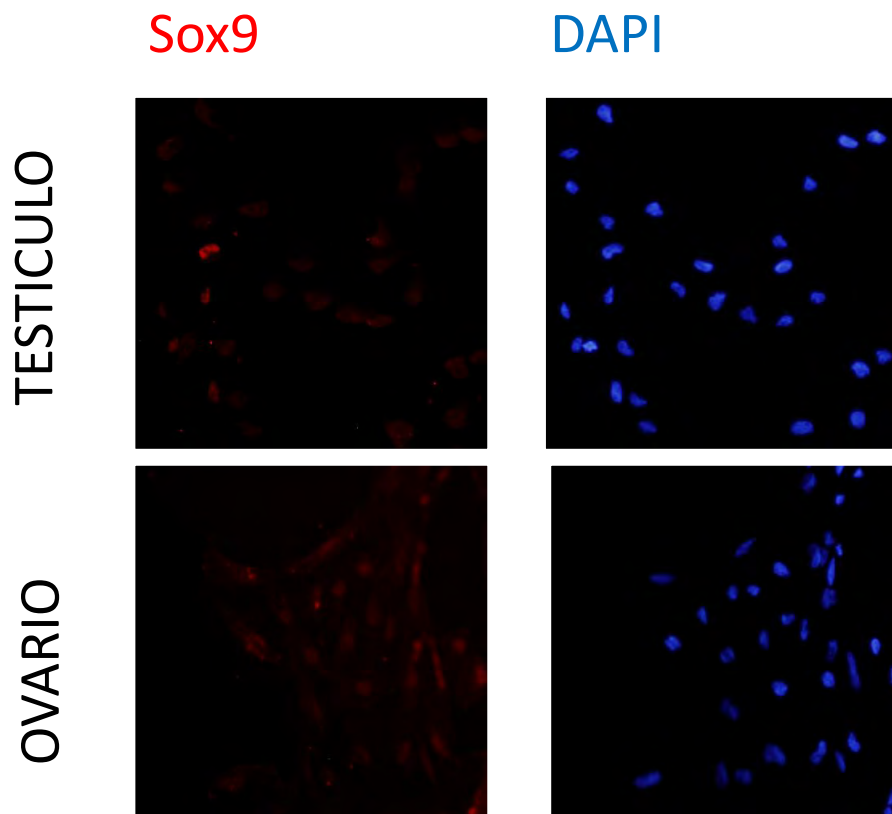


Fig. 37. Análisis de expresión de Sox9 por inmunofluorescencias en cultivos de gónadas disgregadas. Los análisis de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra el factor transcripcional Sox9 mostraron menos del 5% de células Sox9+ en cultivos de testículos disgregados (rojo) después de una semana de incubación. Los núcleos son identificados mediante DAPI (azul).

3- ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL DNA SOBRE EL PROMOTOR DEL GEN

DMRT1

3.1- Clonación del primer exón y la región 5' del gen *Dmrt1*.

Antes de clonar el promotor de *Dmrt1*, fue necesario conocer la secuencia de un fragmento del primer exón del mismo gen. Se realizaron alineamientos entre las secuencias del genoma de las tortugas *C. picta* y *Ch. mydas* utilizando el programa Clustal W2, a partir de las cuales se amplificó por PCR, clonó y secuenció un fragmento de 95 pb del exón 1 de *Dmrt1* en *L. olivacea*.

El análisis de BLAST encontró una alta similitud del fragmento de 95 pb secuenciado con la secuencia mRNAs del gen *Dmrt1* en varias especies de tortugas, que van de un 100% de similitud con *C. picta* a un 95% con *T. scripta*.

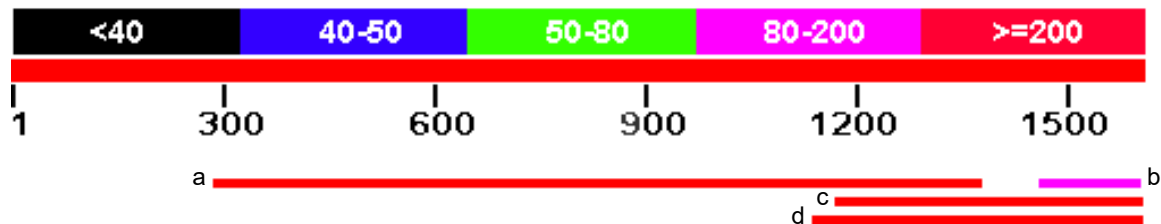
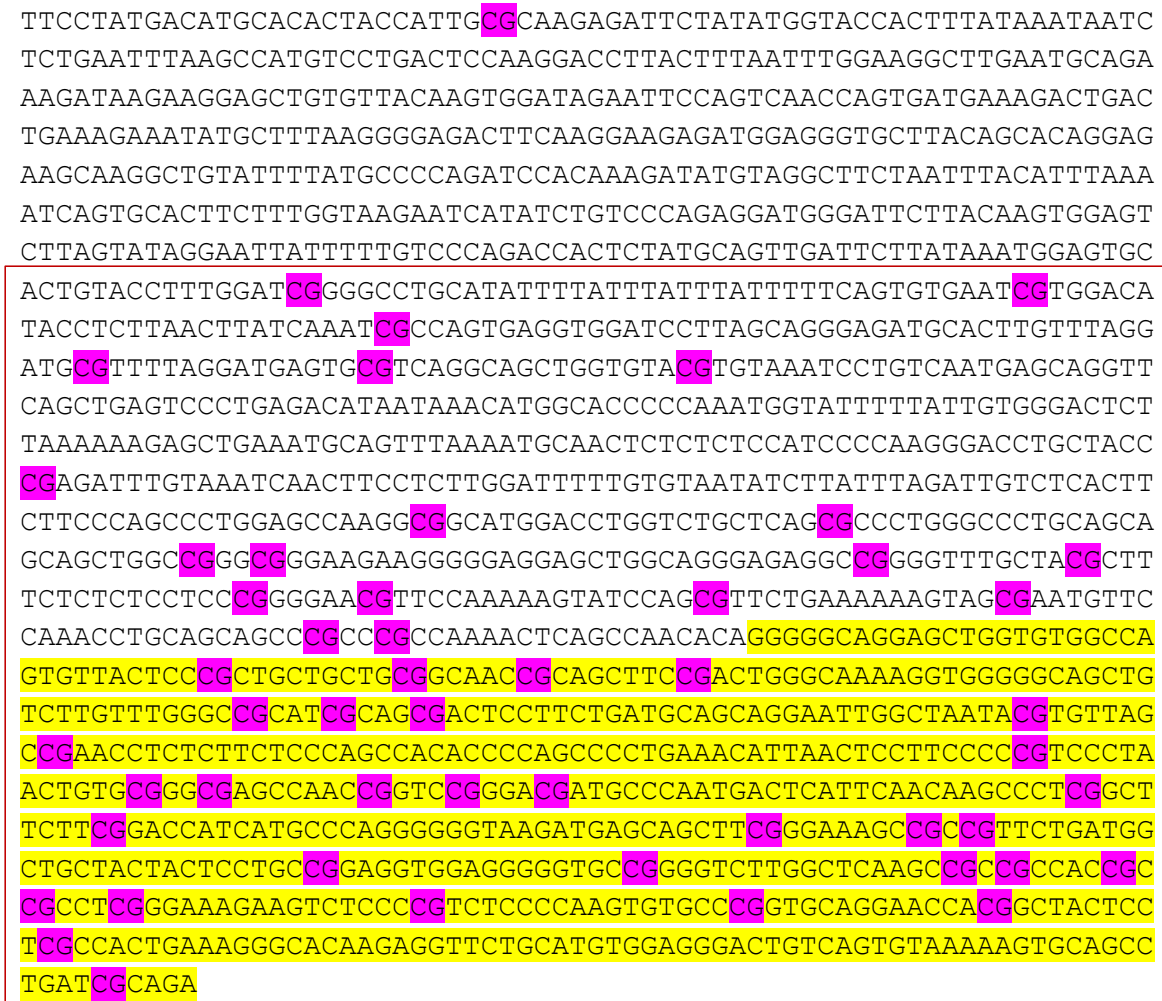


Fig. 38. Análisis tipo BLAST de la secuencia obtenida de la región 5' del gen *Dmrt1*. Un análisis tipo BLAST en la base de datos de NCBI mostró secuencias con alta similitud a la secuencia obtenida de la región 5' del gen *Dmrt1*. El número de nucleótidos que mostraron similitud se encuentra indicado en pb según el código de colores mostrado. La posición indica el segmento que mostró similitud en relación al fragmento clonado de *L. olivacea*. a) *T. scripta* promotor de *Dmrt1* y cds parciales, identidad 89% KJ583239.1 b) *C. mydas* mRNA parcial de *Dmrt1*, 96% de identidad XM007065580.1 c) *C. picta* mRNA completo de *Dmrt1*, 93% de identidad. XM005296762.1 d) *P. sinensis* mRNA completo de *Dmrt1*, 85% de identidad. NM001317047.1

A partir de la secuencia obtenida del primer exón del gen, se diseñaron oligonucleótidos degenerados sobre fragmentos de genomas de *C. picta* y *Ch. mydas*, con los que se logró amplificar por PCR, clonar y secuenciar un fragmento de 1610 pb río arriba del primer exón en *L. olivacea*.



Promotor reportado en *T. scripta*

Fig. 39. Análisis de distribución de CpGs de la secuencia obtenida de la región 5' del gen *Dmrt1*. Se encontró una isla CpG (caja roja) conteniendo 50 sitios CpG (rosa), que abarca el inicio de mRNA de *Dmrt1* (amarillo) y parte de la región identificada como el promotor del gen *Dmrt1* en *T. scripta* (línea negra).

Un análisis de Blast del fragmento de 1610 pb obtenido de *L. olivacea*, mostró similitud con un fragmento de 454 pb de las secuencias reportadas de mRNA completo de varias especies de tortuga, como son *Chelonia mydas*, (96%), *Mauremys reevesii* (93%), *Chrysemys picta* (96%) y *Pelodiscus sinensis* (85%). En base a los mRNAs conservados puede predecirse un sitio de inicio de la transcripción del gen *Dmrt1* también para *L. olivacea* (Fig. 38).

Rio arriba del sitio de inicio de transcripción putativo se encontró una secuencia de 858 pb que muestra un 89% de similitud con el promotor predicho para el mismo gen en *T. scripta*. Se encontró una isla CpG que abarca segmento la región 5'UTR y del primer exón del gen *Dmrt1* (31 CpGs en 454 pb), así como un fragmento del promotor putativo (19 CpGs en 602 pb), conteniendo en total 50 sitios CpG en 1610 pbs. Río arriba de la isla CpG hay un fragmento de 470 pb antes del próximo sitio CpG (Fig. 39).

3.2- Análisis de metilación de DNA sobre el promotor del gen *Dmrt1*.

Una vez identificada la secuencia correspondiente al promotor putativo del gen *Dmrt1*, se decidió realizar un análisis de metilación del DNA, para determinar si el silenciamiento de este gen en ovarios después del PTS está relacionado a un proceso de metilación diferencial. El análisis por tratamiento con bisulfito de sodio evidenció una hipometilación general sobre toda la secuencia analizada tanto en DNA de ovario como de testículo. Sin embargo, se encontró un dimorfismo sexual en los niveles de metilación en las 5 CpGs correspondientes al inicio de la isla CpG hacia el extremo 5'. Mientras que el porcentaje de metilación en promedio es de 22% en testículos, es del

51% en ovarios. En especial la citosina en la posición -533 con respecto al sitio de inicio de la transcripción mostró un 100% de metilación en ovarios y solamente un 40% de metilación en testículo. Estos resultados pueden correlacionarse con las diferencias en los niveles de expresión de *Dmrt1* en gónadas entre embriones incubados a temperatura feminizante y masculinizante (Fig. 40).

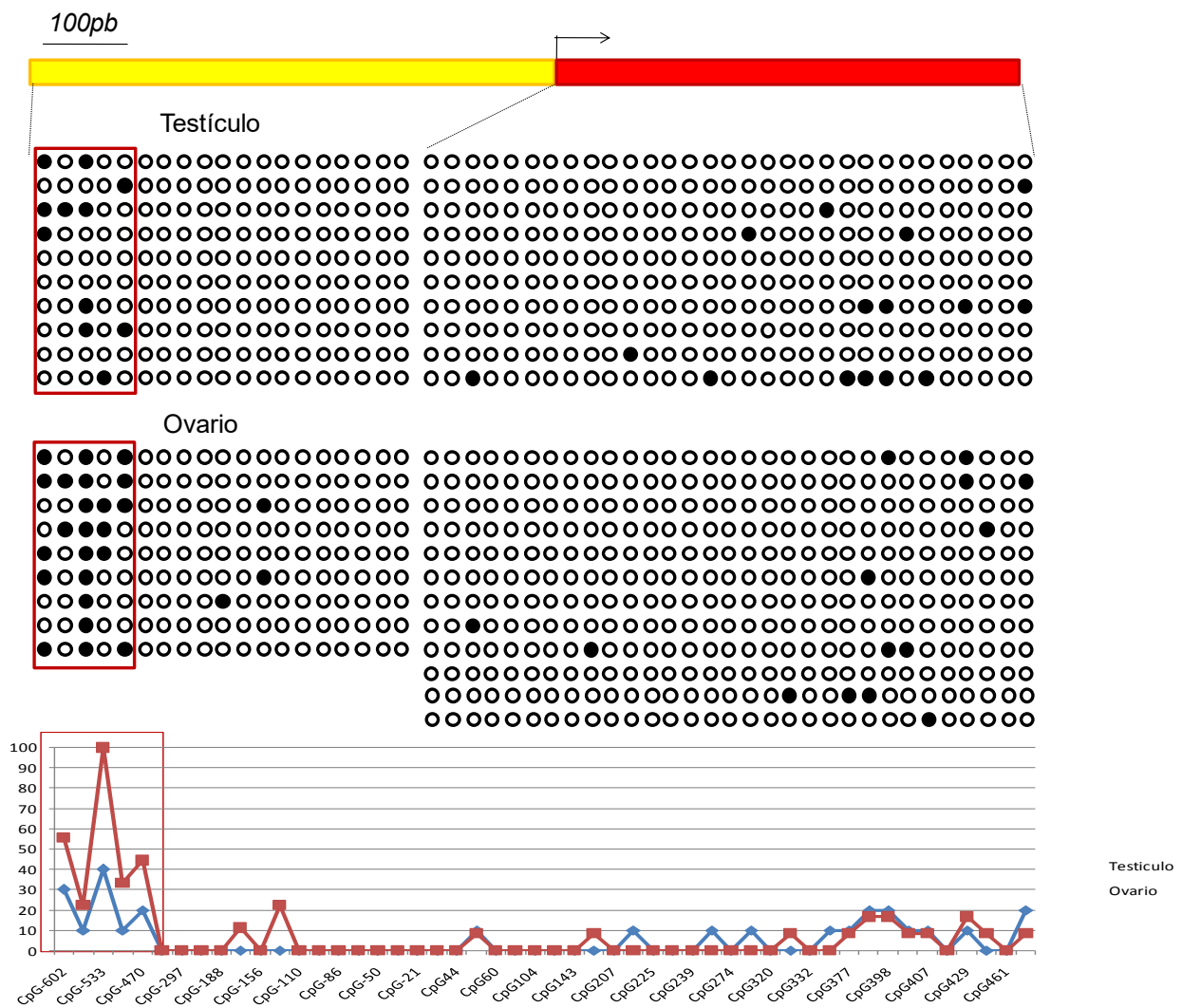


Fig. 40. Análisis metilación del DNA sobre la región 5`del gen *Dmrt1*. Análisis de metilación sobre la región 5`del gen *Dmrt1*. Se indica el sitio de inicio de transcripción al inicio del gen (rojo) *Dmrt1*. Cada columna corresponde a un sitio CpG distinto. Cada hilera corresponde a una clona analizada. Los círculos blancos representan CpGs no-metiladas. Los círculos negros marcan los sitios CpG que muestran metilación. Se encontró diferencia en los porcentajes de metilación éntre ovario (línea roja) y testículo (línea azul) (51% y 22%, respectivamente) en las CpGs comprendidas entre los nucleótidos -602 y -470 (caja roja).

3.3- Análisis de metilación de DNA sobre el promotor del gen *Dmrt1* durante el periodo sexualmente indeterminado.

Para determinar si las diferencias en los niveles de metilación entre ovarios y testículos se establecen como parte del proceso de determinación sexual, o si son resultado de la cascada de eventos durante la diferenciación sexual; evaluamos los niveles de 5mC en gónadas bipotenciales de embriones incubados a TPH o TPM en etapas 23-24 (Fig. 39). Se encontró una diferencia del 21% de metilación a TPM contra un 44% a TPH en los 5 sitios CpG donde se identificó previamente un dimorfismo entre ovario y testículo. En especial la citosina en posición -533 mostró 33% y 80% de metilación a TPM y TPH respectivamente (Fig. 41).

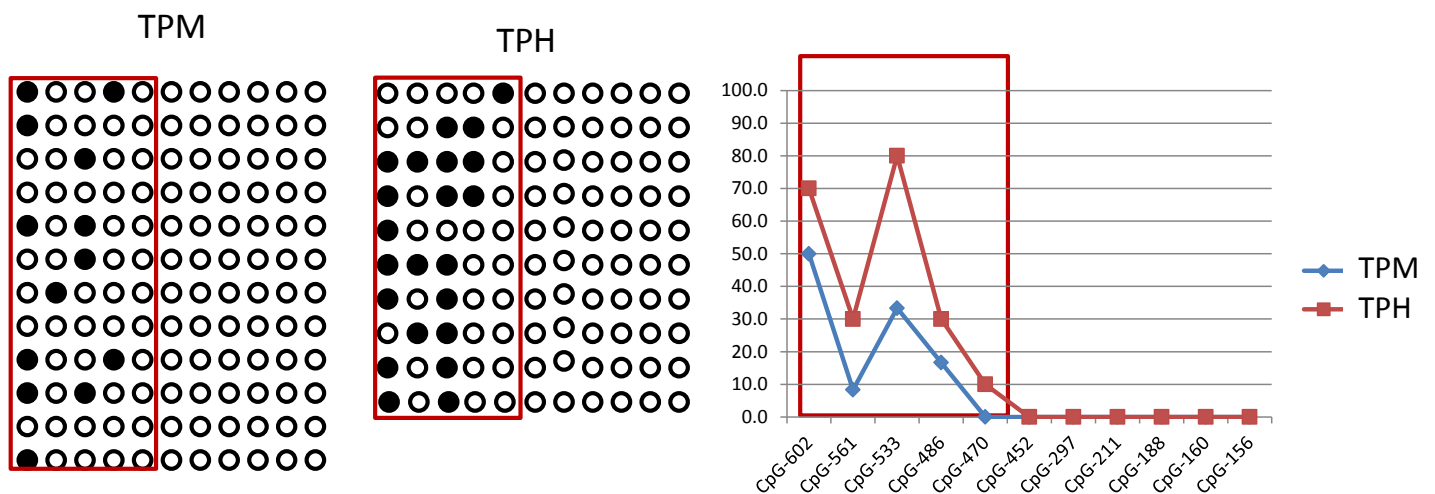


Fig. 41. Análisis de metilación del DNA sobre la región 5` del gen *Dmrt1* en gónadas bipotenciales de etapa 24. Cada columna corresponde a un sitio CpG distinto. Cada hilera corresponde a una clona analizada. Los círculos blancos representan CpGs no-metiladas. Los círculos negros marcan los sitios CpG que muestran metilación. Se encontraron diferencias dependientes de la temperatura de incubación en los porcentajes de metilación del DNA en las CpGs entre los nucleótidos -602 y -470 (caja roja): a TPH se encontró 44% de metilación (línea roja), mientras que 21% se encontró a TPM (línea azul).

Los análisis demostraron que los patrones de metilación diferencial sobre el promotor del gen *Dmrt1* se establecen de manera dependiente de temperatura desde la formación de la gónada bipotencial, antes del PTS y del establecimiento irreversible del sexo del embrión. Los actuales resultados sugieren un papel de la metilación del DNA durante el proceso de determinación sexual termosensible en *L. olivacea*.

DISCUSIÓN

El análisis global de metilación del DNA por accesibilidad al corte con enzimas metilosensibles y detección con inmunofluorescencia, mostró que no hay diferencias significativas en los niveles de 5mC entre ovarios y testículos. Sin embargo; al comparar el barrido generado por DNA tratado con la enzima *HpaII* y DNA sin tratamiento en geles agarosa, fue posible discernir que el DNA de las gónadas y el mesonefros adyacente de *L. olivacea* poseen un alto grado de metilación. En los controles utilizando DNA de células HeLa, la enzima *HpaII* generó un barrido, producto del corte de DNA genómico en fragmentos de distintos tamaños, pero sobre el DNA de *L. olivacea* hubo poca accesibilidad, evidenciando un alto nivel de metilación del DNA.

