



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA VASCULOGÉNESIS E INERVACIÓN DURANTE
EL DESARROLLO GONADAL DE LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CHINO PALOMO LUIS JAVIER

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , JUNIO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA VASCULOGÉNESIS E INERVACIÓN DURANTE
EL DESARROLLO GONADAL DE LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CHINO PALOMO LUIS JAVIER

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/467/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 01 de marzo de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** del estudiante **CHINO PALOMO LUIS JAVIER** con número de cuenta 519020593 con la tesis titulada “**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA VASCULOGÉNESIS E INERVACIÓN DURANTE EL DESARROLLO GONADAL DE LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea***”, realizada bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARICELA VILLAGRAN SANTA CRUZ
Vocal: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
Vocal: DR. RODRIGO MACIP RÍOS
Vocal: DR. LUIS RAMOS TAVERA
Secretario: DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ

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

ATENTAMENTE
“**POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU**”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de mayo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El trabajo fue realizado gracias al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

Este trabajo se realizó gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-UNAM: IN209520 y el IN201218 del presupuesto anual recibido por la Facultad de Medicina, UNAM.

Al apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la Beca Nacional para Posgrados de excelencia con numero de CVU: 766504.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la doctora Verónica Díaz Hernández.

Este trabajo contó con la asesoría de los miembros del comité tutor; el Dr. Horacio Merchant Larios y Dr. Fausto Roberto Méndez de la Cruz.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a la Dra. Verónica Díaz Hernández por brindarme todas las facilidades académicas, administrativas y económicas para continuar con mi desarrollo académico. Además, del asesoramiento y dirección del presente trabajo de tesis.

Este proyecto conto con los permisos de colecta científica de huevo de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* otorgado por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) número SGDPA/DGVS/06090/19 y SGDPA/DGVS/04317/20.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo coordinado del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Mazunte, Oaxaca. Bajo la dirección de la Bióloga Denisse Bermúdez Díaz.

Otorgo especial reconocimiento al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia por el apoyo dado en el manejo y cuidado de embriones, así como, su asesoramiento en la obtención de muestras.

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios por las facilidades otorgadas en su laboratorio y poner a disposición el material y equipo necesario.

Brindo un especial agradecimiento a la alumna de biología Paloma Domínguez por su apoyo en el procesamiento de muestras biológicas y en el trabajo de laboratorio.

Me gustaría agradecer a la M. en C. Martha Harfush Meléndez, Investigadora del CMT, y al Biól. José Roberto Cruz Alcántara por coordinar y participar en la colecta y transporte de muestras biológicas.

Al Biól. Ángel Guillermo González Padilla y al Biól. Andrés Mariano Alcántara por el apoyo en el Campamento Morro Ayuta para la colecta de muestras biológicas.

Agradezco al Dr. Fausto Roberto Méndez de la cruz por el tiempo brindado en la revisión de este trabajo de tesis.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, responsable de la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Quien nos brindó todas las facilidades y asesoramiento para la obtención de las imágenes analizadas en el presente trabajo de tesis.

A la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. En especial a E. López, S. Becerra, J. Yáñez y P. Gaytán por la síntesis de oligonucleótidos utilizados en este proyecto.

A la M. en C. Patricia de la Torre, encargada de la Unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Por la secuenciación de los productos amplificados reportados en este trabajo.

A los miembros del comité por su participación en la revisión de este proyecto.

A mi universidad y a los profesores que me formaron durante el camino académico, gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, por su invaluable amor y esfuerzo:

A mi madre María Irene Palomo

A mis hermanos Robert y Lourdes

Y en especial a mi padre José Francisco Chino Juárez.

A mis amigos y compañeros durante esta etapa de la vida:

Mariela Palomo Guzman

Adriana Castro Domínguez

José Roberto Cruz Alcántara

Andrea Hernández Romero

Paloma Domínguez

Eduardo Colin Hidalgo

Pedro Cuauhtémoc Collazo

Xitlali Sánchez Girón

Con quienes compartí momentos memorables.

Índice

Abreviaturas

Glosario

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Reproducción sexual	3
Estrategias de Determinación sexual.....	3
Determinación sexual por temperatura (DST)	4
Determinación sexual en <i>Lepidochelys olivacea</i>	5
Periodo termosensible en <i>Lepidochelys olivacea</i>	5
Sexo gonadal en <i>Lepidochelys olivacea</i>	6
Formación de la cresta gonadal en <i>Lepidochelys olivacea</i>.....	7
Gónada indiferenciada de <i>Lepidochelys olivacea</i>	8
Gónada diferenciada en <i>Lepidochelys olivacea</i>	10
Influencia del estroma en la diferenciación sexual de la gónada	11
Vasculogénesis y Angiogénesis	13
Vascularización de la gónada en mamíferos	13
Inervación en la gónada	14
Inervación extrínseca e intrínseca de la gónada.....	14
Inervación en gónadas de mamíferos.....	15
Factores de crecimiento	15
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)	15
Factor de crecimiento neuronal (NGF)	18
Preguntas de investigación.....	19
Objetivo	19

Antecedentes	19
Vascularización de la gónada en Reptiles con DST	19
Inervación en gónadas de reptiles con DST	21
Influencia del sistema nervioso en la diferenciación sexual.....	22
Metodología	23
Obtención y manipulación del material biológico	23
Diseño de muestreo	23
Obtención de los complejos urogenitales y procesamiento de tejidos	24
Inmunofluorescencia en criosecciones	24
Inmunofluorescencia anti Sox9 – β -III tubulina	25
Inmunofluorescencia anti Sox9 - Cav1	27
Inmunofluorescencia anti NeuN – β -III tubulina	28
Inmunofluorescencia de los complejos urogenitales completos	30
Procesamiento de muestras para análisis de factores de crecimiento	31
Extracción de RNA	31
Síntesis de cDNA.....	32
Diseño de oligonucleótidos	33
Estandarización de las condiciones de PCR punto final	34
Purificación de secuencias amplificadas para secuenciación.....	35
PCR punto final	35
Análisis estadístico	36
Resultados	37
Caracterización de la inervación mediante inmunofluorescencia	37
Neuronas intrínsecas del ovario	48
Caracterización de la vascularización mediante inmunofluorescencia	50
Análisis de los perfiles de expresión de factores de crecimiento	58
Análisis del factor de crecimiento nervioso	58
Análisis del factor de crecimiento de endotelio vascular	59

Discusión	62
Conclusiones	68
Referencias bibliográficas	69
Anexos	77
Organismo de estudio	77
Clasificación taxonómica (Eschscholtz, 1829):	77
Caracteres morfológicos	77
Estatus de conservación	78
Secuenciación e identificación de genes	79

ABREVIATURAS

Tabla de abreviaturas			
Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AchE	Acetilcolinesterasa	Hg	Intestino posterior
Cav-1	Caveolina 1	Mes	Mesonefros
CE	Célula endotelial	mRNA	RNA mensajero
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario	NEuN	Neuronal nuclei
CGP	Células germinales primordiales	NGF	Factor de crecimiento neural
Cm	Cordones medulares	No	Notocorda
Cs	Cordones seminíferos	P	Células peritubulares
Da	Aorta dorsal	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Acido desoxirribonucleico	PPIA	Peptidil propil isomerasa A
Dmrt1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	PSG	Prospermatogonias
DSA	Determinación sexual ambiental	PST	Periodo sensible a la temperatura
DSG	Determinación sexual genética	RNA	Ácido ribonucleico
DST	Determinación sexual por temperatura	Rspo1	R-spondin1
Dpc	Días post coito	S	Células de Sertoli
E	Espacio estromático	Sox9	SRY box 9
Fc	Fibras de colágeno	Sry	Sex-determining región Y

ECS	Epitelio celómico superficial	TF	Temperatura feminizante
Et	Etapa de desarrollo	TM	Temperatura masculinizante
FoxL2	Forkhead box L2	VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
G	Gónada	Vs	Vasos sanguíneos
H	Hilium		

GLOSARIO

β -III tubulina: Proteína perteneciente a la familia de las tubulinas. Conforman los microtúbulos en células neuronales inmaduras.

Acetilcolinesterasa: Enzima cuya función es hidrolizar la acetilcolina después de haber permitido la transmisión de la sinapsis.

Alelo: Cada una de las alternativas de un gen.

Andrógenos: Hormonas sexuales masculinas. Estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales.

Angiogénesis: Formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.

Anticuerpo: Proteína producida por el sistema inmunológico que interacciona sobre un antígeno en un sitio específico denominado epítopo.

Antígeno: Sustancia que induce la producción de anticuerpos por parte del sistema inmunológico.

Apoptosis: Proceso de muerte celular programada, desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Aromatización: Producción de estrógenos a partir de andrógenos mediante aromatasa.

Axones: Prolongación del cuerpo neuronal por la cual circulan impulsos nerviosos.

Caveolina: Proteína que conforma a las invaginaciones de la membrana plasmática.

Célula endotelial: Tipo celular plano que recubre los vasos sanguíneos y capilares.

Células de Leydig: Células presentes en el estroma testicular, su función principal es la producción de andrógenos.

Células de Sertoli: Células presentes en los túbulos seminíferos testiculares. Brindan soporte estructural y metabólico durante la espermatogénesis.

Células germinales: células precursoras de los gametos femeninos y masculinos.

Células glía: Células de soporte del sistema nervioso.

Células somáticas: Células que conforman tejidos y órganos, no forman gametos y se dividen por mitosis.

Cordones medulares: Formados por células epiteliales en la región medular de la gónada bipotencial, su desarrollo dará lugar a la formación de túbulos seminíferos.

Cordones seminíferos: Se forman a partir de los cordones sexuales medulares en testículos.

Cresta gonadal: Región donde se desarrollan las gónadas.

Cresta neural: Estructura que se desarrolla durante el cierre del tubo neural. Mantiene alta capacidad migratoria la cual es esencial durante el desarrollo de la mayoría de los órganos.

Cromosomas sexuales: Cromosoma que posee genes responsables de la determinación del sexo.

Desarrollo embrionario: Periodo desde la fecundación hasta el nacimiento.

Determinación sexual: Mecanismo molecular que establece el sexo del organismo.

Determinación sexual ambiental: En este tipo de determinación, el sexo de la progenie está condicionado por factores físicos o sociales.

Determinación sexual genética: La presencia de cromosomas sexuales heteromorfos establece el sexo de la progenie.

Determinación sexual por temperatura: El sexo de la progenie se encuentra condicionado al efecto de la temperatura durante el desarrollo embrionario.

Diferenciación sexual: Proceso que involucra redes de regulación génica y hormonal que promueven la formación de ovarios o testículos a partir de una gónada bipotencial.

Embriogénesis: Proceso que conduce a la formación de un organismo pluricelular. Formado por 4 fases: segmentación, gastrulación, neurulación y organogénesis.

Epitelio celómico: Conjunto de células epiteliales que recubren la cavidad celómica.

Esteroidogénesis: Conjunto de reacciones metabólicas que propician la síntesis de hormonas esteroides.

Estradiol: Hormona esteroide, importante en el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales femeninos.

Estroma: Tejido conjuntivo con función de soporte.

Exones: Regiones de la secuencia del gen que se expresan.

Etapas de desarrollo: Clasificación artificial con finalidad de dividir el desarrollo embrionario en diferentes estadios de acuerdo con las características del embrión en desarrollo.

Factores de crecimiento: Son proteínas de regulación fisiológica, que propician la proliferación, diferenciación, motilidad, migración y sobrevivencia celular.

Factor de transcripción: Proteínas necesarias en la expresión de un gen o grupo de genes. Interaccionan con regiones específicas del ADN con efectos de aumento o disminución de la transcripción.

Fibroblastos: Tipo celular encargado de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular, presente en el tejido conjuntivo.

Gónada bipotencial: Gónada con la capacidad de desarrollarse en testículo u ovario, dependiente de la regulación génica.

Gónada diferenciada: Órgano reproductor establecido como testículo u ovario.

Heterogamético: Con presencia de cromosomas sexuales de ambos tipos. Por ejemplo, XY y ZW.

Histología: Parte de la biología que estudia la estructura y las características de los tejidos.

Homogaméticos: Que presentan ambos cromosomas sexuales del mismo tipo. Por ejemplo, XX o ZZ.

Inmunohistoquímica: Procedimiento histológico que se basa en el uso de anticuerpos para la identificación de marcadores antigénicos en los tejidos.

Isoformas: Diferentes formas de la misma proteína. Originados por splicing alternativo, genes relacionados o diferencia en la maduración del mRNA.

Lamina basal: Matriz extracelular formada por proteínas fibrosas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Delimita el tejido epitelial y es importante en la señalización celular.

Saco vitelino: Membrana extraembrionaria que provee de nutrientes y oxígeno al embrión.

Mesonefros: Sistema renal formado durante el desarrollo embrionario.

Microtúbulos: Uno de los 3 filamentos que componen al citoesqueleto. Participan en movimientos celulares, transporte intracelular y se encargan de dar forma a la célula.

Modificación postraduccional: Es un cambio químico ocurrido en una proteína después de su síntesis en el ribosoma.

Motilidad celular: Habilidad de una célula para moverse.

NeuN: Marcador de núcleos neuronales maduros, también denominado Fox3.

Neuronas extrínsecas: Somas presentes fuera del órgano diana al cual se dirigen los axones.

Neuronas intrínsecas: Neuronas con presencia de somas al interior de órganos como el estómago, el intestino, corazón y gónadas.

NGF: Proteína presente en el sistema nervioso necesaria para la supervivencia y desarrollo de neuronas durante el periodo embrionario.

Notocorda: Se conforma de células derivadas del mesodermo. Formando un cuerpo flexible en forma de vara y se encuentra en los embriones de todos los cordados.

Ovario: Órgano reproductor femenino.

Periodo termosensible: Lapso durante el desarrollo embrionario en el que la temperatura ejerce efecto sobre el sexo del embrión.

Proliferación celular: Incremento en la cantidad de células por eventos de división mitótica.

Proporción sexual: Proporción de hembras respecto a machos y viceversa en una población.

Receptores: Proteínas ubicadas generalmente en la membrana celular. Su interacción con moléculas específicas desencadena mecanismos de respuesta celular.

Reproducción sexual: Modo de reproducción donde se involucran dos progenitores, cada progenitor aporta un gameto con la mitad de información genética que poseerá el nuevo organismo.

Selección natural: Mecanismo evolutivo, establece la selección de rasgos genéticos que favorecen la supervivencia y reproducción de las especies mejor adaptadas.

Sexo genético: Se establece mediante la carga genética sexo específico durante la fecundación.

Sexo gonadal: Establecimiento del desarrollo del ovario y testículo a partir de una gónada bipotencial.

Sexo somático: Etapa donde se lleva a cabo el desarrollo y diferenciación de los tractos sexuales y órganos reproductores externos.

Sistema nervioso: Red compleja de células encargadas de dirigir, supervisar y controlar las funciones y actividades de los organismos. Se divide en sistema nervioso central y periférico.

Sox9: Factor de transcripción involucrado en diferentes procesos de desarrollo. En gónadas se ha relacionado con el establecimiento de los túbulos seminíferos.

Splicing: Proceso de corte y empalme durante la maduración del mRNA.

Sry: Gen ubicado en el cromosoma sexual Y. Ha sido identificado como el gen responsable de la determinación sexual en machos.

Temperatura: Mide la energía cinética de las moléculas de un cuerpo. Es medible mediante un termómetro.

Temperatura de incubación: Temperatura a la cual se desarrolla la progenie durante el estadio embrionario.

Temperatura feminizante: Temperatura en la cual se obtiene un 100% de hembras.

Temperatura masculinizante: Temperatura en la cual se obtiene un 100% de machos.

Testículo: Órgano reproductor masculino.

Testosterona: Hormona sexual masculina.

Tubo neural: Estructura presente en los embriones, a partir de esta se origina el sistema nervioso central.

Vasculogénesis: Formación de vasos sanguíneos a partir de células precursoras.

VEGF: Proteína de regulación fisiológica de la vasculogénesis y angiogénesis. Estimula la proliferación, sobrevivencia y motilidad de las células endoteliales.

RESUMEN

Durante la diferenciación sexual gonadal resalta una arquitectura diferente del estroma y la migración de células desde el mesonefros al interior de la gónada, encontrando una organización disímil entre el testículo y el ovario. Observaciones con microscopio electrónico sobre el desarrollo gonadal en *Lepidochelys olivacea*, evidenció la presencia de axones en estadios tempranos del desarrollo ovárico. Sin embargo, la formación de estructuras como los cuerpos precursores de neuronas y precursores de vasos sanguíneos se mantienen dentro de un panorama no aclarado en el desarrollo gonadal de especies con Determinación Sexual por Temperatura (DST).

En este trabajo, se determinó mediante inmunofluorescencia la disposición morfológica de la inervación y del endotelio vascular durante la determinación y diferenciación sexual. Además, mediante RT-PCR de punto final, se evaluaron perfiles de expresión de factores moleculares involucrados en el establecimiento de ramas nerviosas y vasculares durante el desarrollo gonadal de embriones de *L. olivacea*.

Los axones se marcaron usando el anticuerpo anti- β -III tubulina. Se identificaron nervios ingresando a la gónada durante la determinación sexual. En ovarios, los axones se ubicaron mayormente en la médula, mientras que, en el testículo, la inervación se encontró asociada al epitelio celómico. El anticuerpo anti-caveolina-1 marcó células endoteliales, mostrando diferencias en la disposición de vasos sanguíneos en testículos y ovarios diferenciados. La expresión de NGF, fue similar durante la diferenciación sexual y disminuye únicamente en testículos. Además, durante la determinación del sexo, la expresión de las isoformas VEGF-A₁₂₁ y ₁₆₅ fue significativamente mayor a temperatura feminizante, respecto a temperatura masculinizante. Este trabajo establece las bases sobre la implicación del sistema nervioso y vascular en la determinación y diferenciación de la gónada. Además, la expresión dimórfico temprana de VEGF establece un precedente sobre la influencia de la temperatura en la producción de factores angiogénicos.

ABSTRACT

During gonadal sex differentiation, the architecture of stroma and cell migration from mesonefros to the gonad differs in the testis and ovary. Based on electron-microscopic observations of gonadal development in *Lepidochelys olivacea*, axons have been observed in the early stages of ovarian development. However, in the developing gonad of species with temperature sex determination, the formation of structures, such as the precursor to neurons and precursors to blood vessels, remains unclear.

The morphological disposition of the innervation and the vascular endothelium was determined by immunofluorescence during sex determination and sex differentiation. Using RT-PCR, we evaluated the expression profiles of molecular factors involved in the establishment of nerves and vascular branches, during the gonadal development of *L. olivacea*.

The axons were marked with the anti- β -III tubulin antibody. Nerves entering the gonad were identified during sex determination. In ovaries, the axons were mostly located in the medulla, whereas in the testicle, innervation appeared to be associated with the coelomic epithelium. The anti-caveolin-1 antibody marked endothelial cells, showing differences in blood vessel arrangement in testes and ovaries. The expression of NGF was similar during sex differentiation and decreased only in testes. Besides, during sexual determination, the expression of VEGF-A₁₂₁ and ₁₆₅ isoforms was significantly higher at feminizing temperature, than at masculinizing temperature. This work establishes the basis of the nervous and vascular system's involvement in the determination and differentiation of the gonad. Furthermore, the early dimorphic expression of VEGF sets a precedent for the influence of temperature on the production of angiogenic factors.

INTRODUCCIÓN

Reproducción sexual

La reproducción sexual es un proceso biológico ampliamente difundido entre los seres vivos del planeta. En este modo de reproducción se involucran dos progenitores. Cada progenitor aporta un gameto con la mitad de información genética que tendrá el nuevo organismo. De la unión de los gametos masculino y femenino se forma el cigoto, que se desarrolla hasta convertirse en un nuevo individuo. Este tipo de reproducción permite la variación por recombinación genética.

El establecimiento del sexo es definido a través de tres etapas secuenciales: El sexo genético, el sexo gonadal y el sexo somático. El sexo genético se refiere a la carga genética dimórfica entre hembras y machos desde la fecundación. Mientras que, el establecimiento del sexo gonadal se refiere a los procesos moleculares y hormonales que llevan a la gónada histológicamente indiferenciada a desarrollarse como testículo u ovario. Por otro lado, durante la etapa somática se lleva a cabo el desarrollo y diferenciación de los tractos sexo-específicos, así como de, los órganos reproductores externos y caracteres sexuales secundarios (Díaz-Hernández y Merchant-Larios 2017).

Estrategias de Determinación sexual

Actualmente, se conocen dos estrategias de determinación sexual: genética y ambiental.

La Determinación Sexual Genética (DSG) se caracteriza por la presencia de cromosomas sexuales. Esta ha sido reportada en mamíferos euterios, aves y algunos reptiles. En mamíferos, la DSG está presente por la carga de cromosomas sexuales X-Y. Además, se ha demostrado que la presencia del gen *Sry*, ubicado en el brazo corto del cromosoma sexual Y, induce el aumento de expresión del gen *Sox9*. El cual, es el encargado de iniciar una cascada de expresión génica en el desarrollo testicular. Mientras que la ausencia del gen *Sry* en las hembras

desencadena el desarrollo ovárico (Kanai *et al.*, 2005). Es así como la presencia o ausencia del cromosoma Y durante el establecimiento del sexo cromosómico condiciona al desarrollo testicular u ovárico en el feto (Díaz-Hernández y Merchant-Larios 2017). Por otro lado, aves y algunos reptiles presentan cromosomas sexuales denominados Z-W. Siendo los machos homogaméticos (Z-Z) y las hembras heterogaméticas (W-Z) (Merchant-Larios, 2001)

La segunda estrategia es la Determinación Sexual Ambiental (DSA). Esta ocurre en un periodo de tiempo durante el desarrollo embrionario y se encuentra regulada mediante factores físicos o sociales (Merchant-Larios, 2001). Se ha registrado en una amplia variedad de especies incluyendo peces, anfibios y reptiles (Colina y Moncada, 2007). La mayoría de las especies con DSA carecen de cromosomas sexuales (Crews *et al.*, 1994) por lo que, la determinación del sexo depende de variables como la proporción sexual de la población, la humedad o la temperatura, siendo esta última la más estudiada.

Determinación sexual por temperatura (DST)

Los primeros estudios realizados que demostraron la influencia del ambiente sobre el sexo de la progenie se realizaron en las primeras décadas del siglo XX. A partir de sus estudios con urodelos, Uchida (1937) y Yoshikura (1959) demostraron que la temperatura del acuario determina el sexo de larvas en especies de anfibios como *Hynobius retardatus*.

En el caso de los reptiles, el primer trabajo experimental que registró la influencia de la temperatura en la determinación sexual fue realizado por Risley (1933). Quien incubó huevos de la tortuga *Sternotherus odoratus* a 30°C, los cuales intercambió a temperaturas inferiores durante el desarrollo embrionario, encontrando reversión sexual de ovarios a testículos. Por otro lado, Charnier (1966) registró la temperatura en nidos de la especie de lagartija *Agama agama* encontrando una correlación entre la temperatura y la proporción sexual de la progenie. Estableciendo así que a temperaturas de 27°C se desarrollaban principalmente hembras, mientras que a 30°C machos.

Estudios en otras especies confirmaron que la temperatura de incubación determina el sexo en todas las especies de cocodrilos, algunas lagartijas y varias especies de tortugas, incluyendo a todas las especies de tortugas marinas: *Caretta caretta* (Yntema y Mrosovsky, 1980), *Chelonia mydas* (Miller y Limpus, 1981), *Dermochelys coriacea* (Benabib-Nisenbaum, 1984), *Eretmochelys imbricata* (Dalrymple *et al.*, 1985) y *Lepidochelys olivacea* (Asis-Silva, 1986; McCoy *et al.*, 1983).

Partiendo de esto, se han publicado trabajos donde se aborda la DST desde distintos aspectos: implicaciones evolutivas (Bull, 1983), conservacionistas (Mrosovsky e Yntema, 1980) y de determinación sexual (Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990; Merchant-Larios *et al.*, 1989; Merchant-Larios *et al.*, 1997; Torres-Maldonado *et al.*, 2002)

Determinación sexual en *Lepidochelys olivacea*

Lepidochelys olivacea es una tortuga marina con determinación sexual por temperatura (Asis-Silva, 1986). Estudios de laboratorio han demostrado que la incubación de embriones a 26°C - 28°C favorece la determinación de machos, siendo de 100% la proporción sexual en las crías. Mientras que, a 32°C - 33°C el sexo resultante de la progenie es de 100% hembras (McCoy *et al.* 1983; Wibbels *et al.*, 1998). Estableciendo así la temperatura masculinizante (TM) y feminizante (TF), respectivamente. Además, en trabajos posteriores se logró determinar que embriones incubados a TM presentan un desarrollo más lento respecto a embriones incubados a TF (Merchant-Larios *et al.*, 2010).

Periodo termosensible en *Lepidochelys olivacea*

Cabe destacar que la temperatura, ejerce efecto sobre el sexo del embrión, únicamente en un intervalo de tiempo denominado Periodo Sensible a la Temperatura (PST). Para establecer el inicio y las dimensiones temporales del periodo termosensible se han realizado experimentos, en los cuales, se incuban nidos inicialmente a TM o TF y son intercambiados a temperatura contraria en diferentes etapas del desarrollo. En el caso de *Lepidochelys olivacea*, se ha registrado que embriones incubados a TM presentan el PTS entre las etapas 23, 24

y 25. Mientras que, embriones incubados a TF el PTS se ubica entre etapas 24, 25 y 26 (Figura 1) (Merchant-Larios *et al.*, 2010).

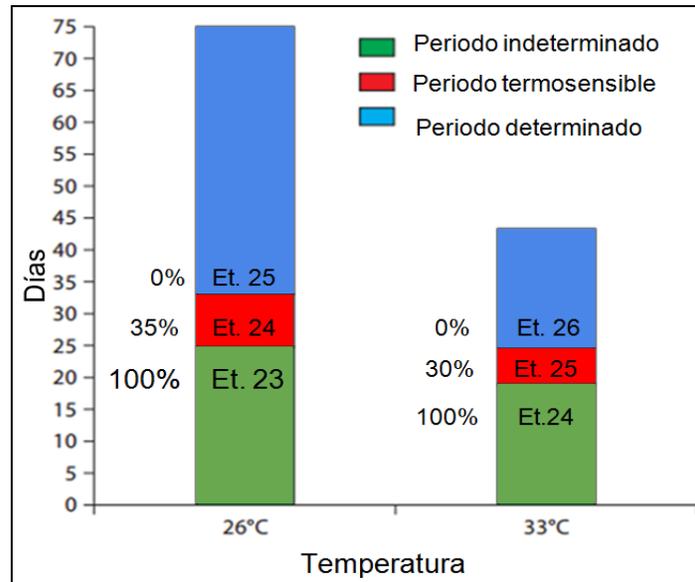


Figura 1. Gráfico que muestra el inicio y las dimensiones temporales del periodo termosensible de *Lepidochelys olivacea*. A 26°C se observa que el periodo termosensible abarca desde la etapa 23 con una respuesta del 100% al tratamiento feminizante, en la etapa 24 con 35% de respuesta y 0% en etapa 25. Por otro lado, en organismos incubados inicialmente a 33°C el periodo abarca desde la etapa 24, pasando por la etapa 25 y culmina a inicio de la etapa 26 donde no se observa respuesta al tratamiento masculinizante (Tomado de Merchant-Larios *et al.*, 2010).

Sexo gonadal en *Lepidochelys olivacea*

La determinación sexual es el proceso inicial que dirige los mecanismos moleculares que propician el establecimiento del sexo. Mientras que, la diferenciación sexual gonadal es un proceso complejo que involucra redes reguladoras génicas y hormonales que promueven la formación de ovarios o testículos a partir de gónadas indiferenciadas (Merchant-Larios. 2001)

El estudio sobre la determinación y diferenciación de la gónada en mamíferos, aves y reptiles ha demostrado que existe una conservación en los procesos involucrados durante el establecimiento del sexo. Es posible identificar similitudes en la formación de la cresta gonadal, la migración de las células germinales y la histología ovárica y testicular (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Además, existe similitud en los

mecanismos moleculares y celulares involucrados en el desarrollo de los órganos reproductores. Por ejemplo, genes que participan en la determinación del sexo en *Lepidochelys olivacea* han sido reportados en otras especies con DST y DSG. Como son: *Sox9* (SRY-Box 9) y *Dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) (Picard *et al.*, 2015) implicados en la diferenciación del testículo y *FoxL2* (Forkhead box L2) y *Rspo1* (R-spondin1) en la diferenciación del ovario (Shoemaker *et al.*, 2009).

Formación de la cresta gonadal en *Lepidochelys olivacea*

La formación de la cresta gonadal en *Lepidochelys olivacea* inicia alrededor de la etapa 22 de desarrollo embrionario, aproximadamente a los 20 días de incubación a TM y 12 días de incubación a TF. Se ubica a lo largo del borde ventromedial del mesonefros, a ambos lados del intestino posterior, ventralmente respecto a la aorta dorsal, la notocorda y el tubo neural (Merchant-Larios *et al.*, 1989).

La gónada se forma por la proliferación de dos tipos celulares somáticos: 1) células epiteliales presentes en cordones medulares y epitelio celómico y 2) células del estroma (células mesenquimáticas, fibroblastos, vasos sanguíneos, etc.). El origen de las células epiteliales en la médula se da por la migración de estas desde el epitelio celómico en un proceso de división asimétrica (Díaz-Hernández *et al.*, 2012). Mientras que, el estroma se forma por la invasión de vasos sanguíneos y células estromáticas desde el mesonefros.

