



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

11281  
33

ASPECTOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA  
DETERMINACIÓN DEL SEXO POR TEMPERATURA  
EN LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea*

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M.C. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO

Director de Tesis: Dr. Horacio Merchant Larios  
Comité Tutorial: Dra. Irma Villalpando Fierro  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ

Director General de la  
Administración Escolar  
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 13 de diciembre de 2000, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para examen de Doctorado de la M. en C. Torres Maldonado Leda Carolina con no. de cuenta 82238568 y no. de expediente 3921001 con la tesis titulada: "Aspectos moleculares involucrados en la determinación del sexo por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*", dirigida por el Dr. Horacio Merchant Larios.

Presidente:	Dr. Daniel Piñero Dalmau
Secretario:	Dr. Horacio Merchant Larios
Vocal:	Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Vocal:	Dr. Abraham Landa Piedra
Vocal:	Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
Suplente:	Dra. Susana H. Kofman Epstein
Suplente	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

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

A T E N T A M E N T E  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., 9 de enero del 2001.

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre  
Responsable en el Instituto de  
Investigaciones Biomédicas

Dr. César A. Domínguez Pérez Tejada  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

## DEDICATORIAS

A mis padres: Gloria y Pedro,  
por su apoyo, siempre demostrado.

A mis hermanos: Iván, Ligia y Cynthia,  
por todo lo que hemos compartido  
y lo que todavía tenemos que compartir.

A mis grandes amores: Rafael y Tomás  
por ser la otra mitad de mi vida.

A mi nueva familia: Emilia, Wim,  
Peter, Stijn, Riet y todos los demás, por su cariño

A mis amigos: Jesús, Verónica F., Jorge Alberto, Patricia,  
Aleida, Carlos, Verónica R., Euclides, Claudia. Emmy, Roxana,  
Edgar y Margarita por estar siempre presentes.

A mis compañeros de laboratorio: Horacio, Alejandro, Norma, Francisco,  
José, Nayelli, Adalucía, Miguel, Agustín, Isabel Cristina,  
Julieta, Gloria, Isabel, Esther y Martha.

## AGRADECIMIENTOS

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

Los miembros del comité tutorial fueron la Dra. Irma Villalpando Fierro y el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Este trabajo contó con el apoyo técnico de la Dra. Norma A. Moreno Mendoza, el M.C. Alejandro Marmolejo Valencia y el Sr. José Baltazar García en el manejo de nidos, microdissección y técnicas histológicas.

El Dr. Abraham Landa Piedra apoyo en el diseño de los oligonucleótidos.

Nayelli Najera García, Adalucía Meza Martínez y Miguel Tapia Rodríguez, apoyaron en la metodología de biología molecular.

El M.Ing. Rafael Schouwenaars y el Biol. Martín García ayudaron en el análisis estadístico.

Apoyo técnico en la elaboración de las figuras: DG. Ada Ligia Torres Maldonado

A los investigadores: Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dr. Abraham Landa Piedra, Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, Dra. Susana H. Kofman Epstein y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por aceptar formar parte del jurado y por sus comentarios al presente trabajo.

Por el apoyo en equipo y sus comentarios durante el desarrollo del proyecto: M.C. Felipe Vilchis, Dra. Irma Villalpando Fierro, Dr. Abraham Landa, Dra. Martha Pérez Armendariz, Dr. Alfonso González Noriega, Dra Susana Kofman y Dr. Roberto Hernández.

Este proyecto fue apoyado por CONACyT : 26697N

El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM otorgó los apoyos 102374 y 201434.

La Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM otorgó beca en el período comprendido de febrero de 1997 a julio de 2000.

# INDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	3
2.1. Determinación Genética del Sexo	4
2.1.1. Genes relacionados con la determinación del sexo en mamíferos	5
2.1.2. Genes relacionados con la determinación del sexo en aves	14
2.2 . Determinación Sexual por Temperatura	15
2.2.1. Genes relacionados con la determinación del sexo en reptiles	18
3. Hipótesis	21
4. Objetivos	21
4.1. Objetivo General	21
4.2. Objetivos Particulares	21
5. Metodología	22
5.1. Colecta	22
5.2. Control de temperatura	22
5.3. Muestreo	22
5.4. Extracción de RNA total	23
5.5. Diseño de oligonucleótidos	23
5.6. RT-PCR (Transcripción inversa - Reacción en cadena de la polimerasa)	25
5.7. Electroforesis	27
5.8. Purificación y secuenciación	27
5.9. Densitometría	28
5.10. Dot Blot	28

5.11. Experimentos de intercambio	33
5.12. Regulación negativa de la expresión de Sox9	33
5.13. Sexado histológico	34
6. Resultados	35
6.1. Desarrollo embrionario	35
6.2. Desarrollo de la gónada	35
6.3. Secuenciación	36
6.3.1. Sox9	39
6.3.2. Dax1	40
6.3.3. Aromatasa P-450	42
6.4. RT-PCR	44
6.4.1. Sox9	44
6.4.2. Dax1	47
6.4.3. Aromatasa P450	49
6.5. Experimentos de intercambio	53
6.6. Regulación negativa de la expresión de Sox9	55
7. Discusión	57
8. Conclusiones	67
9. Bibliografía	68
10. Anexos	78
10.1. Anexo1. Alineaciones de secuencias de aminoácidos de las proteínas: SOX9, DAX1 y Aromatasa P-450.	78
10.2. Anexo 2. Tablas y promedios de las etapas de desarrollo embrionario a temperaturas masculinizante y feminizante.	86
10.3. Anexo 3. Artículo.	89

## RESUMEN

En los vertebrados hay una elección entre dos programas de determinación del sexo, el femenino o el masculino, en respuesta a una señal inicial. El control de la determinación del sexo puede estar influido por factores genéticos o por factores ambientales. En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* la determinación del sexo depende de la temperatura de incubación: los embriones que se incuban a 26°C, se determinan como machos (temperatura masculinizante, TM) y los embriones que se incuban a 33°C, se determinan como hembras (temperatura feminizante, TF). El período sensible a la temperatura en *L. olivacea* abarca de las etapas de desarrollo 20 a 25. En el presente trabajo se estudió la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 en tejidos embrionarios de *L. olivacea* en distintas etapas del desarrollo embrionario, empleando la técnica de RT-PCR. El patrón de expresión de *Sox9* en las gónadas muestra una regulación negativa a TF en la etapa 25, mientras que a TM se expresa en todas las etapas estudiadas. En el cerebro *Sox9* se expresa tanto en cerebro anterior (telencéfalo y bulbo olfatorio) como en cerebro posterior (diencéfalo y mesencéfalo) a ambas temperaturas, en todas las etapas analizadas. La expresión de *Dax1* en gónada es similar en todas las etapas estudiadas a TF, mientras que a TM su expresión disminuye a partir de la etapa 26. El nivel de expresión del gen de la aromatasa P-450 en gónadas es similar a TM y TF en todas las etapas estudiadas. En el cerebro se expresa en ambas regiones en niveles semejantes tanto a TM como a TF. Las conclusiones de la presente tesis son las siguientes: Se sugiere que en la tortuga marina *L. olivacea*, el sexo que se determina de forma pasiva es el masculino. La temperatura de incubación tiene efecto sobre la expresión de los genes *Sox9* y *Dax1* en la gónada, éstos podrían formar parte de la cascada de genes que regulan la diferenciación gonadal en *L. olivacea*. La regulación de la expresión de la aromatasa P-450 puede ser a nivel postranscripcional. La temperatura de incubación no tiene efecto sobre la expresión de los genes *Sox9* y de la aromatasa P-450 en el cerebro.