Nuestros resultados son consistentes con reportes previos sobre las características y composición del genoma de las tortugas. Los primeros análisis de metilación del DNA en vertebrados evidenciaron una relación inversa entre la temperatura corporal y los niveles de 5mC, de modo que los reptiles de sangre fría en general, mostraron mayores niveles de metilación que aves y mamíferos (Varriale y Bernardi, 2006). Estudios filogenéticos describieron el genoma de pollo como una versión “minimalista” de los

genomas de caimán y tortuga, por el alto contenido de secuencias repetidas que presentan estos últimos (Chapus y Edwards, 2009). Por lo que no fue sorprendente encontrar un alto grado de metilación del DNA en el genoma de *L. olivacea*, que hizo imposible la detección de cambios sutiles que ocurren en las gónadas por efecto de la temperatura.

Por lo anterior, decidimos utilizar la técnica de AIMS, como una alternativa para el análisis de metilación global en organismos para los que todavía no se cuenta con genoma secuenciado. Con esta técnica además de analizar los niveles, es posible comparar los patrones de metilación entre distintas muestras. Se hicieron algunas modificaciones al protocolo original de AIMS para este proyecto. En el protocolo descrito por Frigola et al., 2010, se utilizó la enzima metilosensible *SmaI* que reconoce un sitio de corte de 6 nucleótidos. En el presente estudio se utilizó la enzima *HpaII*, con un sitio de corte de 4 nucleótidos, lo que genera más sitios de corte que con *SmaI*. Por otra parte, esta modificación permite dar más variabilidad a los sitios analizados. En ambos protocolos la especificidad de sitios de reconocimiento para la reacción de amplificación fue de 9 nucleótidos; sin embargo, en el protocolo anterior, dichos nucleótidos corresponden a 6 nucleótidos del sitio de reconocimiento de la enzima y 3 nucleótidos aleatorios. Con las adaptaciones realizadas, la especificidad está marcada por 4 nucleótidos del sitio de reconocimiento de *HpaII* y 5 nucleótidos aleatorios. De esta manera, puede estudiarse una mayor variedad de sitios dada por la combinatoria de 5 nucleótidos, en contraste con la menor variabilidad de 3 del protocolo de Frigola et al., 2010. Encontramos un claro dimorfismo en los patrones de metilación del DNA entre ovarios y testículos en etapa 27. Algunas regiones se encontraron hipermetiladas

en ovarios, y otras en testículos, lo que indicó que las diferencias no fueron producto de errores de pipeteo en la reacción de PCR.

El análisis de AIMS de gónadas morfológicamente indiferenciadas (Etapas 24), no detectó diferencias en los patrones de metilación entre embriones incubados a TPH o TPM. Las diferencias surgen entre las etapas 25 y 27, coincidiendo con el probable establecimiento de una red de expresión génica estable en las gónadas de cada sexo. Encontramos también, que el dimorfismo en los patrones de metilación se debe tanto a eventos de metilación como de desmetilación, a partir de un estado inicial en la gónada bipotencial.

Para conocer si un proceso activo de desmetilación podía estar involucrado en el establecimiento de los patrones dimórficos, decidimos buscar la marca de 5hmC mediante Dot Blot. Detectamos altos niveles de esta modificación en cerebro y gónadas de *L. olivacea*, comparable a los niveles encontrados en cerebro de ratón. Esto es importante debido a que en análisis previos se determinó que el cerebro era el tejido más enriquecido en la marca de 5hmC en ratones (Kinney et al., 2011), por lo que su presencia en gónadas puede sugerir también plasticidad en este tejido. La 5hmC se detectó en gónadas bipotenciales y diferenciadas tanto en embriones incubados a TPH como a TPM. La distribución espacial de la 5hmC en los tejidos de la gónada reveló un patrón opuesto de distribución de la marca entre las gónadas incubadas a TPH o TPM: en los ovarios, los vestigios de cordones medulares se ven enriquecidos en 5hmC en comparación con las células del estroma. En cambio, en los testículos, los cordones seminíferos mostraron bajos niveles de esta marca, en comparación con las células estromales. Es importante notar, que las diferencias encontradas entre los dos sexos

correlacionan en tiempo y espacio con los cambios morfológicos propios de la diferenciación de un ovario o un testículo y, con la regulación dimórfica de la expresión de *Sox9*. Las células que muestran un dimorfismo en la marca de 5hmC entre ovario y testículo, son las células de los cordones medulares. En ovario, estas células permanecen únicamente como remanentes de los cordones, pierden la expresión de *Sox9*. En testículo, por otra parte, las células de los cordones medulares disminuyen la marca de 5hmC, mantienen la expresión de *Sox9* y se diferencian en células de Sertoli que constituyen el componente somático de los túbulos seminíferos. Diversos estudios en vertebrados han demostrado la importancia del factor *Sox9* y las células de Sertoli en la formación de un testículo en vertebrados. En mamíferos, inducir la expresión de *Sox9* en estas células es necesario y suficiente para dirigir el desarrollo de la gónada hacia la formación de un testículo (Harley et al., 2003). De igual modo en peces, aves y reptiles, la importancia de las células de Sertoli se mantiene como una constante para diferenciación del testículo (De Falco y Capel, 2009), pese a las heterocronías en la expresión de *Sox9* encontradas entre los distintos grupos de vertebrados (Kent et al., 1998; Díaz-Hernández et al., 2012)

En las gónadas bipotenciales de *L. olivacea*, las células en la médula presentaron altos niveles de 5hmC y es hasta después de la diferenciación sexual que el dimorfismo se hizo evidente. Estudios recientes encontraron una posible relación de la 5hmC y las proteínas TET (necesarias para el establecimiento de esta marca), con la cromatina de tipo bivalente. Se ha sugerido que en células pluripotentes los patrones de metilación del DNA no son mantenidos por Dnmt1, sino por un equilibrio entre la acción de las metilasas de novo y la actividad de las proteínas TET (Ito et al., 2010; Sun et al., 2014).

Esto permite especular que en los cordones medulares de las gónadas de *L. olivacea* ocurre una acumulación de 5hmC en promotores bivalentes. Aunque se desconoce todavía el mecanismo que controla la conversión de la 5hmC en 5mC, que explicaría los cambios en la intensidad detectada por inmunofluorescencia. Nuestros resultados pueden explicarse en términos de un proceso de desmetilación activa de DNA. Así, la cromatina de las células medulares de la gónada bipotencial, precursoras de las células de Sertoli pasarían de un estado bivalente a uno activo a TPM, en tanto que a TPH permanecerían en un estado bivalente en los ovarios.

Las proteínas TET se han visto posicionadas sobre los promotores bivalentes, promoviendo la hidroxilación y desmetilación de citosinas sobre estas regiones. Este proceso de desmetilación activo podría ocurrir en genes como *Sox9* y *Dmrt1* que presentan una expresión moderada en gónadas bivalentes, incrementan sus niveles de expresión en embriones incubados a TPM, mientras que apagan definitivamente su expresión en embriones incubados a TPH.

Para probar esta hipótesis, buscamos correlacionar los niveles de 5hmC con otros marcadores de cromatina bivalente, como la marca establecida por el complejo Triterax H3K4me3 y por el complejo Polycomb H3k27me3 (Vastenhouw y Schier, 2012).

La marca de cromatina abierta H3K4me3, se encontró distribuida de manera casi uniforme sobre los distintos tipos celulares en ovarios como en testículos. Esto puede deberse a que la marca de H3K4me3 se encontró no solo en cromatina bivalente, sino en promotores activos de expresión constitutiva, de modo que, aunque esta modificación se perdiera en algunos sitios, su distribución global haría difícil identificar

diferencias en la señal inmunofluorescente. La marca de H3K27me3, por otra parte, mostró un enriquecimiento notorio en algunas células de los vestigios de cordones medulares, lo que corresponde con el posible silenciamiento definitivo de genes que permanecían bivalentes al extender la incorporación de esta marca. Este tipo de promotores son usualmente regulados por medio del complejo PcG, por lo que creemos que la regulación de la marca H3K27me3 podría estar involucrada en la expresión diferencial en *L. olivacea*.

Por otra parte, de manera inversa a la marca de H3K27me3, en testículo se encontraron algunas células dispersas en el estroma con una mayor acumulación de H3K9me3, lo que sugiere mecanismos distintos de silenciamiento entre las células de cordones medulares y estroma en embriones incubados a TPH y TPM.

Al extender el análisis a otras modificaciones post traduccionales de histonas por inmunofluorescencia confocal, encontramos que las marcas de acetilación tanto en las histonas H3 como H4 mostraron una gran variación entre distintas células. Sin embargo, las diferencias no pudieron ser correlacionadas con tipos celulares específicos, ni entre las temperaturas masculinizante o feminizante. La acetilación de histonas es uno de los mecanismos de regulación epigenética más dinámicas que muestra mayor plasticidad en diferentes condiciones fisiológicas de la célula. Se ha visto que cambia durante el ciclo celular y acompaña también a cambios en el metabolismo. Es posible especular que en la gónada de *L. olivacea*, la diferencia en la intensidad pueda deberse a la falta de sincronización del ciclo celular entre los diferentes linajes.

Para analizar los eventos de metilación y desmetilación sobre promotores de genes específicos, decidimos enfocarnos en la regulación del gen *Sox9*, por tener un papel masculinizante en todos los grupos de vertebrados amniota hasta ahora estudiados. En *L. olivacea*, *Sox9* presenta niveles de expresión similares en las etapas de gónada bipotencial y posteriormente reprime su expresión en ovario, mientras que lo incrementa en testículo. Estos cambios en los niveles de expresión coinciden con la temperatura de incubación: SOX9 permanece a TPM y se reprime a TPH. Así mismo, la expresión de este gen es exclusiva de las células de los cordones medulares (Moreno-Mendoza et al., 1999). Encontramos un fragmento de 450pb en la región 5' del gen *Sox9* de *L. olivacea* con módulos conservados en las secuencias promotoras de *Sox9* reportadas en ratón, pollo y humano, (Kannay y Koopman, 1999; Colter et al., 2005) además de posibles motivos de unión a factores Dmrt, GATA, NF-Y y CTCF, por lo que tenía altas posibilidades de ser la secuencia promotora de *Sox9* en *L. olivacea*. Midiendo su efecto en transfecciones transitorias, logramos identificar el promotor mínimo del gen *Sox9* de *L. olivacea* con una alta actividad promotora inespecífica, independiente del tipo celular o el sexo.

Es importante notar que dos técnicas de transfección fueron estandarizadas para gónadas de *L. olivacea*: transfección por vesículas liposolubles en cultivos de células disgregadas y gónadas completas transfectadas por electroporación en cultivo de órganos. Con ambas técnicas se lograron buenos índices de supervivencia y transfección. Sin embargo, como la transfección en gónadas aisladas requería un mayor número de organismos para analizar estadísticamente los resultados, decidimos continuar con el estudio en células disgregadas. Aunque con criterios morfológicos los

cultivos mostraron células estromales y epiteliales, la detección de Sox9 por inmunofluorescencia mostró sólo un 5% de células positivas después de 7 días de cultivo, lo cuál es importante tomar en cuenta para analizar la expresión en tipos celulares específicos.

Una vez identificada la secuencia promotora del gen Sox9, se realizaron análisis de metilación por tratamiento del DNA con bisulfito de sodio en gónadas incubadas a TPH y TPM. Los resultados mostraron hipometilación del DNA sobre la secuencia analizada tanto en ovarios como en testículos, independientemente de sus niveles de expresión de Sox9, por lo que podemos concluir que la metilación del DNA sobre la secuencia promotora aislada no participa en la regulación de la expresión diferencial de este gen en gónadas de *L. olivacea*.

Nuestro resultado en *L. olivacea* contrasta con el reportado en el caimán *A. mississippiensis*, donde se encontraron diferencias en los niveles de metilación dependientes de la temperatura (Parrot et al., 2014) Por ello, realizamos un alineamiento entre el promotor putativo reportado en el caimán y nuestra secuencia en la tortuga golfina (datos no mostrados). Encontramos que hay varios módulos conservados en los promotores de ambas especies. La región correspondiente al promotor mínimo en *L. olivacea* presenta muy bajo contenido en CpGs al igual que su secuencia homóloga en caimán. Sin embargo, la distribución de los dinucleótidos metilados no se encuentra conservada entre ambas especies. En *L. olivacea* se encontró una isla CpG adyacente a la región promotora en la región 5', además de una isla CpG alta en la región 5' UTR y primer exón de este gen.

Para profundizar en el estudio de *Sox9*, decidimos buscar presencia de la secuencia del potenciador TES en el genoma de *L. olivacea*. La secuencia mostró módulos conservados de unión a factores Sox, FRKH y GATA reportados en posibles secuencias TES en varios vertebrados (Bagheri-Fam et al., 2010). Es importante mencionar que estos módulos se encontraron en la misma orientación y orden que en otros vertebrados. Un análisis de metilación del DNA sobre esta secuencia mediante tratamiento con bisulfito de sodio, demostró que se encuentra hipermetilada tanto en ovarios como en testículos, por lo que la metilación del DNA sobre esta secuencia no participa en la regulación de la expresión de *Sox9* (Urbano-del Aguila, no publicado).

Aunque nuestra secuencia presentó un efecto represor sobre la actividad del promotor del gen *Sox9*, únicamente logró disminuir la expresión en un 50%, lo cual podría deberse a la fuerte actividad del promotor de *Sox9*. Decidimos entonces evaluar el efecto de la posible secuencia TES sobre el promotor débil de la TK, encontrando una represión casi total de la expresión del gen reportero. Los resultados sugieren fuertemente un efecto represor de la expresión de este elemento en células *Sox9* negativas. Sin embargo, en el actual estudio no obtuvimos una demostración directa de la actividad potenciadora del regulador putativo TES en células *Sox9*⁺ de la tortuga golfina.

Para continuar con el estudio de mecanismos epigenéticos regulando la expresión de genes determinantes del sexo en *L. olivacea*, se clonó y secuenció un fragmento del gen y promotor putativo de *Dmrt1*. El fragmento de DNA secuenciado contiene una isla CpG que se extiende sobre el primer exón del gen. Un análisis de metilación del DNA por tratamiento con bisulfito de sodio evidenció un dimorfismo de 22% de metilación en

testículo y 51% en ovario. En especial resulta interesante la CpG en la posición -533 que muestra un 100% de metilación en las clonas analizadas de ovarios, mientras que mostró solo un 40% de metilación en las clonas de testículo. Estos resultados son similares a lo observados en el pez *Paralichthys olivaceus* (Wen et al., 2014) donde se reportó un patrón no metilado en testículo en comparación con 57% en ovario.

Los patrones de metilación coinciden con los análisis de expresión que demuestran que, aunque la expresión de *Dmrt1* disminuye durante la diferenciación sexual en ovario, nunca llega a apagarse completamente. La metilación parcial del DNA podría representar un mecanismo para disminuir la expresión de *Dmrt1* durante la determinación sexual de *L. olivácea*.

Este proyecto constituye tan solo el inicio del estudio de la epigenética en la determinación sexual de *L. olivacea*. Utilizar este modelo permitió identificar un importante evento de desmetilación global del DNA en las células de Sertoli durante la diferenciación sexual en testículos. Este proceso podría estar conservado en mamíferos u otros grupos de vertebrados, sin embargo, las características de desarrollo gonadal de *L. olivacea* permitieron hacer un análisis detallado por etapas que hubiera sido difícil de realizar en ratones u otros mamíferos.

Estudios previos en varios vertebrados han encontrado pocas o nulas diferencias en los niveles de metilación de promotores de genes importantes para la determinación y/o diferenciación sexual. Mediante este estudio comprobamos una importante presencia de la marca de 5hmC que no puede distinguirse de la 5mC por técnicas

convencionales, por lo que muchas diferencias pueden haber sido enmascaradas en estudios previos.

Los patrones de distribución de la 5hmC y la modificación de histonas H3K27me3, así como sus cambios diferenciales durante el desarrollo de ovarios y testículos sugieren la presencia de varias áreas con cromatina bivalente en la gónada bipotencial, lo que permite una rápida respuesta ante cambios en la temperatura de incubación.

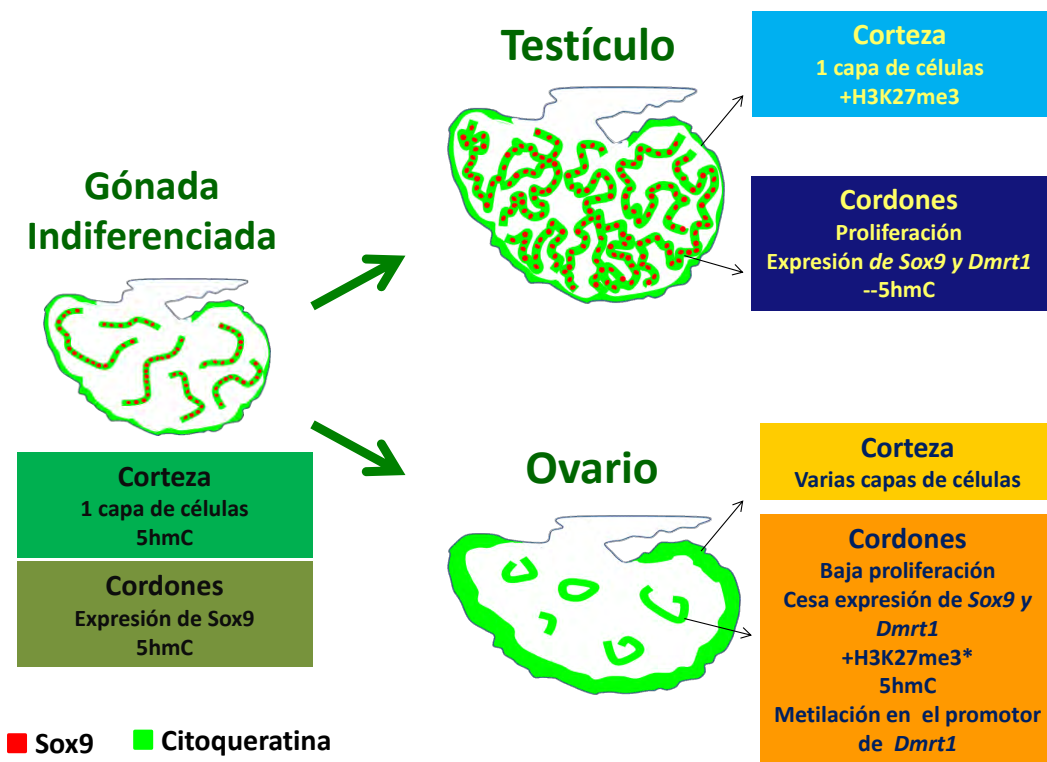


Fig. 42. Diferenciación sexual de *L. olivacea*. Después del PTS, la gónada bipotencial comienza a diferenciarse como un testículo u ovario. En testículo, la marca de H3K27me3 se aprecia en la corteza más que en las células de la médula, mientras que la marca de 5hmC disminuye drásticamente en las células de Sertoli. Estas células conservan expresión de Sox9 y aumentan su expresión de Dmrt1 (lo cual podría asociarse con los bajos niveles de metilación en su promotor). En ovarios, por otra parte, los cordones medulares dejan de proliferar y quedan solo vestigios, los cuales conservan la marca de 5hmC y en ocasiones presentan un enriquecimiento de H3K27me3 (* solo algunas de las células en los cordones); se apaga la expresión de Sox9 (aunque el promotor de este gen permanece desmetilado) y de Dmrt1 (posiblemente relacionado al aumento de metilación en su promotor).

Finalmente, identificamos un dimorfismo en la metilación del DNA sobre el promotor putativo del gen *Dmrt1*, aunque la metilación sobre el promotor de *Sox9* parece no estar involucrada en la determinación sexual de *L. olivacea*, a diferencia de otras especies. Ésto demuestra que, aunque estos genes mantengan una función importante para la determinación y diferenciación sexual en vertebrados, sus mecanismos de regulación no están necesariamente conservados.

CONCLUSIONES

Existen diferencias en los patrones de metilación del DNA entre ovarios y testículos de *L. olivacea* en etapa 27 de desarrollo.

Las diferencias en los patrones de metilación del DNA se establecen durante la diferenciación sexual, a partir de un patrón de metilación independiente de temperatura en la gónada bipotencial en etapa 24.

Existen diferencias en la distribución de la modificación del DNA, 5hmC:

- En ovarios, los cordones medulares presentan mas intensidad de la marca de 5hmC que las células del estroma desde la etapa 26 de desarrollo
- En testículos, los cordones medulares presentan una menor intensidad de la marca de 5hmC que las células del estroma desde la etapa 25 de desarrollo.

En testículos ocurre una pérdida gradual de la marca de 5hmC en células pre-Sertoli durante la determinación sexual.

Se encontraron células enriquecidas en H3K27me3 en los vestigios de cordones medulares de ovarios en relación al estroma en etapa 27.

Se clonó y caracterizó funcionalmente la secuencia del promotor del gen *Sox9* en *L. olivacea*. Se comprobó que esta secuencia presenta actividad promotora independiente de temperatura y tipo celular.