Otro componente celular de la gónada son las células germinales primordiales (CGP). Estas son distinguibles de las células somáticas vecinas por ser más grandes y presentar una forma redondeada (Figura 2). Una vez diferenciados los órganos sexuales, las células germinales mediante divisiones meióticas formarán a los gametos femeninos (ovocitos) y masculinos (espermatozoides) (Merchant-Larios *et al.*, 1989)

El origen de las CGP en *Lepidochelys olivacea* es extragonadal. Las CGP siguen un camino migratorio semejante al descrito en mamíferos (Byskov, 1982) y otras especies de tortugas marinas como *Caretta caretta* (Fujimoto *et al.*, 1979). Se

detectan primero en el endodermo del saco vitelino, después pasan al mesenterio del intestino posterior y finalmente llegan a la región urogenital (Merchant-Larios *et al.*, 1989) (Figura 2).

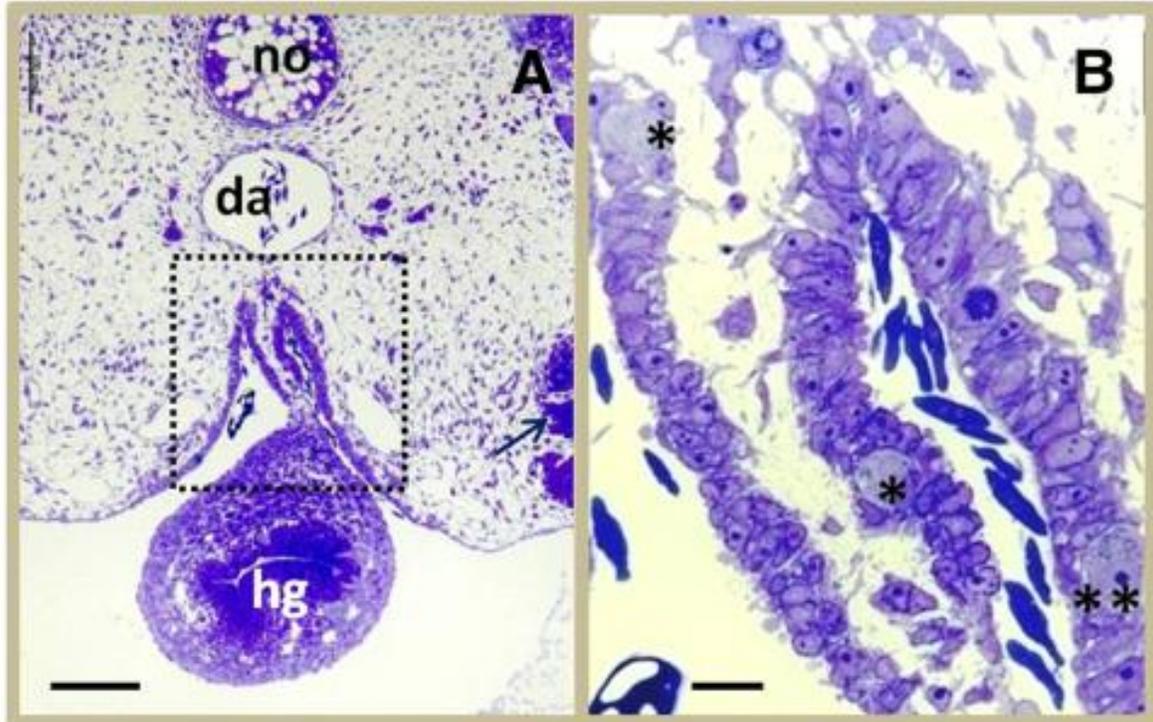


Figura 2. Células germinales (*) de *Lepidochelys olivacea* siguiendo la ruta migratoria hacia la cresta gonadal. A) micrografía donde se observa el intestino posterior (hg), la aorta dorsal (da), la notocorda (no) y el mesenterio (recuadro punteado). B) Micrografía a mayor resolución de la imagen A; se aprecian células germinales en el mesenterio del intestino posterior y en la región de la cresta gonadal. Imagen tomada de Díaz-Hernández *et al.*, 2012.

Gónada indiferenciada de *Lepidochelys olivacea*

En la etapa 24, aproximadamente a los 34-36 días de incubación a TM y 18-20 días a TF se muestra la típica gónada indiferenciada. Es posible distinguir dos áreas, la corteza y la médula con capacidad de diferenciarse potencialmente en ovarios o testículos, respectivamente. Estas dos áreas son altamente identificables debido a su topografía, morfología e histología (Merchant-Larios *et al.*, 1989).

La corteza está formada por un epitelio celómico cúbico simple. Mientras que la médula presenta dos compartimientos, los cordones medulares y el estroma. Los cordones sexuales primarios se observan como una condensación de células

epiteliales, mientras que, en el estroma se ubican fibroblastos y vasos sanguíneos que invaden la médula de la gónada desde el mesonefros (Figura 3) (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Ambos epitelios tanto el celómico como los cordones medulares se encuentran recubiertos por una lámina basal (Chino-Palomo, 2017) (Figura 4).

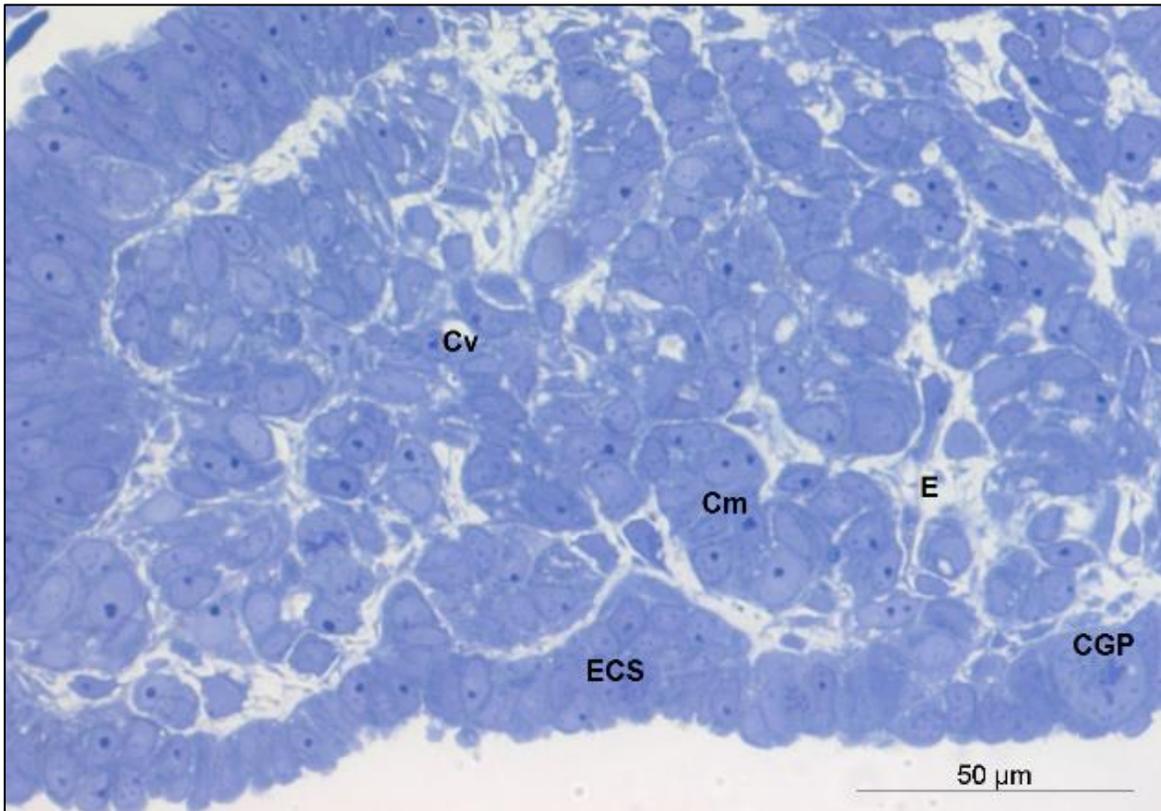


Figura 3. Gónada correspondiente a un embrión incubado hasta los 19 días de desarrollo, encontrándose en etapa 24. Se observa una gónada histológicamente indiferenciada, donde es distinguible el epitelio celómico superficial (ECS), los cordones medulares (Cm), el espacio estromático (E) con vasos sanguíneos (Vs) y células germinales (CGP) inmersas en el epitelio celómico superficial.

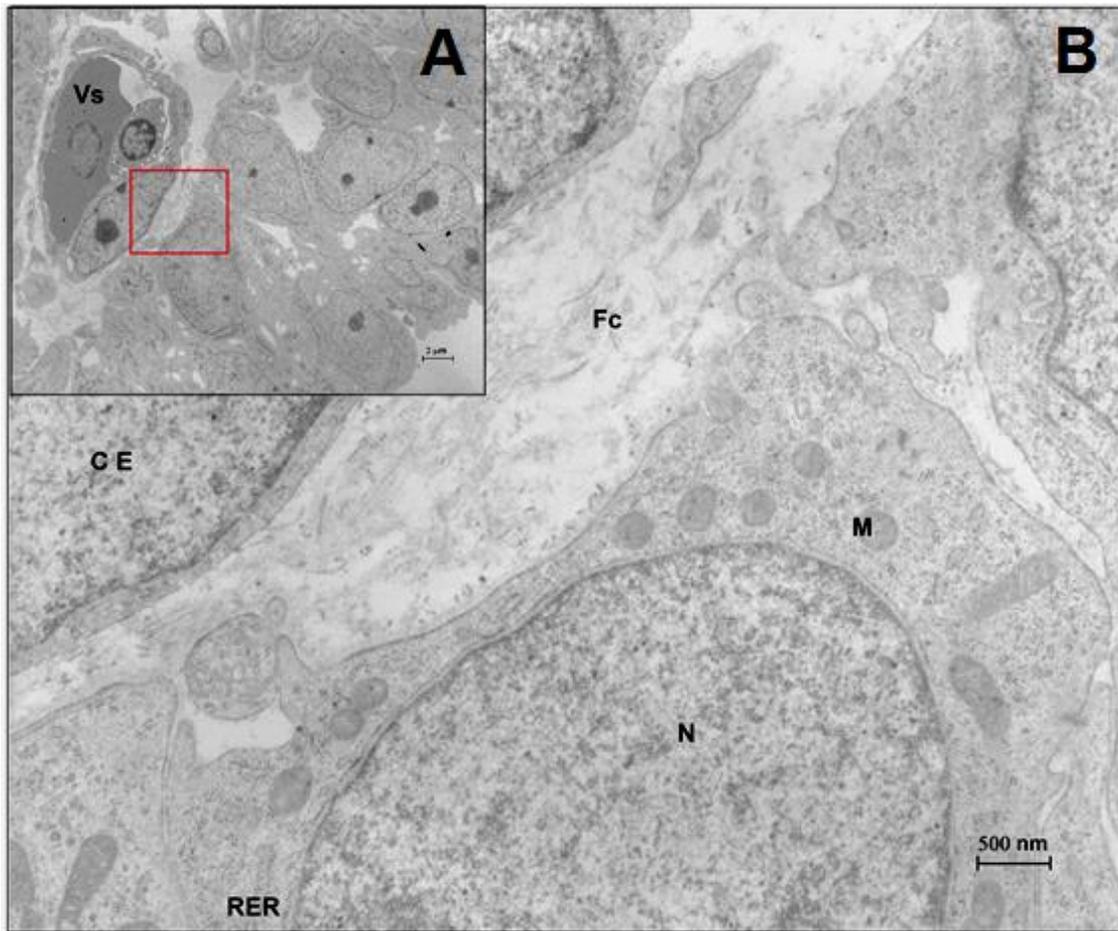


Figura 4. A) Epitelio celómico superficial de gónadas indiferenciadas en embriones de etapa 24, se observa un vaso sanguíneo próximo a la corteza de la gónada. B) Micrografía a mayor resolución de la imagen A, se observan numerosas fibras de colágeno (Fc) que componen a la lámina basal inmersas en el estroma rodeando al epitelio celómico. Además, parte de una célula endotelial (C E).

Gónada diferenciada en *Lepidochelys olivacea*

Los primeros indicios histológicos de diferenciación sexual se observan en machos durante la etapa 25; la formación de cordones testiculares y la reorganización de la corteza como un epitelio plano monoestratificado evidencian el desarrollo testicular (Figura 5A). Por otro lado, en los ovarios los primeros indicios de diferenciación se dan en etapa 26, pero se hacen más evidentes en etapa 27, donde se observa un epitelio celómico engrosado y la fragmentación de los cordones medulares (Figura 5B) (Merchant-Larios *et al.*, 1989; Chino-Palomo, 2017).

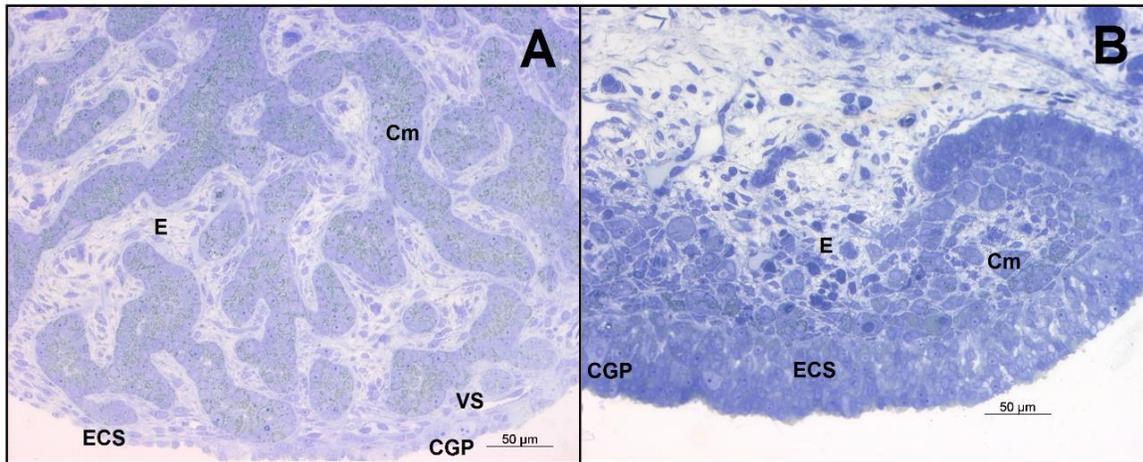


Figura 5. Gónadas de embriones en etapa 27. A) Testículo diferenciado, se observan cordones sexuales conspicuos con numerosas gotas lipídicas hacia el interior de estos, rodeando se encuentra el espacio estromático con varios fibroblastos y vasos sanguíneos. La corteza se observa como un epitelio monoestratificado con algunas células germinales. B) Ovario diferenciado; entre las características más resaltantes se observa una corteza engrosada en la que se encuentran numerosas células germinales, en la región medular se distinguen cordones medulares fragmentados y el espacio estromático.

Influencia del estroma en la diferenciación sexual de la gónada

Poco se sabe de la influencia del tejido estromático sobre la diferenciación sexual de la gónada. Los estudios en especies con DSG han dado algunas pistas sobre la importancia del estroma en la estructura de los testículos. Sin embargo, en especies con DST, los estudios han sido enfocados mayoritariamente al papel que juegan los epitelios y las CGP durante la diferenciación sexual gonadal (Merchant-Larios *et al.*, 1989).

En ratón, estudios han evidenciado que las gónadas aisladas e incubadas *in vitro* desde los 11.5 dpc, durante 7 días, con y sin mesonefros unidos, presentan diferencias estructurales. Los testículos incubados sin mesonefros no desarrollan cordones sexuales diferenciados (Figura 6). Sin embargo, cuando son cultivados con un mesonefros de un embrión donante masculino o femenino, los testículos desarrollan cordones de apariencia normal (Figura 6). Además, los testículos que se cultivan junto a una región mesonéfrica, pero separados por un filtro permeable, no desarrollan cordones normales (Buehr *et al.*, 1993). Por otro lado, cuando se

injertan testículos en regiones mesonéfricas de ratones portadores de un marcador transgénico, el marcador se encuentra en algunas de las células mioides peritubulares y otras células intersticiales de los testículos, pero no en Sertoli o germinales. Por lo cual, al menos en ratón, las células migran de la región del mesonefros a la gónada, contribuyendo así a la población de células del estroma, siendo esta una condición necesaria para el establecimiento de la estructura normal de los cordones sexuales (Buehr *et al.*, 1993).

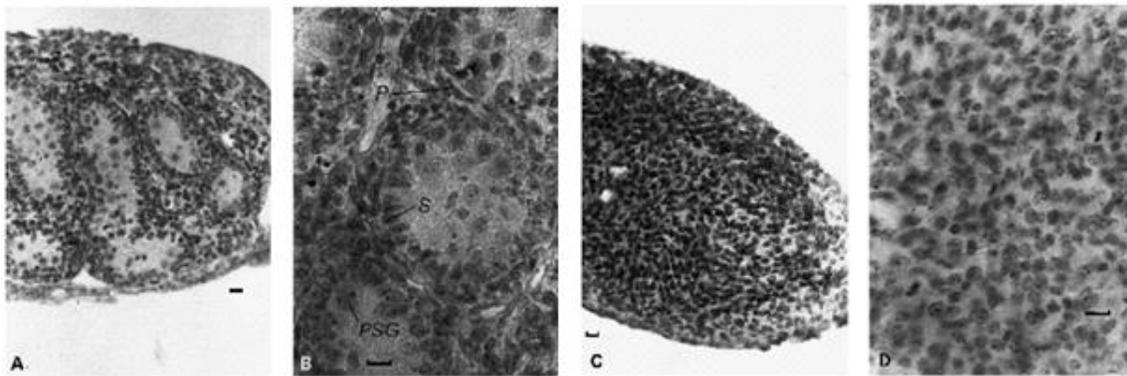


Figura 6. Experimento de cultivo de gónadas XY de ratón. A) Se observa la estructura de los cordones sexuales en gónadas cultivada con mesonefros. B) Imagen a mayor resolución de los cordones medulares, es posible distinguir células de Sertoli (s), peritubulares (P) y prospermatogonias (PSG). C) Imagen correspondiente a una gónada XY cultivada sin mesonefros, no es posible distinguir la estructura testicular. D) Imagen a mayor resolución de C, donde no se aprecian células diferenciadas. Tomado de Buehr *et al.*, 1993.

En *Lepidochelys olivacea*, dos estudios con gónadas en cultivo podrían sugerir que las células estromáticas migran desde la región mesonéfrica. En el primer estudio, se reportó la falta de estructura en los cordones medulares, mostrando un desarrollo plano y el enrollamiento de la gónada hacia el lado mesonéfrico donde se realizó el corte (Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990). En el segundo, las gónadas masculinas sí formaron cordones medulares definidos, pero mantenían un menor tamaño (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001). Esto podría sugerir, que la falta del mesonefros en el primer estudio propició la fallida estructura de las gónadas. Por otro lado, en el segundo estudio, las gónadas fueron cultivadas con una porción del mesonefros, el menor tamaño podría deberse a la limitada cantidad de células disponibles para la migración, sin embargo, no existe evidencia que corrobore esta

hipótesis ni que reafirme este origen del estroma gonadal. Por otro lado, los autores, proponen que la diferencia radica en el microporo ocupado durante el cultivo (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001).

Vasculogénesis y Angiogénesis

Durante el desarrollo embrionario dos procesos dan lugar a la formación del sistema vascular: la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis, es el desarrollo de vasos sanguíneos a partir de células precursoras. Mientras que, la angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Shibuya, 2011).

Vascularización de la gónada en mamíferos

Durante la diferenciación sexual en mamíferos, la vascularización en testículos y ovarios diverge morfológicamente. En la gónada de ratones XY se sabe que la vascularización implica la migración de células endoteliales desde el mesonefros a partir de los 11.5 dpc debido a que es un requisito para la segregación de los cordones seminíferos, ya que, si se inhibe la angiogénesis, los cordones testiculares no se forman (Buehr *et al.*, 1993). Mientras que la gónada XX muestra pocos cambios morfológicos durante este período, lo que implica la no migración de células endoteliales desde el mesonefros (Figura 7) (Coveney *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2002).

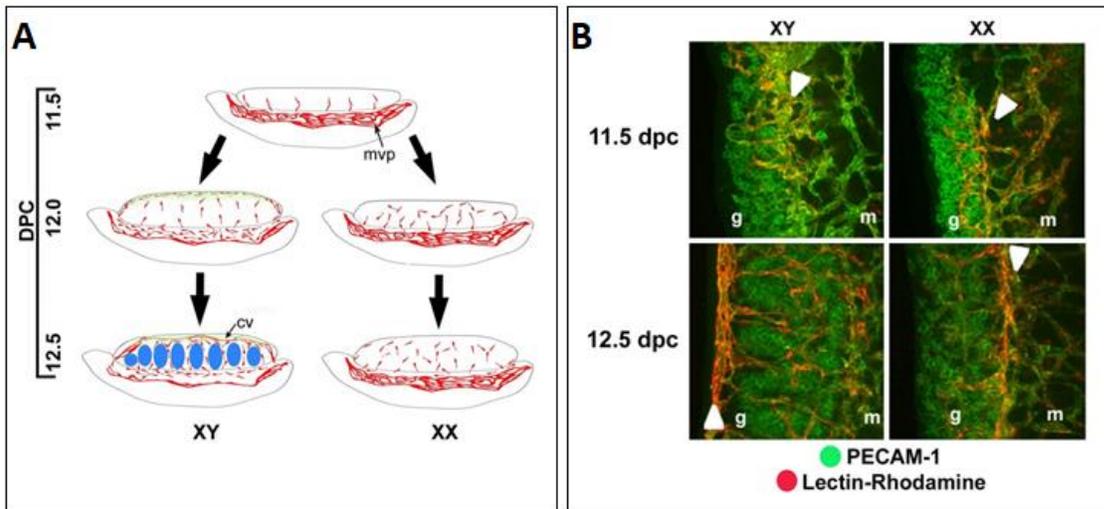


Figura 7. A) Esquema donde se muestra la disposición de vasos sanguíneos durante el desarrollo de gónadas XX y XY en ratón. A los 11.5 dpc, una gran red de células vasculares está presente cerca del borde mesonéfrico XX y XY. A los 12.5 dpc, esta red vascular está ausente en el mesonefros XY. En contraste, en la gónada XX no se muestra algún cambio en la disposición de vasos sanguíneos. B) Imágenes de inmunofluorescencia donde se puede apreciar el mismo patrón descrito en A. De lado izquierdo se aprecian gónadas XY a los 11.5 dpc (superior) y 12.5 dpc (inferior). La presencia de vasos marcados con Lectina (rojo) evidencia la migración de vasos sanguíneos desde el mesonefros hacia la corteza testicular. A la derecha, gónadas XX, la marca con lectina no presenta diferencias entre los 11.5 dpc y los 12.5 dpc. Tomado de Coveney *et al.* (2008).

El movimiento restringido de células endoteliales en la gónada XX sugiere que los dominios corticales y medulares del ovario ya están establecidos durante este período de tiempo, aunque no hay límites morfológicos evidentes en el ovario (Yao *et al.*, 2004). Además, el desarrollo vascular de la gónada XY parece ser el resultado de la proliferación y extensión de las ramas vasculares en la gónada (Coveney *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2002).

Inervación en la gónada

Inervación extrínseca e intrínseca de la gónada

Además de la presencia de neuronas extrínsecas, los ovarios contienen una discreta población de neuronas intrínsecas (D'Albora y Barcia, 1996). La inervación extrínseca en ovarios de mamíferos se compone de fibras simpáticas y sensoriales (Burden, 1978). Su función principal es regular el flujo sanguíneo, contribuir al

control de la esteroidogénesis ovárica y al crecimiento folicular (Mayerhofer *et al.*, 1997). Por otro lado, la función de las neuronas intrínsecas no se encuentra ampliamente estudiada. Sin embargo, en ratón se ha dilucidado que son células derivadas de la cresta neural, las cuales colonizan el ovario diferenciándose en neuronas o células glía, formando una red neuronal en la médula ovárica (McKey *et al.*, 2019).

Inervación en gónadas de mamíferos

En mamíferos se ha visto una mayor influencia del sistema nervioso en la regulación de las funciones ováricas, respecto a los testículos. En un estudio realizado en ratón se observó la presencia de ramas nerviosas a partir de los 15.5 dpc en la parte dorsal del mesonefros para ambos sexos (gónadas XX y XY). A los 18.5 dpc, la marca con β -III tubulina, (ocupada para el marcaje de nervios) fue más evidente en gónadas XX respecto a XY. Finalmente, en ratones neonatos, el ovario se encontró altamente inervado, mientras que el testículo presentó nervios únicamente en el epitelio superficial (McKey *et al.*, 2019).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas de regulación fisiológica, también conocidos como factores tróficos. Son producidos por un gran número de células. Estimulan la proliferación, motilidad, diferenciación y supervivencia de las células diana. Por lo que desempeñan una función importante en la comunicación intercelular.

Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una proteína de regulación fisiológica de la vasculogénesis y angiogénesis. Estimula la sobrevivencia, proliferación y motilidad de células endoteliales. VEGF es producido por muchos tipos celulares, y su estudio ha sido enfocado principalmente en su participación durante la vascularización de tumores (Ferrara *et al.*, 2003).

De acuerdo con su estructura, se distinguen cinco proteínas pertenecientes a esta familia: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Las cuales realizan funciones en células diana a través de tres receptores tirosina kinasa: VEGFR-1 VEGFR-2 y VEGFR-3 (Figura 8).

En 1996, se demostró el rol esencial de VEGF-A en la vasculogénesis y angiogénesis embrionaria. La inactivación de un alelo *Vegf* en ratones resultó en letalidad entre los 11 y 12 días. Los embriones exhibían anomalías, principalmente vascularización defectuosa en varios órganos (Carmeliet *et al.*, 1996). Por lo que, actualmente se conoce que VEGF-A regula la angiogénesis durante el desarrollo embrionario mediante los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 (Ferrara *et al.*, 2003).

Por otro lado, en experimentos en los que se anuló VEGF-B los ratones nacieron vivos, sin defectos significativos relacionados con la angiogénesis. Sugiriendo que estos genes son prescindibles durante la embriogénesis. Sin embargo, presentaron un defecto de conducción auricular. Además, en otro estudio se encontró que VEGF-B está implicado en la protección contra la degeneración de las neuronas sensoriales (Ferrara *et al.*, 2003).

La Familia VEGF incluye otras variantes. Por ejemplo, VEGF-E es específicamente expresada en el veneno de la serpiente *Trimeresurus flavoviridis*. Y VEGF-F o PIGF que es importante durante la formación de la placenta (Ferrara *et al.*, 2003).

En cuanto a los receptores, estudios en ratones apuntan que VEGFR-1 se expresa preferentemente dentro de la placenta (Shibuya, 2011). Sin embargo, la señalización y las propiedades de VEGFR-1 podrían ser diferentes dependiendo de la etapa de desarrollo de los animales o el tipo celular.

VEGFR-2 es el más frecuente, participa de manera crucial en la angiogénesis durante el desarrollo y la hematopoyesis, siendo el mayor mediador de los efectos mitógenos, angiogénicos y de aumento de la permeabilidad del VEGF (Ferrara *et al.*, 2003)

Finalmente, el receptor VEGFR- 3 es específico para VEGF-C y VEGF-D. Se expresa en células endoteliales linfáticas y estimula el receptor de la linfangiogenesis (Alitalo, 2002).

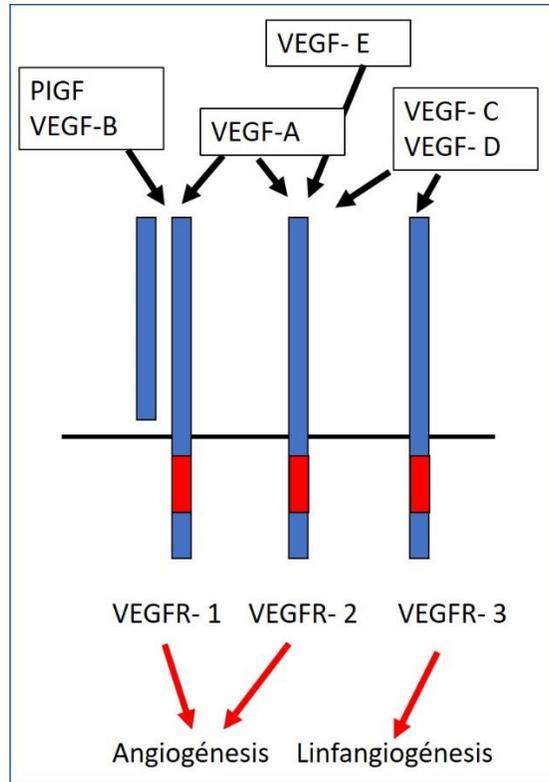


Figura 8. VEGF y sus receptores. Diagrama sobre las diferentes proteínas que componen la familia VEGF y sus receptores. Esquema modificado de Shibuya (2011).

VEGF-A

El Factor de crecimiento endotelial A (VEGF-A) es el factor más estudiado y considerado el más importante en el desarrollo vascular. Es una proteína homodímera de 27 kDa y 232 aminoácidos. Se ha demostrado la existencia de 4 isoformas, producto del splicing de los exones: VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF 206 (Ferrara *et al.*, 2003). Conteniendo 121, 165, 189 y 206 aminoácidos respectivamente (Houck *et al.*, 1991; Pagès y Pouysségur, 2005).