## ABSTRACT

In vertebrates there exist two different sex determination programs, in response to an initial signal. Sex determination can be controlled by genetic factors or by environmental factors. In the sea turtle *Lepidochelys olivacea*, sex determination depends on the temperature of egg incubation (TSD). In this species, the male promoting temperature (MPT) is 26°C, and the female promoting temperature (FPT) is 33°C. The thermosensitive period in *L. olivacea* covers the developmental stages 20 to 25. In the present study we analyze the expression of *Sox9*, *Dax1* and P-450 aromatase using the RT-PCR technique. The *Sox9* expression profile shows a downregulation in FPT at developmental stage 25. *Sox9* was detected in gonads at both temperatures up to stage 25. From stage 26 onwards, *Sox9* transcripts were undetected in female gonads, but its expression remained in testis. In brain *Sox9* expression was detected in both analyzed regions (telencephalon and diencephalon) and at both temperatures in all the stages. *Dax1* transcripts were detected in gonads at FPT at similar levels in all the stages studied, at MPT the *Dax1* level expression decreases at stage 26. The expression level of P-450 aromatase was very similar in gonads at both temperatures (MPT and FPT). In brain the P-450 aromatase expression was also very similar between both regions studied and at both temperatures. The main conclusions of this work are the following: In the sea turtle *L. olivacea*, the male sex is determined in a passive form. The temperature of egg incubation has an effect in the expression of the genes *Sox9* and *Dax1* in the gonads, these genes are probably part of the genetic pathway of gonadal differentiation. The P-450 aromatase expression shows a posttranscriptional regulation. The temperature of egg incubation has no effect in the expression of the genes *Sox9* and P-450 aromatase in the brain.

## 1. INTRODUCCION

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, conocida comunmente como tortuga golfina, anida en México en las playas del Pacífico. Sus principales sitios de anidación se encuentran en los estados de Michoacán y Oaxaca (Benabib y Cruz, 1981). La Convención Internacional para el Tráfico de Especies en Riesgo (CITES) considera a la tortuga golfina que anida en nuestras costas, como una especie amenazada, pero no en peligro de extinción. La tortuga golfina presenta determinación del sexo dependiente de temperatura, es decir los embriones que se incuban a 26-27°C (temperatura masculinizante, TM), se determinan como machos y los embriones que se incuban a 32-33°C, (temperatura feminizante, TF), se determinan como hembras. Es un excelente modelo para estudiar el desarrollo gonadal porque se pueden modificar la temperatura de incubación y saber de antemano cual será el sexo del embrión. Merchant y colaboradores han trabajado en esta especie por más de diez años, estudiando la histología de la gónada en diferentes etapas de desarrollo (Merchant *et al.*, 1989), estableciendo las temperaturas masculinizante y feminizante (Merchant *et al.*, 1989) y definiendo el período sensible a la temperatura (Merchant *et al.*, 1997). Actualmente se están estudiando los mecanismos celulares y moleculares que participan en la determinación del sexo en esta especie.

## 2. ANTECEDENTES

La diferenciación del sexo es una cascada de eventos genéticos y hormonales en los cuales la gónada indiferenciada se desarrolla como un ovario o como un testículo. La determinación del sexo es el evento que pone en marcha este proceso a nivel molecular.

En los vertebrados hay una elección entre dos programas de determinación del sexo, el femenino o el masculino, en respuesta a una señal inicial. La determinación del sexo puede estar influida por factores genéticos (GSD: Genetic

## 1. INTRODUCCION

La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, conocida comunmente como tortuga golfina, anida en México en las playas del Pacífico. Sus principales sitios de anidación se encuentran en los estados de Michoacán y Oaxaca (Benabib y Cruz, 1981). La Convención Internacional para el Tráfico de Especies en Riesgo (CITES) considera a la tortuga golfina que anida en nuestras costas, como una especie amenazada, pero no en peligro de extinción. La tortuga golfina presenta determinación del sexo dependiente de temperatura, es decir los embriones que se incuban a 26-27°C (temperatura masculinizante, TM), se determinan como machos y los embriones que se incuban a 32-33°C, (temperatura feminizante, TF), se determinan como hembras. Es un excelente modelo para estudiar el desarrollo gonadal porque se pueden modificar la temperatura de incubación y saber de antemano cual será el sexo del embrión. Merchant y colaboradores han trabajado en esta especie por más de diez años, estudiando la histología de la gónada en diferentes etapas de desarrollo (Merchant *et al.*, 1989), estableciendo las temperaturas masculinizante y feminizante (Merchant *et al.*, 1989) y definiendo el período sensible a la temperatura (Merchant *et al.*, 1997). Actualmente se están estudiando los mecanismos celulares y moleculares que participan en la determinación del sexo en esta especie.

## 2. ANTECEDENTES

La diferenciación del sexo es una cascada de eventos genéticos y hormonales en los cuales la gónada indiferenciada se desarrolla como un ovario o como un testículo. La determinación del sexo es el evento que pone en marcha este proceso a nivel molecular.

En los vertebrados hay una elección entre dos programas de determinación del sexo, el femenino o el masculino, en respuesta a una señal inicial. La determinación del sexo puede estar influida por factores genéticos (GSD: Genetic

sex determination) (Witschi, 1959; Ohno, 1967) o por factores ambientales (ESD: Environmental sex determination) (Bull, 1980). En el primer mecanismo, la determinación del sexo depende de la presencia o ausencia de genes específicos, y se asocia comúnmente a la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos. En el caso de los mamíferos que presentan el par XX en la hembra y el par XY en el macho. En las aves y algunos reptiles el sexo heteromórfico es la hembra que presenta el par ZW y el macho que presenta el par ZZ. En el segundo mecanismo, la determinación del sexo depende de factores ambientales y se encuentra en ciertos peces, anfibios y reptiles, en general, en especies que carecen de cromosomas sexuales identificables (Vogt y Bull, 1979).

## **2.1. Determinación Genética del Sexo**

En los mamíferos la determinación del sexo es genotípica, es decir, depende de factores genéticos y está relacionada con la presencia del cromosoma Y, que es el determinante masculino y porta el factor determinante testicular (FDT). Una vez que el testículo se ha diferenciado produce hormonas que van a controlar la diferenciación de los genitales internos y externos masculinos. En el caso de las hembras no existe el factor determinante testicular por lo que la gónada se va a diferenciar pasivamente hacia ovario y los genitales internos y externos hacia femeninos. Actualmente se ha identificado al gen *Sry* como el FDT (Sinclair *et al.*, 1990). Además de *Sry*, existen otros genes relacionados con la diferenciación gonadal.