Se clonó un posible elemento regulador TESCO en *L. olivacea*, el cuál presenta elementos conservados con el homólogo de esta secuencia en distintos vertebrados. Se comprobó que este elemento tiene un efecto silenciador sobre la expresión inducida por el promotor de la *TK*.

La expresión de *Sox9* no es regulada por metilación diferencial sobre su secuencia promotora ni sobre la posible secuencia TESCO en gónada de *L. olivacea*.

Se clonó un promotor putativo en la secuencia 5' de *Dmrt1* en *L. olivacea*.

Se comprobó que existen diferencias en los niveles de metilación del DNA entre ovarios y testículos de etapa 27, sobre un fragmento del promotor putativo de *Dmrt1*.

Se comprobó que las diferencias los niveles de metilación sobre el promotor putativo de *Dmrt1* se establecen antes del PTS en gónadas en etapa 24, incubadas a TPH y TPM

PERSPECTIVAS

Analizar por secuenciación masiva los productos de amplificación de la técnica de AIMS, para definir sitios diferencialmente metilados entre ovarios y testículos.

Identificar las secuencias generadas por AIMS en el genoma ensamblado de *L. olivácea* (en proceso), para definir posibles genes afectados por la metilación diferencialmente entre ovarios y testículos.

Evaluar la marca de 5hmC en gónadas incubadas en TPM feminizadas con estradiol, para definir si la pérdida de esta marca en células de Sertoli ocurre de manera secundaria durante la diferenciación o si es dependiente de la temperatura de incubación.

Analizar los patrones de distribución de la marca de 5hmC en gónadas de mamífero en distintas etapas de desarrollo, para definir si la pérdida de esta marca en células de Sertoli es un proceso conservado en vertebrados. Esto nos permitiría además, seguir la distribución de 5hmC en gónadas hasta etapas más avanzadas del desarrollo e incluso en adultos.

Ubicar las secuencias del promotor de Sox9 y del posible elemento TES en el genoma ensamblado de *L. olivácea* (en proceso), para definir una posible relación por cercanía de estos elementos.

Transfectar las construcciones que contienen el posible elemento TES y el promotor de la TK en gónadas completas, para evaluar si este elemento tiene un efecto regulador de la expresión dependiente de tipo celular.

Evaluar los niveles de expresión de Dmrt1, así como los patrones de metilación sobre su secuencia promotora en gónadas después de un intercambio de temperatura de incubación, para medir la plasticidad de la metilación en el proceso de determinación sexual.

Evaluar los niveles de expresión de *Dmrt1*, así como los patrones de metilación sobre su secuencia promotora en gónadas incubadas a TPM, feminizadas con estradiol, para definir si la metilación diferencial de este gen ocurre como efecto de la diferenciación sexual o si es dependiente de la temperatura de incubación de manera más directa.

MATERIALES Y METODOS

Manejo e incubación de embriones

Huevos recién ovipositados de *L. olivacea* (Tortuga golfina) fueron recolectados en la playa La Escobilla en la costa del Océano Pacífico en Oaxaca, México (96_2701600W, 15_4003600N). Los huevos fueron cuidadosamente transportados al laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, en Ciudad Universitaria. Una vez en el laboratorio, los huevos fueron incubados a TPH (33°C) o TPM (26°C) utilizando vermiculita húmeda como sustrato. Todos los protocolos utilizados fueron previamente aprobados por el comité local de derechos animales de la Secretaría de Manejo Ambiental y Recursos Naturales (SEMARNAT) y la UNAM. La etapa de desarrollo de los embriones se determinó según el criterio de Miller (1985).

Extracción de DNA

Para extraer DNA, el tejido fue extraído por disección, en el caso de gónadas y mesonefros los complejos urogenitales fueron extraídos de embriones incubados a TPH o TPM y colocadas en PBS. Posteriormente las gónadas fueron separadas de los mesonefros y el tejido fue cortado en fragmentos menores a 2mm³. Los fragmentos de

tejido de gónadas o mesonefros de varios organismos, tomados al azar de varios nidos fueron incubados en una misma reacción con un volumen suficiente para cubrir las muestras de Buffer de Lisis (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8.0, 10 mM EDTA pH=8.0, 2% SDS, 1 mg/ml de Proteasa K y 150 ug/ml de RNAsa) por 16h o hasta que el tejido se disuelva a 65°C con agitación esporádica. Posteriormente el DNA fue purificado mezclando con 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamilico y mezclando por rotación por 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad en una microcentrífuga Eppendorff para separar las fases. La fase superior acuosa fue cuidadosamente removida y transferida a un tubo limpio. El proceso de purificación fue repetido una vez más cuando la fase acuosa presentaba aún pigmentos o un exceso de lípidos. Una vez purificado, el DNA fue precipitado agregando 1.5 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y mezclando perfectamente por inversión. Las muestras fueron después centrifugadas a máxima velocidad para poder retirar todo el sobrenadante y lavar el DNA 2 veces con Etanol al 70%, después de lo cual las muestras fueron centrifugadas nuevamente y el Etanol fue retirado y evaporado completamente para poder resuspender el DNA en agua inyectable. Para aislar DNA de sangre, las muestras fueron colectadas en PBS en hielo con 10 % de EDTA 0.5 M pH=8.0 y 20% de Heparina. Las células sanguíneas fueron lavadas con PBS y resuspendidas en buffer 10 mM Tris-HCl pH=8.0, 0.1 M EDTA pH=8.0, 0.5% SDS con 1 mg/ml de Proteasa K y 150 ug/ml de RNAsa. Posteriormente el DNA fue purificado como se describió previamente.

Análisis de metilación por Digestión con enzimas metilosensibles.

El DNA de gónadas y mesonefros de distintas etapas de desarrollo y temperaturas de incubación fue obtenido como se describió previamente. Posteriormente 5 µg de cada muestra fueron tratados con 100 unidades de la endonucleasa metilosensible *HpaII* o su isoesquizómero no-metilosensible *MspI* (New England Biolab) por 16h a 37°C, después de lo cual 20 unidades más de enzima fueron agregadas y las muestras y se incubaron por 4 h mas. El DNA fue purificado nuevamente como se describió previamente y resuspendido en 20 µl de agua inyectable para ser corrido en geles de agarosa al 0.85% y teñido con bromuro de etidio para ser analizados.

Amplificación de Sitios Intermetilados AIMS.

El DNA de gónadas y mesonefros fue extraído como se describió previamente. Para cada muestra se digirieron 5 µg de DNA con 50 unidades de endonucleasa metilosensible *HpaII* (New England Biolabs) por 16h a 37°C, después de lo cual se agragaron otras 50 Unidades de enzima y volvió a incubarse por 4 h. El DNA tratado con la endonucleasa fue después purificado por precipitación con 1.5 volúmenes de etanol al 100%, 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH=5.2 y 20 µg de glicógeno. Posteriormente se tomaron 2 µg de cada muestra y fueron tratados con 10 Unidades de DNA Polymerasa I, Large (Klenow) Fragment (New England Biolabs) por 4 h a 30°C, para dejar extremos rasos. La reacción fue inactivada incubando las muestras 30 min a 75°C. A continuación, se precipitaron nuevamente las muestras como se describió previamente y fueron posteriormente digeridas con 50 Unidades de endonucleasa no-metilosensible *MspI* (New England Biolabs) por 16h a 37°C, después de lo cual se agragaron 20 Unidades de enzima *MspI* a la reacción y se incubó por 4h mas para después volver a precipitar el DNA como se describió previamente. Para preparar los

adaptadores se utilizaron los oligonucleótidos complementarios Blue (5' - ATTTCGCAAAGCTCTGA-3') y Blue-GC (5' -P-CGTCAGAGCTTTGCGAAT-3'). Para cada muestra se utilizaron 2 nmoles de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos Blue y Blue-CG fueron mezclados e incubados a 40°C por 2 min, posteriormente a 65°C por 2 min y se dejarán enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente por 30 min. El DNA purificado fue ligado a los adaptadores utilizando 800 unidades de Ligasa T4 (New England Biolabs) por 16h a 14°C. Para eliminar el sobrante de adaptadores no unidos, el DNA fue purificado posteriormente con GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y se resuspendieron las muestras en 250 µl de agua inyectable. Para la amplificación por PCRs se utilizaron 3 µl de cada muestra en un volumen final de 25 µl. Se utilizó la enzima *Taq* HotStart de Quiagen siguiendo recomendaciones del proveedor y se incorporó 1 µCi [α -³²P]dCTP junto con los dNTPs. La reacción de PCR se realizó en 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg.y 72°C por 1min con un paso de extensión final de 10 min a 72°C. El producto de PCR fue precipitado nuevamente como se describió previamente y resuspendido en 2 µl de buffre de carga. Para separar los fragmentos de DNA se utilizarán geles de poliacrilamida al 7.5%, 7 M de urea de 0.4 mm de espesor con buffer TBE y la electroforesis se realizó a 1400 volts por 6h. Se utilizaron films para rayos-X para obtener las autoradiografías de los geles.

Extracion de DNA desde geles de acrilamida

Bandas específicas fueron identificadas y cortadas utilizando la radiografía generada después de la exposición. Los fragmentos de gel obtenidos fueron incubados por 16h a 37°C en solución de elución (0.5 M acetato de amonio, 10 mM acetato de magnesio, 1

mM EDTA, 0.1% SDS). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio, donde el DNA fue precipitado como se describió previamente.

Clonación molecular y secuenciación.

Los productos de amplificación por PCR fueron corridos en electroforesis utilizando geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes al fragmento de DNA deseado fueron cortadas y purificadas utilizando Qiagen gel extraction kit II, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El DNA obtenido fue clonado utilizando el sistema pGEM T-Easy Vector System (Promega) y bacterias quimiocompetentes *E. coli* de la cepa Top10. El DNA plasmídico fue extraído de cultivos líquidos de bacteria mediante el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) y posteriormente enviado para su secuenciación mediante el servicio de Perkin Elmers High Throughput Sequencing.

Dot Blot

Las muestras son cuantificadas y llevadas a la concentración adecuada para utilizar 2 μ l en cada punto. El DNA se coloca en puntos en una cuadrícula de 1 cm^2 en una membrana de nitrocelulosa y se deja secar por 1h. Posteriormente la membrana es incubada en solución de bloqueo (0.1% Tween, 5% leche en polvo Svelty Light en PBS) por 1h con agitación suave a temperatura ambiente. Para continuar, se agrega el anticuerpo primario contra 5hmC (39769, Active Motif : 1/10,000) y se incuba 16h a 4°C con agitación suave. La membrana es después lavada 3 veces en solución PBS con tween al 0.1% por 15 min. Se añade el anticuerpo secundario 1/10,000 anti ratón,

acomplado a HRP en solución de bloqueo, y es incubado por una hora más a temperatura ambiente. La membrana vuelve a lavarse 3 veces como se describió previamente y se revela el resultado utilizando films para auto-radiografía de rayos-x, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Alineamientos y análisis de secuencias.

Los alineamientos se realizaron mediante el programa ClustalW2 en línea, a partir de las secuencias reportadas de mRNAs parciales o totales en la base de datos de NCBI, así como las secuencias genómicas reportadas en la base de datos de ENSEMBLE para *Homo sapiens sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis* y *Gallus gallus*. Para analizar la presencia de islas CpG se utilizó el software de CpG Island Searcher en línea. Para predecir motivos de unión sobre las secuencias analizadas se utilizó el software MatInspector de Genomatix.

PCR Inversa.

Inicialmente 30 µg de DNA purificado como se describió previamente fueron digeridos con 40 unidades de las endonucleasas *BamHI* y *BglII* por 16h a 37°C. Posteriormente las muestras fueron precipitadas como se describió previamente. Se realizó una autoligación del DNA tratado, utilizando 400 unidades de Ligasa T4, por 16h a 4°C en un volumen total de reacción de 10 ml para no exceder los 3 µg/ml de DNA y favorecer las ligaciones intramoleculares. Las reacciones de PCR se realizaron con oligos invertidos diseñados sobre el fragmento conocido de cada gen. Los productos de amplificación obtenidos fueron clonados y secuenciados como se describió previamente.

Disgregación de gónadas y cultivo celular.

Las gónadas fueron extraídas como se describió previamente y cortado en fragmentos no mayores a 2 mm³. Para disgregar las células se utilizó un tratamiento con Tripsina 0.25% en medio Optimem sin rojo de fenol (GIBCO), por 30 min a 37°C con agitación vigorosa cada 5 min. Después del tratamiento, se dejaron las muestras 5 min en reposo para asentar los fragmentos restantes. El sobrenadante fue tomado cuidadosamente y transferido a un tubo limpio, donde se agregaron 0.1 volúmenes de suero fetal bovino. Las muestras fueron después centrifugadas a 1000g para asentar las células aisladas. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y las células resuspendidas en TUGA Mem: Optimem sin rojo de fenol (GIBCO) suplementado con 8% de suero fetal bovino, 2% de suero de pollo, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.1% de Fungizona. Los cultivos fueron mantenidos en incubación a 30°C con CO₂ estable a 5%.

Cultivo de gónadas completas

Para cultivar las gónadas completas, se extrajeron complejos urogenitales de embriones de etapa 28 de desarrollo. Posteriormente las gónadas fueron aisladas del resto del complejo y colocadas en cajas de 24 pozos, suspendidas sobre un micro filtro de 0.3 micras en 1 ml de medio TUGA-Mem. Posteriormente 200 µl más de medio se colocaron suavemente sobre la gónada formando una burbuja. Se usaron las mismas condiciones de incubación previamente descritas para los cultivos celulares.

Transfección en cultivos celulares

Para las transfecciones transitorias se utilizó 1 µg de DNA y 3 µl de Lipofectamina (Invitrogen) en medio Optimem sin suplementar siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se incubarán las células por 6h antes de suplementar el medio, después de lo cual se incubó por 24h antes de ver analizar fluorescencia en el microscopio (7 días en caso del promotor de la TK). Para cuantificar se utilizó el plásmido control pRFP-N1, con el gen que codifica para la proteína roja brillante (*RFP*), bajo regulación del promotor viral de expresión constitutiva SV40. Los plásmidos a analizar fueron transfectados en conjunto con el plásmido control en proporciones 1:1 (500 ng de cada uno). Para cuantificar se evaluó el porcentaje de células transfectadas (RFP+), donde hubo además expresión de GFP inducida por el plásmido a analizar.

Transfección de gónadas por electroporación

Para transfectar gónadas, inicialmente son extraídos los complejos urogenitales y mantenidos en medio Optimem. Se utilizan platos de PBS con agar 1% para dar soporte a los complejos durante la micromanipulación. Un triángulo de agar es extraído del plato y se coloca el complejo urogenital con la gónada hacia arriba y se sujeta el tejido al agar utilizando alfileres estériles sobre el mesonefros sin dañar la gónada. A continuación, se agrega Optimem hasta cubrir el tejido. Posteriormente se colocan los electrodos con micromanipuladores a los lados de la gónada para sujetarla. Se un micro capilar de vidrio con filo a 20° para perforar la gónada e inyectar aproximadamente 2 µl de plásmido con concentración de 6 mg/ml. El plásmido fue mezclado con tinta china para poder observar su distribución en el tejido. Una vez

microinyectado el tejido, se da un pulso de 7 descargas de 70 mV durante 50 mseg cada uno, a intervalos de 50 mseg. Posteriormente las gónadas son aisladas del complejo urogenital y colocadas en cultivo como se describió previamente, 24h después fue evaluada la fluorescencia de las gónadas en el microscopio.

Análisis de metilación por tratamiento con bisulfito de sodio

Para el análisis de metilación del DNA se utilizó el tratamiento con bisulfito de sodio. 3 µg de DNA purificado de *L. olivacea* fueron llevados a 18 µl y desnaturalizados agregando 2 µl de NaOH 3 M e incubando 15 min a 37°C. Posteriormente el DNA es calentando 5 min a 95°C y pasado inmediatamente a hielo. Se agregan a cada muestra 12 µl de Hidroquinona 10 mM y 208 µl de solución saturada de metabisulfito de sodio pH=5 (7.6 g de Na₂S₂O₅ en 15 ml de agua bidestilada), posteriormente se añaden suavemente 200 µl de aceite mineral para evitar la oxidación, formando una segunda fase en la superficie de la muestra con cuidado de no mezclar y se incuban las muestras en obscuridad a 55°C durante 14h. Posteriormente se recupera la fase acuosa de la muestra y se purifica con el Wizard DNA Clean-up System (Promega) y se eluye el DNA en 50 µl de agua inyectable. Para desulfonar el DNA se añaden 5.5 µl de NaOH 3 M y se incuba 15 min a 37°C. Posteriormente se precipita el DNA 16h a -80°C con 33 µl de Acetato de amonio 3 M pH=7, 400 µl de Etanol y 20 µg de glucógeno. El DNA se resuspende en 30 µl de agua inyectable y se utilizan 3 µl para cada reacción de PCR en un volumen final de 20 µl.

Inmunofluorescencias

El tejido es disectado y lavado con PBS, posteriormente es fijado con Paraformaldehído al 4% en PBS por 16h. Previo a la inclusión se realiza un tratamiento con sacarosa al 10%, 20% y 30% por 30 min antes de dejar 16h en una solución de sacarosa 30% y Tissue tek en proporciones 1:1. Las muestras se incluyen en capsulas Bean con Tissue tek y se congelan en hexano a -80°C . Se obtienen cortes de 15 micras en criostato sobre laminillas con carga positiva. Para la reacción de inmunofluorescencia se secan las laminillas 1h en vacío a temperatura ambiente, se hace un tratamiento de exposición de antígeno en citrato de sodio pH=6 con 0.5% de tween20 45 min a 92°C . Las muestras se permeabilizan con tritón al 0.3% en PBS por 15 min y se lavan 3 veces 3 min con PBS. Posteriormente se bloquean 1h con Glicina 100 mM en PBS. Inmediatamente después se agrega la solución de anticuerpos primarios en 100 μl de PBS y se cubre el tejido sobre la laminilla con un trozo de parafilm. Se incuba el anticuerpo 16h a 4°C . El exceso de anticuerpo primario es lavado 3 veces 3 min con PBS antes de agregar la solución con anticuerpos secundarios y dejar incubando 1h a temperatura ambiente. Se lava el anticuerpo secundario 3 veces 3 min con PBS y se agregan 200 μl de solución de DAPI 300 nM en PBS por 10 min. Se lava el exceso de DAPI 3 veces 3 min con PBS y se realiza el montaje del cubreobjetos con medio de montaje Dako. Se utilizarán anticuerpos para H3K4me3, H3K27me3, H3K9me2, H3Ac y H4Ac donados amablemente por el laboratorio del Dr. Thomas Jenuwein. Se utilizaron además, anti-5hmC 1:500 (39769, Active Motif), anti-Pan Cytokeratin Plus AE1/AE3+8/18 1:100 (Biocare Medical). El anticuerpo contra Sox9 se generó en conejo utilizando un epítipo de 24 aminoácidos

(VPSIPQTHSPQHWEQPVYTLTRP) (Díaz-Hernández et al., 2012). Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de Alexa Fluor 1:200 (Invitrogen). Para comparar muestras de embriones incubados a TPH y TPM, se colocaron cortes de ambas temperaturas de al menos 2 organismos distintos para cada temperatura en la misma laminilla.

Para analizar la intensidad de las modificaciones del DNA y la cromatina en inmunofluorescencias, se seleccionaron los nucleos que mostraran un nucléolo en cada corte óptico de cada micrografía y se clasificaron según el compartimiento en que se encontraran (cordones o estroma), posteriormente se evaluó la intensidad de nucleos individuales tanto de estroma como de cordones medulares y se utilizaron estos valores para calcular una intensidad media de cada sección óptica de cada micrografía. Los valores de intensidad de cada núcleo fueron normalizados con la intensidad media de su corte óptico para para calcular un promedio de intensidad de las células de los cordones medulares y del estroma en cada micrografía. Dependiendo de la etapa de desarrollo, se cuantificaron entre 10 y 150 núcleos para cada muestra biológica (varias micrografías y cortes ópticos para cada organismo). Para comparar grupos se realizó un análisis de varianza ANOVA, para lo cual se verificó: a) las frecuencias acumuladas mostraron una distribución simétrica para los valores de cada organismo. Para muestras con mas de 20 valores se utilizaron los parámetros del Teorema del Límite Central. Para muestras con menos de 20 valores se evaluó la normalidad con la prueba de Anderson-Darling. b) La homogeneidad de varianzas enyre grupos se evaluó mediante una prueba de Levene ($P=0.226$). Las comparaciones entre múltiples grupos se llevaron a cabo usando una prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch de rango

múltiple (REGWQ) $P < 0.05$ (SAS Versión 9.0, 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC. USA).