VEGF-A funciona promoviendo la angiogenesis, vasculogenesis, el crecimiento de células endoteliales y su proliferación, así como, la migración celular, la

permeabilización de los vasos sanguíneos e inhibición de la apoptosis (Ferrara y Davis-Smyth 1997; Mohamed *et al.*, 2004).

Tan importante como esta molécula es para la vasculogénesis, sus receptores son igual de significativos en los procesos normales y patológicos. De estos receptores, los más estudiados son VEGFR-1 y VEGFR-2. Se cree que es la unión de VEGF-A a la molécula VEGFR-2 lo que desencadena la cascada de eventos que conducen a la función angiogénica. El VEGFR-1, por otro lado, tiene un papel menos claro e incluso podría ser inhibitorio de la función del VEGF-A (Dvorak 2005).

Además, estudios recientes han revelado una asociación importante entre VEGF-A y células nerviosas, donde la promoción de VEGF-A permite la regeneración de algunas neuronas y ofrece protección contra el daño por hipoxia al aumentar el crecimiento axonal (Storkebaum *et al.*, 2004).

Factor de crecimiento neuronal (NGF)

Es una proteína presente en el sistema nervioso y otros sistemas del cuerpo humano, necesaria para la supervivencia y desarrollo de neuronas en el período embrionario. Otra función de NGF consiste en dirigir el crecimiento de las vías nerviosas hacia órganos efectores durante el período fetal. Su mecanismo de acción consiste en la liberación de factores neurotróficos en las áreas diana en pequeñas cantidades. Los axones neuronales susceptibles a NGF compiten por el factor, aquellas neuronas con acceso al factor sobreviven y forman conexiones en estas áreas (Levi-Montalcini y Angeletti, 1963)

Existe evidencia de una influencia directa o indirecta de NGF con la estimulación de la angiogénesis (Julio-Pieper *et al.*, 2006). Lo que sugiere que podría tener implicaciones en el desarrollo y función de los órganos reproductores tanto femeninos como masculinos. El análisis de las ramas nerviosas, así como de sus factores de crecimiento ayudará a dilucidar su participación en la morfogénesis de la gónada.

Preguntas de investigación

¿La disposición morfológica de las ramas nerviosas y el endotelio vascular en el desarrollo gonadal es diferente entre sexos?

En caso de existir diferencias ¿El crecimiento de nervios y vasos sanguíneos se encuentra predispuesto por la producción diferencial de factores de crecimiento en machos respecto a hembras?

OBJETIVO

Determinar la disposición morfológica de las ramas nerviosas y el endotelio vascular durante el desarrollo gonadal de *Lepidochelys olivacea* a TF y TM.

Determinar la expresión de factores moleculares que intervienen en el establecimiento de las ramas nerviosas y vasculares en la gónada de *L. olivacea*.

ANTECEDENTES

Vascularización de la gónada en Reptiles con DST

Para *Lepidochelys olivacea* y especies con DST no existen estudios enfocados al desarrollo de la vascularización durante la gonadogénesis. Observaciones a través de microscopía de luz y electrónica afirman la presencia de vasos sanguíneos en el estroma de testículos y ovarios, en embriones incubados a temperatura constante. Sin embargo, no se ha logrado caracterizar el desarrollo en ambos sexos.

Una posible evidencia de dimorfismo en la vascularización de ovarios y testículos se dio en gónadas cultivadas de *Lepidochelys olivacea*. Después de 13 días de cultivo (a partir de la etapa bipotencial) a TM, el tejido estromático poseía abundantes células endoteliales formando vasos sanguíneos vacíos, distribuidos entre los cordones medulares. En contraste, a TF las células endoteliales eran escasas y el tejido estromático tenía tejido conectivo fibroso (Figura 9) (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001).

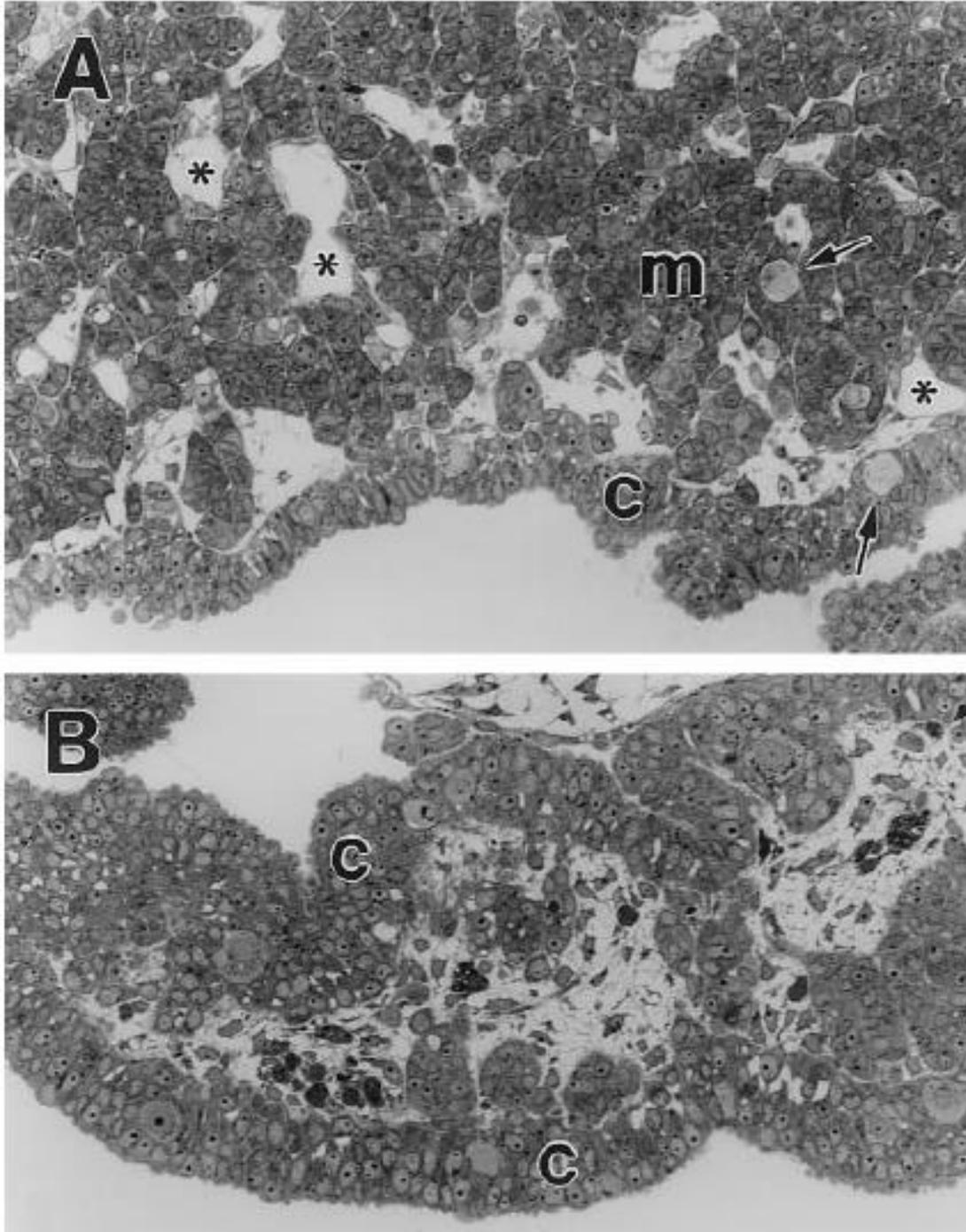


Figura 9. Gónadas de *Lepidochelys olivacea* cultivadas 13 días a TM y TF. (A) Parte de un corte transversal de una gónada incubada a TM, que muestra cordones medulares (m), células germinales (Flechas) y espacios vacíos rodeados por células endoteliales (*). B) gónada contralateral de mostrada en A incubada a TF. Se observa el espesor del epitelio superficial (c). 100 μ m. Tomado de Moreno-Mendoza *et al.*, 2001.

La regulación de factores angiogénicos en la gónada de reptiles podría ser parte importante de la morfogénesis gonadal. Debido a que, el patrón vascular depende de la expresión de moléculas guía como VEGF, que establecen dominios permisivos y restrictivos para la ramificación de las células endoteliales (Gu *et al.*, 2005; Torres-Vázquez *et al.*, 2004).

Inervación en gónadas de reptiles con DST

En *Lepidochelys olivacea* la primera evidencia de células nerviosas en el desarrollo ovárico fue publicada en 1989. Mediante microscopía electrónica se observó la presencia de axones sin mielina cerca de los cordones medulares en gónadas de embriones incubados durante 35 días a TF (Figura 10) (Merchant-Larios *et al.*, 1989).

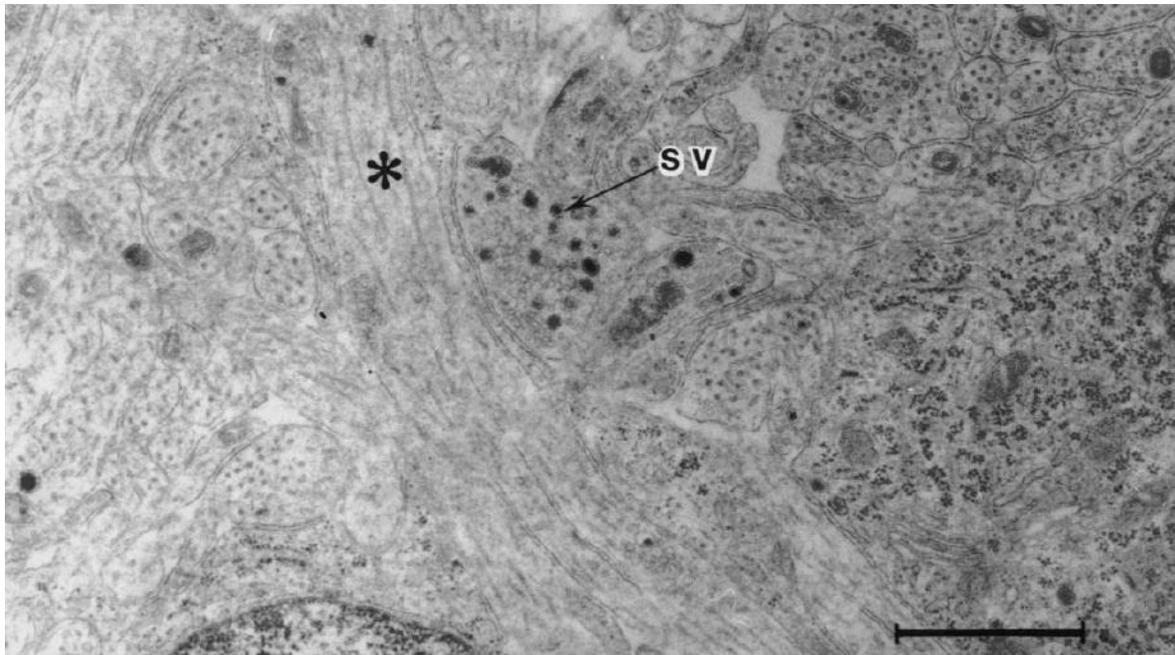


Figura 10. Micrografía de la parte medular de la gónada. Se observan cortes transversales y longitudinales de axones sin mielina (*). Además, de una terminación sináptica con vesículas (SV). Micrografía tomada de Merchant-Larios *et al.*, 1989.

Otra evidencia importante en especies con DST, se dio a partir de un estudio, donde se observó una diferencia en la maduración de la médula espinal en embriones incubados a temperaturas constantes, siendo más desarrollada en hembras respecto a machos. Además, se encontró que las fibras nerviosas en gónadas no

diferenciadas están anatómicamente asociadas a las regiones sensoriales de la médula espinal (Gutierrez-Ospina *et al.*,1999). Además, encontraron un desarrollo similar en nervios de gónadas marcadas con Acetilcolinesterasa (AChE) en etapa 24 – 26 para embriones incubados en ambas temperaturas. Inicialmente, nervios positivos a AChE se ubicaron en la región cortical (Etapa 24), mientras que en etapa 26, fueron visibles en la región medular (Gutierrez-Ospina *et al.*,1999).

Influencia del sistema nervioso en la diferenciación sexual

Si bien la presencia de células nerviosas ya se había reportado en especies con DSG, fue la primera vez que se reportó en especies con DST. Como parte importante para dilucidar el papel del sistema nervioso en el desarrollo gonadal. Salame y colaboradores (1999) midieron los niveles de estradiol y testosterona en la gónada y en dos regiones cerebrales: Telencéfalo y Diencefalo/mesencefalo. Encontrando una mayor cantidad de estrógeno en el diencefalo de embriones incubados a TF. Propiciando la hipótesis de que el sistema nervioso central podría estar involucrado en el establecimiento del sexo. Sin embargo, tres años después se comprobó que la gónada posee un sistema autónomo de respuesta a la temperatura. Esto tras aislar gónadas bipotenciales provenientes de embriones en etapas indiferenciadas: Etapa 23 en embriones incubados a TM y etapa 24 en embriones incubados a TF. Las gónadas aisladas fueron cultivadas una a TM y su contralateral a TF. Mediante Sox9, las gónadas fueron sexadas en diferentes días de incubación, encontrando, un desarrollo similar al descrito en la incubación de embriones completos (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001). Por lo que, el papel de las células nerviosas en la gónada de embriones con DST no se encuentra esclarecido.

A pesar de que no existe una caracterización sistemática de la inervación durante el desarrollo de la gónada, en especies con DST. La evidencia apunta a que es más evidente en ovarios. La disposición morfológica diferencial del sistema nervioso podría deberse a una condición necesaria en la estructura ovárica. Los estudios en ratón concluyeron que la inervación en el ovario es independiente del sexo genético (McKey *et al.*, 2019), por lo que, no tendría relación con la determinación sexual.

Esta condición podría ser similar en especies con DST. Siendo condicionada por la producción de factores de crecimiento.

METODOLOGÍA

Obtención y manipulación del material biológico

La colecta de nidos de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* contó con el permiso expedido por la SEMARNAT con oficio número SGDPA/DGVS/006606/18. La primera colecta de nidos se realizó el 23 de enero de 2019 en la playa morro Ayuta, ubicada en el municipio de San Pedro Huamelula, en el estado de Oaxaca. La segunda colecta se realizó el 3 de abril de 2019 en playa la escobilla, en el municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca. Mediante recorridos nocturnos en playa se avistaron tortugas en desove. Los nidos encontrados fueron colectados, empaquetados y enviados al laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM para su correcta incubación.

Una vez en el laboratorio se realizaron nidos artificiales en cajas de plástico, a los que se adicionó vermiculita semihúmeda. En dichas cajas se colocó un número similar de huevos, los cuales se distribuyeron al azar. Los nidos artificiales se etiquetaron con los datos de nido, fecha y playa de procedencia, así como, la cantidad de huevos y temperatura a la cual se destinó su incubación; siendo 26°C (TM) aquella destinada al desarrollo de machos y 33°C (TF) al desarrollo de hembras.

Diseño de muestreo

Los muestreos se realizaron a los 15, 19, 23, 28, 33 y 37 días de desarrollo en embriones incubados a TF y a los 28, 32, 42, 49, 56 y 63 días de incubación a TM. Lo cual, corresponde a las etapas de desarrollo 23, 24, 25, 26, 27 y 28, respectivamente (Miller *et al.*, 2017). Se obtuvieron complejos urogenitales de tres embriones por cada etapa de desarrollo estudiada (Et: 23-28), tanto a TM y TF. Dichos complejos urogenitales se destinaron al estudio del patrón de innervación y

vascularización mediante inmunofluorescencia. Además, dos embriones en etapa 23 y 24, de ambas temperaturas, fueron disectados para el estudio de innervación mediante inmunofluorescencia *in toto*. Finalmente, se obtuvo un número variable de gónadas para extracción de RNA. Esta variación en la cantidad de embriones dependió del material disponible en el laboratorio y de la disposición de huevos en incubación (Tabla 1).

Tabla 1. Número de gónadas sobre grupo utilizado en las diferentes etapas de desarrollo de *Lepidochelys olivacea* a TM y TF para la obtención de RNA.

Etapas de desarrollo	TM	Gónadas/Grupo	TF	Gónadas/Grupo
Etapa 23	4 grupos	10	4 grupos	10
Etapa 24	4 grupos	10	4 grupos	10
Etapa 25	4 grupos	8	4 grupos	8
Etapa 26	4 grupos	8	4 grupos	8
Etapa 28	4 grupos	8	4 grupos	8

Obtención de los complejos urogenitales y procesamiento de tejidos

Inmunofluorescencia en criosecciones

Para los estudios de inmunofluorescencia en cortes transversales, se obtuvieron los complejos urogenitales mediante microcirugía. Dichos complejos urogenitales se fijaron en paraformaldehído (PFA) 4% durante toda la noche. Fueron cambiados a solución amortiguador fosfato salino (PBS) 1X y se sometieron a concentraciones crecientes de sacarosa 10, 20 y 30%. Posteriormente, se embebieron en una solución de sacarosa 30%/Tissue tek 1:1 (Sakura cat. 62550-12). Al día siguiente las muestras fueron incluidas en congelación en capsulas beem (EMS cat. 70020-B) embebidas en Tissue tek y guardadas a -20°C.

Con ayuda de un criostato marca KEDEE (KD-2850) se realizaron cortes transversales de 25 μm de las gónadas previamente incluidas. Los cortes fueron colocados de forma alternada en 10 laminillas por gónada. Esto aseguró que cada laminilla tuviese representación de la gónada completa. Los cortes de gónadas pertenecientes a TM y TF fueron colocados en la misma laminilla para favorecer que las condiciones durante la inmunofluorescencia fueran similares en ambas temperaturas (Figura 11). Las laminillas fueron sometidas a vacío durante 30 minutos para asegurar la adhesión de los cortes. Finalmente, se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su posterior uso.

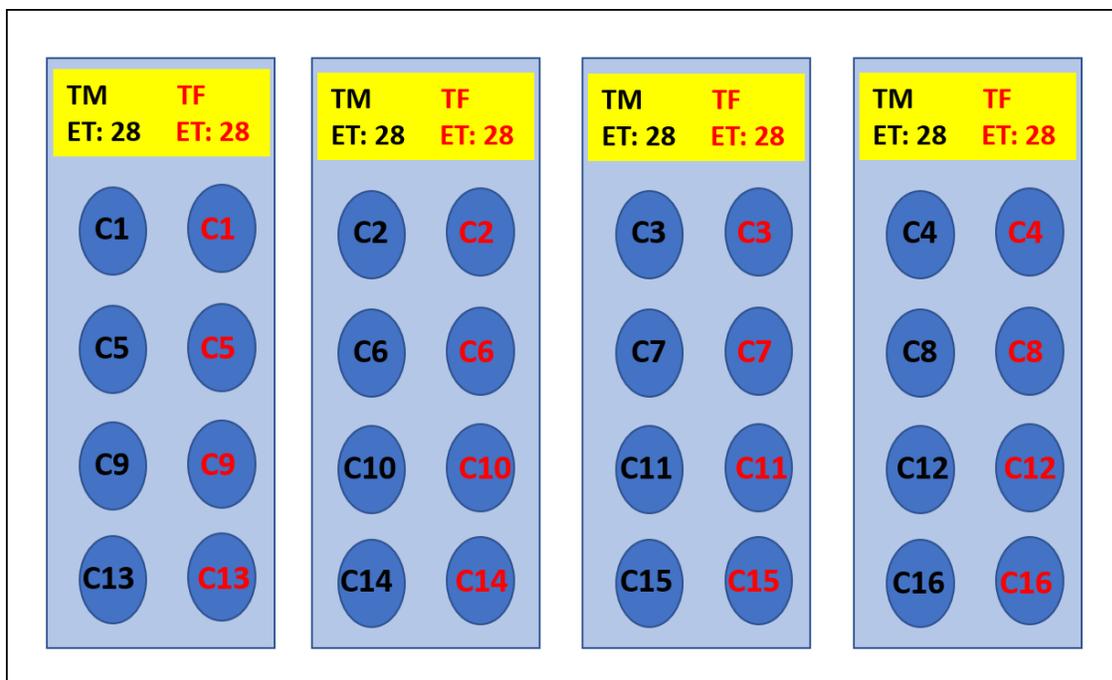


Figura 11. Representación esquemática del montaje de cortes transversales de gónadas sobre cubreobjetos. Se colocaron cortes de ambas temperaturas en la misma laminilla, en forma alternada. C: corte.

Inmunofluorescencia anti Sox9 – β -III tubulina

La innervación se caracterizó mediante inmunofluorescencia con el uso del anticuerpo anti- β -III tubulina (Promega cat. G712A), debido a que es un componente de los microtúbulos específico de células nerviosas. Por otro lado, se ocupó el anticuerpo Anti-Sox9. Siendo un factor de transcripción expresado en células epiteliales de los cordones sexuales, nos permite identificar gónadas

bipotenciales y testículos en desarrollo. Aunado a esto, se ha demostrado su efectividad como marcador de diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea* (Díaz-Hernández *et al.*, 2012).

Se seleccionaron laminillas previamente ubicadas en el congelador a -20°C. Dichas laminillas se descongelaron durante 10 minutos. Posterior a ello se transfirieron a un vaso coplin con PBS 1X y se lavaron durante 5 minutos en movimiento. Para la eliminación de lípidos se hicieron cambios en alcoholes a concentraciones crecientes (25, 50, 75 y 100%) y decrecientes (100, 75, 50, y 25%) durante 15 minutos en cada cambio. Al finalizar el paso por alcoholes, las muestras se volvieron a hidratar con agua corriente. Para la exposición de antígenos las laminillas se colocaron en 10 mM de citrato de sodio pH6 a 90°C durante 45 minutos. Pasado este tiempo, se dejó enfriar y se sustituyó el citrato de sodio con PBS 1X. Para permeabilizar se ocupó 100 µL de PBS 1X/Tritón 0.5% (Bio-Rad cat. 1610407) por laminilla, durante 15 minutos. Se bloqueo cada laminilla con una solución de suero de caballo 10%/ albumina 2%/ tritón 0.5% durante 2 horas en incubadora a 30°C.

Al terminar, se incubaron con Bloxall (Vector Laboratories cat: SP-600) 100 µL por laminilla durante 15 minutos. Posteriormente, se aplicó el equipo de Bloqueo Streptavidin/biotin (Vector cat. SP-2002); inicialmente se colocó el bloqueo de Streptavidina (100 µL por laminilla, durante 15 minutos) seguido del inhibidor de Biotina (100 µL por laminilla, durante 15 minutos). Una vez realizado los bloqueos, se procedió a la colocación del anticuerpo primario Sox9 a 1:1000 diluido en Da Vinci Green Diluent (Biocare Medical cat. PD900), por otro lado, a los controles negativos se les añadió PBS 1X. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS 0.1% Tritón (PBT 0.1%) y un lavado con PBS 1X. Posterior a ello se colocó el anticuerpo secundario Biotin horse anti rabbit (Vector Laboratories Cat. BA-1100) 1:500 diluido en Tritón al 0.5% durante 20 minutos. Cada laminilla se lavó con PBS 1X durante 4 minutos. Se aplicó el acople streptodylight 549 (Vector Laboratories cat. SA-5549) en dilución 1:500 con PBS 1X durante 20 minutos. Se procedió a lavar 3 veces las laminillas con PBT 0.1% y una vez con PBS 1X.

Para la segunda inmunofluorescencia se lavaron las laminillas con PBS 1X. Se realizó la permeabilización con PBT 0.5% durante 15 minutos. El bloqueo se realizó con una solución que contiene suero de caballo al 10%/ albumina al 2%/ Tritón al 0.5%, durante 2 horas. Una vez realizado el bloqueo, se colocó el anticuerpo primario β -III tubulina (Promega cat. G712A) 1:100 diluido con Da Vinci Green Diluent e incubados durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBT 0.1% y un lavado con PBS 1X. Se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor anti-mouse 488 (Invitrogen cat. A21202) en dilución 1:200 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBT 0.1% y un lavado con PBS 1X.

Para la tinción de núcleos, a cada laminilla se le adicionó 100 μ L de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma cat. D9542) en dilución 1:500 durante 15 minutos. Para eliminar la autofluorescencia se adicionó el reactivo TRUE BLACK Lipofuscin Autofluorescence Quencher 20X (Biotium cat. 23007) en dilución 1:20 durante 2 minutos, seguido de 3 lavados con PBS 1X. Se montaron las laminillas con Fluoromont (Sigma Aldrich cat. F4680) y fueron selladas con barniz de secado rápido.

Inmunofluorescencia anti Sox9 - Cav1

Para la observación de células endoteliales se utilizó el anticuerpo anti-Cav-1 (BD Transduction Laboratories cat. 610407), el cual ha sido reportado con alta especificidad en células endoteliales de mamíferos (Bullejos *et al.*, 2002). Su expresión no ha sido reportada en órganos sexuales de reptiles con DST.

Las laminillas fueron descongeladas durante 10 minutos. Posterior a ello, se transfirieron a un vaso coplin con PBS 1X y se lavaron durante 5 minutos en movimiento. Se realizaron lavados en alcoholes a concentraciones crecientes (25, 50, 75 y 100%) y decrecientes (100, 75, 50 y 25%). Para la exposición de antígenos las laminillas se colocaron en citrato de sodio 10 mM pH6 a 90°C durante 45 minutos. Pasado este tiempo se dejó enfriar y se sustituyó el citrato de sodio con PBS 1X. Se permeabilizaron con 100 μ L de PBT 0.5%, durante 15 minutos. Se

bloqueó cada laminilla con suero de caballo 10%/ albumina 2%/ tritón 0.5% durante 2 horas a 30°C.

Al terminar se incubaron con Bloxall (Vector Laboratories cat. SP-6000) 100 µL por laminilla, durante 15 minutos. Se aplicó el estuche de Bloqueo Streptavidin/biotin (Vector cat. SP-2002). Una vez realizado los bloqueos se procedió a la colocación del anticuerpo primario Anti-Sox9 1:1000 diluido con Da Vinci Green Diluent (Biocare Medical cat. PD900 H, L, M). Por otro lado, a los controles negativos se les añadió PBS 1X. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBT 0.1% y un lavado con PBS 1X. Posterior a ello, se colocó el anticuerpo secundario Biotin Horse anti-rabbit (Vector Laboratories Cat. BA-1100) 1:500 diluido en tritón al 0.5% durante 20 minutos. Cada laminilla se lavó con PBS 1X durante 4 minutos. Se aplicó el acople Streptodylight 549 (Vector Laboratories cat. SA-5549) en dilución 1:500 con PBS 1X durante 20 minutos. Se procedió a lavar 3 veces las laminillas con PBS 1X. Para la segunda inmunofluorescencia, se permeabilizaron las laminillas con Tritón 0.5% durante 15 minutos. Se bloquearon con una solución de suero de caballo 10%/albumina 2%/Tritón 0.5% durante 30 minutos. Se colocó el anticuerpo primario anti-Cav-1 (BD Transduction Laboratories cat. 610407) en dilución 1:50 durante toda la noche. Se colocó el anticuerpo secundario AlexaFluor 488 anti-mouse (Invitrogen cat. A21202) en dilución 1:200. La tinción de núcleos se realizó con DAPI (Sigma cat. D9542) en dilución 1:500 durante 15 minutos. Se adicionó el reactivo TRUE BLACK Lipofuscin Autofluorescence Quencher 20X (Biotium cat. 23007) en dilución 1:20 en etanol 75%. Las laminillas fueron montadas colocando el medio Fluoromont (Sigma Aldrich cat. F4680), el cubreobjetos y el sellado con barniz de secado rápido.

Inmunofluorescencia anti NeuN – β -III tubulina

Para la observación de cuerpos neuronales se utilizó el anticuerpo anti-NeuN (Sigma cat. MAB377). El cual ha sido ampliamente ocupado en observación de somas en el tejido nervioso. Por lo que, se realizó una doble inmunofluorescencia para la observación de núcleos neuronales, así como la disposición de axones nerviosos mediante β -III tubulina. Las muestras utilizadas fueron cortes

transversales pertenecientes a embriones incubados a TM y TF de etapa 28. Como control positivo se ocupó el tubo neural presente en cortes transversales de complejos urogenitales unidos en etapa 24 tanto a TM como a TF.

Las laminillas fueron deshidratadas en alcoholes a concentraciones crecientes y decrecientes. Se realizó la exposición de antígenos con citrato de sodio 10mM pH 6 a 90°C durante 45 minutos. Se permeabilizó el tejido con tritón 0.5% y se bloqueó con una solución de suero de caballo 10%/ albumina 2%/ tritón 0.5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Se colocó el anticuerpo primario mouse anti-NeuN (Sigma cat. MAB377) fue colocado en dilución 1:1600 en Da Vinci Green Diluent (Biocare Medical cat. PD900 H, L, M) durante 17 horas. Se realizaron lavados con PBS 1X y se colocó el anticuerpo secundario AlexaFluor 488 anti-mouse (Invitrogen cat. A21202) en dilución 1:200. Para la segunda inmunofluorescencia se realizó nuevamente la permeabilización con Tritón 0.5% durante 15 minutos. Se siguió el protocolo del estuche de inmunodetección de ratón sobre ratón (M.O.M. por sus siglas en inglés) (Vector cat. BMK-2202), el cual consistió en la preparación de un suero de bloqueo compuesto por M.O.M protein concentrate stock solution diluido en PBS 1X (92% PBS 1X/8% M.O.M). Las muestras fueron fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se colocó el anticuerpo primario β -III tubulina (Promega cat. G712A) 1:100 diluido con la solución de bloqueo M.O.M durante 17 horas. Nuevamente se realizaron lavados con PBS 1X y se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor anti-mouse 555 (Thermo Fisher Scientific cat. A31570) en dilución 1:500 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminado el periodo de incubación, se realizaron tres lavados con PBT 0.1% y un lavado con PBS 1X.