En contraste con el conocimiento existente de los eventos moleculares que están involucrados en la determinación del sexo en los mamíferos (revisiones: Jiménez *et al.*, 1996; Swain y Lovell-Bagde, 1999; Hiort y Holterhus, 2000), nuestro conocimiento de estos eventos en el resto de los vertebrados es muy pobre y casi todo se reduce a estudiar la expresión de los genes ya identificados en los mamíferos pero en otros vertebrados.

En el desarrollo embrionario temprano se establece un asimetría, es decir, a partir de una sola célula inicial esta puede dar lugar, en algunas divisiones celulares, a

células que tienen, cada una, propiedades diferentes. Cada célula se caracteriza por su patrón de expresión génica, es decir, por los productos particulares que ella produce. El nivel principal de control de la expresión génica es a nivel de transcripción, los componentes de las vías regulatorias de transcripción representan a una clase importante de reguladores del desarrollo. Los reguladores transcripcionales pueden actuar de diferentes maneras, cambiando la estructura de un promotor, iniciando la transcripción al unirse al promotor, regulando la actividad de un potenciador o incluso en ocasiones puede reprimir a otros factores de transcripción. Una cascada de expresión génica se establece cuando cuando los eventos reguladores están conectados, es decir, un gen puede encenderse o apagarse en determinada etapa de desarrollo, además de que él mismo puede controlar la expresión de otros genes en la siguiente etapa de desarrollo, además se pueden ver diferencias en los patrones de transcripción en diferentes regiones del embrión (Ingham y Martínez-Arias, 1992).

### **2.1.1. Genes relacionados con la determinación del sexo en mamíferos**

Para el establecimiento de la gónada indiferenciada se ha propuesto la participación de varios genes, entre ellos el *SF1* y el *WT1* (Shen *et al.*, 1994; Pelletier *et al.*, 1991; Kent *et al.*, 1995).

**SF1:** El receptor nuclear esteroideogénico 1 (*SF1* o *Sf1*) conocido también como Ad4BP, es un componente clave en la vía de desarrollo gonadal y adrenal. En el ratón el gen *Sf1* se expresa en embriones de ambos sexos en los estadios muy tempranos de la gonadogénesis, cuando el mesodermo intermedio se condensa en la cresta urogenital. A los 9 días poscoito (dpc), se observa expresión en ambos sexos hasta el día 12.5 dpc cuando la expresión persiste en el testículo, en las células de Sertoli y en la región intersticial. En este mismo estadio no se detecta su expresión en el ovario (Ikeda *et al.*, 1994). Los ratones homocigotos para el alelo nulo de *Sf1* muestran un desarrollo normal temprano de las crestas urogenitales pero no desarrollan gónadas, mostrando que *Sf1* es esencial para la formación del primordio gonadal en ambos sexos (Luo *et al.*, 1994).

La expresión de *Sf1* es paralela a la de *Amh* (hormona antimülleriana) e inclusive parece que *Sf1* regula la expresión de *Amh* (Shen *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1996). Asimismo, *Sf1* parece interactuar con otro gen, el *Dax1*, que codifica un receptor nuclear, el cual parece expresarse en los mismos lugares que *Sf1* (Parker *et al.*, 1996). Estas observaciones confirman que en el ratón, *Sf1* tiene un papel en distintos puntos del programa de diferenciación gonadal.

En el humano el gen *SF1* se expresa desde el día 32 posovulación (CS14)(CS: Etapa de Carnegie). Inicialmente, en un grupo de células en el mesonefros y en las crestas genitales. Un día después (33dpo/CS15) hay dos sitios discretos de expresión, el primordio gonadal y la gónada indiferenciada. En el día 41dpo/CS17 la señal de *SF1* se localiza lejos de las células germinales, y hasta este estadio no hay diferencia en la expresión entre los sexos. En el día 44dpo/CS18 la expresión sólo se mantiene en el testículo en desarrollo. Posteriormente, en la etapa 52dpo/CS21, hay un incremento en la intensidad de la señal en los cordones sexuales, mientras que en el ovario la expresión es difusa, observándose señal en el epitelio celómico (Hanley *et al.*, 1999).

**WT1:** El gen *WT1*, gen relacionado con el tumor de Wilms (Wilms tumor 1), codifica para una proteína con cuatro dominios de dedos de Zinc (Gessler *et al.*, 1992). Esta proteína es un regulador del desarrollo renal y gonadal (Buckler *et al.*, 1991; Pelletier *et al.*, 1991). La expresión de *WT1* se ha estudiado en diferentes vertebrados, indicando que su papel en la gonadogénesis y la nefrogénesis está conservado en los diferentes grupos estudiados (Kent *et al.*, 1995).

En el ratón el patrón de expresión de *Wt1* es el siguiente: A los 9 dpc se observa expresión en el mesénquima en la línea lateral de la cavidad celómica. A los 9.5 dpc la expresión se observa en el epitelio celómico particularmente sobre la línea parietal, y en el mesotelio del corazón e intestino. También se presenta sobre la cresta urogenital, particularmente en el mesonefros. A los 10 dpc los órganos comienzan a formarse y la restricción en la localización de los transcritos de *WT1* se hace más clara. A los 11 dpc la expresión más intensa se encuentra sobre la

cresta genital y en el mesénquima y mesonefros vecinos (Armstrong *et al.*, 1992). Otros autores reportan la expresión de *WT1* a los 12.5 dpc en testículo. Posterior al nacimiento, *WT1* se expresa a los 17 dpp (días posparto) en los folículos localizados en la periferia y en la capa celular epitelial ováricos, así como en la fimbria de la tuba uterina. En los folículos la expresión se limita a las células de la granulosa y se incrementa con la maduración folicular. A los 17 dpp, en los machos, la expresión de *WT1* está limitada en los túbulos seminíferos a las células de Sertoli, se encuentra la expresión de dos transcritos, uno de 3.1 kilobases (kb) y otro de 2.5 kb en el testículo, la expresión del segundo transcrito es tres veces menor que la del primero. En el ovario sólo se observa el transcrito de 3.1 kb (Pelletier *et al.*, 1991).

En el cerdo se ha estudiado la expresión de *WT1* en recién nacidos, observando expresión en riñón, bazo y testículo. Se observó también expresión en riñones embrionarios, sugiriendo una posible asociación del *WT1* con el desarrollo del sistema urogenital (Tsurutani *et al.*, 1998).

En el humano, durante el período de gónada indiferenciada, *WT1* se expresa de manera idéntica en los embriones 46,XX y en los embriones 46,XY. En los 32dpo/CS14 *WT1* se expresa en altos niveles en los corpúsculos glomerulares del mesonefros y en menor nivel en el epitelio celómico y en la cresta genital. Para los 41 dpo/CS17 la expresión en el epitelio celómico y el mesonefros sigue sin cambio, sin embargo, la señal gonadal se ha incrementado y es idéntica en hembras y machos. A los 52 dpo/CS21 los cordones testiculares están bien avanzados, pero la expresión de *WT1* persiste en todo el testículo, en el epitelio celómico, *rete testis*, mesonefros y las estructuras glomerulares en desarrollo. La sección de ovario de la misma etapa carece de diferenciación morfológica y la expresión de *WT1* es difusa en todo el ovario. Después del período embrionario los transcritos de *WT1* se localizan en el intersticio de los cordones testiculares como se ve a los 18 semanas de gestación, en cambio, en el ovario la expresión generalizada permanece hasta las 15 semanas de gestación (Hanley *et al.*, 1999).