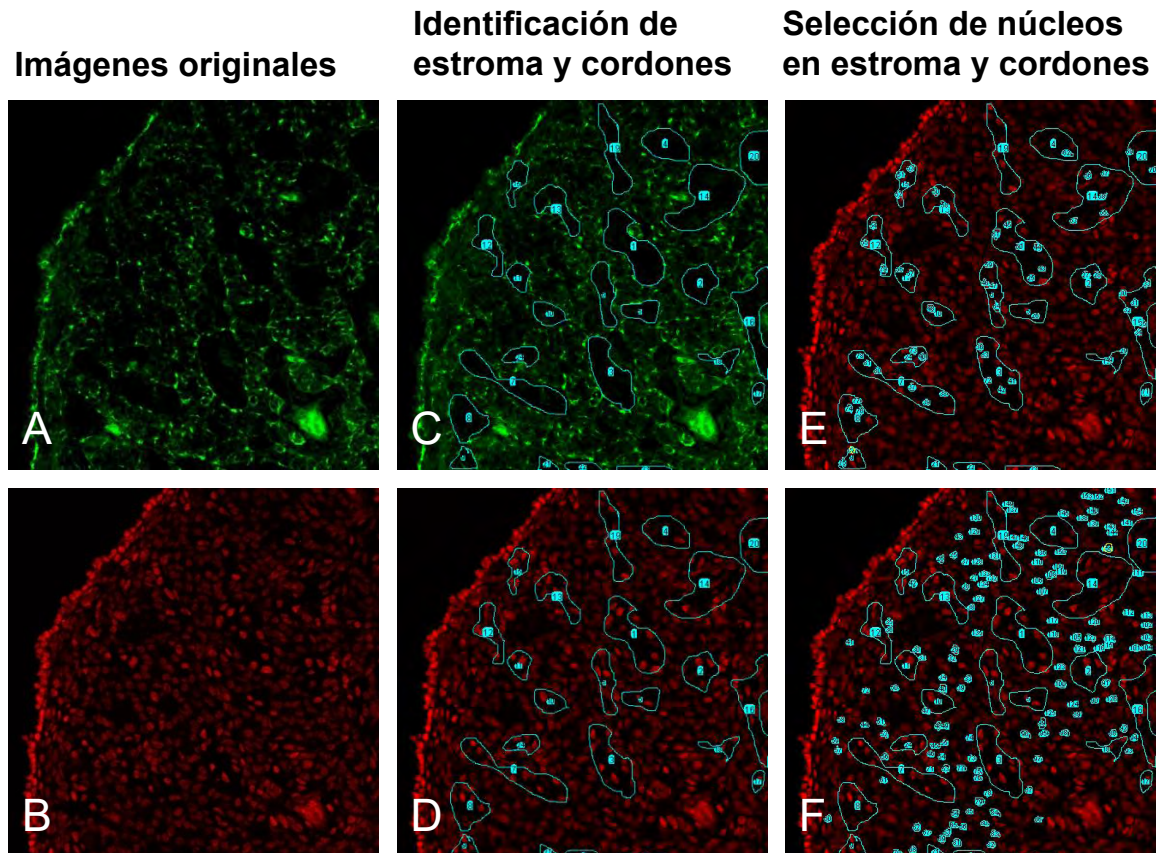


Fig. 43. Metodología de cuantificación de señal nuclear en inmunofluorescencias. A partir de las imágenes originales, se selecciona un corte óptico y se separan el canal que se utilizará para definir los tipos celulares y el canal que muestra la marca a cuantificar (A y B). Posteriormente se traza una plantilla que divida los compartimentos a analizar (estroma y cordones) con ayuda de la marca que seleccionemos para definir el tipo celular (C). Posteriormente se transfiere la plantilla al canal que tiene la marca a analizar. Se seleccionan los núcleos que presenten un nucléolo en cada uno de los compartimentos (E: estroma, F: cordones) y se calcula la intensidad promedio de cada núcleo seleccionado. La intensidad de cada núcleo es normalizada contra la media de intensidad entre todos los núcleos seleccionados en esa micrografía y corte óptico.

Tabla de Oligonucleótidos

<i>Sox9exon1-Fw</i>	5'-GCTTTCTCGCATGAATCTCC-3'
<i>Sox9exon1-Rv</i>	5'-CCACACCATGAAGGCGTTC-3'
<i>Sox9ex1BIS-Fw</i>	5'-AGAGTAGGATAAATGTATTTTTG-3'
<i>Sox9ex1BIS-Rv</i>	5'-ACATAAACACCAAATCCAATC-3'
<i>Sox9OUT-Fw</i>	5'-GGAGATTCATGCGAGAAAGC-3'
<i>Sox9OUT-Rv</i>	5'-GTCAGCCAAGTCCTGAAGG-3'
<i>PromSox9BIS1-Fw</i>	5'-GGATTTTGGATGTTTTATATTAG-3'
<i>PromSox9BIS1-RV</i>	5'-ACTACCTTATTCAAAAATAATC-3'
<i>PromSox9BIS2-Fw</i>	5'-AGATTAGTTTTGAATAAGGTAG-3'
<i>PromSox9BIS2-RV</i>	5'-CTAACACACAAATAATTAACACTAC-3'
<i>PromSox9BIS3-Fw</i>	5'-GTAGTTAATTATTTGTGTGTTAG-3'
<i>PromSox9BIS3-RV</i>	5'-AAAATACATTTATCCTACTCTTC-3'
<i>PromSox9Long-Fw</i>	5'-GTGAACGGATCTTGGATGC-3'
<i>PromSox9Short-Fw</i>	5'-CAGGAGACTGTCCATAGTC-3'
<i>PromSox9-Rv</i>	5'-CCTGCTCTGAGGATAGTC-3'
<i>TESolivacea-Fw</i>	5'-TTGAAAGGTGTGATTGCAGC-3'
<i>TESolivacea-Rv</i>	5'-CAGTYACCTTTCCTGCCAG-3'
<i>TES.BIS1-Fw</i>	5'-GTAGTTATGTAGTTGTTGTGG-3'
<i>TES.BIS1-Rv</i>	5'-CCCACCATAAACCAAACCC-3'
<i>TES.BIS2-Fw</i>	5'-GGGTTTTGGTTTATGGTGGG-3'
<i>TES.BIS2-Rv</i>	5'-ATCACCTTTCCTACCAAAC-3'
<i>promDmrt1BISFw</i>	5'-GTAGGAGTTGGTGTGGTTAG-3'
<i>promDmrt1BISRv</i>	5'-CCCTCCACATACAAAACCTC-3'
<i>Dmrt1promFw</i>	5'-CCTATGACATGCACACTACC-3'
<i>Dmrt1promRv</i>	5'-TACACCAGCTGCCTGACG-3'
<i>Dmrt1bisFw</i>	5'-AATGGAGTGTATTGTATTTTTGG-3'
<i>Dmrt1bisRv</i>	5'-CTAACCACACCAACTCCTAC-3'
<i>Blue1</i>	5'-ATT CGCAAAGCTCTGACGGATTAG-3'
<i>Blue2</i>	5'-ATT CGCAAAGCTCTGACGGATATC-3'
<i>Blue3</i>	5'-ATT CGCAAAGCTCTGACGGATGC-3'

Tab. 1. Tabla de oligonucleótidos utilizados. Prom=diseñado sobre la región promotora del gen; Bis=diseñado para DNA tratado con bisulfito de sodiobisulfito; OUT=utilizado para PCR inversa

REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, A., Plotkin, P.** (2008). *Lepidochelys olivacea*. En: IUCN 2008, 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
- Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M. L.** (2008). Epigenetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Ajiro, K. Allis, C. D.** (2002). Histone code hypothesis. *Nat. Genet.* **30(1)**: 73-76
- Bagheri-Fam, S., Sinclair, A. H., Koopman, P., Harley, V. R.** (2010). Conserved regulatory modules in the *Sox9* testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **3**: 472-277.
- Barske, L.A., Capel, B.** (2010). Estrogen represses *SOX9* during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*. *Dev. Biol.* **341**: 305-314.
- Beisel, C., Paro, R.** (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* **12**: 123-135.
- Bird, A.** (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**: 6-21.
- Bogdanovic, O., Veenstra, G. J. C.** (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* **118**: 549-465.
- Branco, M. R., Ficiz, G., Reik, W.** (2012). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 7-13
- Brennan, J., Capel, B.,** (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat. Rev. Genet.* **5(7)**: 509-521.
- Bull, J.J.** (1980). Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.* **55**: 3-21.
- Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L.** (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**: 321-329.
- Cao, R.** (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* **298**: 1039-1043.
- Chaboissier, M.C., Kobayashi, A., Vidal, V.I.P.** (2004). Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development.* **131**:1891-1901.
- Charnier, M.** (1966) Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **160(3)**: 620-622
- Chapus C., Edwards, S.V.** (2009). Genome evolution in Reptilia: in silico chicken mapping of 12,000 BAC-end sequences from two reptiles and a basal bird. *BMC Genomics.* **14**: 10.

- Chen, Z., Riggs, A. D.** (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J. Biol. Chem.* **286**: 18347-18353.
- Colter, D. C., Piera-Velazquez, S., Hawkins, D. F., Whitecavage, M. K., Jimenez, S. A., Stokes, D. G.** (2005). Regulation of the human *Sox9* promoter by the CCAAT-binding factor. *Matrix Biol.* **24**: 185–197
- Conover, D.O., Kynard, B. E.** (1981). Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science.* **213**: 496-498
- Cremer, T., Cremer, C.** (2003). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **162**: 809-820.
- Crews, D., Bull, J.J., Wibbels, T.** (1991). Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**: 357-364.
- DeFalco, T., Capel, B.** (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**: 457- 482
- Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., Harfush, M., Merchant-Larios, H.** (2012). Formation of the genital ridges is preceded by a domain of ectopic *Sox9*-expressing cells in *Lepidochelys olivacea*. *H. Dev. Biol.* **361**: 156-166.
- DiNapoli, L., Capel, B.** (2008). SRY and the standoff in sex determination. *Mol. Endocrinol.* **22**:1-9.
- Ellis, H. L., Shioda, K., Rosenthal, N. F., Coser, K. R., Shioda, T.** (2012). Masculine epigenetic sex marks of the CYP19A1/aromatase promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion. *Biol. Reprod.* **87**: 12-21.
- Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F., Marshall Graves, J.A.** (2006). Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Curr. Biol.* **16**: 736–743.
- Felsenfeld, G., Groudine, M.** (2003). Controlling the double helix. *Nature.* **421**: 448-453.
- Ferguson, M. W. J., Joanen, T.** (1982). Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature.* **296**: 850–852
- Ficz, G. et al.,** (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells during differentiation. *Nature.* **473**: 398-402.
- Flemming, A., Wibbles, T., Skipper, J.K., Crews, D.** (1999). Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**: 336-346.
- Frigola, J., Ribas, M., Risques, R. A., Peinado, M. A.** (2010). Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res.* **30**: e28.

- Gallien, L.** (1953). Total inversion of sex in *Xenopus laevis* Daud, following treatment with estradiol benzoate administered during larval stage. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **237(23)**: 1565-1566
- Gordon, C. T., Tan, T. Y., Benko, S., Fitzpatrick, D., Lyonnet, S., Farlie, P. G.** (2009). Long-range regulation at the *SOX9* locus in development and disease. *J. Med. Genet.* **10**: 649-656.
- Harley, V.R., Clarkson, M.J., Argentaro, A.** (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex determining region on the Y chromosome) and *SOX9* [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr. Rev.* **24(4)**: 466-487.
- He, Y. F.** (2011). TET mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science.* **333**: 1303-1307.
- Hughes, I.A.** (2001). Minireview: Sex differentiation. *Endocrinology.* **142(8)**: 3281-3287.
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., Zhang, Y.** (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* **466**: 1129-1133.
- Janes, D. E., Wayne, M. L.,** (2006). Evidence for a genotype X environmental interaction in sex-determining response to incubation temperature in the leopard gecko, *Eublepharis macularis*. *Herpetologica.* **62**: 56-62
- Janzen, F.J., Phillips, P. C.** (2006). Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *J. Evol. Biol.* **19**: 1775-1784.
- Jenuwein, T., Allis, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science.* **293**: 1074-1080
- Jiang, T., Hou, C. C., She, Z. Y., Yang, W. X.,** (2013). The *SOX* gene family: function and regulation in testis determination and male fertility maintenance. *Mol. Biol. Rep.* **3**: 2187-2194.
- Jin, Q., Yu, L., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L., Lee, J., Wang, C., Brindle, P., Dent, S., Ge, K.** (2011). Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO Journal.* **30**: 249-262.
- 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 Dis.* **1**: 149-161.
- Josso N., Belville, C., di Clemente, N., Picard, J.Y.** (2005). AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Hum. Reprod. Update.* **11(4)**: 351-356.
- Kanai, Y., Koopman, P.** (1999). Structural and functional characterization of the mouse *Sox9* promoter: implications for campomelic dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 691-696.

Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Shiroishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K., Higashinakagawa, T.,(1998). Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*. **393**: 688-692

Katoh, K., Miyata, T. (1999). A heuristic approach of maximum likelihood method for inferring phylogenetic tree and application to the mammalian SOX-3 origin of the testis-determining gene SRY. *FEBS Lett.* **463**: 129-132.

Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J. E., Sinclair, A.H., Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. **122**: 2813-2822.

Kettlewell, J. R., Raymond, C. S., Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis*. **26(3)**: 174-178.

Kinney, S. M., Chin, H. G., Vaisvila, R., Bitinaite, J., Zheng, Y., Estève, P. O., Feng, S., Stroud, H., Jacobsen, S. E., Pradhan, S. (2011). Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *J. Biol. Chem.* **286**: 24685-24693.

Klose, R. J., Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 89-97.

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.

Koopman, P. (2001). The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell*. **105**: 843-847

Lee, T. F., Zhai, J., Meyers, B. C. (2010). Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 9027-9028.

Lewin, B. (2008). GENES IX. Ed. ; *Mc Graw Hill*.

Loffler, K. A., Koopman, P. (2002). Charting the course of ovarian development in vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* **46(4)**: 503-510

Márquez, R. (2002). Las tortugas marinas y nuestro tiempo. *Fondo de cultura económica*. 3ª edición.

Márquez, R., Peñaflores, C., Vasconcelos, J.C. (1996). Olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) show signs of recovery at La Escobilla, Oaxaca. *Mar. Turt. News*. **73**: 843-847.

Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., Zarkower, D. (2011). *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*. **476**: 101-105.

Matsumoto, Y., Buemio, A., Chu, R., Vafae, M., Crews, D. (2013). Epigenetic control of gonadal aromatase (cyp19a1) in temperature- dependent sex determination of red-eared slider turtles. *Plos One*. **8**: e63599.

- Mendenhall, E. M., Koche, R. P., Truong, T., Zhou, V. W., Issac, B., Chi, A. S., Ku, M. Bernstein, B. E.** (2010). GC-rich sequence elements recruit PRC2 in mammalian ES cells. *Plos Genet.* **6**;6(12): e1001244.
- Merchant-Larios, H., Villalpando, Fierro, I., Centeno Urruiza, B.** (1989). Gonadal Morphogenesis under Controlled Temperature in the Sea Turtle. *Lepidochelys olivacea Herpetol. Monogr.* **3**: 43-61.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramírez, S., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A.** (1997). Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **107**: 373-385.
- Merchant-Larios, H.** (1999). Determining hatchling sex. En: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. (eds.). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.
- 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**: 50-61.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V.** (2013). Environmental sex determination mechanisms in reptiles. *Sex. Dev.* **7**: 95-103.
- Miller, J. D.** (1985). Embryology of marine turtles. In *Biology of the Reptilia* (ed. C. Gans, F. Billet and P. F. A. Maderson), pp, 269-328. New York: *John Wiley & Sons*.
- Mizukami, T., Kanai, Y., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Hayashi, Y.** (2008) Five azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, specifically inhibits testicular cord formation and Sertoli cell differentiation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 1002–1010.
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M., Schubeler, D.** (2008). Lineage specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol. Cell.* **30**(6): 755-66
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V.R., Merchant-Larios, H.** (1999). Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- female-promoting temperatures. *J. Exp. Zool.* **284**: 705-710.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V.R., Merchant-Larios, H.** (2001). Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Dev. Biol.* **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.
- Murr, R.** (2010). Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv. Genet.* **70**: 101-141.

Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., Schart, M. (2002). A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99(18)**: 11778-11783.

Natoli, G., Andrau, J. C. (2012). Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annu. Rev. Genet.* **46**: 1-19.

Navarro-Martin, L., Vinas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutierrez, A., Di Croce, L., Piferrer, F. (2011). DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genet.* **7**: e1002447.

Ong, C. T., Corces, V. G. (2012). Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO Rep.* **13**: 423-430.

Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* **38**: 1304-1309.

Parrott, B. B., Kohno, S., Cloy-McCoy, J. A., Guillette, L. J. Jr. (2014). Differential incubation temperatures result in dimorphic DNA methylation patterning of the *SOX9* and aromatase promoters in gonads of alligator (*Alligator mississippiensis*) embryos. *Biol. Reprod.* **90**: 1-11.

Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays.* **18(1)**: 19-26.

Pieau, C., Dorizzi, M., Richard-Mercier, M. (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 887-900.

Ramsey, M., Shoemaker, C.M., Crews, D. (2007). Gonadal expression of *Sf1* and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Differentiation.* **75**: 978-991.

Raymond, C.S, Murphy, M.W, O'Sullivan M.G., Bardwell, V.J., Zarkower, D. (2000). *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* **14**: 2587-2595

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.

Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., Lovell-Badge, R. (2004). *SOX9* is up-regulated by the transient expression of *SRY* specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* **274**: 271-279.

Sekido R, Lovell-Badge R. (2008). Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature.* **453**: 930-934.

- Shoemaker, C., Crews, D.** (2009). Analyzing the Coordinated Gene Network Underlying Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles. *Seminars in Cell and Dev. Biol.* **20(3)**: 293-303.
- Shoemaker, C., Queen, J., Crews, D.** (2007). Response of Candidate Sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol. Endocrinol.* **21(11)**: 2750-2763.
- Simon, M. D., Pinter, S. F., Fang, R., Sarma, K., Rutenberg-Schoenberg, M., Bowman, S. K., Kesner, B. A., Maier, V. K., Kingston, R. E., Lee, J. T.** (2013). High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature.* **504**: 465-469.
- Smith, C.A., McClive, P.J., Western, P.S., Reed, K.J.** (1999). Evolution: conservation of a sex determining gene. *Nature.* **402**: 601-602.
- Smith, C.A., Shoemaker, C.M., Roeszler, K.N., Queen, J., Crews, D., Sinclair, A.H.** (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev. Biol.* **8**: 72-76
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P. G., Doran, T. J., Sinclair, A. H.** (2009). The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature.* **461**: 267-271.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N.** (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* **346**: 240-244.
- Sinclair, A., Smith, C.** (2009). Females battle to suppress their inner male. *Cell.* **139(6)**: 1051-1053
- Singal, R., Ginder, G. D.** (1999). DNA methylation. *Blood.* **93**: 4059-4070.
- Spotila, L.D., Spotila, J.R., Hall, S. E.** (1998). Sequence and expression analysis of *Wt1* and *Sox9* in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* **281**: 417-427.
- Sun, W., Guan, M., Li, X.** (2014). 5-hydroxymethylcytosine-mediated DNA demethylation in stem cells and development. *Stem Cells Dev.* **23**: 923-930
- Sutendra, G., Kinnaird, A., Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T. H., Haromy, A., Hashimoto, K., Zhang, N., Flaim, E., Michelakis, E. D.** (2014). A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for degeneration of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell.* **158**: 84-97

Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Budukawala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. **324**: 930-935.

Torres-Maldonado, L.C., Landa-Piedra, A., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A., Meza-Martínez, A., Merchant-Larios, H. (2002). Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **129**: 20-26.

Uhlenhaut, N. H., Kakob, S., Anlag, K., Eisenberg, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A. C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I., Riethmacher, D., Schutz, G., Cooney, A. J., Lovell-Badge, R., Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*. **139** (6): 1130-1142

Vastenhouw, N. L., Schier, A. F. (2012). Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**: 374-386.

Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. **397**: 405-409.

Varriale, A., Bernardi, G. (2006). DNA methylation in reptiles. *Genes*. **385**: 122-127.

Voigt, P., Tee, W. W., Reinberg, D. (2013) A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* **27**(12): 1318-1338.

Weber, M. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**: 457-466.

Wen, A. Y., You, F., Sun, P., Li, J., Xu, D. D. Wu, Z. H., Ma, D. Y., Zhang, P. J. (2013). CpG methylation of *dmrt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Biol.* **1**: 193-205.

Western, P.S., Harry, J.L., Graves, J.A.M., Sinclair, A.H. (1999). Temperature-dependent sex determination: Upregulation of *SOX9* expression after commitment to male development. *Dev. Dynam.* **214**: 171-177.

Western, P.S., Harry, J.L., Graves, J.A.M., Sinclair, A.H. (2000). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Genes*. **241**: 223-232

Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination turtles. En: Lutz P.L., Musik, J.A. & Wineken, J. (eds). The biology of sea turtles Vol, 2. *CRC Press Inc.* Boca Ratón Florida. 103-134.