Para la tinción de núcleos, a cada laminilla se le adicionó 100 μ L de DAPI (Sigma cat. D9542) en dilución 1:500, durante 15 minutos. Para eliminar la autofluorescencia se adicionó el reactivo TRUE BLACK Lipofuscin Autofluorescence Quencher 20X (Biotium cat. 23007) en dilución 1:20 con etanol 75% durante 2 minutos, seguido de 3 lavados con PBS 1X. Se montaron las laminillas con

Fluoromont (Sigma Aldrich cat. F4680) y fueron selladas con barniz de secado rápido.

Inmunofluorescencia de los complejos urogenitales completos

Para el análisis de innervación en gónadas *in toto*, los complejos urogenitales fueron obtenidos mediante microcirugía. Se realizó una fijación con PFA 4% durante 17 horas. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de fijador. Las gónadas fueron deshidratadas con soluciones crecientes de Metanol/PBT 1% (25%, 50%, 75% y 100%). Y colocadas en metanol 100% a -70°C, hasta su uso.

Los complejos urogenitales se rehidrataron a concentraciones decrecientes de metanol/PBT 1% (75%, 50%, 25% y PBT 1%). Posteriormente, se realizó la exposición de antígenos mediante citrato de sodio 10 mM pH: 6, durante 45 minutos a 90°C. Se colocó una solución de bloqueo que contiene suero de caballo 10%/albumina 2% en tritón 0.5%, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas 10 veces con PBT 1% durante 30 minutos por lavado. Se colocó agua oxigenada (ZUUM) durante 30 minutos y se realizaron tres lavados nuevamente con PBT 1% (10 minutos durante cada lavado). Se colocó una solución de anticuerpos primarios anti-rabbit Sox9 1:1000, anti-mouse Tuj-1 1:50 (Promega cat. G712A) diluidos en Da Vinci Green Diluent (Biocare Medical cat. PD900 H, L, M) durante 17 horas. En el caso de controles negativos se colocó PBT 1%. Nuevamente se realizaron lavados con PBT 1%. Se colocó una dilución de anticuerpos secundarios que consistió en Alexa Fluor Anti-Mouse 488 1:250 (Invitrogen cat. A21202), Anti-Rabbit Cy3 (cat. Z90410) 1:600 y DAPI 1:60 (Sigma cat. D9542) diluidos en PBT 1%, durante 17 horas. Se procedió a lavar las muestras con una dilución de albumina 1%/PBT 1%, diez veces durante 30 minutos por lavado.

Para aclarar los complejos urogenitales se realizaron dos diluciones: 1) 25% formamida/10% polietilenglicol y 2) 50% formamida/ 20% polietilenglicol. Las mezclas se realizaron diluyendo la formamida (Sigma-Aldrich cat. F75030) al 50%

en PBS 1X. El polietilenglicol (Sigma-Aldrich cat. P2139) se diluyó al 40% en agua tibia. Para la dilución uno se agregó formamida al 50% y polietilenglicol al 20% en proporción 1:1. Para la dilución 2 se agregó formamida 100% y polietilenglicol al 40% en proporción 1:1. Se realizaron varios cambios en las diluciones hasta observar el aclaramiento de las gónadas.

Procesamiento de muestras para análisis de factores de crecimiento

Mediante microcirugías se realizó la obtención de gónadas destinadas al estudio de los factores de crecimiento involucrados en la vasculogénesis (VEGF) e inervación (NGF). Se destinó un número variable de gónadas, dependiendo de la etapa de desarrollo (Tabla 1). Previo a la microcirugía se realizó la esterilización del material en luz ultravioleta durante 20 minutos. Además, el material fue limpiado con alcohol y toallas RNaseZap (Ambion cat. 9786). Posterior a la microcirugía, las gónadas se colocaron en tubos de 1.5 ml con RNAlater (Invitrogen AM7020) y se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el protocolo con TRIzol Reagent (Invitrogen cat. 10296-010 y 10296-028) y Direc-zol RNA miniprep plus (Zymo cat. R2050). Las gónadas fueron colocadas en un tubo nuevo de 1.5 ml, sin RNAlater. A dicho tubo se le adicionó 100 µL de Trizol Reagent y se homogenizó el tejido con ayuda de pistilos de plástico estériles.

Posterior a ello, se completó el volumen de 350 µL con Trizol e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el homogenizado a una columna QIAshredder y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos. Se recuperó el eluido y se agregó 350 µL de etanol 100%, mezclando con pipeteo. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo-spin IIC Column y centrifugó a 10,000 rpm, descartando el eluido. Se agregó 400 µL de RNA Wash Buffer (cat. R1003-3-12) a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.

Para el tratamiento con DNAsa se preparó un tubo con 5 μL de DNAsa I + 75 μL de DNA Digestion Buffer (cat. E1010-1-4) por muestra. La cantidad de enzima y buffer se calculó de acuerdo con el número de muestras procesadas. Se colocó la mezcla de DNAsa a las columnas e incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 400 μL de Direct-Zol RNA PreWash (cat. R2050-2-40) a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el eluido. Se agregó 700 μL de RNA WashBuffer (cat. R1003-3-12) a la columna y centrifugó durante 2 minutos a 10,000 rpm. Se pasó la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml, se agregó un volumen de agua libre de RNAasas y DNAsas a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos.

Una vez extraído el RNA se revisó su integridad mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% teñido con 2 μL de GelRED (Biotium cat. 41003). Posteriormente, se realizó la cuantificación del RNA total mediante el uso de NanoDrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific.

En tubos nuevos y estériles se adicionó 10 μL del RNA extraído, 4 μL de buffer de carga (Thermo Scientific cat. R0611). Cada tubo obtenido fue cargado en un pozo diferente del gel. La cámara se programó a 90 Volts durante 25 a 35 minutos y se fotodocumentó el gel resultante en el transiluminador Alliance MINI HD6 UVITEC Cambridge.

Síntesis de cDNA

Se preparó en un tubo eppendorf de 0.2 μL , una mezcla que contenía 1 μg de RNA, oligo dT (Invitrogen cat. 18418-012) a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Random P (Invitrogen cat. 58875) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una cantidad necesaria de agua estéril para completar un volumen final de 13 μL . La mezcla se homogenizó con ayuda de una microcentrifuga marca Labnet International, posteriormente los tubos fueron colocados en un termociclador MultiGene Optimax marca Labnet, programándose a 65°C durante 10 minutos. Al terminar, los tubos fueron colocados en una gradilla congelada a -20°C.

Se preparó una solución con 4 µL de solución para síntesis de cDNA (cat. 1307064), 2 µL de dNTPs 10mM (Invitrogen cat. 18418-012), 0.5µL de RNAsa out (Invitrogen cat. 10777-019) y 0.5µL de enzima transcriptasa reversa (Roche cat. 03531287001) para cada una de las muestras a procesar. Todos los tubos fueron homogenizados. Se adicionó 7 µL de esta mezcla a cada tubo salido del termociclador, se colocaron los tubos nuevamente en el termociclador seleccionando el programa cDNA que comprende 34 ciclos de 25°C por 10 minutos, después asciende a 55°C por 40 minutos y finalmente asciende a 85°C por 5 minutos, una vez cumplido los 34 ciclos se retiraron los tubos y se almacenaron a -20°C.

Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos (Tabla 2) se realizó mediante la alineación de secuencias de NGF, VEGF y PPIA en distintas especies de reptiles, utilizando las bases de datos y herramientas disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en ingles). Una vez diseñados, los oligonucleótidos se mandaron a sintetizar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 2. Oligos diseñados y sintetizados para el estudio de los factores de crecimiento endotelial A (VEGFA) y nervioso (NGF).

NOMBRE OLIGO	OLIGO 5'-3'
VEGFA LOLIV-FW	CCT GAT GAG GTG GAG TAC AT
VEGFA LOLIV-RV	TGC TCT ACC GAT CCT TCA TT
NGF OLIV 2 -FW	CCA TCG GAC TAA AGC AAA TC
NGF LOLIV-RV	TTG CCT TTG ATG TCA GTA GC
PPIA FW	GAC AAG GTT CCA AAG ACT G
PPIA RV	CCC ACA GTT AGA AAT GGT G

Estandarización de las condiciones de PCR punto final

Las condiciones óptimas para llevar a cabo la RT-PCR en punto final fueron determinadas mediante gradiente de temperatura y curva de ciclos. Siendo específicas para cada par de oligos ocupados. Los cDNAs ocupados para la estandarización se obtuvieron a partir de mesonefros en el caso de VEGF y de cerebro para NGF.

Para la obtención de la temperatura optima de alineamiento se preparó una solución maestra para seis reacciones en un tubo de 0.6 ml. Se agregó 36 μ L de solución de PCR (Invitrogen cat. Y02028b), 6 μ L de oligo sentido, 6 μ L de oligo antisentido, 124.2 μ L de agua y 1.8 μ L de enzima taqDNA Polimerasa (Invitrogen cat. 10966-030). Posteriormente se etiquetaron seis tubos eppendorf de 0.2 ml a los cuales se añadió 29 μ L de la solución maestra y 1 μ L de cDNA. Cada tubo fue homogenizado y colocado a diferentes temperaturas de alineamiento dentro del termociclador: 48°C, 52°C, 56°C, 60°C, 64°C y 68°C. Para comprobar el resultado de la curva de ciclos se corrieron las muestras amplificadas en un gel de agarosa al 1% (tabla 3).

Por otro lado, para la curva de ciclos se programó el termociclador con la temperatura de alineación establecida con la curva de temperatura y se corrió con una programación de 38 ciclos. De forma manual se fueron retirando los tubos a los 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 y 38 ciclos, dejando el tubo control hasta el ciclo 38. Nuevamente para corroborar el resultado, se corrieron los productos amplificadas en un gel de agarosa al 1%, a 90 volts durante 40 minutos (tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la estandarización de condiciones de PCR para la amplificación de fragmentos de VEGF, NGF y PPIA.

GEN	TEMPERATURA	CICLOS
VEGF	56	30
NGF	60	30
PPIA	60	28

Purificación de secuencias amplificadas para secuenciación

Una vez establecidos los parámetros óptimos para cada gen, se procedió a realizar una nueva PCR con la finalidad de secuenciar los productos amplificados y corroborar su identidad. Se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El gel fue colocado en el transiluminador y con ayuda de un bisturí se cortó la banda correspondiente al amplificado. La purificación se realizó mediante el estuche de recuperación de ADN en gel ZymoClean (Zymo Cat: D4007). El volumen del reactivo ADB (cat. D4001-1-50) fue determinado por el volumen de cada banda, siendo tres veces mayor a esta. La banda se disolvió en baño maría a 55°C. Una vez disuelto, la mezcla se transfirió a las columnas Zymo-spin Column y se centrifugo a 10,000 rpm durante 1 minuto. El eluido fue descartado, la columna se secó con ayuda de gases estériles y se procedió a centrifugar el resto de la banda disuelta. Posteriormente fue adicionado 200 μ L de DNA Wash buffer (CAT. D4003-2-6) a la columna y se centrifugo a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se cambió el tubo colector por un eppendorf de 1.5 ml nuevo y se agregó 30 μ L de agua libre de RNAsas y DNAsas. Una vez terminado este procedimiento se cuantificó y se guardó el DNA a -20°C. El producto amplificado fue enviado a la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas para su correcta secuenciación.

PCR punto final

Para cada reacción, se agregó 6 μ L de Buffer para PCR, 1 μ L de oligonucleótido sentido, 1 μ L de oligonucleótido antisentido, 20.7 μ L de agua, 0.3 μ L de enzima taqDNA Polimerasa (Bioline cat. MT-818110B) y 1 μ L de cDNA. Se ocuparon cDNA de gónadas pertenecientes a embriones en etapa 23, 24, 25, 26 y 28 de TM y TF, utilizando los oligos sintetizados para los 3 genes VEGF, NGF y PPIA. Los tubos de cada reacción fueron colocados en el termociclador MultiGene Optimax marca Labnet programándose de acuerdo con las condiciones previamente estandarizadas (Tabla 3). Los productos obtenidos se corrieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 40 minutos a 90 volts.

Análisis estadístico

Una vez realizadas las RT-PCR en punto final de las muestras estudiadas, se procedió a su análisis mediante densitometría. Los geles resultantes fueron fotodocumentados mediante el transiluminador Alliance MINI HD6 UVITEC Cambridge con las mismas condiciones para todos los productos amplificados (Tiempo de Exposición: 2/10 segundos). Mediante el programa IMAGEJ 1.52a se procedió al análisis de las imágenes. Los resultados del análisis densitométrico fueron relativizados con los valores obtenidos por el control negativo y los valores del gen endógeno (PPIA). Para comparar los valores obtenidos y observar si se presentó diferencias significativas en la expresión, entre temperaturas de incubación en cada etapa de desarrollo, se procedió a aplicar la prueba estadística t-student, los valores estadísticos fueron considerados significativos si el valor de p arrojado era menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

Los embriones colectados a los 15, 19, 23, 28, 33 y 37 días de desarrollo incubados a TF y 28, 32, 42, 49, 56 y 63 días de incubación a TM, correspondieron a las etapas 23, 24, 25, 26, 27 y 28 basado en la tabla de Miller y colaboradores (2019) (Figura 12).

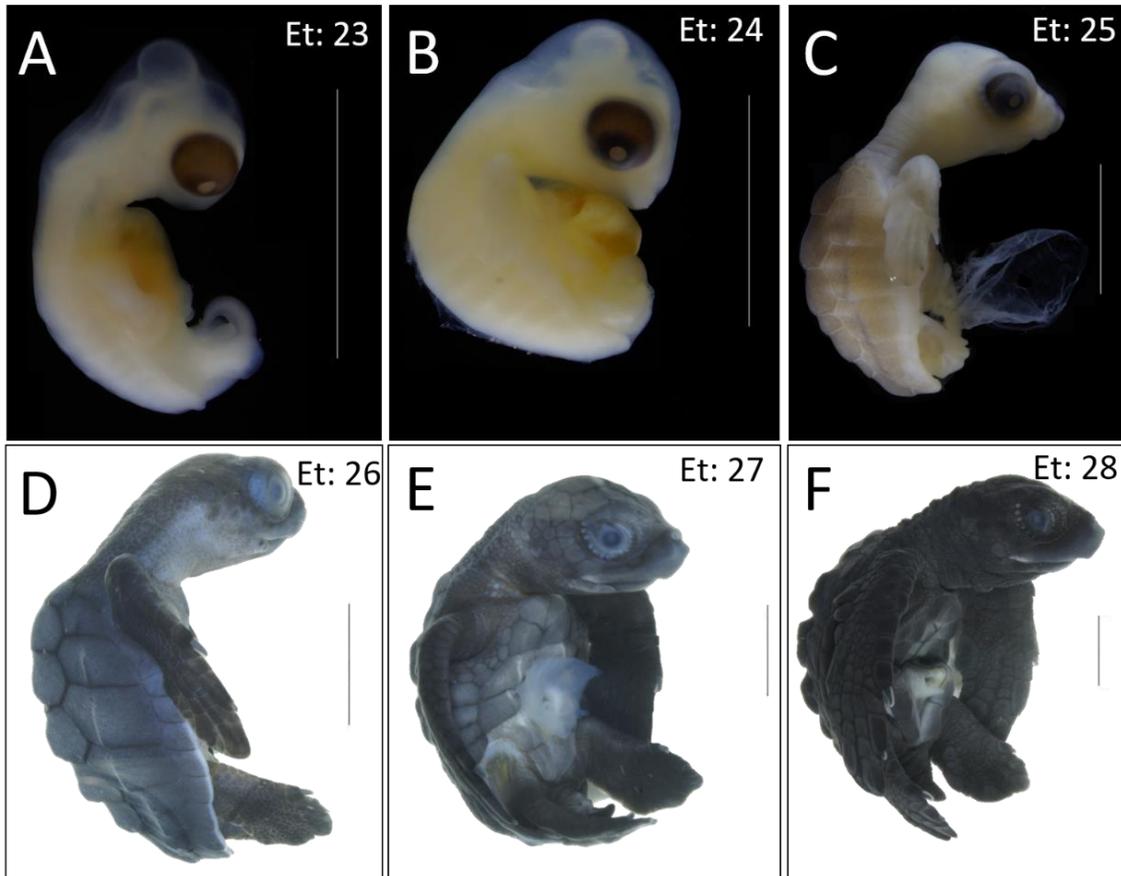


Figura 12. Embriones representativos de las etapas 23 (A), 24 (B), 25 (C), 26 (D), 27 (E) y 28 (F) incubados a TF. Siendo similares a los incubados a TM. Su identificación se realizó con base en la descripción de Miller y colaboradores (2017). Escala: 1cm.

Caracterización de la inervación mediante inmunofluorescencia

A los 15 días de incubación a TF y 28 días a TM, los embriones muestreados se encontraron en etapa 23. Durante esta etapa es posible observar la cresta gonadal. La presencia de células Sox9 positivas (Rojo) en la región medular de la gónada evidencian su estado histológicamente indiferenciado (Figura 13). Estas

características han sido descritas anteriormente en *Lepidochelys olivacea* (Díaz-Hernández *et al.*, 2012) y proveen referencia sobre el patrón de diferenciación sexual gonadal. Por otro lado, el marcaje realizado con el anticuerpo β -III tubulina, denotó fibras nerviosas ingresando a la gónada a partir del tejido conectivo adyacente al mesonefros y recorriendo la cresta gonadal por debajo del epitelio celómico, siendo este patrón similar a TF y TM (Figura 13).

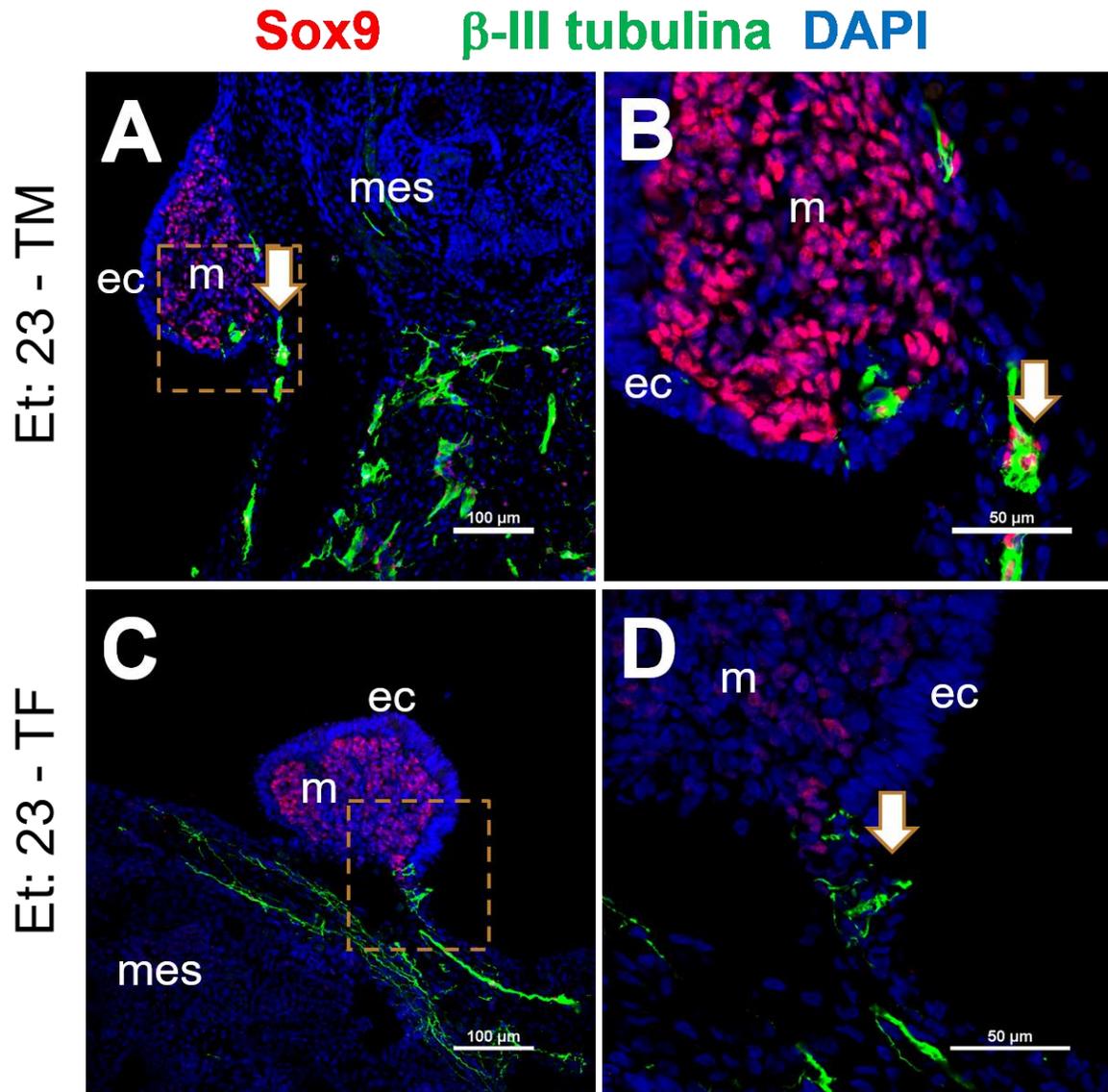


Figura 13. Gónadas pertenecientes a embriones incubados a TM (A y B) y TF (C y D) en etapa 23. Se observa la presencia de núcleos positivos a Sox9 (rojo) en las gónadas de ambas temperaturas. La marca de nervios positivos a β -III tubulina (verde) puede ser observada en la región del

mesonefros teniendo contacto con la gónada mediante el epitelio celómico (ec). Núcleos teñidos con DAPI (Azul). m: medula, mes: mesonefros, ec: epitelio celómico.

Durante la etapa 24 se observó la presencia de células positivas a Sox9 en la región medular de la gónada a TM y TF, indicando que la gónada se encuentra histológicamente indiferenciada. Por otro lado, se observaron marcas positivas a β -III tubulina al interior de la gónada, siendo más evidentes en la región mesonéfrica en ambas temperaturas. Algunas de estas marcas están asociadas a núcleos positivos a Sox9. Lo cual indica la presencia de células glía (Figura 14). Al comparar la disposición de nervios entre ambas temperaturas, no fue posible observar diferencias en la inervación. En ambos casos, los nervios ingresaron a la gónada por debajo del epitelio celómico, mientras que en la región medular la presencia de inervación fue reducida en la mayoría de los cortes observados (Figura 14).

Debido a la alta variabilidad en la disposición de los nervios en cortes transversales se logró dilucidar que estos no se encuentran de forma homogénea a lo largo de la gónada. Tras realizar la inmunofluorescencia en el órgano completo se observó su presencia desde la parte media y en dirección al polo craneal. Por otro lado, la región caudal se observó desprovista de inervación (Figura 15).

Sox9 β -III tubulina DAPI

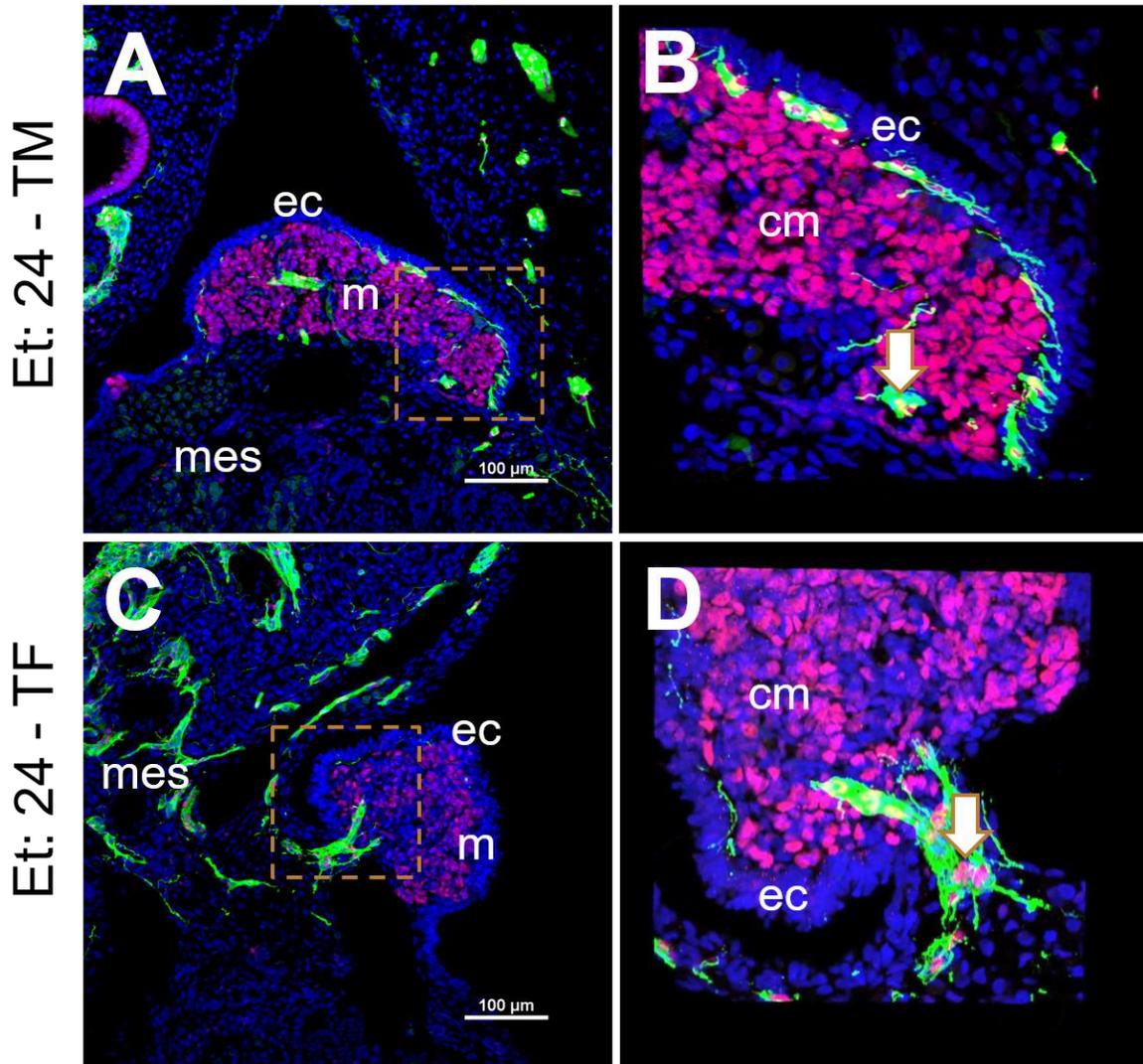


Figura 14. Gónadas de embriones incubados a TM (A y B) y TF (C y D) en etapa 24. A) Gónada histológicamente indiferenciada de embrión incubado a TM. Se observan nervios positivos a β -III tubulina en el mesonefros (mes) y al interior de la gónada. B) Imagen a mayor resolución de A. Se observan nervios recorriendo la gónada por debajo del epitelio celómico superficial. Además, células positivas a Sox9 asociadas con marca de β -III tubulina (flechas). C) gónada histológicamente indiferenciada de embrión incubado a TF, se observa marca positiva a β -III tubulina (verde) en la región del mesonefros (mes). Además, cordones medulares (cm) positivos a Sox9 en la región medular (m). El epitelio celómico (ec) se observa pseudo estratificado. D) Imagen a mayor resolución de C, se observan núcleos positivos a Sox9 asociados a β -III tubulina (flechas) ingresando a la región medular de la gónada y por debajo del epitelio celómico. Se distinguen cordones medulares (cm) y el epitelio celómico superficial (ec). DAPI: Azul, Sox9: Rojo, β -III tubulina: verde.