**Hox-5.2:** En el ratón los transcritos de *Hox5.2* se detectan a los 10 dpc alrededor del lado ventro-medial del epitelio celómico que cubre el mesonefros, en la posición exacta donde va a aparecer la cresta genital. Esto sugiere que *Hox-5.2* está participando en los mecanismos inductivos especificando cuáles células mesonéfricas van a formar parte de la gónada. Los transcritos de *Hox-5.2* se localizan claramente en las células somáticas. En 12.5 dpc se localiza en la corteza de la cresta genital y aparentemente en los cordones sexuales primitivos. Esta expresión no presenta un patrón diferencial ya que se encuentra en las células intersticiales de ambas gónadas, el testículo y el ovario fetales hasta el último estadio estudiado (17.5 dpc). Además, una débil expresión está todavía restringida a las células intersticiales de las gónadas adultas (Leydig en testículo y células intersticiales de la corteza en ovario) (Dollé y Duboule, 1989).

**LIM1:** El gen *LIM1* es un gen que codifica una proteína con una caja homeótica y dos dominios de dedos de zinc, regula a nivel transcripcional la expresión de otros genes y se le relaciona con la formación de ejes de simetría en el embrión y con la definición de la posición de algunos órganos (Tsang *et al.*, 2000). La disrupción dirigida de *Lim1* en el ratón resulta en una completa ausencia de las estructuras de la cabeza y en muerte temprana, pero los fetos sobrevivientes carecen de riñones y gónadas (Shawlot y Behringer, 1995). Se puede suponer que *LIM1*, al igual que *WT1* y *SF1* participa en la maduración de las crestas genitales, pero su papel preciso en la inducción de las gónadas no se ha analizado en detalle.

**Oct-4:** El gen *Oct-4* es uno de los genes que codifican para un factor de transcripción, este factor es de los que se expresan más temprano durante el desarrollo embrionario en mamíferos. Para conocer el papel de *Oct-4* en la embriogénesis temprana de ratón se han realizado diversos estudios de expresión. Se ha detectado la expresión de éste en células pluripotenciales embrionarias, en células en cultivo y en embriones de ratón (Palmieri *et al.*, 1994). Después de la gastrulación la expresión la expresión de *Oct-4* se confina a la línea germinal, se regula negativamente durante la ovogénesis y la espermatogénesis, y coincide con el inicio de la meiosis. Estos datos sugieren que la regulación

negativa de *Oct-4* puede ser una señal molecular involucrada en el compromiso a la meiosis (Pesce *et al.*, 1998).

***Wnt4***: El gen *Wnt4* es probablemente parte de las señales involucradas en el control de la producción de esteroides en la gónada en etapas tempranas. *Wnt4* se expresa en la cresta genital y en el mesonefros. En el momento de la determinación gonadal se regula negativamente en el testículo pero su expresión permanece en el ovario (Vainio *et al.*, 1999).

***Dmrt1***: El gen *Dmrt1* es un candidato a ser un gen regulador del desarrollo sexual en vertebrados. El *Dmrt1* codifica un factor de transcripción que posee un dominio DM, que es un motivo de unión a DNA. Este dominio ha sido identificado en los reguladores sexuales *doublesex* de *Drosophila melanogaster* (Erdman y Burtis, 1993) y *mab-3* de *Caenorhabditis elegans* (Raymond *et al.*, 1998). En el humano el gen *DMRT1* se localiza en 9p24.3 y se requieren dos copias para el desarrollo testicular normal (Raymond *et al.*, 1999a). *Dmrt1* se expresa en el ratón en la cresta genital antes de la diferenciación sexual (Raymond *et al.*, 1999b). En el ratón se creó, por delección dirigida, un alelo nulo para *Dmrt1*. Los ratones machos heterocigotos (+/-) se ven normales, pero los machos homocigotos (-/-) no pueden mantener la diferenciación testicular a partir del día 7 posnatal. Las hembras (-/-) se desarrollan normalmente. Estos hallazgos apoyan la idea de que el gen *Dmrt1* es específico para los machos y necesario para la diferenciación testicular (Raymond *et al.*, 2000).

Una vez establecida la gónada indiferenciada inicia el período de determinación y diferenciación de la gónada, en dónde participan los siguientes genes:

***Sry***: En los mamíferos placentarios, que presentan cromosomas sexuales heteromórficos, el sexo se determina por la acción de un gen localizado en el cromosoma Y, el gen *Sry* (en ratón) o *SRY* (en humano) que inicia la formación del testículo; en ausencia del *Sry* se desarrolla un ovario (Sinclair *et al.*, 1990). El gen *SRY* se localiza en el brazo corto del cromosoma Y en el humano, en el ratón y en muchos de los mamíferos placentarios estudiados. Este gen se localiza también en el cromosoma Y en algunos marsupiales, (Foster y Marshall-

Graves, 1994). Sin embargo, este gen no ha sido detectado en algunos mamíferos no placentarios, e incluso tampoco se ha detectado en algunas especies de ratones arborícolas como el *Ellobius tancrei*, mostrando que puede existir masculinización en ausencia de *Sry* (Just *et al.*, 1995). Los estudios de expresión de *Sry* se han realizado en ratón, en el cual se han detectado transcritos del gen *Sry* en la gónada desde los 10.5 dpc alcanzando su pico de expresión a los 11.5 dpc, declinando hasta los 12.5 dpc. El sitio de expresión es la cresta urogenital (testículo) en células somáticas (preSertoli). A los 13.5 dpc ya no se observa expresión de *Sry*. Se han detectado transcritos circulares de *Sry* en testículo adulto, estos transcritos no se traducen (Hacker *et al.*, 1995).

El *Sry* no se ha observado en vertebrados no mamíferos. Tiersch y colaboradores en 1991 realizaron un estudio sobre la conservación filogenética del gen *SRY* (Sinclair *et al.*, 1990), y observaron en diversos grupos como peces y reptiles hibridación contra la sonda de la región más conservada del *SRY* (caja HMG, High Mobility Group) en ambos sexos. Es posible que en estos casos no se relacione con la diferenciación testicular (Tiersch *et al.*, 1991).

**Zfy-1:** El gen *Zfy* se localiza también en el brazo corto del cromosoma Y en mamíferos. Este gen fue considerado como el FDT (Page *et al.*, 1987). En el humano y en el ratón se ha descrito un gen homólogo en el cromosoma X (Schneider-Gadicke *et al.*, 1989), el *ZFX*, que escapa a la inactivación, invalidando el papel de *ZFY* como TDF. La expresión de *Zfy* se ha estudiado en ratón, los transcritos se detectan en los machos en las células germinales desde los 10.5 dpc. A los 14.5 dpc la expresión decrece y continúa así hasta los 17.5 dpc donde ya no se observa. En las hembras no hay expresión de *Zfy-1* (Koopman *et al.*, 1989).