Wilhelm, D., Palmer, S., Koopman, P. (2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol. Rev.* **87**: 1-28.

Williams, K. et al., (2011). TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*. **473**: 343-348.

Williams, K., Christensen, J., Helin, K. (2012). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* **13**: 28-35.

Wen, A. Y., You, F., Sun, P., Li, J., Xu, D. D., Wu, Z. H., Ma, D. Y., Zhang, P.J. (2014). CpG methylation of *dmt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Biol.* **84(1)**: 193-205.

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., Ito, M. (2007). A W-linked DM-domain gene, DM-W participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 2469-2474.

Zarkower, D. (2001). Establishing sexual dimorphism: conservation admits diversity? *Nat. Rev. Genet.* **2**: 175-185.

Zhao, L., Svingen, T., NG, E. T., Koopman, P. (2015). Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of *Dmrt1*. *Development.* **142**: 1083-1088.



Dimorphic DNA methylation during temperature-dependent sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*



Daniela Venegas^a, Alejandro Marmolejo-Valencia^a, Christian Valdes-Quezada^b, Tzipe Govenzensky^{a,c}, Félix Recillas-Targa^b, Horacio Merchant-Larios^{a,*}

^a Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México DF, México City, Mexico

^b Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México DF, México City, Mexico

^c Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México DF, México City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2016

Revised 13 June 2016

Accepted 19 June 2016

Available online 21 June 2016

Keywords:

Temperature sex determination

DNA methylation/demethylation

Spatiotemporal 5hmC

Gonadal development

Sea turtle

ABSTRACT

Sex determination in vertebrates depends on the expression of a conserved network of genes. Sea turtles such as *Lepidochelys olivacea* have temperature-dependent sex determination. The present work analyses some of the epigenetic processes involved in this. We describe sexual dimorphism in global DNA methylation patterns between ovaries and testes of *L. olivacea* and show that the differences may arise from a combination of DNA methylation and demethylation events that occur during sex determination. Irrespective of incubation temperature, 5-hydroxymethylcytosine was abundant in the bipotential gonad; however, following sex determination, this modification was no longer found in pre-Sertoli cells in the testes. These changes correlate with the establishment of the sexually dimorphic DNA methylation patterns, down regulation of *Sox9* gene expression in ovaries and irreversible gonadal commitment towards a male or female differentiation pathway. Thus, DNA methylation changes may be necessary for the stabilization of the gene expression networks that drive the differentiation of the bipotential gonad to form either an ovary or a testis in *L. olivacea* and probably among other species that manifest temperature-dependent sex determination.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Development of the bipotential gonad to form either an ovary or a testis depends on the dimorphic expression of a conserved network of genes (Davidson and Erwin, 2006; Shoemaker and Crews, 2009). However, the mechanisms that trigger the establishment of male or female gene expression patterns differ among taxa. Most organisms have genetic sex determination, where sex is determined by the genetic background after fertilization (Ezaz et al., 2006). Therefore, differences in sex-specific alleles are responsible for activation of male or female differentiation pathways (Matsuda et al., 2007). Among mammals, genetic sex determination relies on the XX and XY sex chromosomes, in which the Sry gene encoded in the Y chromosome acts as the testis-determining factor (Koopman et al., 1991). Among birds, the *Dmrt1* gene is encoded in sexual chromosome Z and dosage of this gene in

paired ZZ and ZW chromosomes is important for sex determination (Smith et al., 2009).

Among vertebrates with environmental sex determination, sex depends on external cues, mostly in the absence of sex chromosomes (Rhen and Schroeder, 2010). Several species of turtles, lizards and all crocodiles are subject to temperature-dependent sex determination (TSD) (reviewed in Merchant-Larios and Díaz-Hernández (2013)). In these organisms, the molecular mechanism(s) involved in translation of temperature cues to dimorphic regulation of sex-determining genes in the gonad remain poorly understood. Epigenetic mechanisms play an important role in translating environmental and cellular stimuli into gene expression patterns and may also be involved in TSD (Navarro-Martin et al., 2011; Matsumoto et al., 2013; reviewed in Piferrer (2013)). Among epigenetic mechanisms, some directly affect DNA molecules, such as methylation of carbon 5 of cytosine in the CpG context (5mC), associated with transcriptional repression and stabilization of transposable elements. DNA methylation is important in inactivation of the X-chromosome among mammals and Z chromosome in birds (Simon et al., 2013; Teranishi et al., 2001; Yang et al., 2011). Furthermore, active DNA demethylation has recently been described in many embryonic cell types, proving

* Corresponding author at: Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP. 04510, México DF, México City, Mexico.

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

DNA methylation and demethylation to be highly dynamic during development (Kinney et al., 2011; Szwegierczak et al., 2010). In particular, DNA demethylation involves hydroxylation of 5mC (5hmC) and its subsequent excision and replacement by a non-methylated cytosine (Sun et al., 2014; Ito et al., 2010; Koh et al., 2011). Another versatile epigenetic mechanism is that associated with a sophisticated set of histone post-translational modifications. Different histone residues can be targets for changes in acetylation, methylation, ubiquitination, or phosphorylation, among others that have direct effect on gene expression with biological significance (Gardner et al., 2011; Zentner and Henikoff, 2013).

Recent reports correlate epigenetic processes with sex differentiation: DNA methylation is necessary for Sertoli cell differentiation and formation of testicular cords in murine gonads (Mizukami et al., 2008). In birds, the DNA methylation over the promoter sequence of the aromatase gene *CYP19A1* is more abundant in male than in female gonads (Ellis et al., 2012). In species with TSD, such as the European sea bass, it has also been found that the aromatase promoter shows higher levels of DNA methylation in males than in females (Navarro-Martin et al., 2011). This type of regulation has also been described in two reptile species: the red-eared turtle *Trachemys scripta* (Matsumoto et al., 2013) and the alligator *Alligator mississippiensis* (Parrott et al., 2014). Furthermore, in the alligator, a putative promoter sequence of the *Sox9* gene showed higher DNA methylation levels in gonads from embryos incubated at female-promoting temperature (FPT) than when they were incubated at the male-promoting temperature (MPT) (Parrott et al., 2014). These results strongly corroborate the idea that epigenetic modifications are involved in the regulation of certain genes from the sex-determining networks in species with TSD. However, much has still to be clarified regarding global epigenetic changes to the DNA and epigenetic signals for specific gonadal cells involved in the establishment of TSD networks.

Sea turtles manifest TSD, where low and high temperatures produce male and female hatchlings, respectively. In the olive ridley turtle, *L. olivacea*, differentiation of the bipotential gonad into a testis or ovary takes several days, enabling the study of structural and molecular changes during sex determination and differentiation (Merchant-Larios and Díaz-Hernández, 2013). In the current study, we extended the investigation of this species using unbiased, global approaches and we provide evidence of dimorphism of DNA methylation patterns between ovaries and testes. We found a correlation between levels of 5hmC DNA modification in medullary cords and sexual commitment. Together, our results suggest that changes in DNA methylation are necessary for the stabilization of gene expression networks of ovaries and testes in *L. olivacea* and probably in other species with TSD.

2. Methods

2.1. Embryos

Freshly laid eggs of the olive ridley turtle (*L. olivacea*) were collected at La Escobilla beach on the Pacific Coast of Oaxaca, Mexico (96.2701600W, 15.4003600N). The eggs were transported to the laboratory in Mexico City and incubated at MPT (26 °C ± 0.5) or FPT (33 °C ± 0.5). The total number of embryos used in the present study is shown in Supplementary Table 1. All protocols were approved by local animal rights committees from the Secretary for Environment and Natural Resources (SEMARNAT) and the National Autonomous University of Mexico. Embryos were sampled before and after sex determination: at Stages 24 and 27 for MPT and 23 and 27 for FPT; samples for immunofluorescence were

taken also at stages 25 and 26 (Supplementary Table 1). Stages are according to Miller's criteria (Miller, 1985).

2.2. Genomic DNA isolation

Urogenital complexes were removed from embryos incubated at MPT or FPT. Gonads were separated from the adjacent mesonephros and grouped into pools containing tissue from 10 embryos each. Gonads from embryos of at least 2 different nests were included in each pool. Samples were sliced into 5–8 pieces smaller than 2 mm³ and incubated in Lysis Buffer (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 2% SDS, 1 mg/ml Proteinase K and 150 µg/ml RNase) for 16 h at 65 °C. DNA was purified with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and precipitated with ethanol. Biological replicates for other experiments were prepared from another 10 embryos originating from 2 different nests each time. Mouse DNA was obtained from a pool of 5 brains from new born male CD-1 strain.

2.3. Amplification of Inter-methylated Sites (AIMS)

The AIMS method was adapted from the original (Frigola et al., 2002). Embryos came from the same 2 nests, sampled at different developmental stages. DNA samples from different incubation temperatures and developmental stages came from pools of gonads of 10 embryos, these being 5 embryos from each nest. A biological replicate used embryos from 2 other nests. (Supplementary Table 1). Each sample of 5 µg DNA was treated with 100 U methylation-sensitive endonuclease HpaII for 16 h at 37 °C and then purified with phenol-chloroform-isoamyl alcohol, as previously described. From each sample, 2 µg were treated with 10 U DNA polymerase I, Large (Klenow) fragment (New England BioLabs) following the manufacturer's instructions, for 4 h at 30 °C until blunt ends remained. The reaction was arrested at 75 °C for 30 min and DNA was precipitated with 100% ethanol, 0.1 volumes of sodium acetate 3 M pH5 and 20 µg glycogen (Roche). This DNA was treated with 100 U methylation-insensitive MspI endonuclease for 16 h at 37 °C, and 20 U enzyme MspI was then added to the reaction and incubated for 4 h at 37 °C, prior to heat inactivation of the enzyme. DNA was once again precipitated, as previously described. To prepare the linkers, 2 nmoles of each primer Blue (5'-ATTCGCAAAGCTCTGA-3') and Blue-GC (Phos-5'-CGTCA GAGCTTTGCGAAT-3') were incubated together at 65 °C for 2 min and then at room temperature for 30 min. Linkers were ligated to treated DNA with 800 U T4 Ligase (New England BioLabs) for 16 h at 14 °C. Unincorporated linkers were removed with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and DNA was re-suspended in 250 µl DNase-free H₂O. PCRs were prepared with 3 µl sample DNA and 1 µCi [α -³²P]dCTP with Hot Start Taq (Qiagen), using 5 pmol of primer Blue1 (5'-ATTCGCAAAGCTCT GACGGATTAG-3'), Blue2 (5'-ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATC-3'), Blue3 (5'-ATTCGCAAAGCTCTGACGGATGC-3'). Reactions were performed in quadruplicate, using 35 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, with a last extended stage of 10 min at 72 °C. PCR products were precipitated as previously described and re-suspended in 2 µl loading buffer. Products were run on 7.5% polyacrylamide denaturing gels, 0.4 mm thick with 7 M urea on TBE buffer. Gels were dried and auto-radiographs were produced from X-ray films that had been exposed for 48 h. AIMS was performed twice for stage 24 and 3 times for embryos at stage 27, plus one extra time for a biological replicate to corroborate the results. Quantity One Analysis Software was used to generate histograms and evaluate relative intensity of the banding patterns. Only bands showing dimorphic intensity in every PCR and biological replicate were considered as indicating differences in DNA

methylation. In order to elute DNA from acrylamide gels, bands were sliced and incubated in Elution Buffer (0.5 M ammonium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) overnight at 37 °C. DNA from the aqueous phase was then precipitated, as previously described.

2.4. Dot blot

DNA was obtained from *L. olivacea* gonads and brains as previously described. DNA from mouse brain was used as a positive control and pDrive vector was used as a negative control. Diverse amounts of DNA (30 ng, 50 ng, 500 ng, 1 µg and 2 µg) were diluted in 2 µl H₂O for each sample. This concentration gradient was used to detect 5hmC in tissues, which may present varied abundance. The greatest amount of DNA used from mouse brain was 500 ng, thus avoiding saturation. DNA was dotted on nitrocellulose membranes and dried at room temperature for 1 h. The membranes were blocked with blocking solution (0.1% Tween, 5% Svelty Light Powder Milk in PBS) for 1 h and then the primary antibody against 5hmC (1/10,000) was added and incubated overnight at 4 °C with gentle agitation. The membranes were then rinsed with 0.1% Tween PBS before incubation with secondary antibody diluted in blocking solution for 1 h at room temperature. The membranes were rinsed with PBS and revealed with X-ray films that had been exposed, using the kit as indicated by the manufacturer. In order to show that DNA was loaded for every sample, the membrane was stained with Ethidium Bromide (EtBr) to expose DNA under UV light.

2.5. Immunofluorescence

Urogenital complexes were dissected and fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS, for 16 h at 4 °C. The tissues were washed with PBS and sequentially incubated for 3 h in 10%, 20% and 30% sucrose, in PBS solutions. Samples were incubated overnight at 4 °C on a 1:1 mixture of 30% sucrose in PBS and Tissue-Tek CRYO-OCT Compound (Fisher Scientific). The complexes were then embedded in Tissue-Tek CRYO-OCT and frozen at –70 °C. Serial sections of 20 µm were obtained and vacuum dried prior to use. Tissue samples were permeabilized with 0.3% Triton X-100 on PBS for 15 min and blocked with 100 mM Ultra-pure Glycine (Sigma) on PBS for 1 h. Antigens were retrieved by incubating slides in citrate buffer (10 mM sodium citrate pH = 6, 0.05% Tween) for 45 min at 92 °C. Slides were incubated overnight at 4 °C with primary antibody: anti-5hmC 1:500 (39769, Active Motif), anti-Pan Cytokeratin Plus AE1/AE3 + 8/18 1:100 (Biocare Medical). Incubation with secondary antibodies Alexa Fluor 1:200 (Invitrogen) was performed for 1 h. Finally, slides were incubated with 300 nm DAPI in PBS for 2 min and rinsed before being mounted with Fluorescence Mounting medium (DAKO). In order to quantify signal intensity, CK antibody was used to segregate stromal from epithelial cells. Afterwards, cells showing at least one nucleolus were marked and signal intensity of the mark was quantified with the Image J program. To group data from different images and biological samples, we calculated the average intensity value in every image and normalized the intensity of every quantified cell (both epithelial and stromal) against this value. Between 10 and 200 cells were quantified, from gonads of at least 3 embryos each from 2 different nests (Supplementary Table 1).

2.6. Analysis software

The following software was used: Image J open-access software to analyse and quantify signal intensity in IF images and Image Quant 5.2 Analysis for gel analysis.

2.7. Statistical analyses

To analyse 5hmC distribution, individual nuclei ($n > 10$ per micrograph) from both stromal or epithelial cells were identified and their average fluorescent intensity quantified using Image J Software. To normalize intensity values, all quantified nuclei from both epithelial and stromal cells were identified, and median intensity was calculated for each of these. Values obtained were used to calculate an average intensity for the entire micrograph. Intensity values relating to every nucleus were normalized against the mean intensity value of each micrograph. Several organisms were quantified for each developmental stage and incubation temperature (St. 27 $n = 8$; St. 26 and 25 $n = 3$ for each temperature). Independent graphs were generated for each organism (mean \pm S. D, $n > 10$) (Fig. 3B–C; Supplementary Figs. 4 and 5).

Average values were calculated for each cell type (epithelial medullary cords or stromal), developmental stage and incubation temperature using the normalized values from each organism. Comparison between groups was performed using ANOVA. Verifying ANOVA assumptions: (a) Cumulative frequency distributions showed symmetrical distributions of the values for each organism; since the dependent variable used is the average for each organism, averages calculated from big numbers ($n > 20$ for symmetrical distributions) have a normal distribution according with the Central Limit Theorem; for those cases where averages were calculated with $n < 21$ normality was proved using Anderson-Darling test. (b) A Levene's test showed homogeneity of variance between groups ($P = 0.226$). Significant difference for multiple comparisons was evaluated using a Ryan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test (REGWQ) $P < 0.05$ (Fig. 3D). (SAS Version 9.0 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Differential DNA methylation patterns between ovaries and testes

To explore epigenetic mechanisms involved in TSD, we looked for epigenetic differences between differentiated ovaries and testes from *L. olivacea* embryos incubated at MPT (26 °C) or FPT (33 °C), respectively. With the aim of identifying whether particular differences in DNA methylation patterns correlate with incubation temperature, we performed amplification of inter-methylated sites (AIMS) (Frigola et al., 2002). AIMS is an unbiased technique used to expose differences in DNA methylation patterns, based on the cleavage of genomic DNA with methyl-sensitive endonucleases (Supplementary Fig. 1).

The results revealed differences in DNA methylation distribution between ovaries and testes, evidenced by the presence of differentially enriched bands in acrylamide sequencing gels (Fig. 1A). These differences were maintained in PCR reactions and biological replicates. Histograms were generated to analyse banding patterns using Image Quant 5.2 Analysis software. Bands showing dimorphic intensity in every replicate PCR reaction were identified as differentially methylated. These bands were cut from either ovary or testis samples, depending on where they showed greater intensity (hence higher DNA methylation), and were eluted from the acrylamide gels. Eluted bands were used as templates for PCR re-amplification with the same primers used for AIMS. re-amplified bands were cloned and sequenced for identification (Fig. 1B); however, several sequences were found in each band. We performed a Genome browser BLAT analysis of the sequences obtained from the AIMS technique against the reported genome from *Chrysemys picta*, (Supplementary Tables 2 and 3). Unfortunately, it was impossible to determine which sequence was responsible for the dimorphic band intensity shown in the gels.

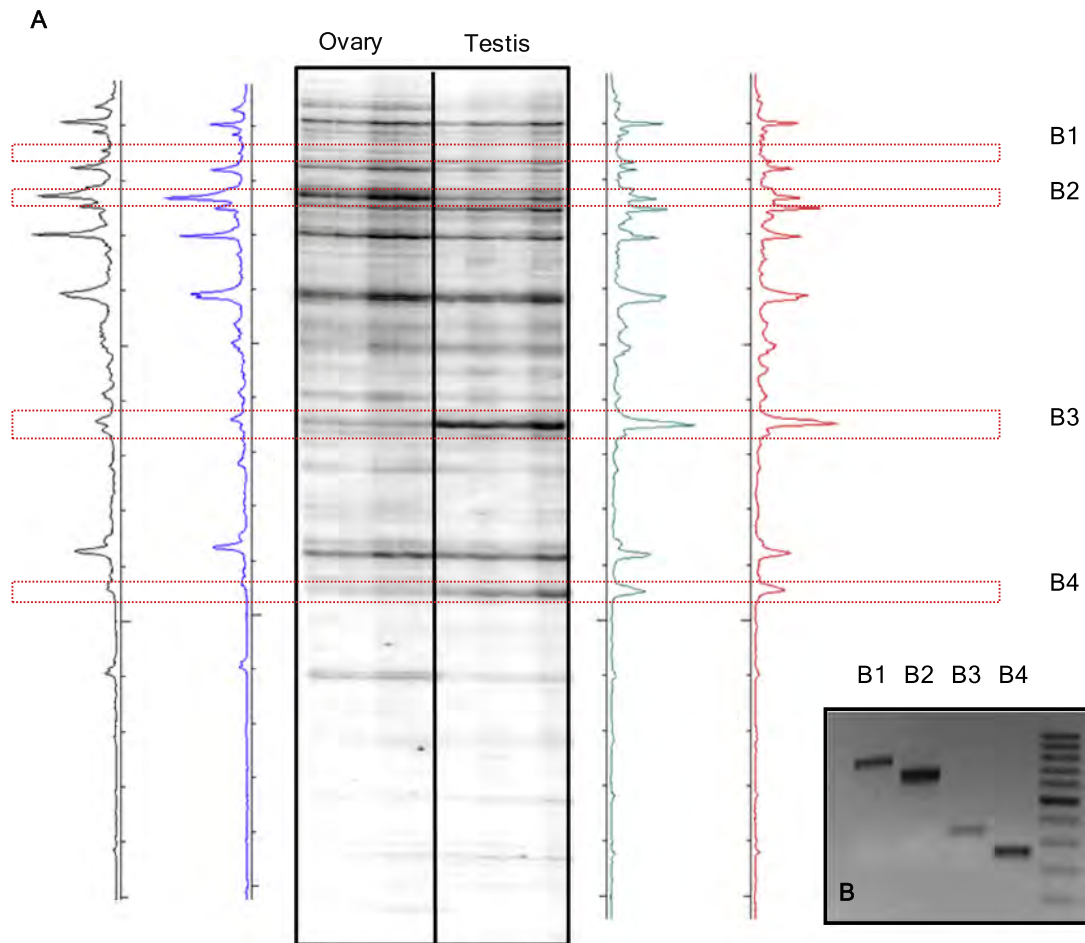


Fig. 1. DNA methylation in differentiated ovary and testis at stage 27. (A) PCR products corresponding to DNA methylation patterns generated by amplification of inter-methylated sites. 4 PCR reactions, using DNA from a pool of gonads from 10 embryos, are shown for each sex (A). A biological replicate was performed using DNA from a pool of gonads from another 10 embryos (data not shown). Bands that revealed dimorphic intensity in every PCR reaction and biological replicate were identified (red boxes). Histograms prove differences in band intensity for the 4 selected bands B1–B4 (only 2 histograms are shown for each sex). Higher band intensity is evidence of higher DNA methylation levels of the CpG sites surrounding a specific DNA fragment. (B) Analyzed band size ranged from 200 pb to 800 pb. As a molecular weight marker, a 100 bp ladder is shown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. Dimorphic DNA methylation patterns may be stabilized during sex determination

During the thermo-sensitive period, embryos have bipotential gonads responsive to temperature (Merchant-Larios et al., 1997). In order to discover whether the dimorphic DNA methylation patterns were established before or after the thermo-sensitive period, we performed AIMS in morphologically undifferentiated gonads from embryos incubated at MPT or FPT (Fig. 2, Supplementary Fig. 2).