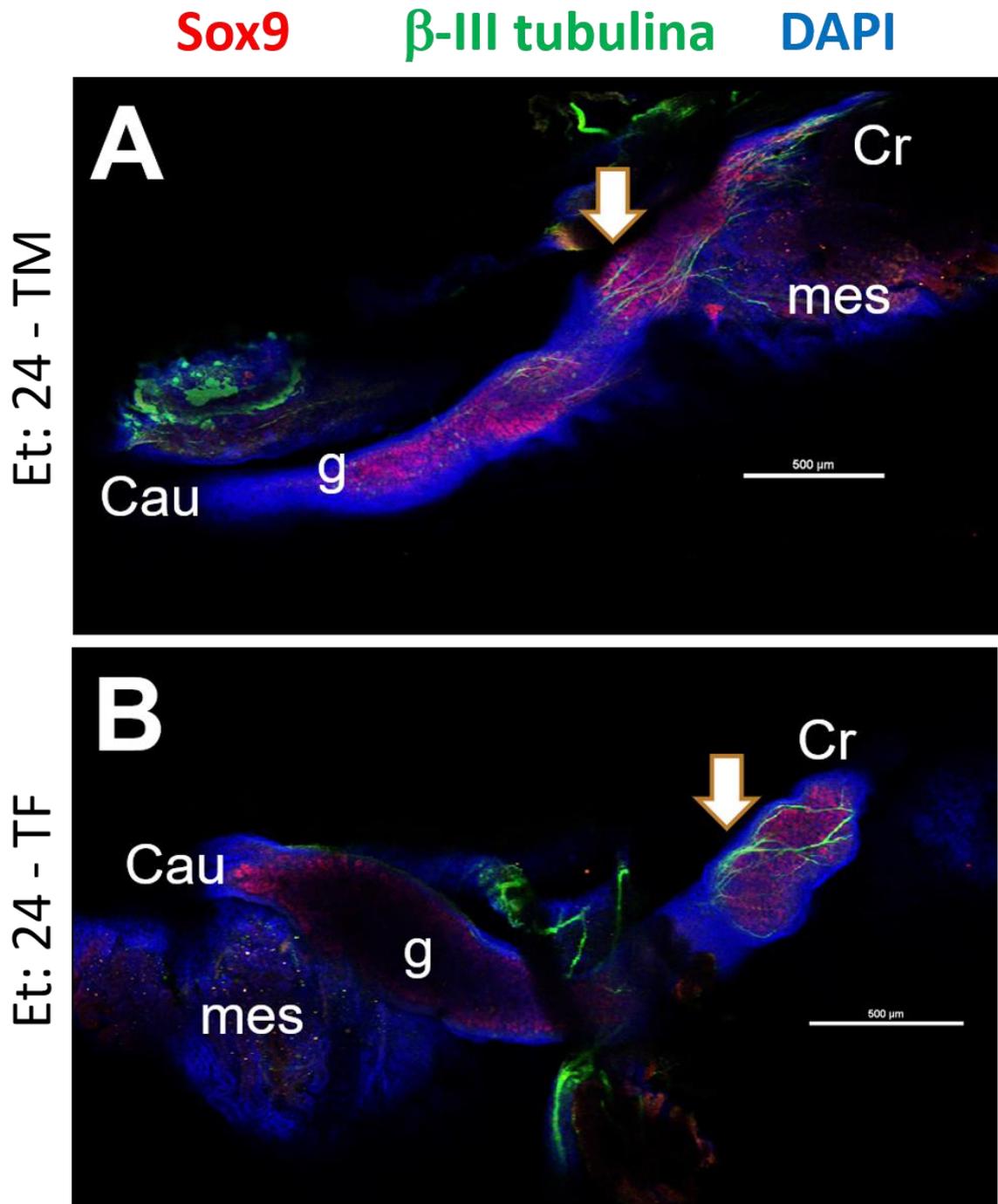


Figura 15. Imágenes obtenidas a través de una inmunofluorescencia in toto con β -III tubulina (verde), Sox9 (rojo) y DAPI (azul). A) se observa una reconstrucción tridimensional de una gónada perteneciente a un embrión incubado a TM. La disposición de nervios positivos a β -III tubulina se observa recorriendo del centro de la gónada (g) hacia el polo craneal (Cr). Mientras que, el polo caudal (Cau) se encuentra desprovista de inervación. B) Reconstrucción tridimensional de gónada

perteneciente a un embrión incubado a TF. Se observa de forma similar la disposición de axones positivos a β -III tubulina de forma polarizada.

Durante la etapa 25 se observó la disminución en la expresión de Sox9 en gónadas pertenecientes a embriones incubados a TF, sugiriendo el inicio de la diferenciación sexual ovárica. Por otro lado, en gónadas pertenecientes a embriones incubados a TM se observó la presencia de células positivas a Sox9 en los cordones sexuales, indicando la diferenciación testicular (Figura 16). En ambos casos, se registró el ingreso de fibras nerviosas ingresando a la médula gonadal a través del hilio. Además, fue posible observar inervación en la región mesonéfrica y al interior de las gónadas sin diferencias aparentes entre ambas temperaturas de incubación (Figura 16).

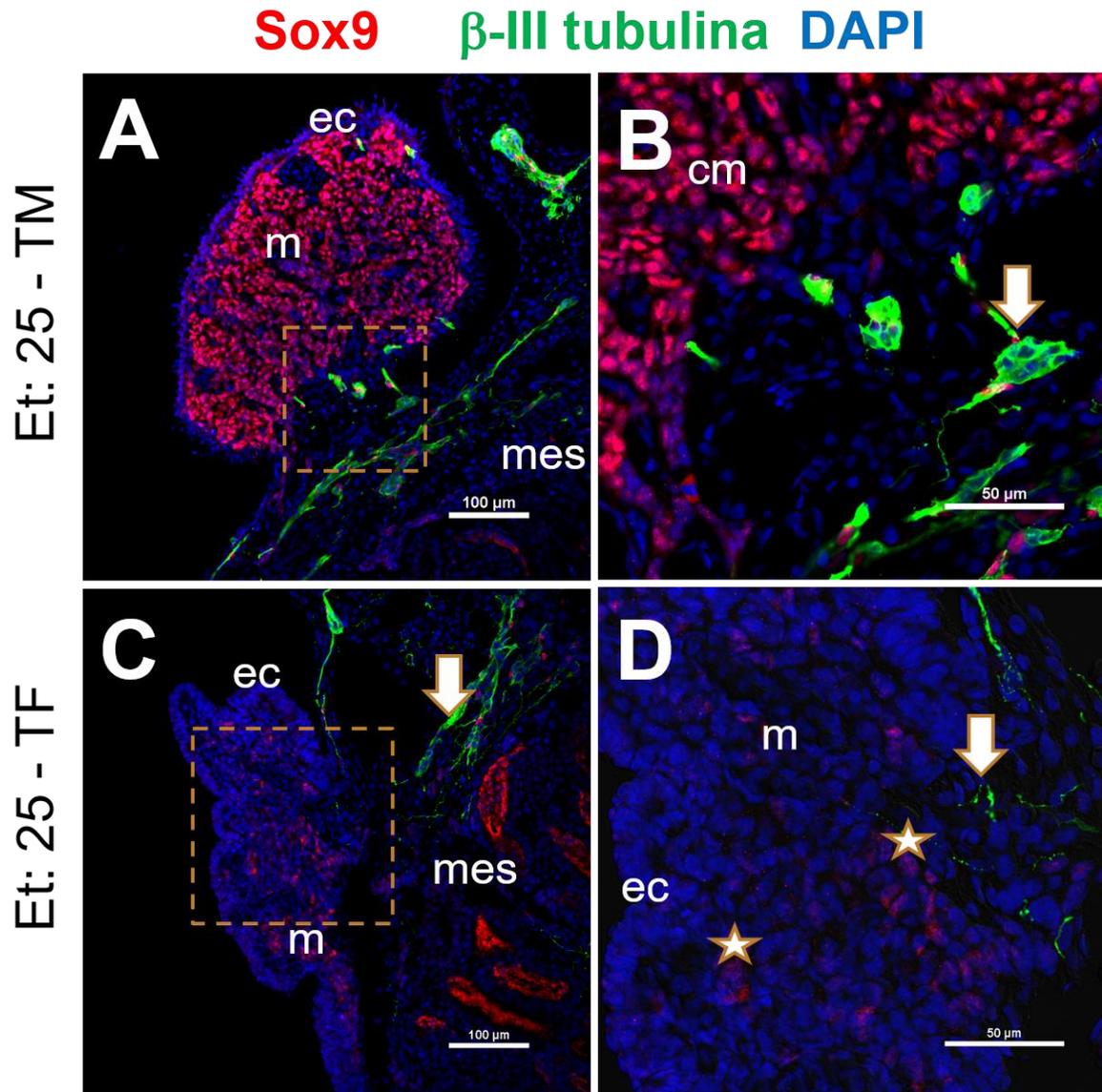


Figura 16. Micrografías representativas de gónadas pertenecientes a embriones en etapa 25 incubados a TM (A y B) y TF (C y D). A) Gónada de embrión incubado a TM. Se observan cordones medulares positivos a Sox9 (cm), algunos axones (flecha) se desplazan desde el mesonefros hacia el hilio de la gónada. B) imagen a mayor resolución de A. Se observan nervios ingresando a la gónada a través del hilio C) Gónada perteneciente a un embrión incubado a TF. Se observa una gran cantidad de fibras nerviosas positivas a β -III tubulina (flecha) en el mesonefros (mes). Además, las dos regiones gonadales: la corteza (ec) y la medula (m). D) Imagen a mayor resolución de la imagen C, se observa que la cantidad de células positivas a Sox9 (estrella) ha disminuido en la región medular (m). Fibras nerviosas invaden la región medular de la gónada (flecha). DAPI: Azul, Sox9: Rojo, β -III tubulina verde.

En etapa 26 la presencia de células positivas a Sox9 al interior de gónadas de embriones incubados a TF se limitó únicamente a células glía. Por otro lado, en gónadas de embriones incubados a TM, Sox9 evidenció la clara formación de cordones sexuales, siendo evidente la separación entre el compartimiento epitelial y el estromático. Respecto a los nervios, gónadas incubadas a TM presentaron una disminución en la expresión de β -III tubulina (verde) presente al interior de la gónada. Sin embargo, aquellas gónadas provenientes de embriones incubados a TF presentaron un aumento sustancial en la presencia de inervación, con una gran cantidad de nervios ingresando a través del hilio y recorriendo la médula (Figura 17).

Sox9 **β-III tubulina** **DAPI**

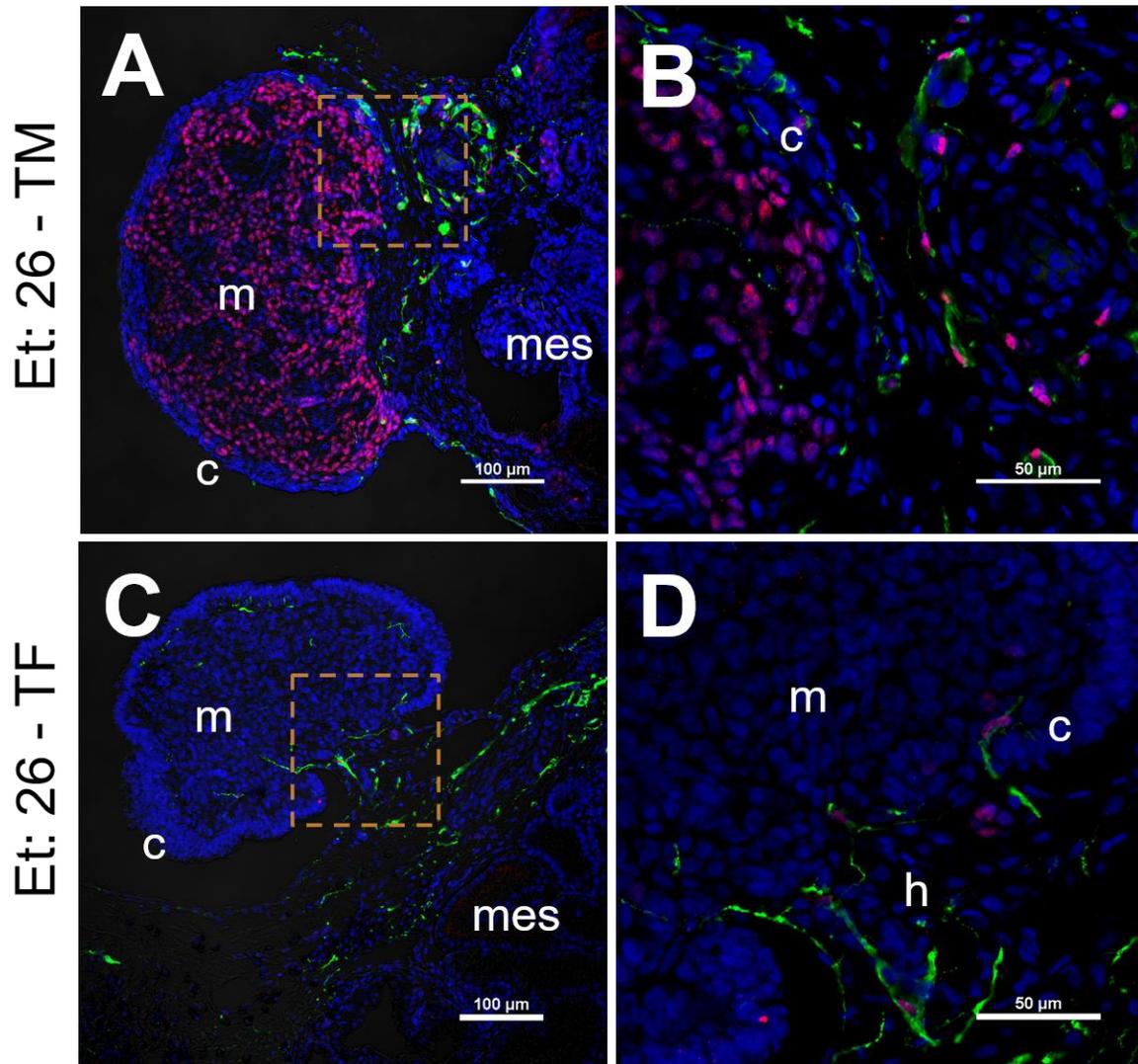


Figura 17. Gónadas pertenecientes a embriones incubados a TM y TF en etapa 26. A) Gónada de embrión incubado a TM. Se observa un decrecimiento en la cantidad de nervios (Verde) presentes al interior de gónadas durante el desarrollo testicular. B) Imagen a mayor resolución de A, se observan algunos nervios al interior del testículo siendo afines a la corteza (c). C) Se observa un aumento en la cantidad de nervios en gónadas en desarrollo ovárico (A). D) imagen a mayor resolución de C, parte del hilum (h) con numerosos nervios ingresando a la gónada. m: medula; c: corteza; mes: mesonefros.

En etapa 27 se observó la tendencia en el decremento de nervios al interior de los testículos con ligeras marcas asociadas al epitelio celómico y a la médula. Por el

contrario, en los ovarios se observa la tendencia a una mayor inervación, principalmente en la médula ovárica (Figura 18).

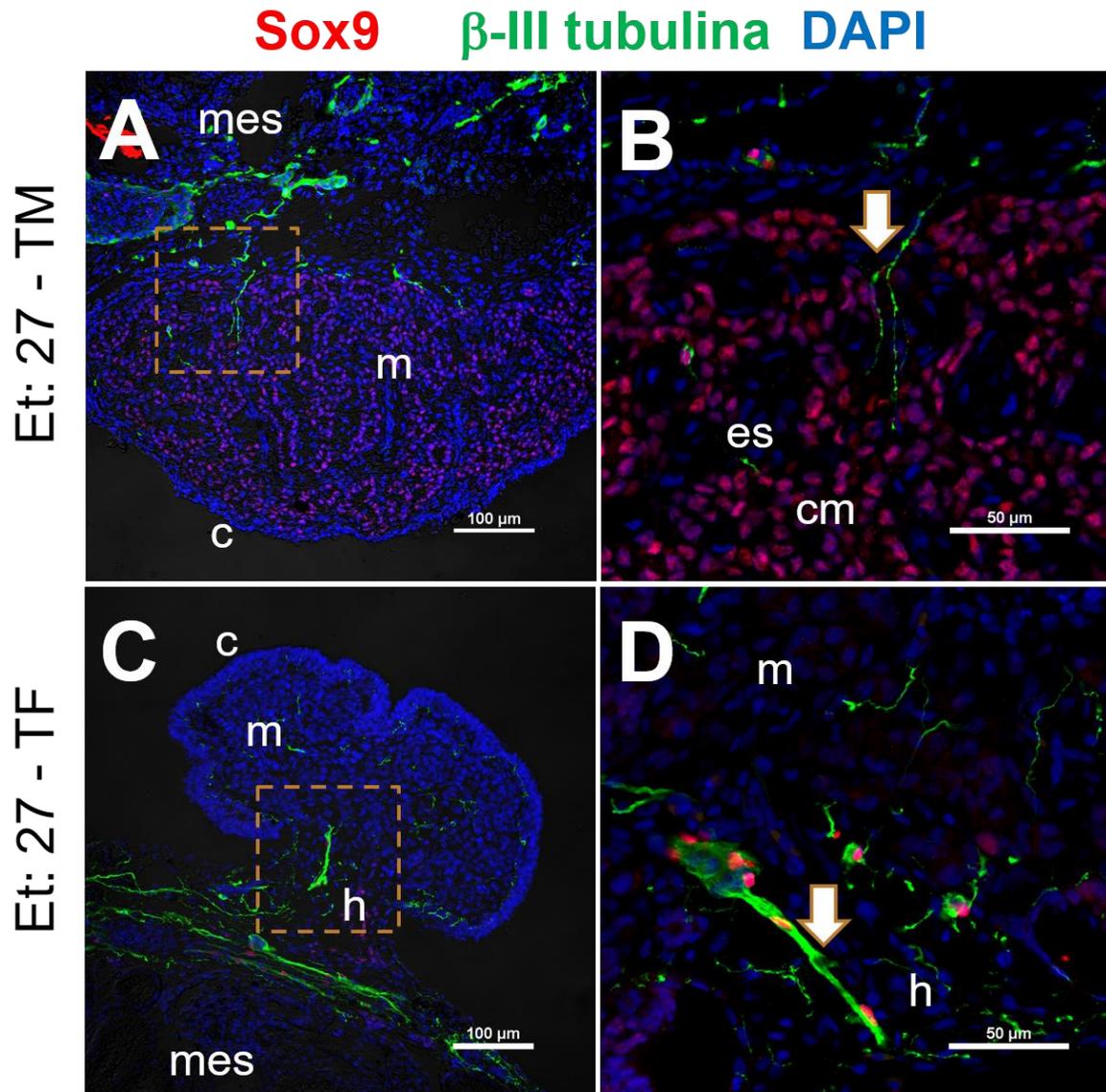


Figura 18. Gónadas de embriones incubados a TM y TF en etapa 27. A) Testículo diferenciado, la presencia de nervios se observa asociada a la corteza y en algunas partes invade la médula testicular. B) Imagen a mayor resolución de A. Se observa la presencia de delgados nervios al interior de la médula del testículo (flecha). C) similar a la etapa 26, se observa la presencia de varios nervios al interior de la médula (m) ovárica. D) Imagen a mayor resolución de C, Se observa la presencia de nervios ingresando a la gónada a través del hilum (h). c: corteza; es: estroma; cm: cordón medular.

En etapa 28 la presencia de células positivas a FoxL2 afirma la diferenciación ovárica en gónadas de embriones incubados a TF (Figura 19C). Mientras que en

las gónadas de embriones incubados a TM la marca positiva de Sox9 denota la formación de cordones sexuales en el testículo (Figura 19A). De forma aparente se observa mayor presencia de fibras nerviosas ingresando a la médula de la gónada desde el mesonefros, en ovarios. En contraparte, los testículos presentaron mayor asociación de los nervios al epitelio celómico superficial. Sin embargo, no se descarta la presencia de delgadas fibras nerviosas en la parte medular (Figura 19).

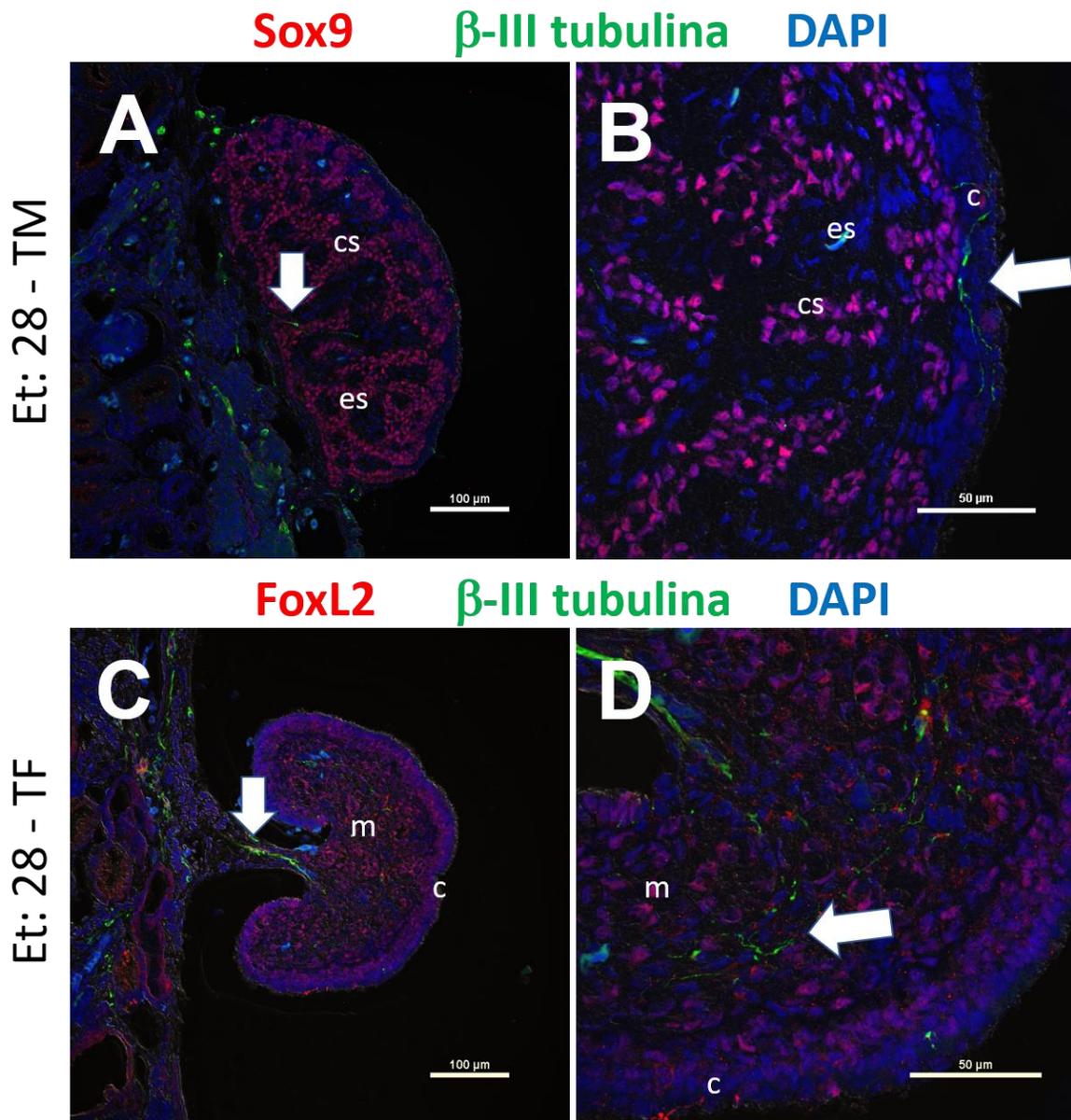


Figura 19. Gónadas de embriones incubados en etapa 28. A) Gónada de embrión incubado a TM, la marca positiva a Sox9 (rojo) en las células epiteliales de los cordones seminíferos (cs) nos indica la formación de un testículo y evidencia el estroma (es). B) Imagen a mayor resolución de un testículo,

podemos observar los cordones seminíferos (cs), el estroma (es) y la corteza (c). Además, se observa nervios recorriendo la corteza testicular (flecha). C) gónada de embrión incubado a TF, el epitelio celómico (ec) y la presencia de FoxL2 (rojo), indican la formación de un ovario. Se observa un nervio prominente en el hilio gonadal (flecha). D) Imagen a mayor resolución de C, se aprecian fibras nerviosas ingresando por el hilio gonadal, y una mayor inervación a lo largo de la médula ovárica (flecha).

Neuronas intrínsecas del ovario

Diversas observaciones y proyecciones en z lograron evidenciar núcleos (marcados con DAPI) rodeados por marcas de β -III tubulina (Figura 20A y B). Esto nos sugirió la presencia de neuronas intrínsecas en el ovario, si bien, su existencia ya ha sido reportada en ovarios de mamíferos, no se ha reportado su presencia en gónadas de reptiles con DST. Para determinar si se trataban de cuerpos neuronales se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-NeuN (también llamado Fox3), el cual es un marcador de núcleos neuronales maduros. Como control positivo se usó el tubo neural presente en cortes transversales de gónadas de embriones incubados a TM y TF (Figura 20D). Fue posible observar núcleos neuronales en el tubo neural perteneciente al sistema nervioso central y en ganglios pertenecientes al sistema nervioso periférico. Sin embargo, en la gónada de *L. olivacea* no fue posible observar presencia de núcleos neuronales durante la diferenciación sexual (Figura 20C), descartando la presencia de neuronas intrínsecas en las etapas de desarrollo estudiadas.

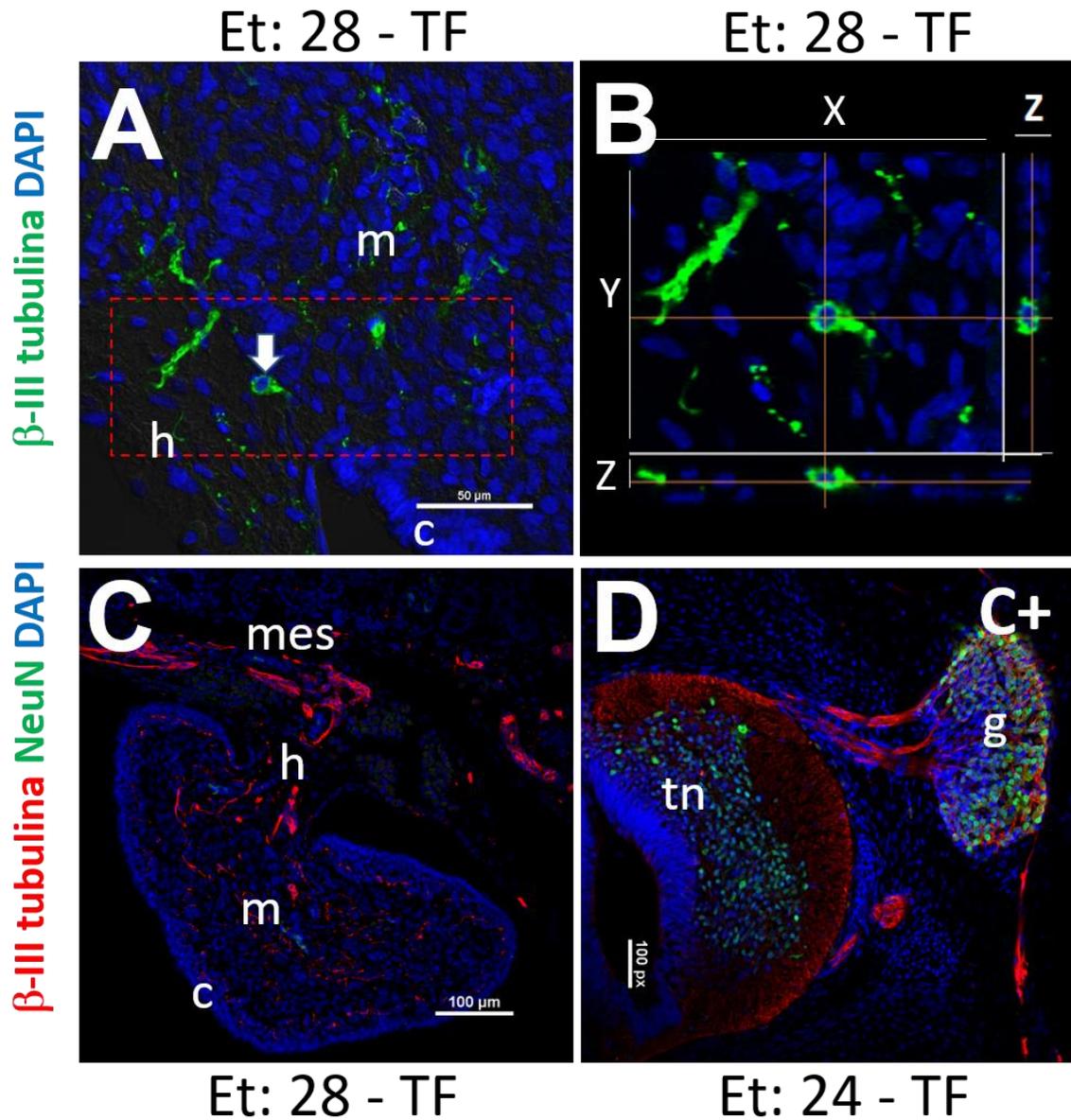


Figura 20. No existe presencia de neuronas intrínsecas en el ovario. A) Micrografía de ovario a 60X, se aprecia un núcleo celular rodeado por marca positiva a β -III tubulina (verde). B) Proyección en plano z de A, donde se observa un núcleo rodeado por marca positiva a β -III tubulina (verde) en todos sus ejes. C) Ovario de embrión en etapa 28. No se observa marca positiva a NeuN. Núcleos teñidos con DAPI (azul). D) Corte transversal de tubo neural (tn) presente en criosecciones de embriones en etapa 24. El tubo neural fue ocupado como control positivo para el marcador NeuN (verde). Además, se utilizó a β -III tubulina (rojo). h: hilum, m: médula, c: corteza, g: ganglio, C+: control positivo.

Caracterización de la vascularización mediante inmunofluorescencia

Para el análisis de la vascularización gonadal se recurrió al uso del anticuerpo anti Cav-1, el cual marca a la proteína caveolina, componente estructural de las caveolas presentes en células epiteliales y endoteliales. Este anticuerpo ha sido reportado como marcador específico de células endoteliales en ovarios de ratón (Bullejos *et al.*, 2002). Sin embargo, su estudio no ha sido aplicado en especies con DST.

En todos los cortes y etapas estudiadas, se logró observar el marcaje del epitelio celómico en el mesonefros. Así como de células epiteliales y endoteliales en distintos compartimientos de la gónada. En etapas 23 y 24 no se observó diferencias en la marca obtenida mediante Cav-1 entre TM y TF. En etapa 23 la presencia de vasos sanguíneos no fue evidente al interior de las gónadas, pero sí en el mesonefros. Algunas células del epitelio celómico presentaron marca positiva a Cav-1 polarizada, siendo positiva en la base de la célula (con dirección a la médula) y negativa en el ápice (con dirección al celoma) (figura 21).