**Amh:** El gen de la hormona antimülleriana (*Amh*), llamado también sustancia inhibidora de los conductos müllerianos (MIS), se localiza en el cromosoma 10 en el ratón. El patrón de expresión muestra transcritos desde los 11 a 11.5 dpc (20 horas después del inicio de la transcripción de *Sry*) en la cresta urogenital testículo hasta los 43 dpp. Probablemente *Sry* actúa indirectamente sobre la expresión de *Amh* (Behringer, 1994; Hacker *et al.*, 1995).

**Dax1:** El gen *DAX1* descubierto recientemente, es miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares (Muscatelli *et al.* 1994, Zanaria *et al.*, 1994;). Este gen se ha mapeado en una región del brazo corto del cromosoma X, esta región se encuentra duplicada en algunos pacientes con reversión sexual XY. Las mutaciones en el gen *DAX1* en humanos resultan en hipoplasia adrenal congénita (Zanaria *et al.*, 1994).

En otros mamíferos el gen *Dax1* se ha mapeado y clonado, en ratón se localiza también en el cromosoma X (Swain *et al.*, 1996). En marsupiales se ha clonado y mapeado en el wallabí *Macropus eugenii*, en este caso tiene una localización autosómica, en el brazo corto del cromosoma 5, mapeando cerca de otros genes humanos que se localizan en el brazo corto del cromosoma X (Xp). Este hallazgo podría indicar que la región donde se encuentra *Dax1* es originalmente autosómica (Pask *et al.*, 1997).

Los estudios de expresión de *Dax1* en el ratón han detectado que este gen se expresa desde los 11.5 dpc en machos y en hembras en el componente somático de la cresta urogenital. A los 12.5 dpc decrece dramáticamente en los cordones testiculares. En la gónada femenina se continúa expresando en las células de la teca, sugiriendo que *Dax1* se requiere para la diferenciación ovárica pero no para la testicular (Swain *et al.*, 1996).

Se han realizado estudios en la expresión de *Dax1* y su correlación con la expresión de *Sry*, los cuales muestran que *Dax1* puede antagonizar la acción de *Sry* (Swain *et al.*, 1998). Resulta interesante notar que la distribución y expresión de *Dax1* es similar a la de *Sf1* y que ambos se transcriben en las gónadas fetales y en testículo adulto, ovario y adrenal. Sin embargo, no queda clara la relación molecular o fisiológica en la expresión de estos dos factores.

**Sox9:** En humano existe un síndrome de malformaciones esqueléticas llamado displasia campomélica que se asocia con reversión sexual; estas alteraciones se asocian con translocaciones o rearrreglos en el cromosoma 17 humano en 17q24.1 a 17q25.1. El análisis molecular de esta región llevó al hallazgo de un gen relacionado con el *SRY*, al cual se denominó *SOX9*, que pertenece a la

familia SOX (SRY-like HMG-box gene) y que parece estar relacionado con la diferenciación gonadal (Foster *et al.*, 1994). El homólogo en ratón es el Sox9. El estudio de la expresión del gen Sox9 en ratón se ha realizado por dos grupos diferentes: Kent y cols. (1996) y Morais da Silva y cols. (1996). En el ratón los transcritos se observan desde los 10.5 dpc en ambos sexos en la cresta urogenital. A los 11.5 dpc sólo hay expresión en machos. A los 12.5-13.5 dpc la expresión se localiza en las células somáticas los cordones sexuales en los testículos, los cuales en este estadio constan de células de Sertoli y células germinales. En la etapa posnatal se expresa en el testículo en las células somáticas hasta la edad adulta (Morais da Silva *et al.*, 1996). Sox9 se expresa a los 12.5 dpc en los conductos de Müller y mesonéfricos en hembras y machos. A los 13.5 dpc la expresión sólo se mantiene en los machos en las células del mesenquima que rodean los conductos müllerianos, se detecta expresión a los 15.5 dpc pero a los 17.5 dpc ya no se observa porque ya se completó la regresión del conducto mülleriano (Kent *et al.*, 1996). Se ha detectado también la expresión de Sox9 en cerebro de ratón de los 10.5 dpc a los 16.5 dpc (Ng *et al.*, 1997).

Se han descrito mutaciones que anulan a ciertos genes como son: *Dhh* (Bitgood *et al.*, 1996), M33 (Katoh-Fukui *et al.*, 1998), *GATA-4* (Molketin *et al.*, 1997) y *Emx2* (Miyamoto *et al.*, 1997), en los cuales se observan alteraciones en el desarrollo de la gónada además de alteraciones del desarrollo en otros sistemas. Todavía no se analiza el patrón de expresión para confirmar su participación en el desarrollo gonadal. Se ha descrito otro gen el llamado *vanina1* el cual se ha relacionado con el desarrollo testicular. Para su identificación se ocupó una técnica de tamizaje de genes (Bowles *et al.*, 2000).

En la figura 1 se muestra un diagrama de la cascada de genes relacionados con la determinación del sexo en el ratón.