DNA methylation patterns in the bipotential gonads (stages 23 and 24) were similar at both temperatures (Fig. 2); however, they differed in differentiated testis and ovaries. Thus, the establishment of a sex-specific pattern of DNA methylation may gradually evolve between the stages 24 and 26. Importantly, events of DNA methylation as well as demethylation took place during the thermo-sensitive period, setting the sexually dimorphic DNA methylation patterns found in differentiated gonads (Fig. 2, Supplementary Fig. 2). These results suggest that methylation and demethylation processes are both involved in the establishment of the DNA methylation patterns of ovaries and testes during the thermo-sensitive period.

3.3. 5-Hydroxymethylcytosine DNA modification in nuclei of stromal and epithelial cells shows dimorphic distribution in ovary and testis

Even though both methylation and demethylation processes are involved in the establishment of a sex-specific DNA methylation pattern, due to the difficulties involved in acquiring samples, we decided to investigate whether an active demethylation process may be involved. For this purpose, the presence of 5hmC was analyzed, as DNA demethylation involves hydroxylation of 5mC and its subsequent excision and replacement by a non-methylated cytosine (Sun et al., 2014; Ito et al., 2010; Koh et al., 2011).

We first evaluated the presence of 5hmC in *L. olivacea* gonads and brain by Dot-Blot assay, using a 5hmC antibody (Supplementary Fig. 3). As 5hmC modification is reported to be abundant in mouse brain (Kinney et al., 2011), we used genomic DNA from that tissue as a positive control. We compared brain and gonad genomic DNA from embryos at stages 23–24 (bipotential gonads) and at stage 27 (differentiated ovaries and testes) of *L. olivacea*. 5hmC mark was found in both bipotential and differentiated gonads, whether the embryos were incubated at FPT or at MPT. Thus 5hmC modification is present in gonads as well as in the brain of *L. olivacea* (Supplementary Fig. 3).

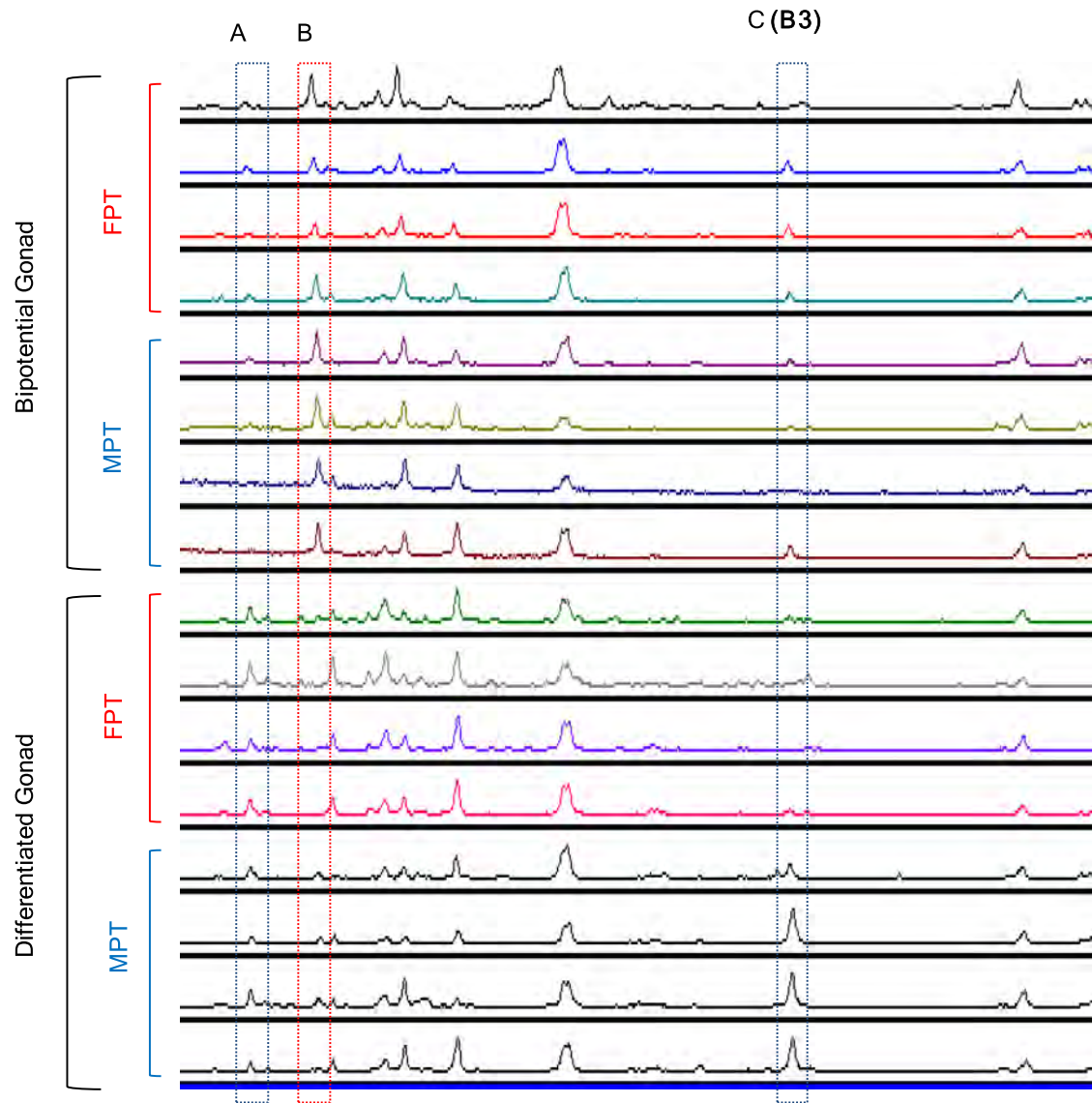


Fig. 2. DNA methylation changes during temperature-dependent sex determination. AIMS amplification products corresponding to DNA methylation patterns in bipotential gonads at stage 23/24 of embryos incubated at FPT and MPT and in differentiated ovary and testis at stage 27. Examples of DNA sequence: (A) gain in methylation (B) demethylation and (C) methylation levels differing between ovary and testis after sex determination; selected band corresponds to B3 from Fig. 1 differentiated gonad samples are a biological replicate of the samples in Fig. 1.

To study the distribution and relative abundance of 5hmC modification in distinct cell types within developing ovaries and testes, we performed confocal immunofluorescence on frozen sections. Gonads were isolated from 8 embryos of each sex, sampling four nests (Fig. 3). Interestingly, in all embryos the intensity of 5hmC signal in differentiated gonads at stage 27 showed an opposed distribution depending on the gonadal sex (Fig. 3): in ovaries, the nuclei of cells in fragmented medullary cords showed higher signal intensity than did the surrounding stromal cells; the reverse was found in the testes, where levels were lower in seminiferous cords than in stromal cells.

To discover whether this sexually dimorphic distribution originated from enrichment or losses of 5hmC modification, early developmental stages were analyzed (Supplementary Figs. 4 and 5). The paucity of stromal tissue precluded distinction between the staining of nuclei of epithelial and stromal cells in bipotential gonads at stage 24 (data not shown). The sexually dimorphic distribution of 5hmC becomes apparent in gonads at stage 25 (Supplementary Fig. 4A–D). The differences in 5hmC intensity between cell types increase at stage 26 (Supplementary Fig. 5A–D) and become clear

in differentiated gonads from stage 27 (Fig. 3). The 5hmC signal of medullary cords was considerably diminished in embryos incubated at MPT through gonad differentiation. Some clusters of cells at stage 25 and even stage 26 still maintained a high intensity of 5hmC (Supplementary Figs. 4C and 5C). These observations suggest abundant 5hmC modification in epithelial cells of bipotential gonads. In ovaries, however, a difference in signal intensity between epithelial and stromal cells first became evident at stage 26 (Supplementary Fig. 5E–H). These results suggest a gradual dimorphic loss of 5hmC modification among cells that depends upon the temperature.

4. Discussion

Genes involved in sex determination and differentiation are highly conserved in vertebrate Amniota; however, their spatial and temporal expression varies among species, owing to the evolution of the multiple layers of regulatory mechanisms (Rhen et al., 2015). Due to difficulties for obtaining samples, in the current

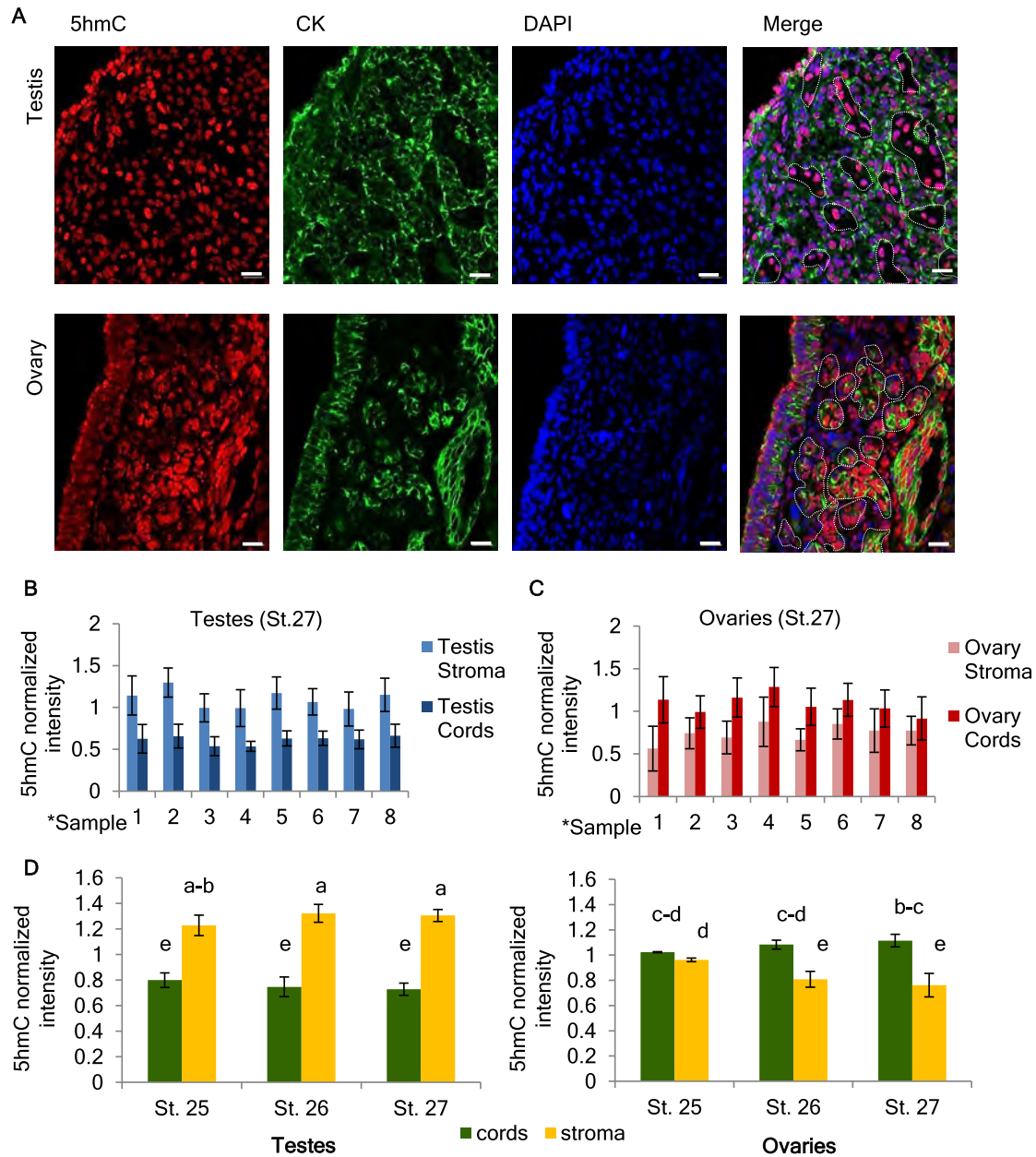


Fig. 3. 5hmC distribution between nuclei of epithelial and stromal cells of testes and ovaries at stage 27. (A) 5hmC (red) distribution differed between ovary and testis at Stage 27. In testis, stroma cells show a higher intensity than cords, whereas the opposite is observed in the ovary. Cytokeratin CK (green) marks epithelial cells of gonadal medullary cords: they become seminiferous cords in testes or fragmented medullary cords in ovaries. Dotted lines: the border between epithelial and stromal cells. DAPI (blue) marks cell nuclei. Scale bar, 20 μ m. (B and C) 5hmC signal intensity was quantified in individual stromal or epithelial cells ($n > 10$) from ovaries or testes of each organism sampled (*) (mean \pm S.D.). (C) Summary graph shows average 5hmC intensity values of stromal and epithelial cells in gonads from embryos of different incubation temperatures: MPT or FPT and developmental stages: St. 25 ($n = 3$), St. 26 ($n = 3$) or St. 27 ($n = 8$) (mean \pm S.D.). RGEWQ grouping (a–d) shows significant difference among groups ($P < 0.05$). Groups with different letters are statistically different. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

study only a few developmental time points were tested. Thus, the overall representation of all molecular events underlying gonadal development remains unclear. However, the sampled gonads analyzed correspond to two critical developmental stages: bipotential and sexually differentiated (ovary or testis). A dimorphic DNA methylation pattern was found between ovaries and testes that depended upon the incubation temperature. The DNA methylation profile in the bipotential gonad is modified by methylation or demethylation events so that the profile differs between differentiated ovaries and testes.

Cell-cell and cell-matrix interactions are crucial prior to and after remodeling of the bipotential gonad under the influence of temperature (Mork et al., 2014; Pieau and Dorizzi, 2004). Similar to the red-eared turtle (Barske and Capel, 2010), the bipotential gonads of the olive ridley turtle have two kinds of epithelial cells: Sox9-negative cells at the cortex and Sox9-positive cells in the medullary cords. Medullary cords are delimited by stromal cells formed by blood vessels, mesenchymal cells and fibroblasts. In the current study, the nuclear staining signal of 5mC modification was more intense in the surface epithelium than in medullary cells

in both the ovary and the testis. This suggests that DNA methylation may be involved in the dimorphic specification of the surface epithelium, prior to segregation of cells negative or positive for Sox9 (Díaz-Hernández et al., 2012).

Ten-eleven translocation (TET) proteins, responsible for 5mC oxidation into 5hmC, have been associated with poised promoters that present bivalent histone marks H3K4me3/H3K27me3 and are prepared to be activated or silenced during development (Sun et al., 2014; Ito et al., 2010; Koh et al., 2011). It has also been suggested that DNA methylation patterns in pluripotent cells are not maintained by Dnmt1 maintenance methyl-transferase, but rather by the equilibrium that exists between *de novo* methyl-transferases and TET proteins (Ficz et al., 2011). Concurring with those observations, we found high levels of 5hmC modification in bipotential gonads, whereas this modification appears to cease in pre-Sertoli cells. Thus, the decrease in this DNA modification in the testes may be associated with the loss of bipotentiality after the thermo-sensitive period. It is interesting to note that differences in 5hmC signal became evident at stage 25 in testes and stage 26 in ovaries, correlating with the end of the thermo-sensitive period reported for MPT and FPT respectively and the loss of Sox9 expression in ovaries (Merchant-Larios and Díaz-Hernández, 2013).

Changes in DNA methylation may be necessary for the stabilization of gene expression networks that drive the differentiation of the bipotential gonad to form either an ovary or a testis. The dimorphic 5hmC DNA modifications are spatially and temporally correlated with major structural and molecular events that occur during gonadal development in *L. olivacea*. Considering that the current study is the first to analyse the global DNA methylation and the dimorphic 5hmC DNA modifications in a species with TSD, comparison with other species needs to be carried out.

Acknowledgments

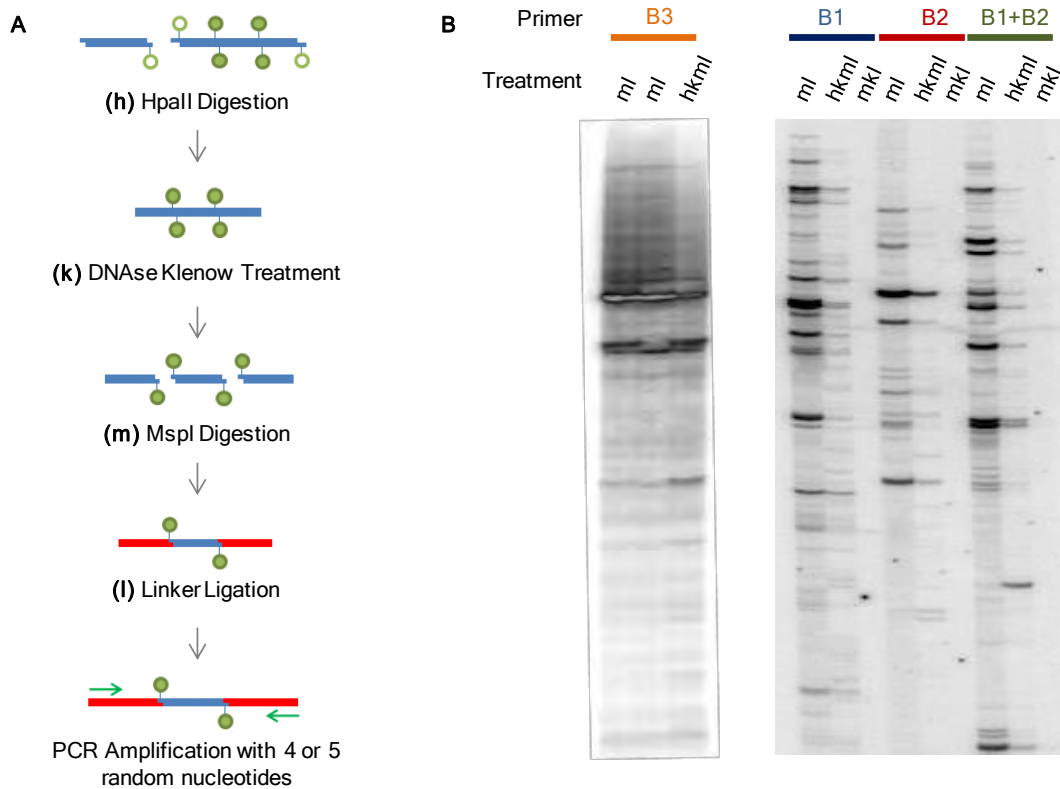
This work was funded by Grants from PAPIIT, UNAM (IN205213 and IN202115) and CONACyT (166012) to MLH and PAPIIT, UNAM (IN209403, IN203811 and IN201114) and CONACyT (42653-Q, 128464 and 220503) to RTF; also by the Ph.D. fellowship to V.D. (CONACyT CVU: 289109) from CONACyT and Dirección General de Estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP). We thank Martha Harfush from the Centro Mexicano de la Tortuga, Mazunte, Oaxaca, for her enthusiastic support and facilities to collect the eggs under permit by SEMARNAP No. 230998-213-03. The technical assistance of Georgina Guerrero-Avedaño is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

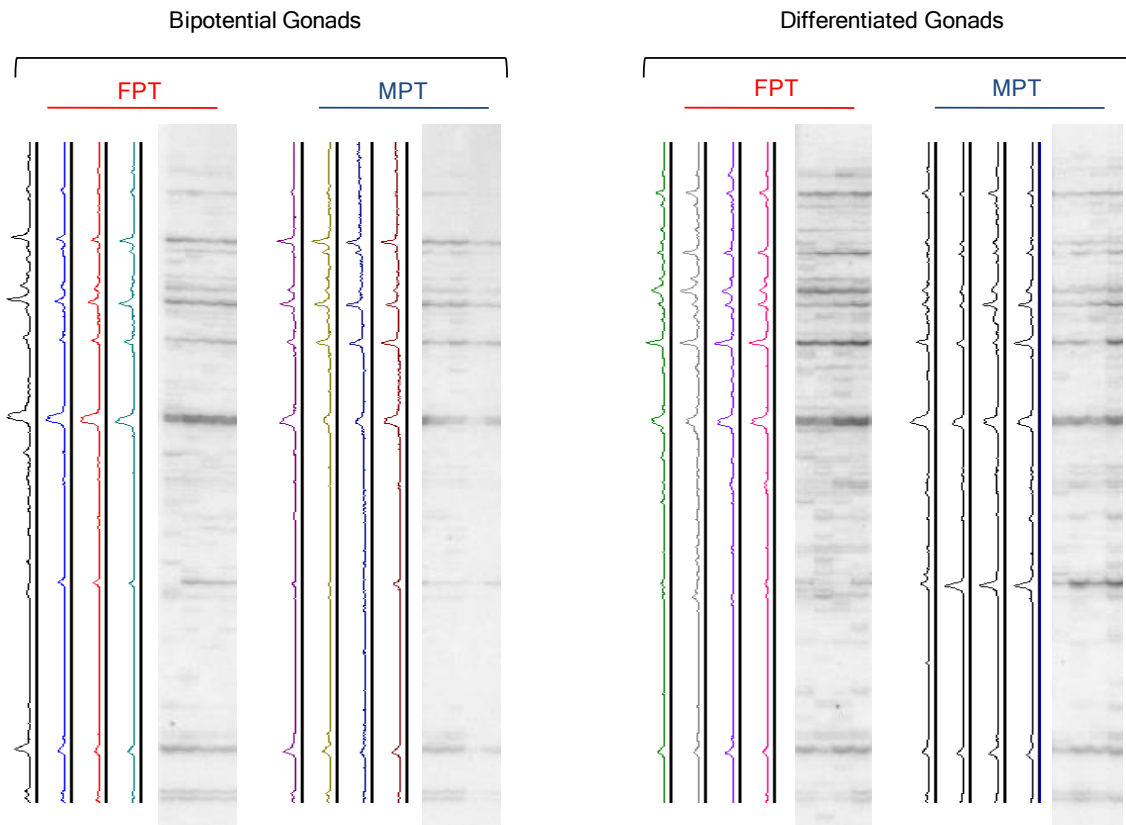
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.026>.