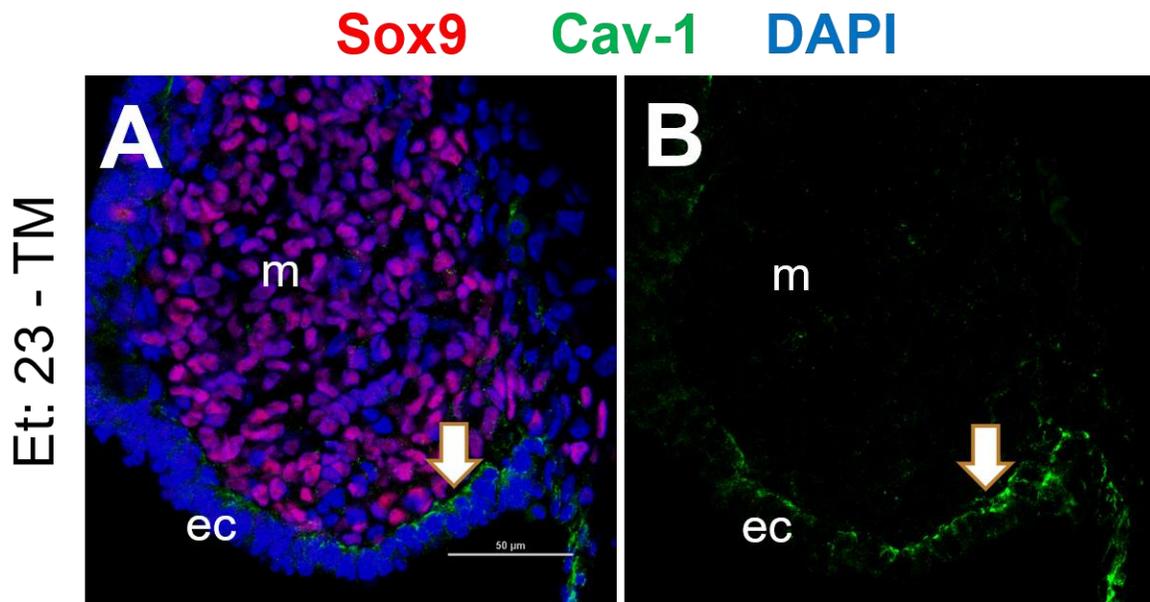


Figura 21. A) Gónada de embrión incubado a TM en etapa 23, similar a la gónada incubada a TF. Se observa un fragmento de la gónada con células positivas a Sox9 en la región medular (m). Por debajo del epitelio celómico (ec) se aprecia marca positiva a Cav-1 (flechas). B) Imagen en un solo

canal de A, se aprecia la marca de Cav-1 positiva en células del epitelio celómico únicamente con dirección a la médula.

Durante la etapa 24 es posible observar vasos sanguíneos positivos a cav-1 al interior de la gónada. Su disposición parece ser similar en gónadas de embriones incubados tanto a TM como a TF (Figura 22)

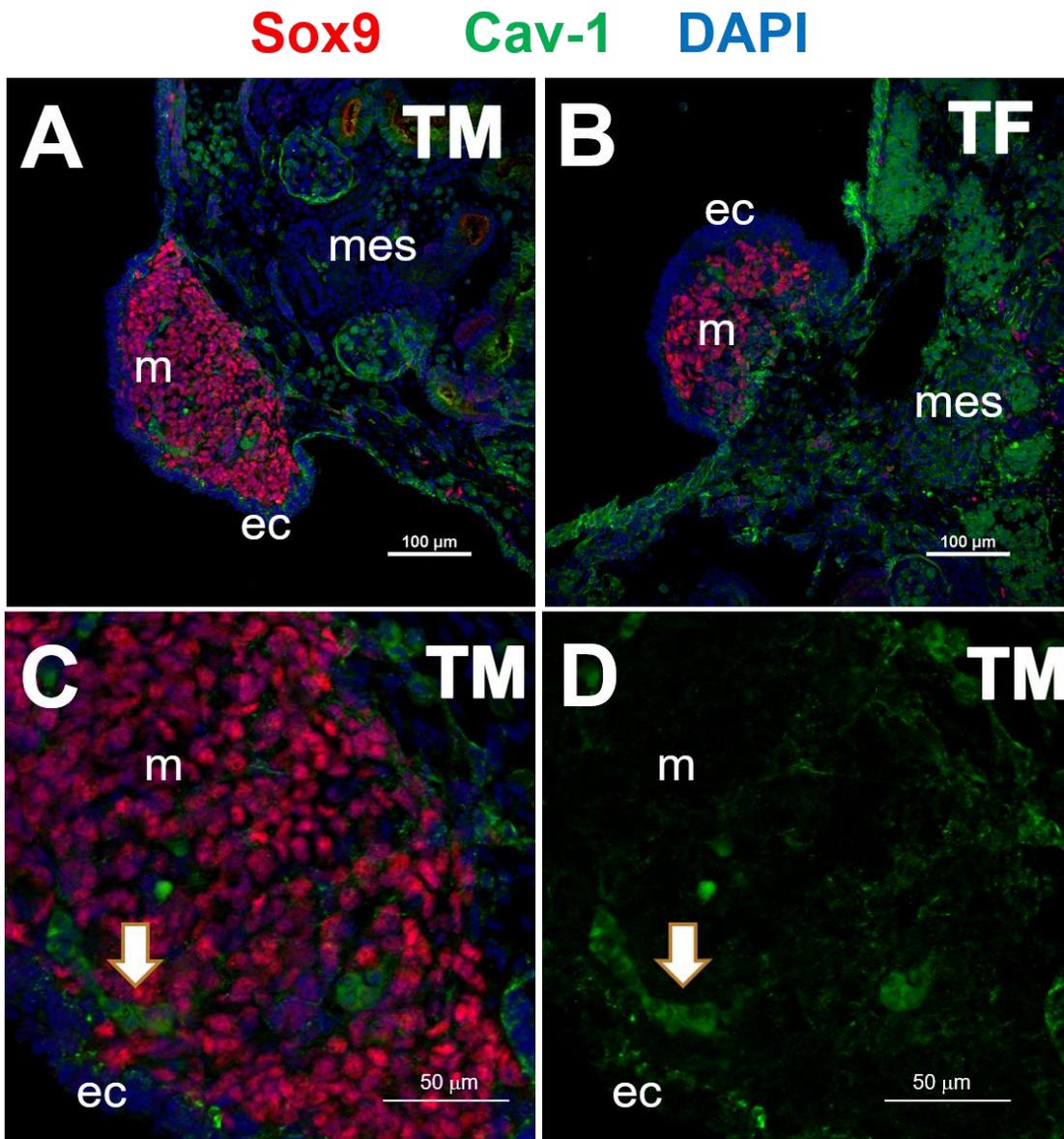


Figura 22. Cortes transversales de gónadas incubadas a TM (A) y TF (B) no evidencian dimorfismo en la vascularización durante el periodo indiferenciado de la gónada (Et: 24). Sox9 se expresa en células de la médula (m) para gónadas de embriones incubados en ambas temperaturas. Además, se observan algunos vasos sanguíneos al interior de la médula gonadal. C) Imagen a mayor

resolución de A, Se observa con mayor detalle algunos vasos sanguíneos (flechas) recorriendo la parte medular. D) Imagen en un solo canal de C, Se observa la marca positiva a Cav-1. Por otro lado, algunas células del epitelio celómico (ec) se observan marcadas con Cav-1 de forma polarizada (similar a etapa 23). Mes: mesonefros.

En etapa 25 la disposición de vasos sanguíneos se observó similar en gónadas de embriones incubados en ambas temperaturas. Dichas células endoteliales se encontraron en la región medular de ambas gónadas, a pesar del inicio en la diferenciación sexual, no fue posible observar algún indicio dimórfico en la disposición de los vasos sanguíneos (Figura 23).

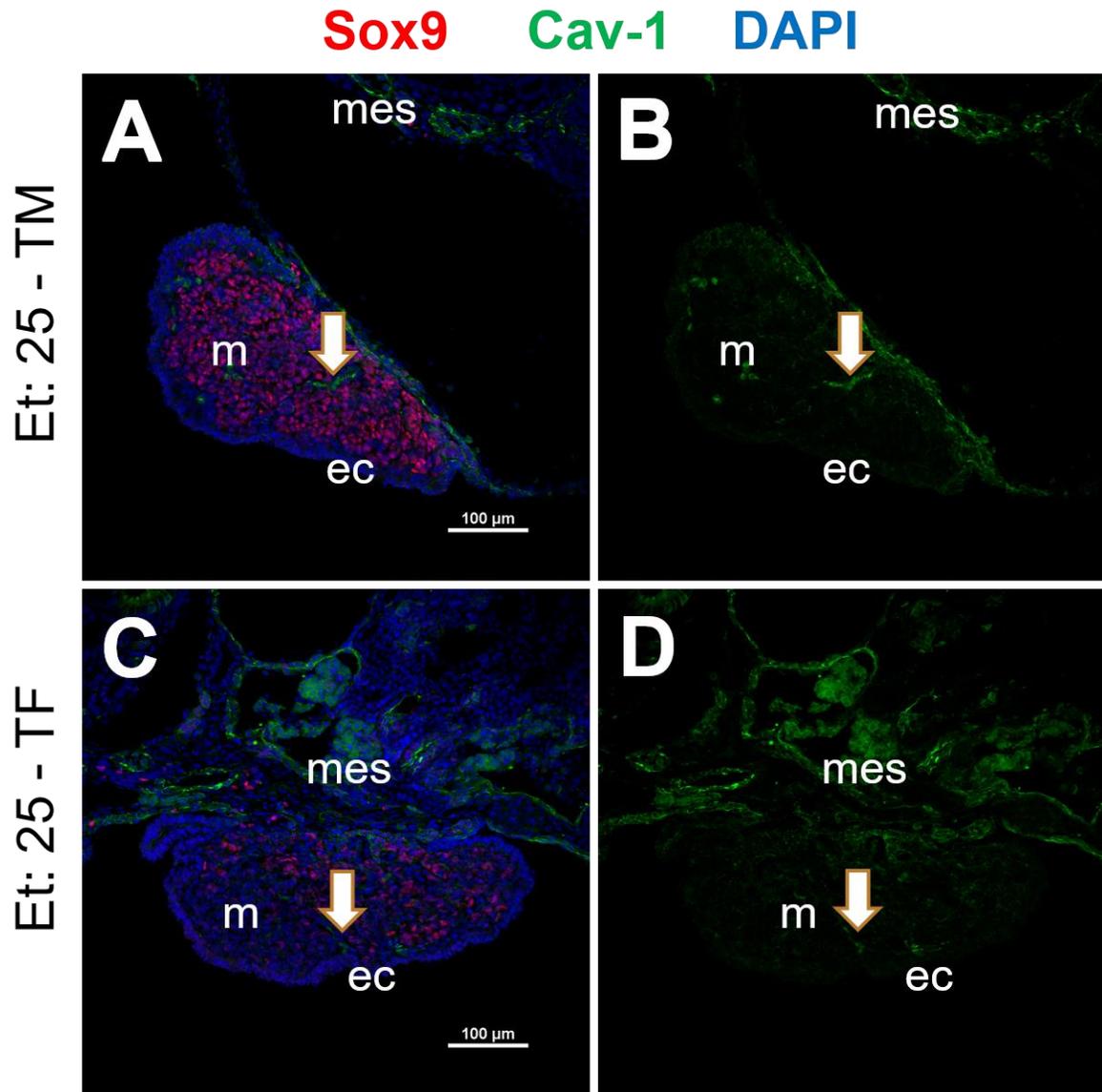


Figura 23. Gónadas de embriones incubados a TM y TF en etapa 25. A) Testículo potencial de embrión incubado a TM, se observa Sox9 (Rojo), Cav-1 (Verde) y DAPI (Azul). B) imagen en un canal de la imagen A, Se muestra únicamente a células positivas a Cav-1. C) Ovario potencial, se observa Sox9, Cav-1 y DAPI. D) Imagen en un sólo canal de C, se muestra células positivas a Cav-1. No se observan diferencias aparentes en la distribución de Cav-1 para ambas temperaturas. La cantidad de células Sox9 positivas disminuye en gónadas de embriones incubados a TF (C). Se distinguen algunos vasos sanguíneos (flechas) al interior de la médula (m) gonadal. Mes: mesonefros; ec: epitelio celómico.

En etapa 26 se logró observar un aumento en la cantidad de vasos sanguíneos en gónadas pertenecientes a embriones incubados en ambas temperaturas. En testículos, las células endoteliales se encontraron recorriendo el espacio

estromático. Además, la marca de Cav-1 fue positiva en las células del epitelio celómico (Figura 24).

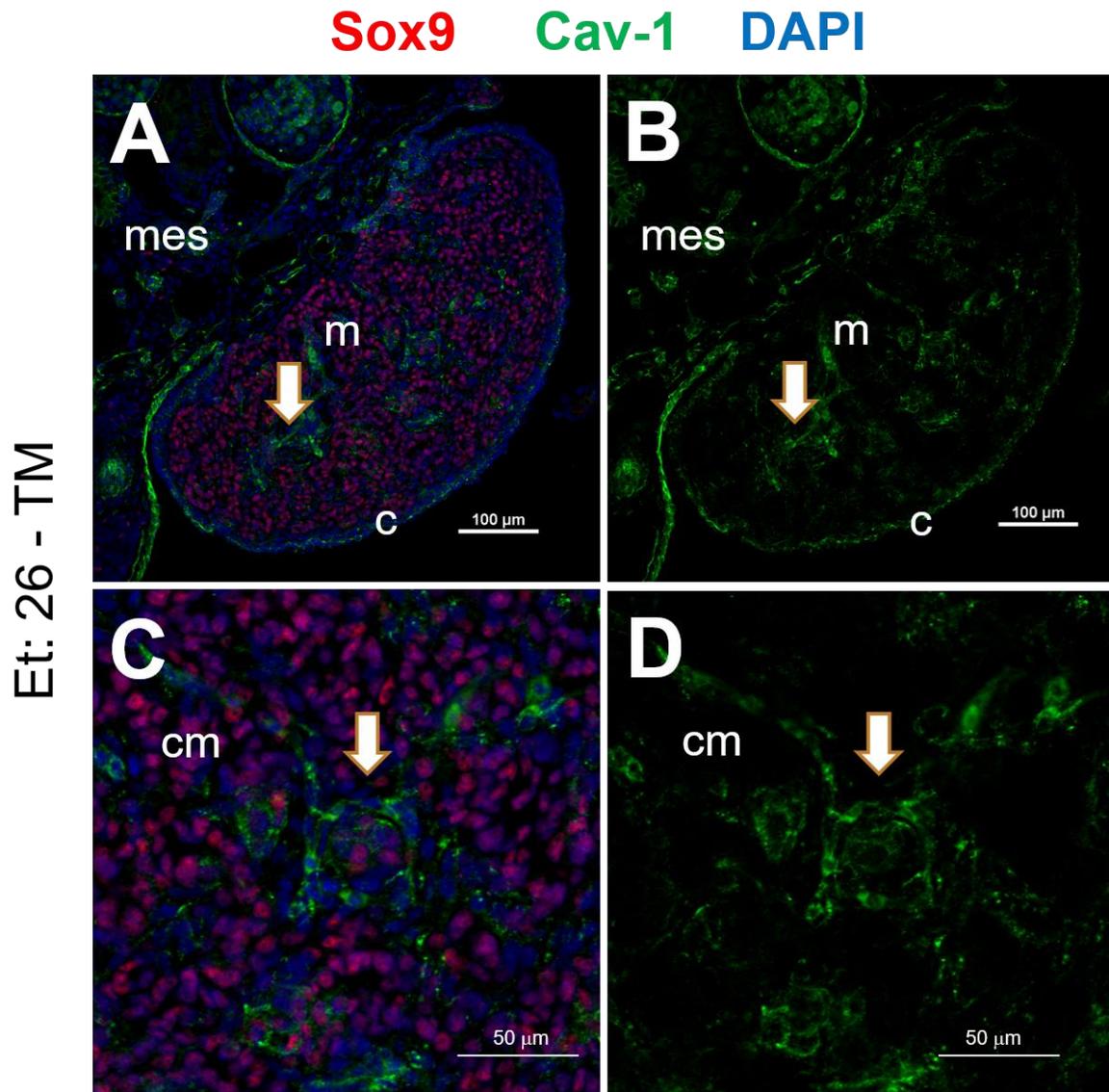


Figura 24. A) Testículo de embrión en etapa 26 incubado a TM. Se observa parte del mesonefros. B) Imagen de la marca positiva a Cav-1 (verde). Se distinguen algunos vasos sanguíneos (flechas) recorriendo el estroma gonadal. C) Imagen a mayor resolución de A. Se observan cordones sexuales (cs) positivos a Sox9 (rojo). Entre ellos, algunos vasos sanguíneos (flechas) recorriendo el estroma gonadal. D) Imagen en un solo canal de Cav-1. Mes: mesonefros.

Por otro lado, en ovarios se observó la entrada de células endoteliales a través del hilio, sin embargo, también fue posible observar a células epiteliales en la médula

positivas a Cav-1. Contrario a lo observado en los testículos, ninguna célula del epitelio celómico presento marca positiva (Figura 25).

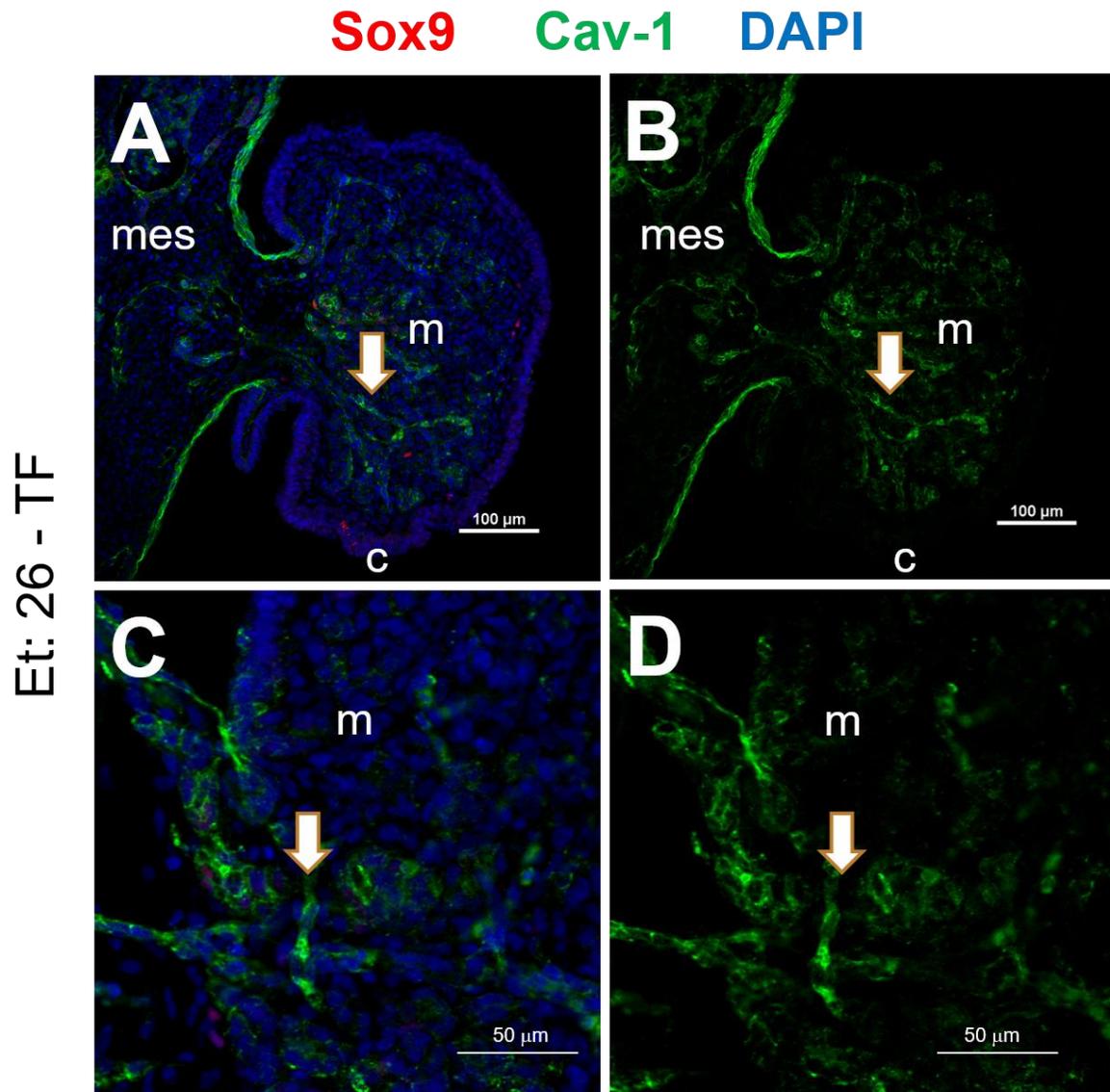


Figura 25. A) Corte transversal de ovario tratado con los anticuerpos Sox9 (Rojo), Cav-1 (Verde) y DAPI (Azul). B) Se observa Cav-1 marcando vasos sanguíneos (flechas) invadiendo el ovario a través del hilio y vascularizando la médula (m). No se observa marca positiva en la corteza ovárica (c). Mes: mesonefros.

En etapa 27 la marca de Cav-1 se observó similar a la etapa 26. En el caso de los testículos, se observan vasos sanguíneos en la región del estroma testicular. Además, las células del epitelio superficial son positivas a Cav-1. Por otro lado, los

ovarios muestran la entrada de grandes vasos a la médula de la gónada desde la región del mesonefros. Sin embargo, la corteza se observa desprovista de marca positiva a Cav-1. Por otro lado, en la región medular es posible observar a un grupo de células epiteliales positivas a Cav-1 (Figura 26).

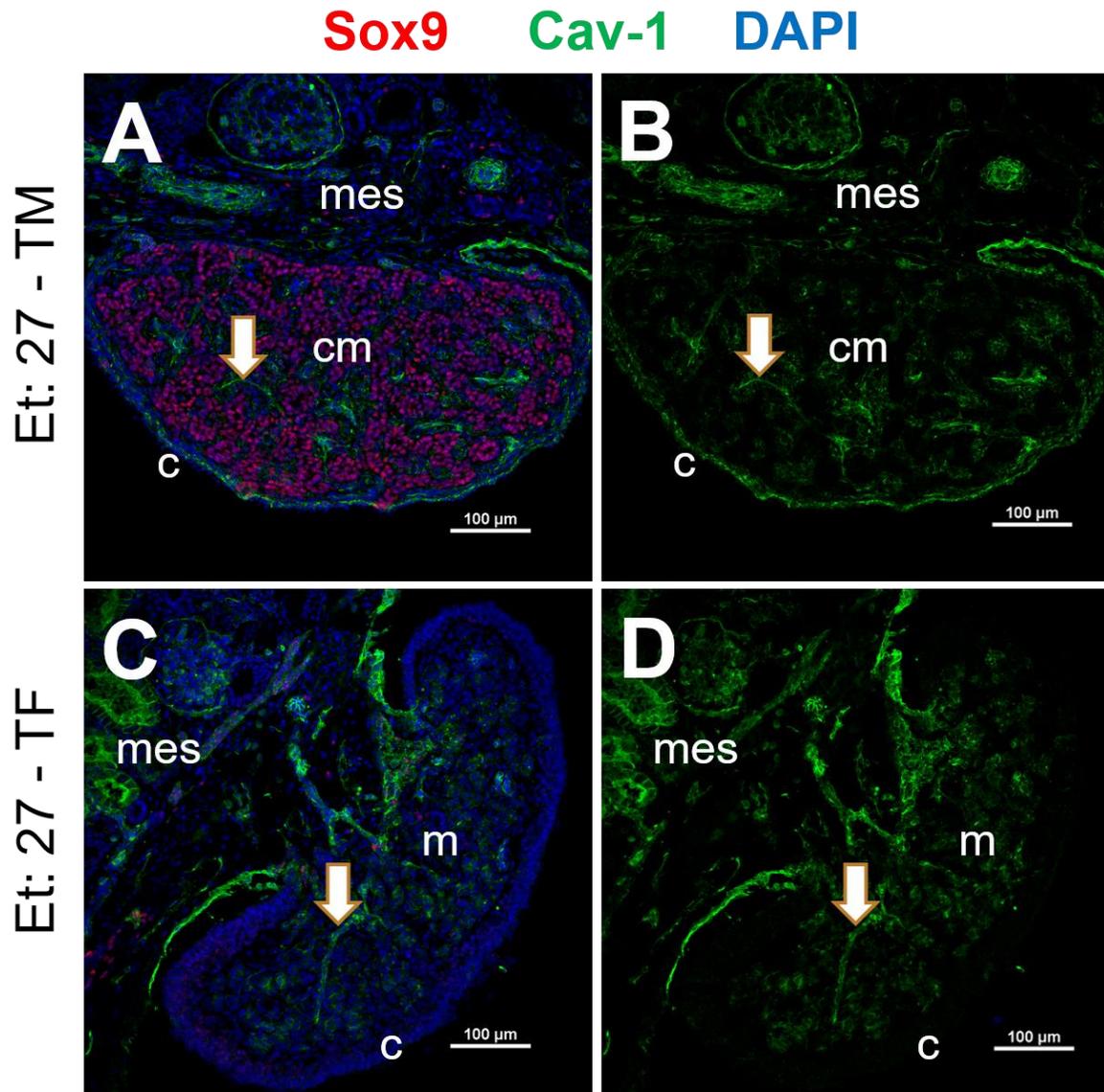


Figura 26. Gónadas de embriones incubados a TM (A y B) y TF (C yD) en etapa 27. A) Micrografía de un testículo, Se observan células positivas a Sox9 (Rojo), Cav-1 (Verde) y DAPI (Azul). B) Imagen de la marca positiva a Cav-1. Se observan vasos sanguíneos recorriendo el estroma del testículo (flechas). Además, células de la corteza (c) siendo positivas a Cav-1. C) Imagen de un ovario marcado con Sox9, Cav-1 y DAPI. D) Imagen en un sólo canal de C. Se observan células positivas

a Cav-1; vasos sanguíneos ingresando a la médula (m) del ovario a través del hilio, así como células epiteliales en la medula.

Durante la etapa 28 fue posible observar el mismo patrón dimórfico en la marca de Cav-1 en células epiteliales. En el caso de testículos diferenciados, se observó marca positiva a Cav-1 en la corteza. Mientras que, en ovarios, la marca positiva se observó en las células epiteliales que conforman a las lacunas (Figura 27).

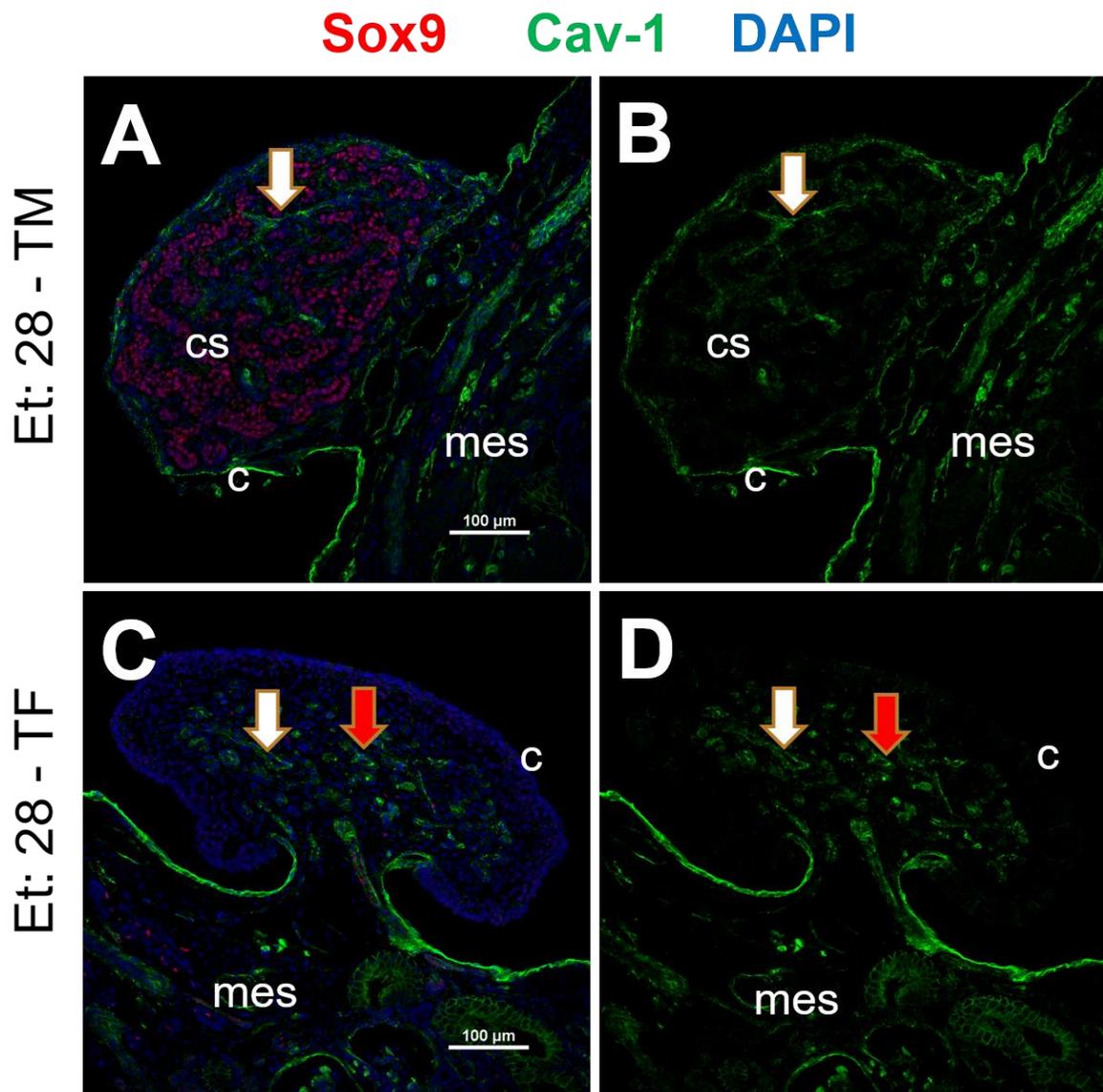


Figura 27. Gónadas de embriones en etapa 28 incubados a TM (A y B) y TF (C y D). A) testículo marcado con Sox9 (Rojo) Cav-1 (Verde) y DAPI (Azul). B) imagen en un sólo canal de A, Se observa la marca de Cav-1 en la corteza (c), marcando células epiteliales en la corteza y vasos sanguíneos (flecha) en la médula, entre los cordones sexuales (cm). C) Ovario marcado con Sox9, Cav-1 y DAPI.