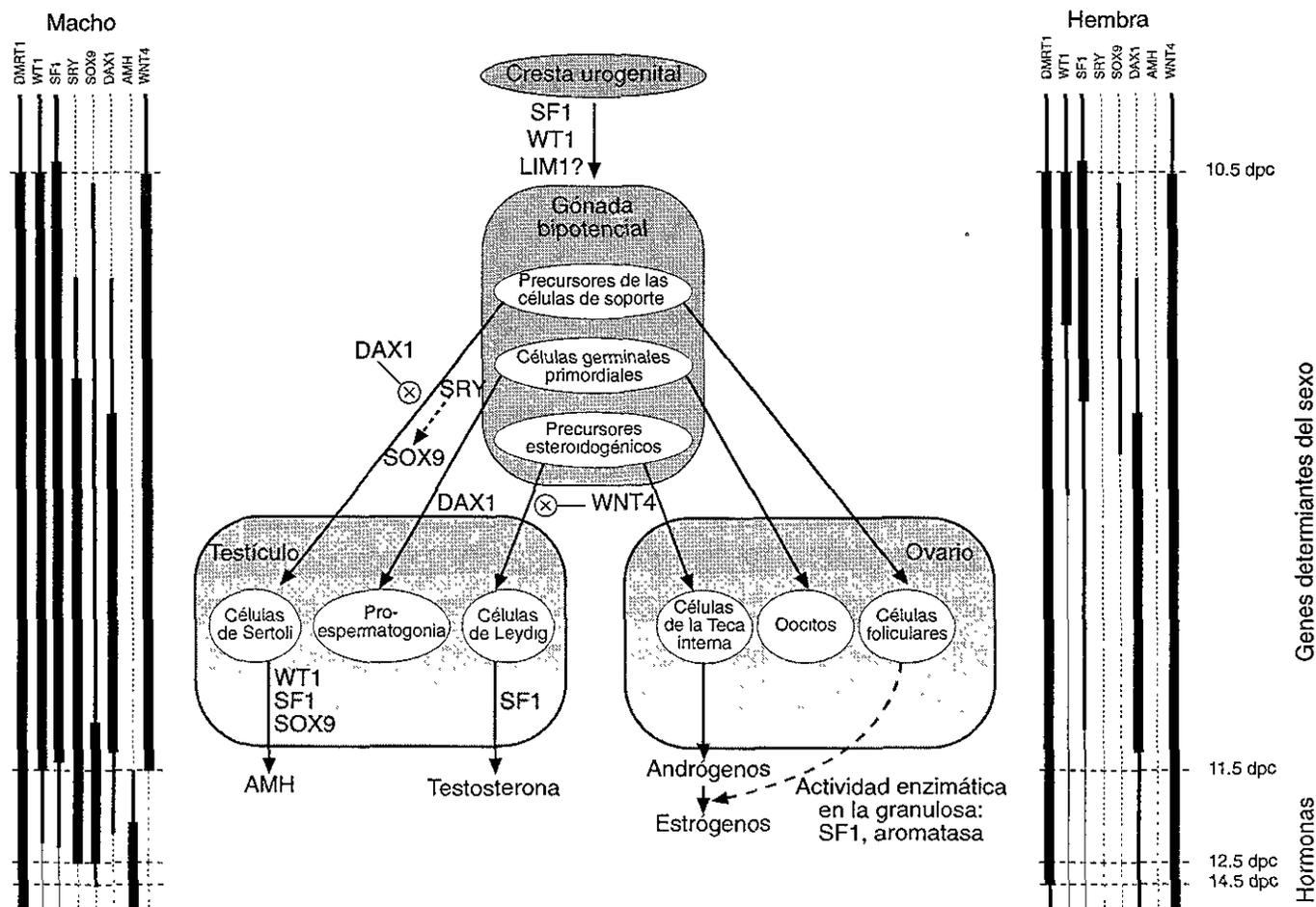


Figura 1. Diagrama que muestra la cascada de expresión génica durante la diferenciación gonadal en el ratón. Los patrones de expresión de cada gen se muestran en las líneas verticales, el ancho de cada línea es proporcional al nivel de expresión. El tiempo de expresión esta dado en días postcoito (dpc). La parte central muestra la relación de la diferenciación de la gónada y sus tipos celulares con los distintos genes descritos (Modificado de Vaiman y Pailhoux, 2000).

### 2.1.2. Genes relacionados con la determinación del sexo en aves

**Sf1:** La expresión de *Sf1* se ha estudiado en otros vertebrados no mamíferos como las aves. En el embrión de pollo la expresión de *Sf1* se observa en ambos sexos en las etapas anteriores a la diferenciación de la gónada (etapas 28-30, días 5.5-6.5) y aumenta su expresión en ovarios después del comienzo de la diferenciación (etapa 32, día 7.5). Este patrón de expresión es diferente al observado en mamíferos, pero puede correlacionarse con el efecto estimulador de *Sf1* en la esteroidogénesis ya que en las aves el ovario embrionario presenta mayor actividad esteroidogénica que el testículo (Smith *et al.*, 1999).

**Wt1:** En las aves el gen *Wt1* se expresa durante la diferenciación sexual gonadal, pero el patrón de expresión de *Wt1* es diferente al de mamíferos, por ejemplo en el embrión de pollo los niveles de expresión son altos y similares en ambos sexos, antes, durante y aún después de la diferenciación gonadal (etapas 28-40, 5.5-13.5 días) (Smith *et al.*, 1999).

**Dmrt1:** El gen *Dmrt1* se localiza en el cromosoma Z en el pollo, su expresión ha sido detectada en la cresta genital antes de la diferenciación sexual (etapas 19 a 25) hasta la etapa 31 cuando inicia la diferenciación sexual. La expresión en machos es en todas las etapas es mayor que en hembras (Raymond *et al.*, 1999b; Nanda *et al.*, 2000).

**Amh:** En el pollo se ha observado que la expresión de *Amh*, gen de la hormona antimülleriana, en las gónadas en desarrollo es un día anterior (etapa 25) a la expresión de *Sox9*. El hecho de que se encuentran promotores potenciales para responder a *SOX9* en el *Amh* parece no tener relevancia en el pollo, ya que el patrón de expresión parece descartar la hipótesis de que *Sox9* pueda estar regulando a *Amh* (Oreal *et al.*, 1998).

**Sox9:** El gen *Sox9* también se ha encontrado en aves como el pollo y se ha observado su expresión en ambos sexos en etapas tempranas (etapa 28) y a partir de la etapa 32 sólo se observó su expresión en embriones ZZ, demostrando que en aves juega un papel importante en la diferenciación testicular (Morais da Silva *et al.*, 1996). Cabe mencionar que otros estudios realizados en pollo

muestran observaciones diferentes, ya que no observan expresión de Sox9 en los embriones hembras (ZW) en ninguna de las etapas estudiadas (28-40), observando expresión solo en los machos (Kent *et al.*, 1996; Oreal *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). En peces se ha encontrado el gen Sox9, aunque no queda clara su participación en la diferenciación testicular (Takamatsu *et al.*, 1997).

## **2.2. Determinación Sexual por Temperatura**

Algunos grupos de reptiles como las familias de serpientes Boidae y Colubridae presentan cromosomas sexuales heteromórficos, ZZ en machos y ZW en hembras. En los otros grupos que no muestran cromosomas sexuales heteromórficos el factor ambiental que determina el sexo es la temperatura de incubación del huevo (TSD, Temperature-dependent Sex Determination) (Bull, 1980).

En varias especies de tortugas, los embriones que se incuban a temperaturas bajas (20-27°C)(TM), se desarrollan como machos y los que se incuban a altas temperaturas (30-35°C)(TF), se desarrollan como hembras. En el caso de lagartos y algunas lagartijas sucede lo contrario, a bajas temperaturas se desarrollan hembras y a altas machos (Bull, 1980). Las tortugas marinas *Chelonia mydas* (Miller y Limpus, 1980; Morreale *et al.*, 1982) *Caretta caretta* (Yntema y Mrosovsky, 1982), *Lepidochelys olivacea* (Morreale *et al.*, 1982), *Eretmochelys imbricata* (Dalrymple *et al.*, 1985) y *Dermochelys coriacea* (Rimblot *et al.*, 1985) presentan determinación del sexo dependiente de temperatura (TSD).

Es importante señalar que en la teoría original de la TSD cada individuo tiene igual potencial para desarrollarse como macho o como hembra, es decir, la temperatura de incubación actúa como la señal inicial de la cascada que lleva a la diferenciación de testículos o de ovarios (Bull, 1980). Para tratar de explicar como la temperatura de incubación puede actuar como señal de inicio para la diferenciación sexual, Claude Pieau (1973) propuso que la temperatura de incubación altera el ambiente hormonal del embrión sexualmente indiferenciado, conduciendo el desarrollo hacia la dirección femenina o masculina.

Específicamente, la temperatura de incubación actúa modulando la expresión de enzimas esteroidogénicas y receptores hormonales, los cuales guían la diferenciación de la gónada embrionaria (Crews *et al.*, 1994). Esta hipótesis se sostiene en el hecho de que en los vertebrados ovíparos el vitelo es un rico almacén de hormonas y sus precursores; si la temperatura de incubación modula la naturaleza, la cantidad y la actividad de las enzimas esteroidogénicas en el embrión, estas enzimas pueden actuar modificando estos precursores produciendo un ambiente hormonal en el embrión dependiente de la temperatura (Bern, 1990).