References

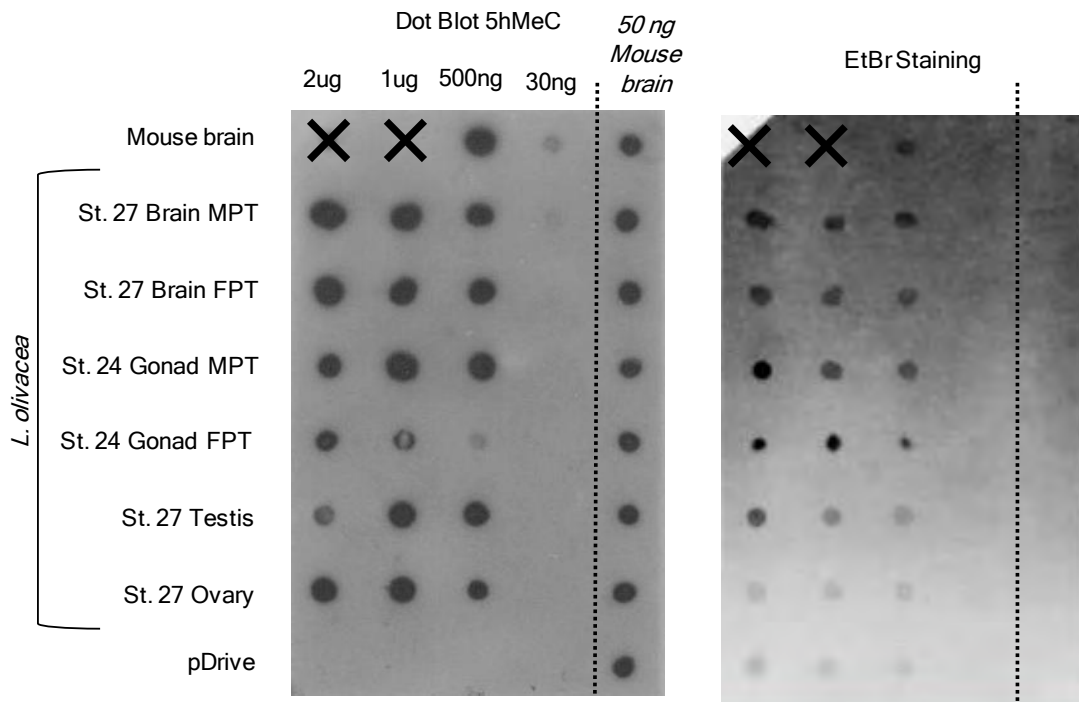
- Barske, L.A., Capel, B., 2010. Estrogen represses SOX9 during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*. *Dev. Biol.* 341 (1), 305–314.
- Davidson, E.H., Erwin, D.H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311, 796–800.
- Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., Harfush, M., Merchant-Larios, H., 2012. Formation of the genital ridges is preceded by a domain of ectopic Sox9-expressing cells in *Lepidochelys olivacea*. *Dev. Biol.* 361, 156–166.
- Ellis, H.L., Shioda, K., Rosenthal, N.F., Coser, K.R., Shioda, T., 2012. Masculine epigenetic sex marks of the CYP19A1/aromatase promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion. *Biol. Reprod.* 26 (871), 23.
- Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F., Marshall Graves, J.A., 2006. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Curr. Biol.* 16, 736–743.
- Ficz, G., Branco, M.R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T.A., Marques, C.J., Andrews, S., Reik, W., 2011. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 7347, 398–402.
- Frigola, J., Ribas, M., Risques, R.A., Peinado, M.A., 2002. Methylation profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites AIMS. *Nucl. Acids Res.* 30, e28.
- Gardner, K.E., Allis, C.D., Strahl, B.D., 2011. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J. Mol. Biol.* 409, 36–46.
- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., Zhang, Y., 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466, 1129–1133.
- Kinney, S.M., Chin, H.G., Vaisvila, R., Bitinaite, J., Zheng, Y., Estève, P.O., Feng, S., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Pradhan, S., 2011. Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *J. Biol. Chem.* 286, 24685–24693.
- Koh, K.P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., 2011. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 200–213.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Bagde, R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117–121.
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Nagahama, Y., 2007. DMY gene induces male development in genetically female XX medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3865–3870.
- Matsumoto, Y., Buemio, A., Chu, R., Vafaei, M., Crews, D., 2013. Epigenetic control of gonadal aromatase cyp19a1 in temperature-dependent sex determination of red-eared slider turtles. *PLoS ONE* 8, e63599.
- 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*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107 (3), 373–385.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., 2013. Environmental sex determination mechanisms in reptiles. *Sex Dev.* 7, 95–103.
- Miller, J.D., 1985. Embryology of marine turtles. In: Gans, C., Billet, F., Maderson, P.F. A. (Eds.), *Biology of the Reptilia*. John Wiley & Sons, New York, pp. 269–328.
- Mizukami, T., Kanai, Y., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., 2008. Five azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, specifically inhibits testicular cord formation and Sertoli cell differentiation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1002–1010.
- Mork, L., Czerwinski, M., Capel, B., 2014. Predetermination of sexual fate in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Dev. Biol.* 386, 264–271.
- Navarro-Martin, L., Vinas, J., Ribas, L., Diaz, N., Gutierrez, A., Di Croce, L., Piferrer, F., 2011. DNA methylation of the gonadal aromatase cyp19a promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genet.* 7, e1002447.
- Parrott, B.B., Kohno, S., Cloy-McCoy, J.A., Guilette Jr., L.J., 2014. Differential incubation temperatures result in dimorphic DNA methylation patterning of the SOX9 and aromatase promoters in gonads of alligator *Alligator mississippiensis* embryos. *Biol. Reprod.* 90, 1–11.
- Pieau, C., Dorizzi, M., 2004. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J. Endocrinol.* 181, 367–377.
- Piferrer, F., 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Dev. Dyn.* 242, 360–370.
- Rhen, T., Schroeder, A., 2010. Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. *Sex Dev.* 4, 16–28.
- Rhen, T., Fagerlie, R., Schroeder, A., Crossley, A.D., Lang, W.J., 2015. Molecular and morphological differentiation of testes and ovaries in relation to the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Differentiation* 89, 31–41.
- Shoemaker, C.M., Crews, D., 2009. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 293–303.
- Simon, M.D., Pinter, S.F., Fang, R., Sarma, K., Rutenberg-Schoenberg, M., Bowman, S. K., Kesner, B.A., Maier, V.K., Kingston, R.E., Lee, J.T., 2013. High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* 504, 465–469.
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., Sinclair, A.H., 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267–271.
- Sun, W., Guan, M., Li, X., 2014. 5-hydroxymethylcytosine-mediated DNA demethylation in stem cells and development. *Stem Cells Dev.* 23, 923–930.
- Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C.S., Spada, F., Leonhardt, H., 2010. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 38, e181.
- Teranishi, M., Shimada, Y., Hori, T., Nakabayashi, O., Kikuchi, T., Macleod, T., Pym, R., Sheldon, B., Solovej, I., Macgregor, H., Mizuno, S., 2001. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chromosome Res.* 9, 147–165.
- Yang, X., Zheng, J., Qu, L., Chen, S., Li, J., Xu, G., Yang, N., 2011. Methylation status of cMHM and expression of sex-specific genes in adult sex-reversed female chickens. *Sex Dev.* 5, 147–154.
- Zentner, G.E., Henikoff, S., 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 259–266.



Supplementary Figure 1. Amplification of Inter-methylated Sites (AIMS).(A) AIMS protocol includes sequential treatment of genomic DNA samples: (h) Methylation sensitive digestion using HpaII endonuclease; (k) Blunt ends formation with DNase Klenow; (m) Methylation sensitive digestion with MspI endonuclease; (l) Ligation of sequence specific linkers to sticky ends and PCR amplification over linkers using primers with 4 (B3) or 5 (B1 and B2) random nucleotides during PCR amplification were analyzed. (B) Bands were better resolved using 1 or 2 sets of primers with 5 random nucleotides.

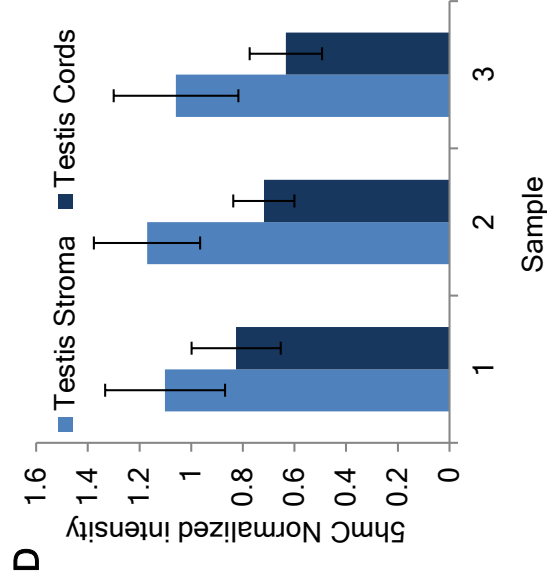
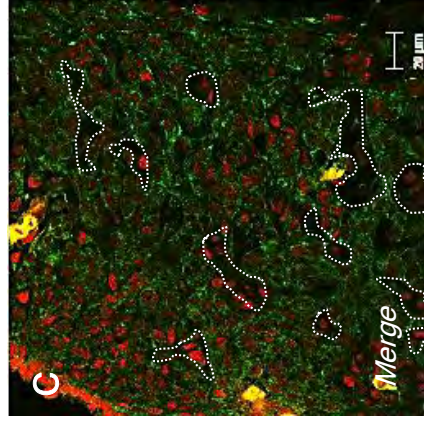
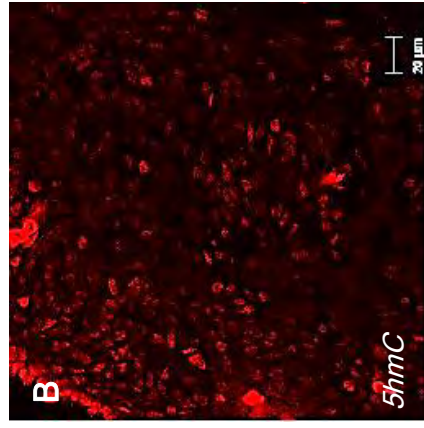
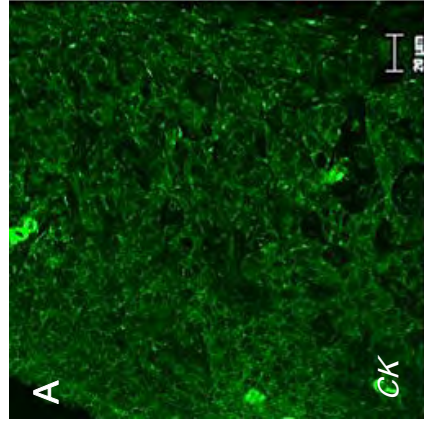


Supplementary Figure 2. Amplification of Inter-methylated Sites in bipotential and differentiated gonads. While DNA methylation patterns appear similar in gonads from embryos incubated at female- (FPT) or male-producing temperature (MPT) at stage 23/24, the patterns are different at stage 27. Four representative PCRs are shown for each developmental stage and incubation temperature sample. Histograms show relative intensity of the bands in each line.

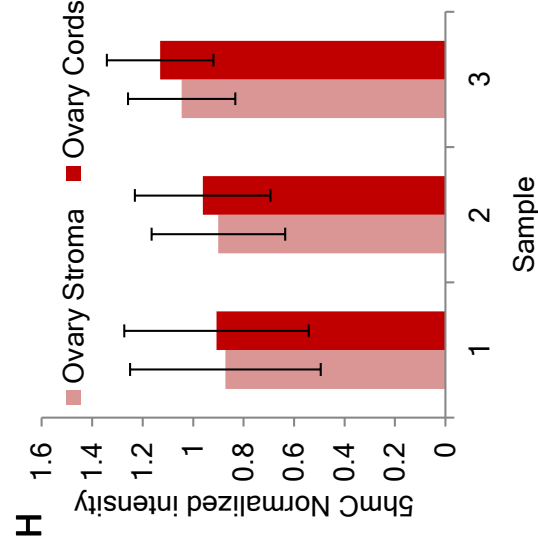
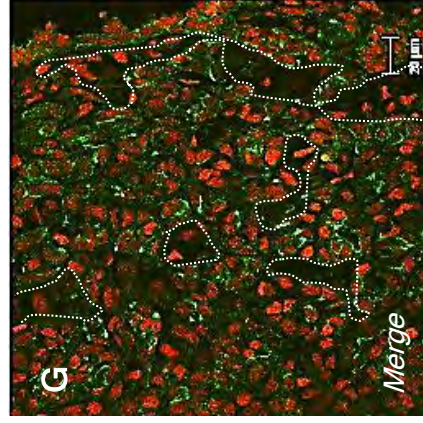
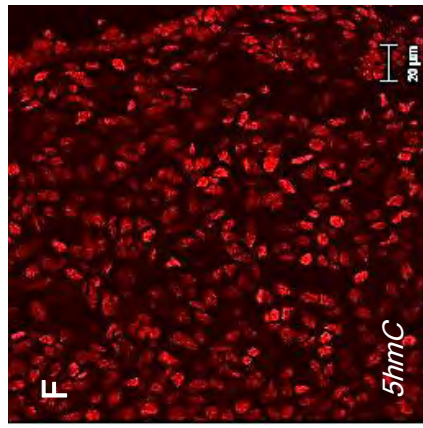
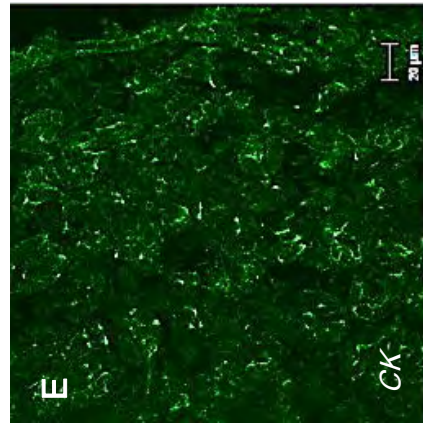


Supplementary Figure 3. 5hmC Dot Blot Assay (non-quantitative). Brain and gonad DNA proved to be enriched on 5hmC mark in *L. olivacea*. Left panel: brain and gonad DNA from embryos at stages 23/24 (bipotential gonads) and 27 (differentiated ovaries and testes). Positive control, mouse brain DNA; negative control, pDrive cloning vector. To avoid saturation, mouse 1 μ g and 2 μ g samples were not loaded. Right panel: ethidium bromide staining for DNA loading.

Testes (Stage 25)

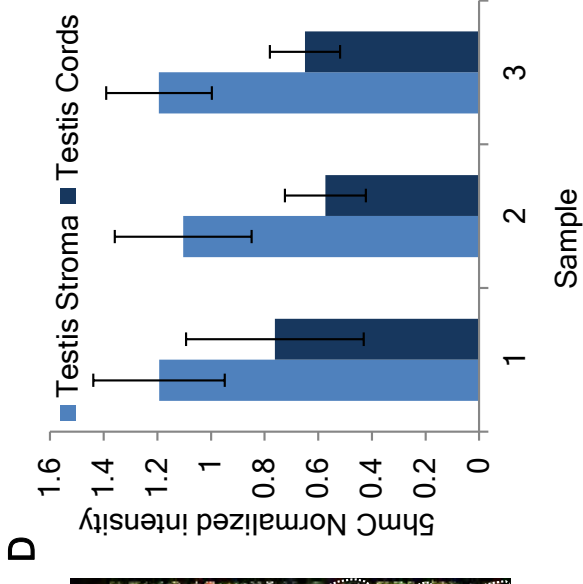
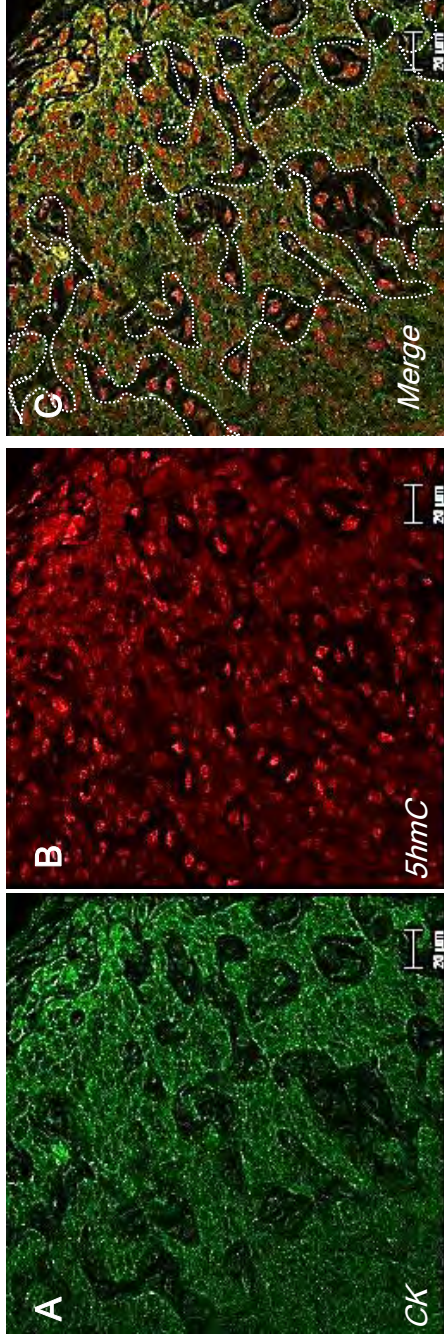


Ovaries (Stage 25)

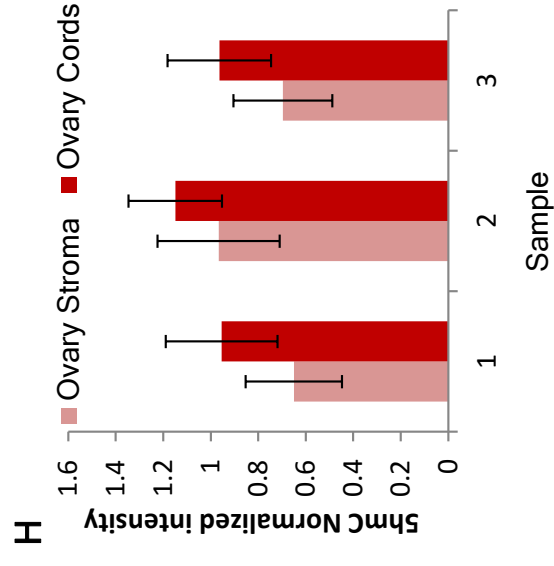
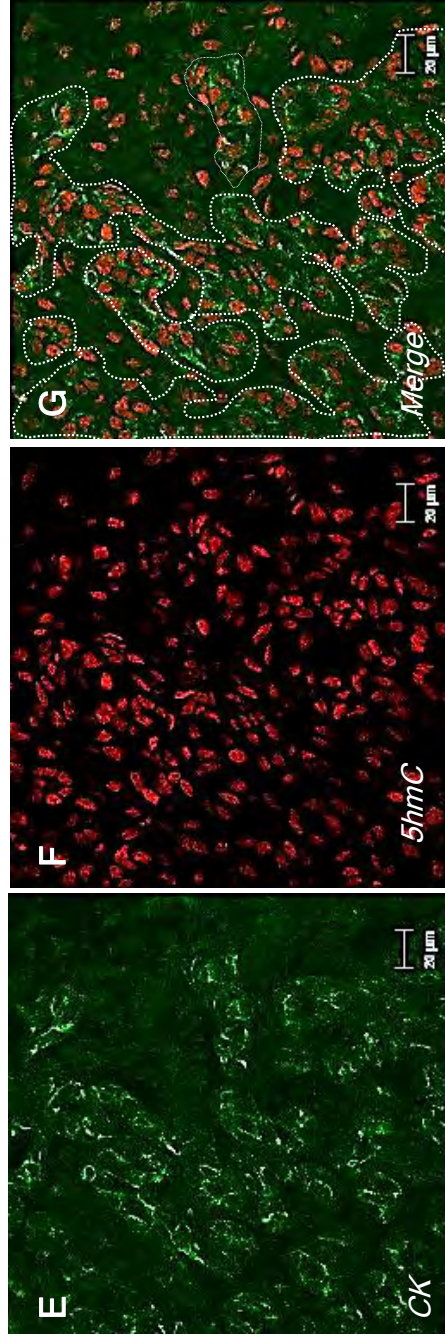


Supplementary Figure 4. 5hmC distribution between nuclei of epithelial and stromal cells of testes at Stage 25. A and E) Cytokeratin (green) marks pre-Sertoli cells in medullary cords. B and F) Differential distribution of signal intensity of 5hmC (red) between stromal and epithelial nuclei becomes evident in testes. However, there is no evidence of differential distribution of 5hmC between stromal and epithelial nuclei in ovaries at this stage. C and G) Merge. Dotted lines: the border between epithelial and stromal cells. Scale bar, 50 μm. D and H) 5hmC signal intensity was quantified in individual stromal or epithelial cells (n > 15) from gonads of each analysed organism n=3 (mean ± S.D.).