D) Se observa la marca de Cav-1 marcando vasos sanguíneos (flechas) y algunas células epiteliales (flechas rojas) al interior de la medula ovárica, correspondientes a las lacunas.

Análisis de los perfiles de expresión de factores de crecimiento

El estudio del perfil de expresión de factores moleculares que intervienen en los procesos de inervación (NGF) y vascularización (VEGF) se realizó mediante RT-PCR. Datos semicuantitativos fueron calculados mediante valores densitométricos y relativizados con la expresión del gen endógeno Peptidil Propil Isomerasa A (PPIA).

Análisis del factor de crecimiento nervioso

Los valores obtenidos a partir de densitometría mostraron que la expresión semicuantitativa de NGF en etapas biopotenciales (Et: 23 y 24) se observa similar tanto a TM como TF. En etapa 25, al inicio de la diferenciación sexual se observa una mayor expresión de NGF a TM. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto a TF. En etapa 26, la expresión de NGF se observa mayor a TM, con diferencias significativas respecto a TF. Por el contrario, en etapa 28 el patrón de expresión cambia abruptamente, manteniendo una mayor presencia de RNA mensajeros en ovarios diferenciados a TF. Mientras que, a TM su expresión disminuye (Figura 28).

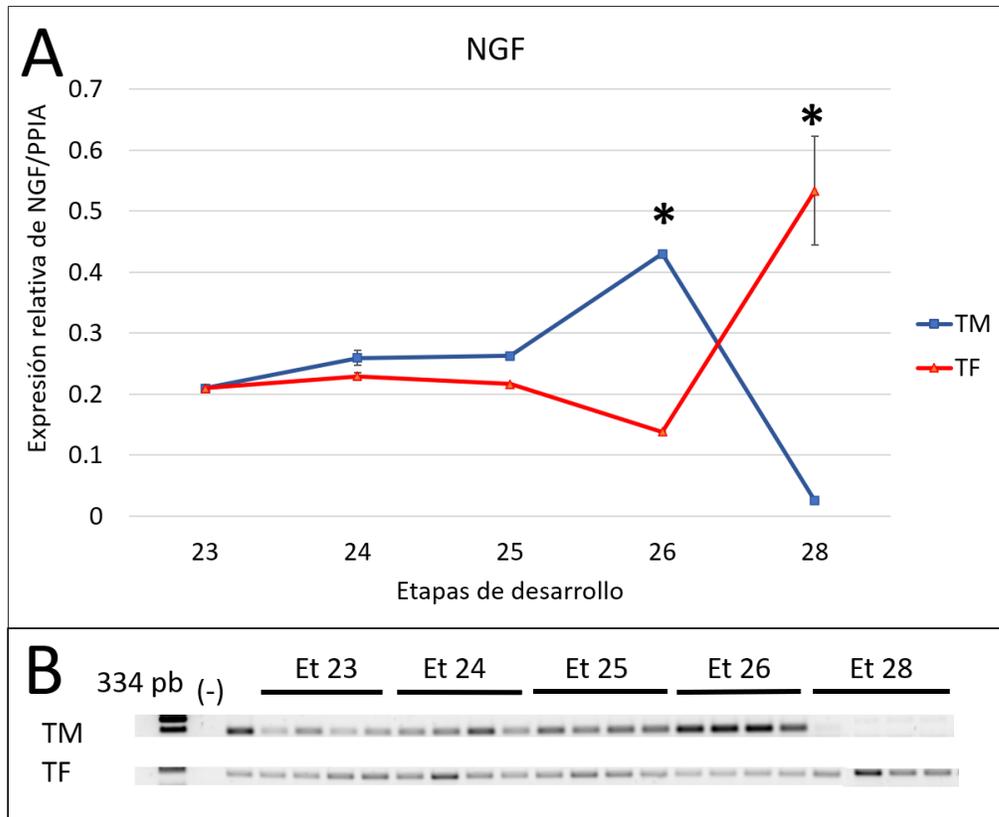


Figura 28. Expresión de NGF obtenida a partir de RT-PCR. A) Perfiles de expresión obtenidos a partir de análisis densitométrico, se observa una expresión similar del gen NGF durante etapas biopotenciales (Et: 23 y 24) y al inicio de la diferenciación (Et: 25). En etapa 26 se observan diferencias significativas, siendo mayor la expresión a TM. En etapa 28 la expresión se invierte, favoreciendo a embriones incubados a TF, respecto a los incubados a TM. B) Imagen representativa de los geles obtenidos a partir de cDNA gonadal de *Lepidochelys olivacea* en diferentes etapas de desarrollo (Et:23, 24, 25, 26 y 28) incubados a TM y TF.

Análisis del factor de crecimiento de endotelio vascular

El análisis de VEGF mediante RT-PCR develó la presencia de dos isoformas; VEGF-A₁₂₁ y VEGF-A₁₆₅, ambas presentes en gónadas de embriones incubados a TM y TF (Figura 29B). El análisis densitométrico reveló una expresión diferencial para ambas isoformas durante etapas biopotenciales (Et:23 y 24) y de diferenciación (Et: 25 y 26). Sin embargo, en etapa 28 la expresión de VEGF-A₁₂₁ y VEGF-A₁₆₅, decremanta en gónadas de embriones incubados en ambas temperaturas (Figura 29A).

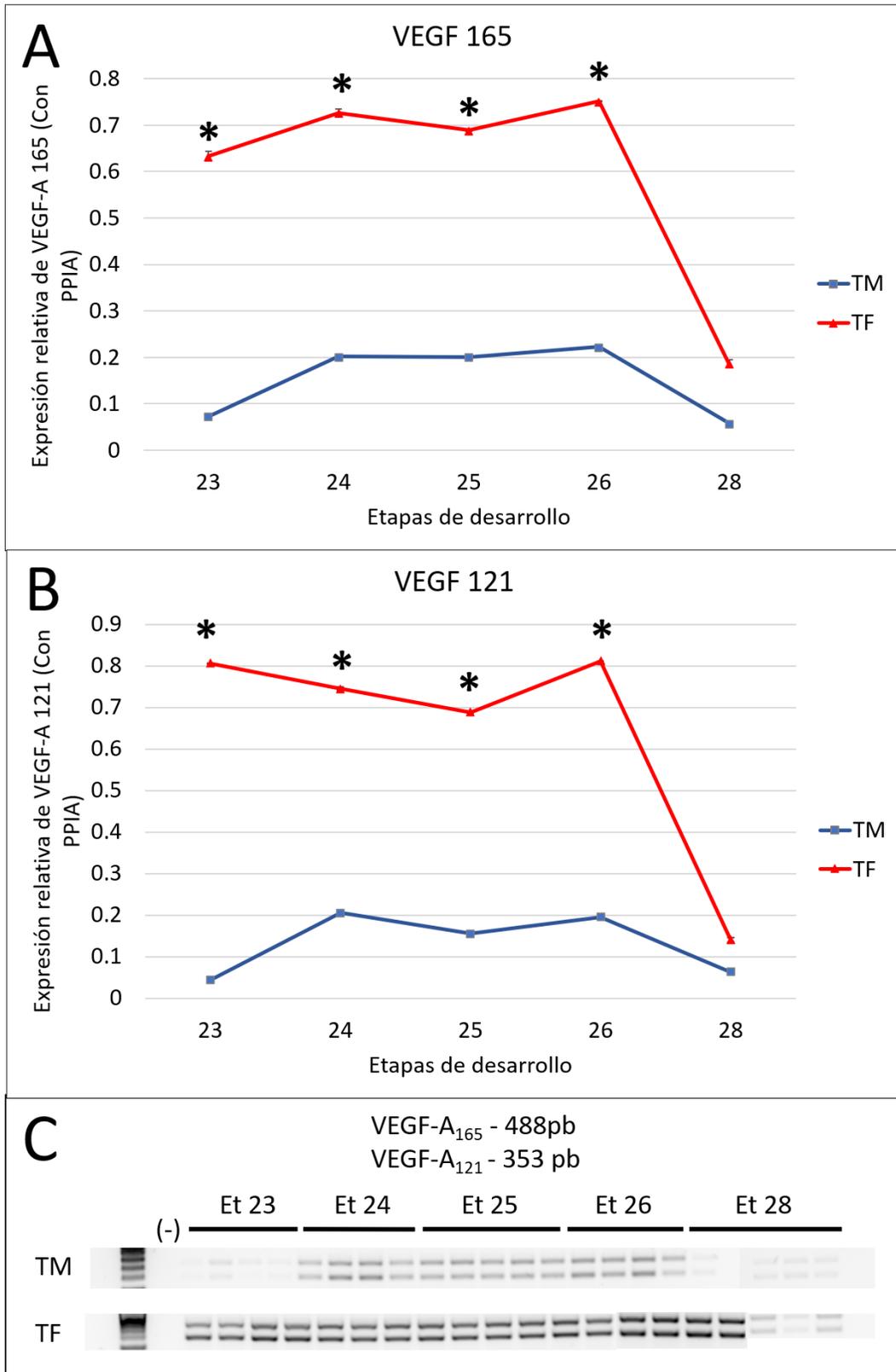


Figura 29. Expresión de VEGF a partir de RT-PCR. A) Perfil de expresión obtenido a partir de análisis

densitométrico, se aprecia la expresión diferencial de VEGF-A₁₆₅ en etapas 23, 24, 25 y 26, siendo mayor su expresión en gónadas de embriones incubados a TF. En etapa 28 se observa que la expresión disminuye en ambas temperaturas. C) perfil de expresión obtenido para la isoforma de VEGF-A₁₂₁, se aprecia un patrón similar a la isoforma 165. Se obtuvieron diferencias significativas en etapas con gónadas biopotenciales (Et: 23 y 24) y en diferenciación (Et: 25 y 26). Mientras que, en gónadas diferenciadas (Et: 28) la expresión de la isoforma 121 decae en gónadas de embriones incubados a TM y TF. B) Imagen representativa de los geles obtenidos a partir de cDNA gonadal de *Lepidochelys olivacea* en diferentes etapas de desarrollo (Et:23, 24, 25, 26 y 28) incubados a TM y TF. Se observan dos bandas correspondientes a las isoformas de VEGF-A₁₂₁ y VEGF-A₁₆₅.

DISCUSIÓN

El estudio de la diferenciación sexual gonadal se ha enfocado principalmente en el análisis de los epitelios mediante metodologías histológicas y moleculares. Por ejemplo, ha sido ampliamente descrito la formación de los túbulos seminíferos del testículo y la formación de los folículos en el ovario, así como los procesos moleculares involucrados en el establecimiento del sexo. Sin embargo, menor cantidad de trabajos de investigación han sido enfocados al estudio del estroma y su influencia en la diferenciación sexual.

Dos elementos importantes presentes en el tejido conectivo de la gónada son los vasos sanguíneos y las ramificaciones del sistema nervioso. Su estudio se ha realizado principalmente en mamíferos, siendo especies con DSG Coveney *et al.*, 2008; McKey *et al.*, 2019). Sin embargo, en especies con DST el panorama es bastante limitado. La existencia de artículos científicos sobre la inervación durante el desarrollo gonadal es reducida (Gutiérrez-Ospina *et al.*, 1999; Jiménez-Trejo *et al.*, 2011). Mientras que, el estudio de vasos sanguíneos es prácticamente inexistente. Por lo que, el presente trabajo colabora en la búsqueda de información en un campo poco explorado.

De acuerdo con el primer objetivo estipulado se determinó analizar la disposición morfológica de las ramas nerviosas y el endotelio vascular durante el desarrollo gonadal de *Lepidochelys olivacea*, tanto en embriones incubados a TM como a TF.

En primera instancia se logró determinar la existencia de nervios positivos a β -III tubulina al interior de las gónadas en todas las etapas estudiadas, incluyendo etapas tempranas de desarrollo gonadal (Et:23 y 24) donde la expresión de Sox9 en gónadas de embriones incubados a TM y TF indican el fenotipo de gónada biopotencial (Díaz-Hernández *et al.*, 2012). Esto resulta ser contrario a lo observado en especies con DSG. En donde, la presencia de inervación en gónadas de ratón estuvo únicamente relacionado a la formación de ovarios, y fue presente en etapas avanzadas de diferenciación sexual (McKey *et al.*, 2019). A partir de los 16.5 dpc en ratón, es posible observar nervios positivos a β -III tubulina invadiendo el ovario,

pero no al testículo (McKey *et al.*, 2019). De forma contraria, en *Lepidochelys olivacea*, a partir de la etapa 23, tanto en gónadas con desarrollo testicular y ovárico, es posible observar la presencia de nervios. Esta discrepancia, podría ser un factor clave en la estrategia de determinación sexual por temperatura. La cual podría sugerir la participación del sistema nervioso en algún proceso de regulación a inicios de la diferenciación sexual o incluso durante la determinación sexual.

La hipótesis sobre la posible participación del sistema nervioso en la regulación de la diferenciación sexual inició con la observación mediante microscopía electrónica de axones sin mielina en ovarios diferenciados (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Trabajos posteriores intentaron dilucidar si dichos nervios participan en procesos de determinación del sexo a través de metodologías como inmunohistoquímica (Gutiérrez-Ospina *et al.*, 1999; Jiménez-Trejo *et al.*, 2011) y cultivo de órganos (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001; Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990). Sin embargo, estos trabajos no han sido concluyentes. En cuanto al mecanismo se ha evaluado la participación de canales dependientes de temperatura o canales TRPV. Un estudio realizado en *Alligator mississippiensis* demostró la activación del canal TRPV4 a temperaturas cercanas en las cuales se determina el sexo. Además, observaron que la actividad del canal afecta los patrones de expresión génica asociados con la diferenciación sexual masculina (Yatsu *et al.*, 2015).

En cuanto a la disposición morfológica, Gutiérrez-Ospina y colaboradores (1999) realizaron un marcaje de nervios mediante la enzima acetilcolinesterasa en cortes transversales de gónada de *Lepidochelys olivacea* en diferentes etapas del desarrollo. Durante las etapas 23 y 24 se observaron nervios por debajo del epitelio celómico, sin embargo, en el presente trabajo logramos demostrar la presencia de ramas nerviosas tanto por debajo del epitelio celómico, como en la región medular y en gónadas de embriones incubados en ambas temperaturas. La diferencia podría deberse al anticuerpo usado por los investigadores, siendo la enzima acetilcolinesterasa, la cual participa en la hidrólisis de la acetilcolina en neuronas colinérgicas. Por otro lado, en el presente trabajo se utilizó un anticuerpo reactivo a β -III tubulina, el cual marca diferentes tipos neuronales. Además, la polarización de

las ramas nerviosas al interior de la gónada (Figura 15) dificulta la representatividad del órgano completo en cortes transversales. Siendo esta metodología la ocupada por Gutiérrez-Ospina y colaboradores (1999). Mientras que, en el presente trabajo, la inmunofluorescencia *in toto* denotó que la innervación no se encuentra distribuida de forma homogénea al interior de la gónada.

En etapa 26 (durante la diferenciación de la gónada), Gutiérrez-Ospina y colaboradores (1999) describen la inervación en la región medular en embriones incubados a TM y TF. Por otro lado, nuestros resultados demuestran la presencia de una mayor cantidad de axones neuronales en gónadas incubadas a TF en la región medular. Mientras que en gónadas de embriones incubados a TM la presencia de nervios positivos a β -III tubulina se ve disminuida y su presencia se ubica tanto en la corteza como en la médula (Figura 17).

En etapa 28 logramos observar una amplia presencia de marca positiva a β -III tubulina en ovarios diferenciados, sin embargo, en testículos se observó una significativa reducción de la marca positiva al anticuerpo. La disminución en la cantidad de nervios positivos a β -III tubulina en el testículo, puede tener diferentes razones.

En primer lugar, evidencia ha demostrado que los niveles de mRNA y de la proteína β -III tubulina en células de Sertoli son regulados por la presencia de andrógenos en el testículo de ratones y ratas prepubertos (Gendt *et al.*, 2011). Por lo que, la presencia de andrógenos podría estar disminuyendo la expresión de la proteína β -III tubulina debido a la reducción de mensajeros. Además, se ha reportado que los andrógenos pueden propiciar cambios en el citoesqueleto de neuronas (Morris *et al.*, 2004; Butler *et al.*, 2001). Influyendo así en la reestructuración de los microtúbulos y evitando su marcaje mediante el anticuerpo. La síntesis de andrógenos en gónadas de *Lepidochelys olivacea* durante el desarrollo embrionario no ha sido reportada, sin embargo, las glándulas interrenales mantienen un proceso activo en la vía de síntesis de hormonas esteroides. Además, la expresión de

aromatasa muestra de forma indirecta que existen rutas metabólicas por las cuales podría estarse aromatizando andrógenos.

En segundo lugar, se sabe que β -III tubulina es ampliamente modificada postraduccionalmente a partir del residuo 430 al extremo C-terminal durante el desarrollo neural (Lee *et al.*, 1990), lo cual le confiere propiedades funcionales durante el desarrollo, catalogándose como marcador de neuronas inmaduras. Razón por la cual, los microtúbulos enriquecidos con β -III tubulina se han considerado más dinámicos que los compuestos por otros isotipos de β -tubulina (Panda *et al.*, 1994). El anticuerpo usado en el presente trabajo (G712A) se une al extremo C terminal en los residuos EAQGPK. Es decir, en residuos altamente susceptibles a modificaciones postraduccionales durante la maduración de las neuronas.

Finalmente, es posible que existan mecanismos que propicien la regresión o remodelación de las ramas nerviosas. Durante el desarrollo del sistema nervioso existe una fase de proliferación y organización de neuroblastos, seguida de una fase regresiva donde neuronas son eliminadas por apoptosis (Cowan *et al.*, 1984). Este fenómeno se ha reportado en ganglios sensoriales y autónomos, en motoneuronas, la retina, el tronco encefálico y la corteza cerebral. Otro fenómeno es la pérdida sináptica, fenómeno reportado en el sistema nervioso central y periférico. Por ejemplo, estudios sobre el desarrollo neuromuscular. En ratas neonatas las células musculares se encuentran invadidas por 5 o 6 axones, sin embargo, en adultos la mayoría de las células presentan un axón. La eliminación progresiva de axones ocurre durante las primeras 2 o 3 semanas después del nacimiento (Thomson, 1986), por lo tanto, la pérdida de marca neuronal en testículos de *Lepidochelys olivacea* podría deberse a alguno de estos fenómenos, con un mecanismo de acción similar a los anteriores.

La remodelación podría llevarse a cabo por ausencia de factores tróficos como NGF. Dicho factor garantiza la supervivencia de células nerviosas. La ausencia de este factor ocasionaría la apoptosis de neuronas o la eliminación selectiva de axones (Campenot, 1977). Esto concuerda con los resultados obtenidos. Se puede

observar una drástica reducción de NGF en gónadas de embriones incubados a TM durante la etapa 28 (Figura 28), lo cual podría ocasionar la reducción en la cantidad de axones presentes al interior del testículo (Figura 19 A). Sin embargo, es importante tomar en cuenta la actividad de otros factores neurotróficos como NT-3 y BDNF, los cuales podrían tener efecto sobre la inervación tanto en ovarios como en testículos.

Respecto al patrón vascular, durante el estadio indiferenciado podemos observar una migración progresiva de células endoteliales hacia la médula del ovario y el testículo, sin diferencias morfológicas aparentes. En las gónadas diferenciadas se observó un patrón dimórfico en la disposición de vasos sanguíneos. Esto concuerda con lo reportado en mamíferos. Coveney y colaboradores (2008) determinaron que la migración de vasos sanguíneos es un factor importante en la segregación de cordones seminíferos en el testículo de ratón, mientras que en el ovario se muestran pocos cambios morfológicos en la disposición de vasos sanguíneos, siendo similar a la distribución en gónadas bipotenciales. Sin embargo, el grado de desarrollo vascular depende de la edad (Lupiañez *et al.*, 2012), por lo que la diferencia en el tiempo y cantidad de vasos que ingresan al ovario de mamíferos y especies con DST podría ser el resultado de las diferentes estrategias de diferenciación sexual.

En *Lepidochelys olivacea*, la vascularización posiblemente tenga efecto sobre la remodelación del estroma en procesos sexo específicos. En testículos, la invasión de células endoteliales podría estar favoreciendo la formación de los cordones sexuales, similar a lo demostrado en mamíferos, mientras que en el ovario podrían favorecer la formación de lacunas. Debido a que es posible observar en etapa 26 y 27, una alta cantidad de vasos sanguíneos ingresando a la médula del ovario a partir del mesonefros. Sin embargo, estas hipótesis deben ser validadas mediante el cultivo de gónadas sin mesonefros en medios idóneos y a temperatura masculinizante y feminizante.

Por otra parte, la resolución en la disposición de células endoteliales al interior de la gónada de *Lepidochelys olivacea* se vio afectada por el marcaje de células epiteliales. Si bien ha sido reportado que Cav-1 es un marcador idóneo para la

identificación del endotelio en ovarios de mamíferos (Bullejos *et al.*, 2002; Lupiáñez *et al.*, 2012). Se ha reportado el marcaje en otros tipos celulares en el ovario del ratón y topo Ibérico como ovocitos prefoliculares y células corticales (Lupiáñez *et al.*, 2012). Además, en reptiles se ha reportado el marcaje de células epiteliales en órganos como el pulmón (Biazik y Braet, 2011). Por lo que, estudios futuros sobre vascularización en gónadas de especies con DST deberá considerar el uso de otros anticuerpos para una mayor resolución, así como técnicas nuevas que logren aumentar la especificidad; como el aclaramiento de órganos (Lupiáñez *et al.*, 2012; Aum *et al.*, 2017).

De forma interesante, la expresión dimórfica de células epiteliales marcadas con caveolina-1 sugiere una actividad diferencial en la regulación de lípidos y señales de transducción. Siendo estas más importantes en la corteza del testículo y en células que conforman las lacunas en el ovario. Esto es evidencia de que ambos tejidos juegan un papel activo durante la diferenciación sexual.

Respecto al segundo objetivo se planteó determinar los perfiles de expresión de factores moleculares que intervienen en el establecimiento de ramas nerviosas (NGF) y vasculares (VEGF).

El perfil de expresión de NGF concuerda con el patrón de inervación obtenido por inmunofluorescencia. Presentando una expresión similar de NGF en gónadas biopotenciales (Et: 23, 24) a TM y TF. Por otro lado, en gónadas diferenciadas, el ovario presentó una mayor expresión de NGF y presencia de nervios positivos a β -III tubulina. Contrario al testículo, donde la expresión de NGF decreció y la observación de ramas nerviosas es reducida.

El análisis de VEGF nos permitió identificar dos isoformas; VEGF-A₁₂₁ y VEGF-A₁₆₅. Ambas isoformas pro angiogénicas. Destaca la diferencia en la expresión del mensajero en gónadas biopotenciales y durante la diferenciación, siendo mayormente expresado a TM, respecto a TF. Sin embargo, en los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia no se observó un dimorfismo evidente en el patrón vascular. Esto puede deberse a que Cav-1 fue reactivo a células

epiteliales, por lo que sería necesario la implementación de otro método para lograr una mayor resolución en la observación de vasos sanguíneos.

CONCLUSIONES

- En esta tesis se determinaron diferencias en la disposición morfológica de ramas nerviosas, durante el desarrollo gonadal en embriones de *Lepidochelys olivacea* a TF y TM. Se observó la presencia de nervios ingresando a la región caudal de la gónada, durante la determinación sexual. En gónadas diferenciadas los nervios se ubicaron principalmente en la médula del ovario, mientras que en el testículo se encontraron mayormente asociadas al epitelio superficial.
- Se determinaron diferencias en la disposición morfológica de vasos sanguíneos en gónadas diferenciadas. Además, se estableció un patrón dimórfico en la expresión de caveolina-1 en células epiteliales de testículos y ovarios.
- Se determinaron diferencias en la expresión de los factores moleculares NGF y VEGF-A durante el desarrollo gonadal de *Lepidochelys olivacea*. La expresión de NGF fue similar durante la diferenciación sexual e inhibida significativamente en testículos diferenciados. Además, la expresión de las isoformas VEGF-A₁₂₁ y VEGF-A₁₆₅ fue mayor a TF, respecto a TM durante la determinación y diferenciación sexual. Siendo este dimorfismo un punto de interés para estudios futuros.
- Este estudio muestra otro aspecto del componente celular crítico para la morfogénesis ovárica y testicular en una especie con DST y establece bases para estudios futuros para comprender mejor su posible papel en la determinación sexual gonadal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alitalo K., Carmeliet P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1 (3): 219-27.

Asis-Silva F. (1986). La temperatura como factor determinante de la diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea*. *Tiempos de Ciencia*, 2: 17-20.

Benabib-Nisenbaum M. (1984). Efecto de la Temperatura de Incubación, la Posición del Nido y la Fecha de Anidación en la Determinación del Sexo de *Dermochelys coriacea*. Universidad Nacional Autónoma de México, M.S. Tesis.

Brennan J., Karl J., Capel B. (2002). Divergent Vascular Mechanisms Downstream of Sry Establish the Arterial System in the XY Gonad. *Developmental Biology*, 244(2): 418-428.

Buehr M., Gu S. McLaren A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, 117(1): 273-281.

Bull J. (1983). Evolution of the sex determining mechanisms. Benjamin-Cummings Publishing Company, 316.

Bullejos M., Bowles J., Koopman P. (2002). Extensive vascularization of developing mouse ovaries revealed by Caveolin-1 expression. *Developmental Dynamics*, 225(1): 95-99.

Butler R., Leigh P., Gallo J. (2001). Androgen-induced up-regulation of tubulin isoforms in neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. 78(4): 854–861.

Byskov A. (1982). Primordial germ cells and regulation of meiosis. Austin CR, Short RV (eds.) *Reproduction in mammals*, Cambridge university press, 2(1): 1-16.

Campenot R. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(10):4516-4519.

Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M. Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L.,

Collen D., Risau W., Nagy A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380 (6573): 435-439.

Charnier M. (1966). Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidaie, Lacertilien). *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 160 (3): 620–622.

Chino-Palomo L. (2017). Estudio ultraestructural de la gónada de *Lepidochelys olivácea* durante el periodo sensible a la temperatura. Tesis de licenciatura. BUAP, 73

CITES. (2015). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndice I. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Colina A., Moncada R., A C. (2007). Determinación Sexual Primaria o Sexo Genético. Revisión. *MedULA, Revista de Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*, 16 (2): 67-74.

Coveney D., Cool J., Oliver T., Capel B. (2008). Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*, 105(20): 7212-7217.

Cowan W., Fawcett J., O'Leary D., Stanfield B. (1984). Regressive events in neurogenesis. *Science*, 225(4668):1258-1265.

Crews D., Bergeron J., Bull J., Flores D., Tousignant A., Skipper J., Wibbels T. (1994). Temperature-dependent sex determination in reptiles: proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Developmental Genetics*, 15 (3): 297-312.

Dalrymple G., Hampp J., Wellins D. (1985). Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill sea turtle *Eretmochelys imbricata*. *Journal of Herpetology*, 19 (1):158-159.

D'Albora H., Barcia J. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neuroscience Letters*, 205 (1): 65–67.

Díaz-Hernández V., Maromolejo-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*. *Developmental Biology*, 361(1): 156-166.

Díaz-Hernández V., Merchant-Larios H. (2017). Consideraciones generales en el establecimiento del sexo en mamíferos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(1): 27-39.

Dvorak H. (2005). Angiogenesis: update. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8): 1835–1842.

Eckert K., Bjorndal K., AbreuGrobos F., Donnelly M. (2000). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE, 4.

Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997). The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*, 18 (1): 4-25.

Ferrara N., Gerber H., LeCounter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9 (6): 669–676.

Fujimoto T., Ukeshima A., Miyayama Y., Horio F., Ninomiya E. (1979). Observations of primordial germ cells in the turtle embryo (*Caretta caretta*): Light and electron microscopic studies. *Development, Growth & Differentiation*, 21 (1): 3-10.