En los reptiles con TSD no queda aun clara la participación de los esteroides sexuales en la diferenciación de la gónada. La síntesis de esteroides y la actividad de la aromatasa en las gónadas se ha estudiado en la tortuga europea *Emys orbicularis*, en la cual las gónadas embrionarias metabolizan diferentes precursores de esteroides radiactivamente marcados como pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona y androsterona, durante y después del período termosensible de la diferenciación sexual (Dorizzi *et al.*, 1991). Durante los estadios tempranos de este período el contenido gonadal de estrógeno es mayor en embriones incubados a temperatura feminizante que en embriones incubados a temperatura masculinizante. La actividad de la aromatasa permanece baja en los testículos en diferenciación desde el período termosensible hasta la eclosión, en los ovarios en diferenciación, la actividad enzimática se incrementa de manera exponencial hacia el fin de la vida embrionaria y disminuye cerca de la eclosión (Dorizzi *et al.*, 1991). Se ha observado también que la diferenciación masculina puede prevenirse y se puede inducir el desarrollo de ovarios y hembras fenotípicas en *E. orbicularis* por el tratamiento con estradiol exógeno de manera dependiente de la dosis y del tiempo de aplicación (Pieau *et al.*, 1994). En *E. orbicularis* se postula que la temperatura puede actuar de manera directa o indirecta en la regulación de la expresión del gen de la aromatasa P-450 (Pieau *et al.*, 1994).

La propuesta de que la regulación de la enzima aromatasa P-450 en la gónada

indiferenciada juega un papel clave en las especies con TSD se apoya también en los estudios en la tortuga terrestre *Malaclemys terrapin* realizados por Jeyasuria y cols. (1994), donde muestran que la expresión de la aromatasa en ovarios de crías es mayor que en testículos de crías. En otro estudio analizaron la expresión del aromatasa P450 en el cerebro de crías hembras y machos, observando niveles más altos de expresión en el cerebro de las hembras (Jeyasuria y Place, 1997). También evaluaron la expresión del aromatasa durante el desarrollo embrionario, observando expresión en los cerebros de los embriones incubados tanto a TM como a TF (Jeyasuria y Place, 1998).

Contrario a los datos en *E. orbicularis*, los embriones macho en la tortuga *Trachemys scripta*, también con TSD, presenta más altos niveles de E2 que los embriones hembra, lo que hace suponer que no hay correlación directa entre estradiol alto y diferenciación ovárica en algunas especies (Gahr *et al.*, 1992).

Estudios realizados en la tortuga marina *Dermochelys coriacea* demostraron actividad de aromatasa y síntesis de estrógenos; a temperatura feminizante la actividad de la aromatasa es baja al inicio y se incrementa al final del desarrollo embrionario, decreciendo en el momento de la eclosión. Los estrógenos se detectan y aparentemente están relacionados con la actividad de la aromatasa (Desvages *et al.*, 1993).

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* la concentración de testosterona es más alta en embriones incubados a temperatura feminizante que en los incubados a temperatura masculinizante (Salame, 1992). En esta especie también hubo un efecto feminizante al inyectar estradiol, aunque no se encuentran diferencias significativas en la concentración de estradiol en las gónadas de los embriones incubados a temperatura feminizante o masculinizante (Merchant-Larios *et al.*, 1997).

Los estudios hasta ahora realizados en reptiles con TSD enfatizan el papel de las hormonas esteroideas en la determinación del sexo a nivel gonadal. Sin embargo, los resultados contradictorios sugieren la posibilidad de que la regulación de la esteroidogénesis pudiera ser extragonadal. En un estudio de microscopía

electrónica de alta resolución del desarrollo gonadal en *L. olivacea* se observaron nervios no mielinizados en la gónada indiferenciada (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Un estudio posterior mostró que las gónadas aisladas se desarrollan en cultivo de acuerdo a la temperatura en que el organismo donador fue incubado inicialmente, las gónadas aisladas no responden al cambio de temperatura mientras que el embrión completo si responde (Merchant-Larios y Villalpando, 1990). Con estos antecedentes se postuló la hipótesis de que en los embriones de *L. olivacea* el sistema nervioso central es el termosensor que genera señales para la diferenciación gonadal. Para verificarla se evaluaron por radioinmunoanálisis (RIA) las concentraciones y biotransformación de hormonas esteroideas en gónadas y cerebro de esta especie en los tres períodos críticos del desarrollo gonadal, encontrándose diferencias significativas en la producción de estradiol en el cerebro dependiendo de la temperatura de incubación, siendo ésta más alta en los embriones incubados a temperatura feminizante (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

### **2.2.2. Genes relacionados con la determinación del sexo en reptiles**

**Sf1:** El patrón de expresión de *Sf1* también ha sido estudiado en reptiles, en la tortuga dulceacuícola *Trachemys scripta* con determinación del sexo por temperatura. Se observa su expresión en la gónada indiferenciada (etapas 15-17) en embriones incubados tanto a temperatura masculinizante (26°C) como a temperatura feminizante (31°C). En la etapa 18, cuando se detecta la primera diferencia histológica entre las gónadas masculinas y femeninas la expresión de *Sf1* aumenta en el testículo y decrece en el ovario. En la etapa 19, la diferencia de expresión es más notoria entre las dos temperaturas de incubación, siendo mayor a 26°C. En la etapa 23, después del período sensible a la temperatura, la expresión en gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante es casi nula mientras que permanece en los embriones incubados a temperatura masculinizante (Fleming *et al.*, 1999). En el cocodrilo americano *Alligator mississippiensis*, el gen *Sf1* parece expresarse en niveles más altos en las gónadas en desarrollo de embriones incubados a TF, que en las gónadas de los

machos (Western *et al.*, 2000), semejante a lo que sucede en el pollo (Smith *et al.*, 1999), apoyando el papel del *Sf1* como un regulador de las enzimas que participan en la producción de estrógenos en el ovario del cocodrilo (Western *et al.*, 2000).

**Wt1:** Se ha estudiado la expresión de *WT1* en la tortuga dulceacuícola *Trachemys scripta*, especie con determinación del sexo dependiente de temperatura. En esta especie la temperatura masculinizante es 26°C y la feminizante 31°C. Se analizaron complejos urogenitales en distintas etapas de desarrollo de embriones de ambas temperaturas. El período termosensible en esta especie abarca de las etapas 12 a 20. Los complejos urogenitales de las etapas 12 a la 20 expresan *WT1* de manera similar a ambas temperaturas (Spotila *et al.*, 1998).

En el cocodrilo parece no haber diferencias en el patrón de expresión de *Wt1* en las gónadas en desarrollo de los embriones incubados tanto a TM como a TF, observando niveles similares de las etapas 20 a 27 (Western *et al.*, 2000).

**Dmrt1:** En la tortuga dulceacuícola de orejas rojas *Trachemys scripta*, se ha encontrado el gen *Dmrt1*, se ha estudiado su patrón de expresión durante el período termosensible, el cual sugiere su posible participación en la diferenciación testicular, ya que se presenta mayor expresión en los complejos urogenitales de embriones incubados a temperatura masculinizante, al compararla con la de los embriones incubados a temperatura feminizante (Kettewell *et al.*, 2000).