Testes (Stage 26)



Ovaries (Stage 26)



Supplementary Figure 5. 5hmC distribution between nuclei of epithelial and stromal cells of ovaries at Stage 26. A and E) Cytokeratin (green) marks epithelial cells in pre-Sertoli cells forming medullar cords and cortex in testes and fragmented medullary cords and the cortex in ovaries. B and F) Differential distribution of signal intensity of 5hmC (red) between stromal and epithelial nuclei becomes evident in ovaries and increases in testes C and G) Merge. Dotted lines: the border between epithelial and stromal cells. Scale bar, 50 µm. D and H) 5hmC signal intensity was quantified in individual stromal or epithelial cells ($n > 15$) from gonads of each analysed organism $n=3$ (mean \pm S.D.).

	Stages 23/24		Stage 25		Stage 26		Stage 27	
	MPT	FPT	MPT	FPT	MPT	FPT	MPT	FPT
IF	3	3	3	3	3	3	8	8
DotBlot	5 (1 pool)	5 (1 pool)	5 (1 pool)	5 (1 pool)	0	0	5 (1 pool)	5 (1 pool)
AIMS	20 (2 pools)	20 (2 pools)	0	0	0	0	20 (2 pools)	20 (2 pools)

Supplementary Table 1. Number of embryos used for each procedure. Pools were made from pairs of gonads. IF: Confocal Immunofluorescence. AIMS: Amplification of intermethylated sites. MPT: Male-promoting temperature. FPT: Female-promoting temperature.

Band	Size	Score	Identity	Location	Closest gene annotation
B1.1	770bp	640bp	92%	JH584699:1,998,946-1,999,713	EP400 (intron/exon)
B1.2	784bp	341bp	85%	JH584524:603,907-604,612	Tmem135 (intron)
B1.3	772bp	502bp	88%	JH584464:15,068,350-15,094,998	Socs3 (5Kbs downstream)
B2.1	666bp	30bp	96%	JH584547:2,591,827-2,630,562	Npm3 (14Kbs downstream)
B2.2	671bp	481bp	93%	JH584893:563,697-564,255	Rgs6 (130Kbs)
B2.3	654bp	506bp	91%	JH586565:6,796-7,396	No genes, fragment not assembled
B2.4	669bp	474bp	89%	JH584753:3,103,880-3,104,551	A4gnt (35Kbs downstream)
B2.5	663bp	37bp	95%	JH584630:847,244-847,287	Znf gene (last exon)
B3.1	342bp	241bp	93%	JH584606:5,555,043-5,555,343	Cstb (first intron)
B3.2	345bp	198bp	91%	JH585262:182,113-182,438	Lrrc4 (16Kbs upstream)
B3.3	349bp	203bp	87%	JH584592:4,824,844-4,825,133	Gata3 (30Kbs downstream)
B4.1	257bp	125bp	82%	JH584682:9,189,815-9,190,064	Rarb (intron)
B4.2	256bp	169bp	89%	JH584800:176,333-176,535	Sept12 (first intron)

Supplementary Table 2. AIMS bands sequence analysis. Bands obtained from AIMS were purified, re amplified and cloned (B1-B4). 5 clones for each band were sequenced. Several different sequences were obtained from each band. A BLAT analysis using UCSC Genome browser against *Chrysemys picta* reported sequence was performed for each band. The results from the highest score match are shown. Closest gene annotation refers to mRNAs from different vertebrates, not necessary for *Ch. picta*. Sequences with highest score of less than 100bp are highlighted in grey.

Band	CpG sites	Sequence
B1.1	12	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCTTTGCTCCGCTCCTCCTTATGGCTTCTCCTTTCCCTC ATACAACCTCCACACCTATGTGTTACAAGTCATAGCTTTTCCAAGCAACAGTGTGAGCG ATTTTTAGTTGGTTTCACTGCTGTCCACAAGGGTTTTGAAGAGTAGTTCATGAAGCCAA TCCGCTTCTTTGTCAGTGTGCTGTTGCTGCTCTTGGAAAAGCTGTGAGCAGCAGCC GAGGCAATGAAGCTGTTGGTCTGCAGATTCAAGAAATCAGCATTGCGTCAGTTGAAAT TTGTTTTTTTTAAAGGAAAGCTTAAATTTAGCAGGCACAGGTGGGCTTGGTCTCCCTG TTCCCCTGGGAAAGTTGAGTGGGTTAATCATTTTTCTCTTAAGCTTTTATTTTGCATGTAC TTTGCAGGTTGTTTCAGCCAGTTCAGTATGGGCAGAAGCCTGAGGGCAGGACTGTAGT TTTTCCAAGTGCTCAAGTACAGCGGACAGTGACCACAGCAACGGTAACCTCAGCAGGA CAAGGGCGAGGAAGGTCACCCATTGCTACAGTATCTGCAAATCAAGGTAAGAAAGGT ATTGCGACCTGAGTTAGTTAAGCCTCCGAATATACTGACATATGCTAGTTTGTAAATAG AACTCTTCTTTCTCTAGCTTGATGATCTAGATTGCTAATGGCTTTTAAAAAATAAAA TAAAAACAAGCTAATAGCCAATACATTTCTCCACTAGTTGCTACAGTGTGACCTACC ATTGTAGT
B1.2	14	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATTAGTAGCCAATCTCATTTTCGTGGGCAAGGTAAGTACTGATC GAAAGGTGAGGAAGGTGTCTTTGATCTATAAAAATCGACACACTCATCATATCAATG GTGTCACCCACTTATGTGTGGCGGGAGGGACTCACTCCCCTCCTCTCTGGCTCCC TCCTCCAGGTCTCCGGTTGGTGGAGATTTTGACAACATAGCAGCGTCAGAAATGGGT CGAGTTGAGTTTCATTCAAAGGCCTTTTCCCCACAGACACTGTGGCACCAAGCATG ACAAACCCAGAATAATGATGTAGATCTATACAGTCAAGAAAAGGTTTTTAAAAAAT CAACATTTTTTAAAAATTTACTTTAGCATAGTGTATTGCTTACCTCAAAAAGACAT TGATCTTGCTAACACTAGGGAAGTTGTCGTTGCTGTGTAGGACTGATACATTTATTCA TCAAATTCATCATCAGTGTCTCTGTCTTGGGTCAGTGTAGATGCGTTGTACATTG ATCCTCATCTACGCTGCACCTGCACATCTCCATACCGGGCAGGCTGCTGGCCAAACATC TGTGAGCTGGTGAGCATCTGGTCTTTGCACACAACCATTTGATTAGCTGGAGGTTGATT AAAAAGTGCATGGTGTTCACACAACCTGGTGTGATCAGTCCATCCTCCAAGACCCAT CCATGCCTGATAGGATAGGGATGTGCTCATTATCCCAAAGCCAATACACTGTTTGAC AATTTGCCCTTGATATCCGTC
B1.3	26	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATTAGCGAGCTGATTTTCAGAAAGAGCTGAGCACTCACT TTCTCAAACACCTCCCCTCCATCACCAGTCACTGAACATCTTGGCCCACGTTGGTTCCA TATCTCCCCTGGGTGCTGGGAGATGCAGGTGTCGGTGAAGCCTTCCGAGCCCCGTCAG CGAGAGGCGCTGGAAAAGCCCAAAGGGTATTAATTCAAGGGCTTTGCCCTGCCCT CACTTCAGGCCCTGTGCCAAGTGCAGCAAGGTCTGGATGAACTCATTCTGGCACA CTCCCCTGGTGCCCATGCGCCAGCAGGGATGTGTGTGGTCTGTGTTGCCTGGAGGA CAGTCTAGGCCCGAGCCCCAAGCACAGCTGGGCAGCTTGCTTTATTTGCAGTGGGGG AGAGTGGGCCAACCAGCTGCCAATCAGCGCTCCACCCACTACCCCTGGGCCAGCTG TCAGTGAGGTCAGGGCGGGCAGTCCAGCCTTCACCTTCATTTCTCCAGGAGAAAC TTGCTCAGGACCTTGGGGCTCTGACGTCCAAAGAGGCAGGGGCTGTGGTGCAGGCTT GGTCGCCCTCGAGTGCCGTTAAGCAGTGCATGAGTTTGTGCGATTTGCTGGACTCCTG TAATGGGAGCTGCACTCCCCGCTCATTGTGCTCTGAGCTTTCCAGAGCTCCAGCCCT CACCCAGCTGCGAGGCGGCTCGTCCCTTCTCTTCGGGTGGTTGGATATCCGTCAAGCT TTGCGAATAATCAA
B2.1	37	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCCCAAGGACGTGCCGACTTCAGGATCGCCAGCTGA TCATCACTTCATGTACGACACGTACATCTGAAGATAAACCAGTACAGGTTCTGAGG CTTCAGGCATTGAAATCAGCGCACGCGGTACATCGACTGTGCCACTCAGACTCAGTTTT TTATTAATGGATACATGTCCAAAGTCAAATCAGGTGTCAGTACAGCGGTAATTAATG GGCCTGACGAATCAGCAGATTGTCCCCTTGCAGTTTTAACTGCACCCGCGGATCACCT TTCCATTCCACAGAACCAGTTAATTTGCCACACCACGGCCACTGTTAAATGCGCCATT GATGCTGGCCGAATTCTAACGTATGGATGAATAGAGCTGTACATTGGTCAAATTCACC GGTAGGGAGATCATGCTGATTGAAGCATCTTTGACACGAACCTCACCTTCAAGCAAAG GACCCGCTAAAGTTCCGCTAATTTTTCCGGCATAAGATAAAATCCCGTCCAGATTACG GATGCTCCTGAATAAATGGCTTAAAGACTTTGAGCCGTACCTGGTTAAAGGCAATTTCCG CCACGCATCGGTTACTGTCAGGTATGGATCAATGATGACATTGGCATAGCCGGTTCC GATATCCGTGAGGCTTTGCGAAT
B2.2	5	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATTAGGAGACCCACACACAATGACATTCACTTATATTTT CATATTTTATAATTCTCCAGGAAAATCCTTATATTTCACTTCCAACCTGTTTAAAGCT GATGCTCCTGACTGAAACCAGAGGGCTGTTGTGCATTTTTCTTTCTATTCTCTTGCCTT CTACTTTTCTGTCTCTGATGAGTGATTTTTAAATGTTAACTGTCAGTGAAGTACCTGCC TTAATTAAGATAAAGACATGTTTAGACTGATGTTGAAATGAAAGAATCACACATTA CTACTGCCGAAGCTGGAATTTTTGGAATAAAGATGAACTAAAGCATAAATATTCCAGA

		CAAAC TTCATTATACCAAGATCTTCTCAGGGAGGAAAGATGTCCTAGCTGTTAAGACA TCAAAC TAGAATCAAAGGTCTAGATTCTATTCCCAGAATGCCACAAACTTGCTATATG ATCTTGCTCAAGTTGTTTAATATTTTTGTGTAGCACATCTGTA AAAATGGGGATAAATAA TATTTCCCTATCATTTAGCAGTGCTGAGAGAATACATCCATTAATGTTTGTGAAGAGCT CTCAATGCTGAAAGAACCACAGAAAAAGACTAATTTGATAACATCTTACCAGACTATC TAATCCGTCAGAGCTTTGCGAAT
B2.3	5	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCTAGAGATTTGAAATCAAAGGATGAGAAATGGA AACCTATAAAATCCCCTAGAAAGAGGCAGGGTAATTATTATCAGAGCTTTTGAGAATT GGGGGAAATGAGTGATATGTTGGAATCTATACTGTCCAATATTACATAATGATCTTCA CCTCTATGTGATGAATATATTATCAAATAATTCTCCATTAGTACCCTTAATCAGTCATA ACTAGCTGACACCCCAACCTAGAAATCTGGATGATTCAAGGGATTGGCAAATGAACTA CAGAACATTGTACCCCAAGAATACTGCTTTAAATTTGGTTT CAGAGCAGTAATAGCACTTC ACCCTTCTGTTGCATTTTAATCTAAGGATCTCAAAGCACTTTAAAGACATACAATTTAC CACACTCTATTAGGTGCATGTTATCATCACCCCATCTTATGGGTGAGTAAATTTGAAG CAAAGAGATTTAATGACTCACTCAAAGTCACACAGCTAGAAGAACAAGGGATGGAAG CCCCAGCCCCCTACTCTAACCACTAGGCCATGCTGTCTCGGTGAACAAAAGTCATGT GAATACTGTTTCATGGTCTATCTGTAGTCAGTCAATTAGCTCAGCCACTAATCCGTCAG AGCTTTGCGAAT
B2.4	15	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCCTGCCAATGACTGGAACAGCTGTAGTGGGTCCAG TCCCAGAGACCCAGCCAAAGTCAGTCCCAGAACC GGA ACTGATTAAGCAACCAGCACT GAGTCCAGTGCTTGCAACCCCGTCTGCAGCCCCAACACCAGAGGGCACCACCGAGCCC GCATTGGCAGCAGAAGATAAACCAACGCAAAAGGCTCAGCTGGAGCCTGAACCCCAA CCTAGTGCACCCGTGGAGAGCGGTTCTTCATCAATGGAAACAGCCCATCACCTGCAT TGCTTCCAGAGGGACCAAGCCCAGGTCCACAATCCAGCGAGGA ACTGAGGTCTCCAGT ATCAAGGGATCAGTTCAGGCCAGACAGAAAGCAGATGAAAGCCTCCAGGGAGCTTG GATGGTGGCACGAAGCAACCCATCTCCTCTCAACTCTTCTAATCGATCCAGGTTTGTTG TAGAAAGAGGGTTTTTATACAAGGAAA ACTGGTATCCTCAGAGACAGCTGGTAATTCC AGCTAAGTACTGTGTAAGGCTCTTTAGCCCATGATCATCCTAGTGGCCATGCTGGGGTG AACAGGACCAAAGACTGTTTGGAGAAGTCCTTCCACTGGGAGGGAATGGGCAAGGAC GTTTCTACCTAATCCGTCAGAGCTTTGCGAAT
B2.5	14	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCCCACACTGGGGAGCGGCCCTACAAATGCCCCATC TGTGAGAAACGCTTTGCCAGAGCTCCAGCACCAACCAGCAAGAGCAGATCCATGGTT GCAGAGAGGTCCCAAATCCCACACAGCGCAGGAGGCTTCAGCCACAGCTTGGACCTT CCTGACCACCAGAGATCCCACGCAGCATGAAATCTGGGCTGCTACCCCAACCCCAAGT ATGTGGGACCCCTCCCCTAAGTCACAATATCTGGGGTCAGAGGAAGGAGAGTGCCA AGGCTGTGGGTTTGAAGGCTCTGGAGGTGGTGAATAAGGGTTTGTCTGCACTGGGG AAAGCCA ACTAGCATAGCTGTCCCGGTGTA ACTACTCCACTTAGCTATCCCATGTAA CTATCCCCTCTAACTGTCCTGGTGTAACTACCCACTCTGGCTAGTCTGATGTAGCA TAGCTATTCCACATAACTACCCTGCTTTTAGCTGTTACACTGGAACAGCTACAGGGCAG TGGAATTACCCCGCTCTAACTTTTTGGCGTACCCATCCTGCTCGAGCCGTTCTGGTGT GCTGTAGCTGTTCCAATGTA ACTAACCCTCTACCTCGCCTGGTGTAAATGTCAGCTAA TCCGTCAGAGCTTTGCGAAT
B3.1	6	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATTAGAGTGCCAGGGTGGGCGCTACACTCCAATGTGCT CTGGTGCATCTCATGTT CAGTCTCCTTTTTCCACAACAGAGGGTGGCAACACCAGTAG GACTAAGATGGCACTTCAGGGCATGCATGATCACCTCTGTGTGAGGAGAGACCTTGGC CAGTAGAGGCACCTGGACAGTTTCTGATTAGTGGGTGGATCATTTATCCCAATTTAC TCATTCCATAGTGTGTGGAAGAAAGAAGTGCAAGCATGGACAGAGCTCTTCTCTCCG CCACCCCTAATCCTTGACACCCCAAGGATATCCGTCAGAGCTTTGCGAATA
B3.2	34	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATTAGCCGTACCGATTTAAGCCGATTTCTGCCAAGCTGG GTTTAAGGGATCTCGAAGCAGCCGCACTTTTCGCCGGGGGCTTTTTCGGCCCGCTTTTCC ACGCAGCTCGAGGCGGCATCCTCGCGGTTTCAAGCTCAGGGGAGAGCGACACCACGTG TGTGAACGCAACCGCATCCACCGGCAGCACCCGCCACTGCTTCCCTCAGATGGGTTT TGAGGTGAAAACCTGGACAGGGACGACACGCCGCTCAATGTCTAGGGGTTAGCTGGC GCAACGCGGCTCCTCTGACAACCTCGCGGATATCCGTCAGAGCTTTGCGAATA
B3.3	24	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCGACGCTGTGGCGATCGATGCACTGGGGGGTTCGAT TTAGCGGGTCTAAAGAAGGCCTACTAAATCGACCCGAGATCACTCTCCTGTCAACTCC GGTACTCCACCGGAATGAGAAGAGTAAGGGAAGTCGACTGGAGAGCGTCTCTCGTTG ACGTAACGTGGTTT TAGACACCCCAAGTAAGTCGACCTAAGCTACGTCGACTCCAGCTAC ATTATTCATAGCTGGAGTTGCATAACTTAGATCGATTTACCCCGTAGTGTAGACAA GGCCTCTGAGATGGGAAAAGACCTTTTAGGTGAACTAATCCGTCAGAGCTTTGCGAAT

		A
B4.1	6	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCCCACCTTCTATGGGCGTGGGCCTGTATTGCCTTGGA CCAGTGGGTGCTACGCACAATAGCATTAGGATACATCCTTCAGTTTTGTTGTTCCCTCT CTTTCTCACACCTTTCAGGGACTCTTTTCATGGGCAACTTCTAGCCCAAGAAGTGCAA TTGCTCCTAAGGATGGGAGCAGTGGAAGAGGTTCTGCCATTGTTAAGGGATATTTCT AATCCGTCAGAGCTTTGCGAAT
B4.2	11	ATTCGCAAAGCTCTGACGGATATCCCACATGTCCCAGCACTCCCACCTGGGCATGGGA CTAGGGATTTTACTGCTGTCTTCTTAGACTCCCCACGCGTTAGCAAATGCAGATGGCAG GTGTGCCACCCCCCTTCCACCATCACTGCGGTCTAGGATCTCTTCCCTGCTGGAGACC CTCATGGGGCGACCGGTGACCCCCGCTGGCCCCTTATGTCACCTCAGGCGGGAAACCT AATCCGTCAGAGCTTTGCGAAT

Supplementary Table 3. AIMS band sequences. Bands obtained from AIMS were purified, re- amplified and cloned (B1-B4). 5 clones for each band were sequenced. Several different sequences were obtained from each band.