DeGendt K., Denolet E., Willems A., Daniels V., Clinckemalie L., Denayer S., Wilkinson M., Claessens F., Swinnen J., Verhoeven G. (2011). Expression of Tubb3, a beta-tubulin isotype, is regulated by androgens in mouse and rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 85 (5): 934–45.

Gu C., Yoshida Y., Livet j., Reirmert D., Mann F., Merte J., Henderson C., Jessell T., Kolodkin A., Ginty D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science*, 307(5707): 265–268.

Gutiérrez-Ospina G., Jiménez-Trejo F., Favila R., Moreno-Mendoza N., Granados-Rojas L., Barrios F., Díaz-Cintra S., Merchant-Larios H. (1999).

Acetylcholinesterase-positive innervation is present at undifferentiated stages of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryo gonads: implications for temperature-dependent sex determination. *The Journal of Comparative Neurology*, 410(1): 90-98.

Houck K., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology*, 5(12): 1806-1814.

Julio-Pieper, M., Lara, H., Bravo, J., Romero, C. (2006). Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. *Reproductive biology and endocrinology*, 4: 57.

Kanai Y., Hiramatsu R., Matoba S., Kidokoro T. (2005). From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *Journal of Biochemistry*, 138(1):13-9.

Lee M., Rebhun L., Frankfurter A. (1990). Posttranslational modification of class III beta-tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18): 7195–7199.

Lee M., Tuttle J., Rebhun L. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific β -tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 17(2):118-132.

Levi-Montalcini R., Angeletti P. (1963). Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Developmental Biology*, 6(1):653–659.

Mayerhofer A., Dissen G., Costa M., Ojeda S. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138(8):3320–3329.

McCoy C., Vogt R., y Censky E. (1983). Temperature controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology*, 17 (4): 404-406.

McKey J., Bunce C., Batchvarov I., Ornitz D., Capel B. (2019). Neural crest-derived neurons invade the ovary but not the testis during mouse gonad development. *PNAS*, 116 (12): 5570-5575.

Merchant-Larios H., Villalpando-Fierro I., Centeno-Urruiza B. (1989). Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological monographs*, 3(1): 43-61.

Merchant-Larios H., Villalpando-Fierro I. (1990). Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *Journal of Experimental Zoology*, 254(3): 327-331.

Merchant-Larios H., Ruiz S., Moreno-Mendoza N., Marmolejo-Valencia A. (1997). Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 107(3): 373–385.

Merchant-Larios H., Díaz-Hernández V. y Marmolejo-Valencia A. (2010). Gonadal Morphogenesis and Gene Expression in Reptiles with Temperature-Dependent Sex Determination. *Sexual Development*, 4 (2): 50-61.

Merchant-Larios H. (2001). Temperature Sex Determination in Reptiles: The Third Strategy. *Journal of Reproduction and Development*, 47(5): 245-252.

Miller J., Limpus C. (1981). Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas L.* *Proceedings Melbourne Herpetological Symp.*, 1 :66-73.

Miller J., Mortimer J., Limpus C. (2017). A Field Key to the Developmental Stages of Marine Turtles (Cheloniidae) with Notes on the Development of *Dermochelys*. *Chelonian Conservation and Biology*, 16 (2): 111-122.

Mohamed K., Le A., Duong H., Wu Y., Zhang Q., Messadi D. (2004). Correlation between VEGF and HIF-1 α expression in human oral squamous cell carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 76(2): 143-152.

Moreno-Mendoza N., Harley V., Merchant-Larios H. (2001). Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Developmental Biology*, 229 (2): 319-326.

Morris J., Jordan C., Breedlove S. (2004). Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nature Neuroscience*, 7(10):1034–1039.

Mrosovsky N., Yntema C. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in the sea turtles: implication for conservation practices. *Biological Conservation*, 18(4): 271-280.

Pagès G., Pouysségur J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene- a concert of activating factors. *Cardiovasc Res.*, 65(3) : 564-573.

Panda D., Miller H., Banerjee A., Ludueña R., Wilson L. (1994). Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24) : 11358–11362.

Picard M., Cosseau C., Mouahid G., Duval D., Grunau C., Toulza E., Allienne J., Boissier J. (2015). The roles of Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: ubiquity and diversity across the animal kingdom. *C. R. Biologie*, 338(7): 451-462.

Pritchard P., Bacon P., Berry F., Carr A., Fletemeyer J., Gallagher R., Hopkins S., Lankford R. (1983). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas 41 R. *Manual of Sea Turtle Research and Conservation Techniques*. Center for Environmental Education, Washington D.C., 2: 126.

Risley P. (1933). Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle. *Sternotherus odoratus* (Latreille). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 18 :459-543.

Salame-Méndez A., Herrera-Muñoz J., Moreno-Mendoza N., Merchant-Larios H. (1998). Response of diencephalon but not gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Experimental Zoology*, 280(4): 304-313.

Shibuya M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Antiand Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2(12):1097–1105.

Shoemaker C., Crews D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in cell and Developmental Biology*, 20(3): 293-303.

Storkebaum E., Lambrechts D., Carmeliet P. (2004). VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays*, 26(9): 943-954.

Thomson W. (1986). Changes in the innervation of mammalian skeletal muscle fibers during postnatal development. *Trends in neuroscience*, 9: 25-28.

Torres-Maldonado L., Landa A., Moreno-Mendoza N., Marmolejo-Valencia A., Meza A., Merchant-Larios H. (2002). Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperatura sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and comparative endocrinology*, 129(1): 20-26.

Torres-Vázquez J., Gitler A., Fraser S., Berk J., Van N., Fishman M., Childs S., Epstein J., Weinstein B. (2004). Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Developmental Cell*, 7(1):117–123.

Uchida T. (1937). Studies in the sexuality of amphibian. III. Sex transformation in *Hynobius retardatus* by high temperature. *Faculty of Science, Hokkaido Imperial University*, 6 (1): 59-70.

Wibbels T., Rostal D., Byles R. (1998). High Pivotal Temperature in the Sex Determination of the Olive Ridley Sea Turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Playa Nancite, Costa Rica. *Copeia*, 4: 1086-1088.

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., Fukuta Y., Ohta Y., Tominaga M., Guillette L., Iguchi, T. (2015). TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Scientific Reports*, 5(1) 1-10.

Yao H., Matzuk M., Jorgez C., Menke D., Page D., Swain A., Capel B. (2004). Follistatin operates downstream of *Wnt4* in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics*, 230(2): 210–215.

Yntema C., Mrosovsky N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads *Caretta caretta* incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*, 36 (1): 33-36.

Yoshikura M. (1959). The action of the pituitary in the sex differentiation and sex reversal in Amphibians II. Effects of the high temperature on the gonads of hypophysectomized frog larvae. *Kunamoto Journal of Science*, 4 (2): 69-101.

Anexos

Organismo de estudio

El presente estudio se realizó en embriones de la especie de tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, conocida comúnmente como tortuga golfina o lora.

Clasificación taxonómica (Eschscholtz, 1829):

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
SuperClase	Tetrapoda
Clase	Reptilia
SubClase	Anaspide
Orden	Testudinata
Suborden	Cryptopodira
Familia	Cheloniidae
Género	<i>Lepidochelys</i>
Especie	<i>Lepidochelys olivacea</i>

Caracteres morfológicos

Su caparazón es de color verde (olivo) o gris oscuro presentando una longitud de 72 cm y un peso que ronda entre los 30kg a 50 kg con un número variable de escudos laterales que va de 6 a 9 (Figura 30). El plastrón es de color crema y contiene un poro pequeño y distintivo cerca del margen posterior de cada uno de los cuatro escudos inframarginales (Figura 30). La cabeza es relativamente grande, ligeramente triangular con dos pares de escamas prefrontales (Figura 31). Las crías presentan una coloración dorsal gris con una longitud de 42mm en su carapacho (Pritchard *et al.*, 1983) (Figura 31).

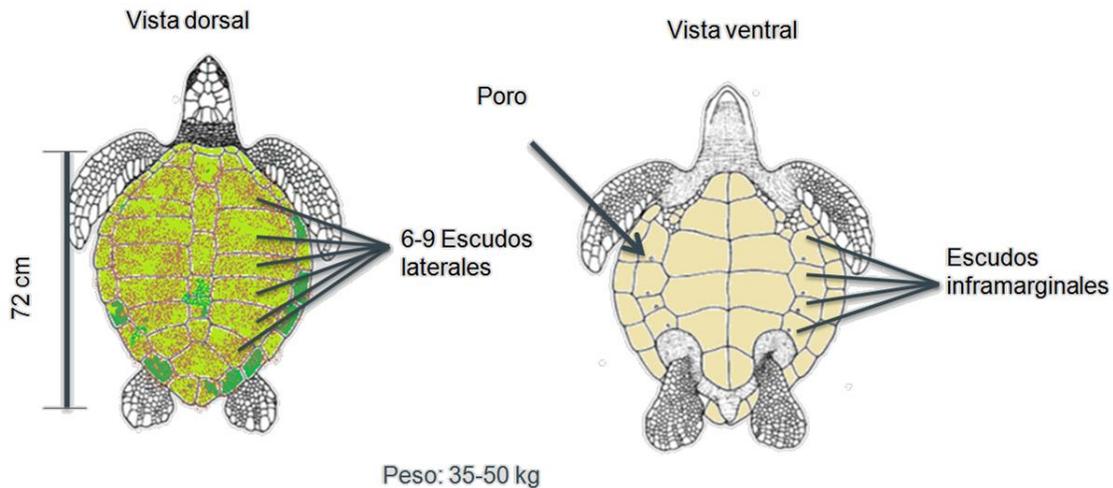
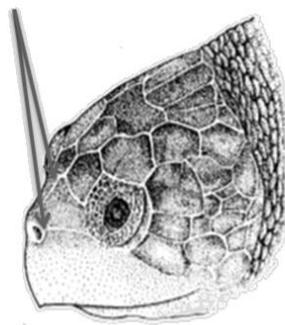


Figura 30. Caracteres morfológicos de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* en edad adulta. Imagen modificada de Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas (Eckert *et al.*, 2000).

2 pares de escudos prefrontales



Color gris oscuro.

Figura 31. Caracteres morfológicos de la cabeza y de las crías de *Lepidochelys olivacea*. Imagen modificada de Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas (Eckert *et al.*, 2000)

Estatus de conservación

La Unión Internacional por la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) cataloga a la tortuga golfina como especie vulnerable. Así mismo, está incluida en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2015). prohibiendo su comercialización entre los países integrantes. En cuanto a leyes de nuestro país la tortuga *Lepidochelys olivacea* se encuentra anexada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) bajo la categoría 'En peligro de extinción' (P)

Secuenciación e identificación de genes

Mediante la secuenciación de cada fragmento amplificado se obtuvo un electroferograma. Se realizó una revisión con el programa FinchTV versión 1.4.0. Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa BLAST, siendo comparadas con la base de datos de NCBI y así corroborando la identidad de los fragmentos amplificados.

En el caso de NGF, la alineación corroboró la amplificación de un fragmento de 167 bases pertenecientes al gen (Figura 32). Obteniendo un porcentaje de identidad de 97% en la alineación con la variante 5 de NGF en la especie *Chelonia mydas* (Figura 33).

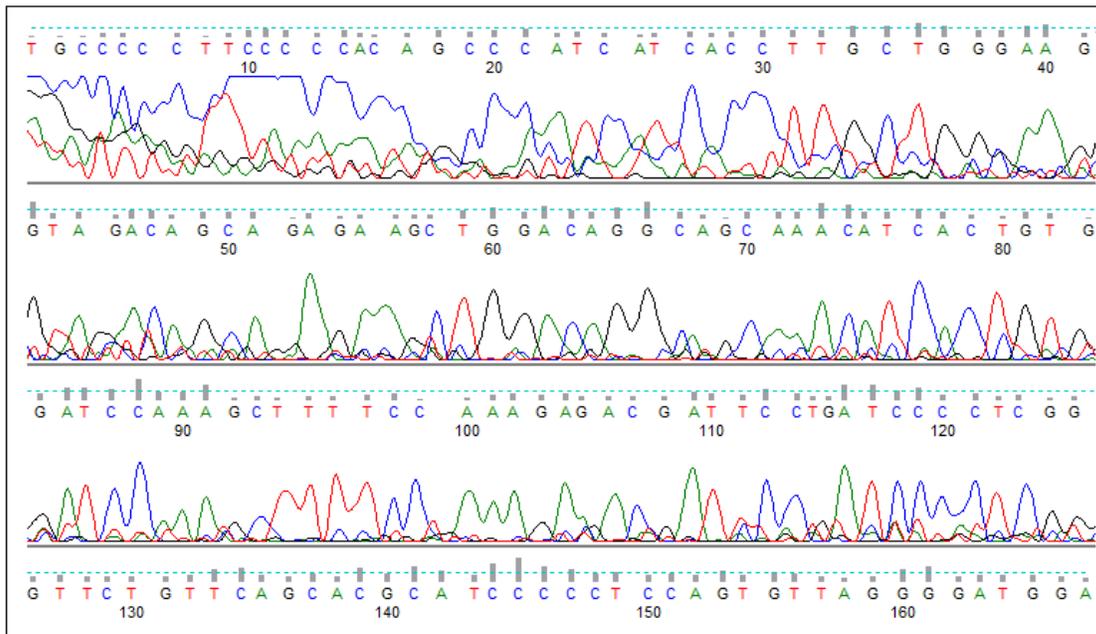


Figura 32. Electroferograma obtenido tras la secuenciación del producto amplificado para NGF.

PREDICTED: Chelonia mydas nerve growth factor (NGF), transcript variant X5, mRNA
 Sequence ID: [XM_027828524.1](#) Length: 1043 Number of Matches: 1

Range 1: 335 to 488 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
257 bits(139)	1e-64	150/155(97%)	2/155(1%)	Plus/Plus
Query 14	CACAGCCCATCATCACCTTGCTGGGAAGGTAGACAGCAGAGAAGCTGGACAGGCAGCAA	73		
Sbjct 335	CACAGCCAATCATCACCTTGCTGGGAAGGTAGACAGCAGAGAAGCTGGACAGGCAGCAA	394		
Query 74	CATCACTGTGGATCCAAAGCTTTTCC-AAAGAGACGATTCC TGATCCCCTCGGGTTCTGT	132		
Sbjct 395	CATCACTGTGGATCCAAAGCTTTTCAGAAAGAGACGATTCC-GATCCCCTCGGGTTCTGT	453		
Query 133	TCAGCACGCATCCCCCTCCAGTGT TAGGGGATGGA	167		
Sbjct 454	TCAGCACGCAGCCCCCTCCAGTGT TAGGGGATGGA	488		

Figura 33. Alineación del fragmento amplificado para NGF. Se observa un 97% de identidad con el gen NGF de Chelonia mydas.

Para VEGF, se obtuvieron dos productos amplificados en gónadas de ambas temperaturas. El primer producto con 361 bases nitrogenadas (Figura 34) y el segundo con 499 bases (Figura 35). La alineación mediante BLAST logró determinar que ambos productos corresponden a dos isoformas de VEGF (Figura 36 y 37). Para lograr identificar la identidad de ambas isoformas, se realizó una alineación de ambas secuencias con el fin de identificar el fragmento eliminado por splicing alternativo. Se logró determinar la ausencia del exón 7 en la banda con menor peso molecular, evidenciando la identidad de los amplificados; el primero correspondiente a VEGFA₁₂₁ y el segundo a VEGFA₁₆₅ (Figura 38).

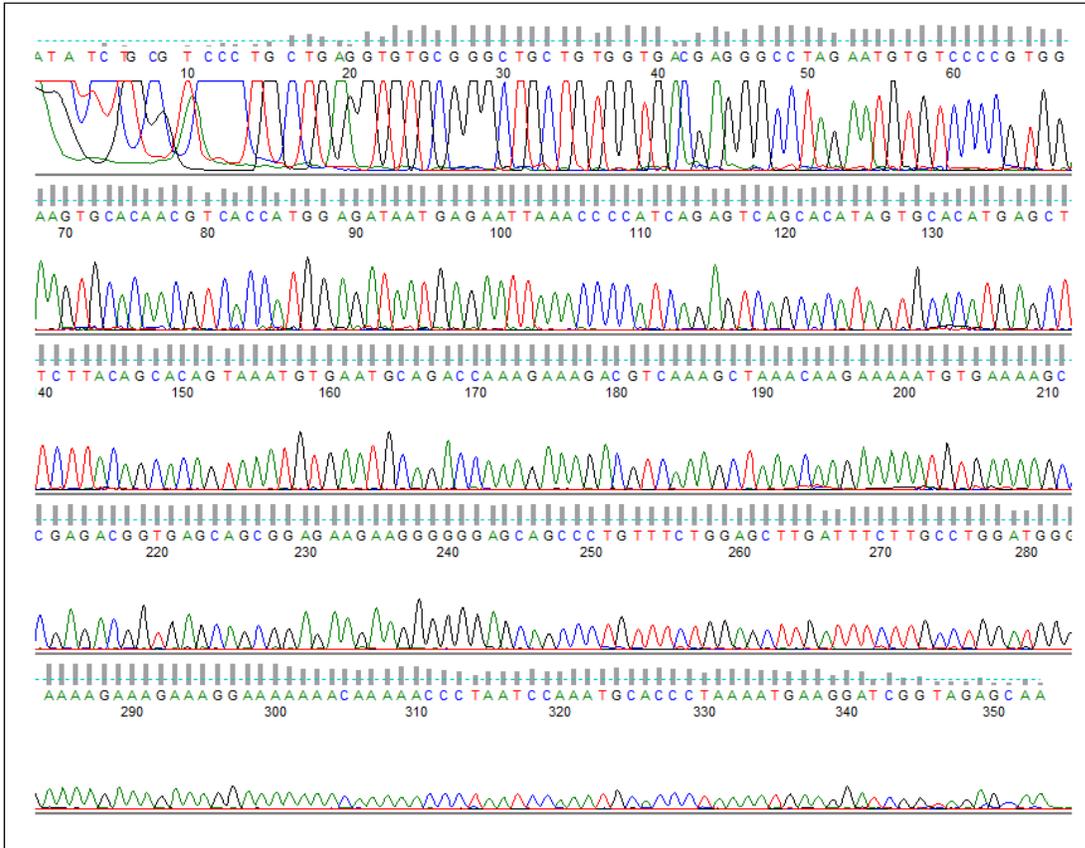


Figura 34. Electroferograma obtenido a partir del producto con menor peso molecular. El cual corresponde a VEGFA₁₂₁.

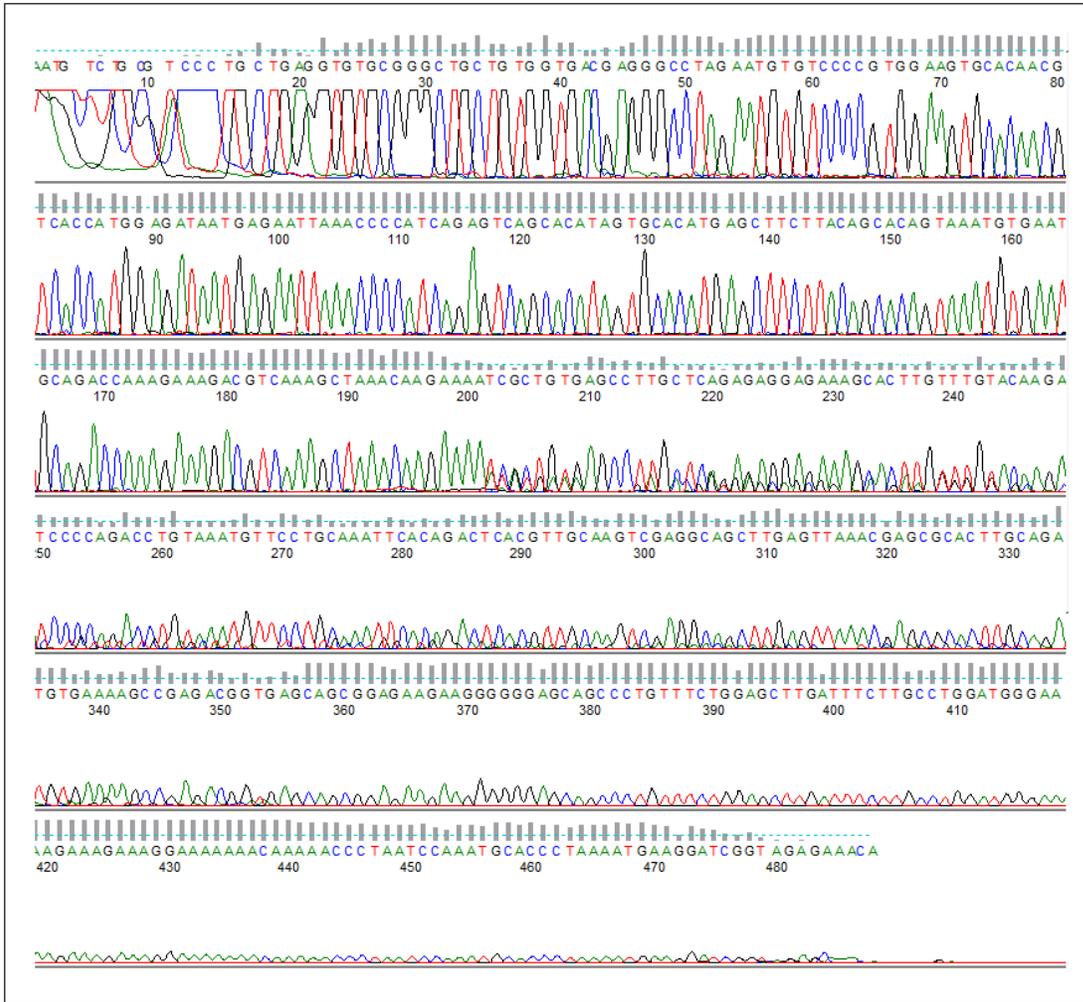


Figura 35. Electroferograma obtenido a partir de la secuenciación del producto de mayor peso molecular, correspondiente a VEGFA₁₆₅.

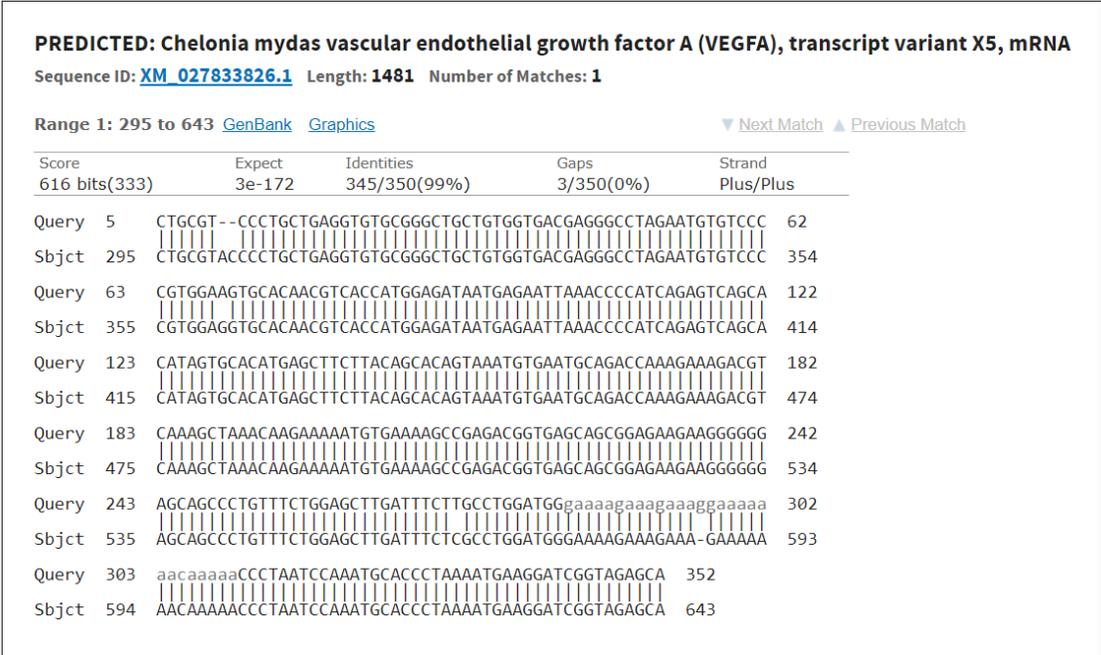


Figura 36. Alineación del fragmento amplificado mediante BLAST. Se corrobora que pertenece a VEGFA con un porcentaje de identidad de 99% con la secuencia reportada de VEGFA de *Chelonya mydas*.

PREDICTED: Chelonia mydas vascular endothelial growth factor A (VEGFA), transcript variant X4, mRNA

Sequence ID: [XM_027833825.1](#) Length: 1613 Number of Matches: 1

Range 1: 295 to 773 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
850 bits(460)	0.0	474/480(99%)	3/480(0%)	Plus/Plus
Query 6	CTGCGT--CCCTGCTGAGGTGTGCGGGCTGCTGTGGTGACGAGGGCCTAGAATGTGTCCC	63		
Sbjct 295	CTGCGTACCCCTGCTGAGGTGTGCGGGCTGCTGTGGTGACGAGGGCCTAGAATGTGTCCC	354		
Query 64	CGTGAAGTGCACAACGTCACCATGGAGATAATGAGAATTAACCCCATCAGAGTCAGCA	123		
Sbjct 355	CGTGAAGTGCACAACGTCACCATGGAGATAATGAGAATTAACCCCATCAGAGTCAGCA	414		
Query 124	CATAGTGACATGAGCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAAGACGT	183		
Sbjct 415	CATAGTGACATGAGCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAAGACGT	474		
Query 184	CAAAGCTAAACAAGAAAATCGCTGTGAGCCTTGCTCAGAGAGGAGAAAGCACTTGTTTGT	243		
Sbjct 475	CAAAGCTAAACAAGAAAATCACTGTGAGCCTTGCTCAGAGAGGAGAAAGCACTTGTTTGT	534		
Query 244	ACAAGATCCCAGACCTGTAATGTTCTGCAAAATTCACAGACTCACGTTGCAAGTCGAG	303		
Sbjct 535	ACAAGATCCCAGACCTGTAATGTTCTGCAAAATTCACAGACTCACGTTGCAAGTCGAG	594		
Query 304	GCAGCTTGAGTTAAACGAGCGCACTTGACAGATGTGAAAAGCCGAGACGGTGAGCAGCGGA	363		
Sbjct 595	GCAGCTTGAGTTAAACGAGCGCACTTGACAGATGTGAAAAGCCGAGACGGTGAGCAGCGGA	654		
Query 364	GAAGAAGGGGGGAGCAGCCCTGTTTCTGGAGCTTGATTTCTGCCTGGATGGgaaaagaa	423		
Sbjct 655	GAAGAAGGGGGGAGCAGCCCTGTTTCTGGAGCTTGATTTCTGCCTGGATGGGAAAAGAA	714		
Query 424	agaaaggaacaaaaaCCCTAATCCAATGCACCCATAAATGAAGGATCGGTAGAG	483		
Sbjct 715	AGAAA-GAAAAAACAAAAACCCCTAATCCAATGCACCCATAAATGAAGGATCGGTAGAG	773		

Figura 37. Alineación del fragmento amplificado mediante BLAST. Se corrobora que pertenece a VEGFA con un porcentaje de identidad de 99% con la secuencia reportada para *Chelonya midas*.

VEGFB1 VS VEGFB2

```

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      -ATACTCGCTCCCTGCTGAGGTGTGCGGGCTGCTGTGGTGACGAGGGCCTAGAATGTGT  59
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      AATGCTCTGCGTCCCTGCTGAGGTGTGCGGGCTGCTGTGGTGACGAGGGCCTAGAATGTGT  60
      ** *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      CCCCCTGGAAGTGACACACGCTCACCATGGAGATAATGAGAATTAACCCCATCAGAGTCA  119
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      CCCCCTGGAAGTGACACACGCTCACCATGGAGATAATGAGAATTAACCCCATCAGAGTCA  120
      *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      GCACATAGTGACACATGAGCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAGA  179
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      GCACATAGTGACACATGAGCTTCTTACAGCACAGTAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAGA  180
      *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      CGTCAAAGCTAAACAAGAAAA-----  210
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      CGTCAAAGCTAAACAAGAAAATCGCTGTGAGCCTTGCTCAGAGAGGAGAAAGCACTTGT  240
      *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      -----  210
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      TGTACAAGATCCCAGACCTGTAATGTTCTCTGCAAATTCACAGACTCACGTTGCAAGT  300

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      -----ATGTGAAAAGCCGAGACGGTGAGCAGC  227
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      GAGGCAGCTTGAGTTAAACGAGCGCACTTGCAATGTGAAAAGCCGAGACGGTGAGCAGC  360
      *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      GGAGAAGAAGGGGGGAGCAGCCCTGTTTCTGGAGCTTGATTCTTGCTGGATGGGAAAA  287
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      GGAGAAGAAGGGGGGAGCAGCCCTGTTTCTGGAGCTTGATTCTTGCTGGATGGGAAAA  420
      *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      GAAAGAAAGGAAAAAACAACCCCTAATCCAATGCACCCCTAAAATGAAGGATCGGTA  347
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      GAAAGAAAGGAAAAAACAACCCCTAATCCAATGCACCCCTAAAATGAAGGATCGGTA  480
      *****

VEGFB1+VEGFS_D02_Placa117_010      GAGCAA-- 353
VEGFB2+VEGFS_E02_Placa117_008      GAGAAACA 488
      *** **

```

Figura 38. Alineación de las bandas obtenidas para VEGF. La sección marcada corresponde al Exón 7, siendo ausente en la banda 1.