**Zfy:** Se ha realizado también la búsqueda de genes homólogos al *ZFY* (Zinc-Finger on Y Chromosome) en otros vertebrados no mamíferos, como la tortuga *Chelydra serpentina* donde se encuentra como homólogo para *ZFY* el gen *Zft* en ambos sexos en adultos. Aun no se ha estudiado su expresión durante el desarrollo embrionario (Spotila *et al.*, 1994a; Spotila *et al.*, 1994b).

**Amh:** En el cocodrilo *Alligator mississippiensis* se detectó la expresión de *Amh*, gen de la hormona antimülleriana, solamente en el sistema urogenital en desarrollo de los embriones incubados a temperatura masculinizante. La expresión de *Amh* se restringe a las células que se localizan en la médula en las gónadas en desarrollo desde la etapa 22, una etapa anterior a la expresión de

*Sox9*. (Western *et al.*, 1999a).

**Dax1:** En el cocodrilo se ha observado expresión de *Dax1* durante la gonadogénesis, al parecer no hay diferencias entre los patrones de expresión de hembras y machos, aunque no se analizó el nivel de expresión (Western *et al.*, 2000).

**Sox9:** Se ha estudiado la presencia y expresión del gen *Sox9* en diferentes reptiles. En la tortuga *Chelydra serpentina*, se encontraron siete genes relacionados a la familia SOX: *TSox1*, *TSox2*, *TSox3*, *TSox4*, *TSox5*, *TSox6*, *TSox7* y tres pseudogenes: *TSox8*, *TSox9*, *TSox10*. Sin estudiar el patrón de expresión (Spotila *et al.*, 1994a; Spotila *et al.*, 1994b). Estudios posteriores en distintas especies de tortugas mostraron el patrón de expresión de *Sox9* en gónadas. Por ejemplo, en la tortuga dulceacuícola *Trachemys scripta* se analizaron complejos urogenitales durante el período sensible a la temperatura (etapas 12 a la 20) en embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) y embriones incubados a temperatura feminizante (31°C). El nivel expresión en ambos grupos es similar hasta la etapa 19, aumentando la expresión en los embriones de 26°C en la etapa 20, al final del período sensible a la temperatura. Estos datos muestran que *Sox9* podría tener un papel en la formación de testículo en esta especie. (Spotila *et al.*, 1998).

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* se analizó la expresión de la proteína SOX9 (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999), y se observó el mismo nivel de expresión tanto en embriones incubados a temperatura masculinizante (27°C) como a temperatura feminizante (32°C), en las etapas 21 a 24. En éstas, la señal se observa en los núcleos de algunas células de la médula. En la etapa 25 hay diferencias entre ambas temperaturas, debido a que a 32°C sólo algunos núcleos se encuentran marcados y en la etapa 26 ya no se observa señal, mientras que en las gónadas de los embriones incubados a 27°C la señal continúa visible.

En el cocodrilo americano *Alligator mississippiensis* se ha reportado la expresión de *Sox9* sólo en gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante

(33°C), mientras que a temperaturas feminizantes (30°C o 34.5°C) *Sox9* se expresa en niveles basales en todas las etapas (Western *et al.*, 1999b).

De los genes que se expresan en reptiles elegimos a los genes *Dax1* y *Sox9* para estudiarlos en *Lepidochelys olivacea*.

En base a los antecedentes presentados se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

### **3. HIPÓTESIS**

Los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 que participan en la diferenciación sexual de los mamíferos están relacionados directa o indirectamente con la determinación del sexo por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 en la gónada y en el cerebro de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* en diferentes etapas de la diferenciación gonadal.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar una región de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 de la tortuga marina *L. olivacea*.
2. Correlacionar la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P450 con el período sensible a la temperatura en *L. olivacea*.
3. Conocer el efecto de los intercambios en la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo y la expresión del gen *Sox9*.

(33°C), mientras que a temperaturas feminizantes (30°C o 34.5°C) Sox9 se expresa en niveles basales en todas las etapas (Western *et al.*, 1999b).

De los genes que se expresan en reptiles elegimos a los genes *Dax1* y *Sox9* para estudiarlos en *Lepidochelys olivacea*.

En base a los antecedentes presentados se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

### **3. HIPÓTESIS**

Los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 que participan en la diferenciación sexual de los mamíferos están relacionados directa o indirectamente con la determinación del sexo por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 en la gónada y en el cerebro de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* en diferentes etapas de la diferenciación gonadal.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar una región de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 de la tortuga marina *L. olivacea*.
2. Correlacionar la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P450 con el período sensible a la temperatura en *L. olivacea*.
3. Conocer el efecto de los intercambios en la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo y la expresión del gen *Sox9*.

(33°C), mientras que a temperaturas feminizantes (30°C o 34.5°C) Sox9 se expresa en niveles basales en todas las etapas (Western *et al.*, 1999b).

De los genes que se expresan en reptiles elegimos a los genes *Dax1* y *Sox9* para estudiarlos en *Lepidochelys olivacea*.

En base a los antecedentes presentados se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

### **3. HIPÓTESIS**

Los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 que participan en la diferenciación sexual de los mamíferos están relacionados directa o indirectamente con la determinación del sexo por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 en la gónada y en el cerebro de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* en diferentes etapas de la diferenciación gonadal.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar una región de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 de la tortuga marina *L. olivacea*.
2. Correlacionar la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P450 con el período sensible a la temperatura en *L. olivacea*.
3. Conocer el efecto de los intercambios en la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo y la expresión del gen *Sox9*.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Colecta**

Se colectaron huevos de tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, nombre común golfina. Los huevos se colectaron en el momento de la puesta en la playa La Escobilla, Oaxaca. (96°27'16"W, 15°40'36"N), México, con autorización del Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAP, México (permisos: 250997-213-03, 230998-213-03 y 161199-213-03) y en colaboración con el Centro Mexicano de la Tortuga en Mazunte, Oaxaca.

Todos los protocolos que se realizaron con el material biológico cuentan además con la autorización de la Comisión de Bioética en Experimentación Animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los nidos se transportaron al laboratorio en donde se incubaron en dos condiciones de temperatura controladas: una a temperatura masculinizante ( $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) y otra a temperatura feminizante ( $33^\circ \pm 0.1^\circ\text{C}$ ). Se ocuparon un total de 15 nidos para realizar los experimentos que se describen en el presente trabajo. Las etapas de desarrollo se establecieron siguiendo los criterios de Miller (1985), tomando en cuenta el largo total del embrión, el largo y ancho de la cabeza, el largo y ancho del caparazón, el largo y ancho del plastrón, el largo de las aletas, la pigmentación y la definición de las escamas.

### **5.2. Control de temperatura**

La temperatura de las incubadoras se registró diariamente, observando el termómetro de la incubadora y los dos termómetros colocados en el interior. De cada nido experimental se dejaron eclosionar de 5 a 7 crías para identificar el sexo histológicamente.

### **5.3. Muestreo**

Se muestrearon embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario: etapas 23, 24, 25, 26, 27 y 28. También se muestrearon crías para establecer las

condiciones de manejo de las muestras. Se realizó la microdissección de tejidos embrionarios: gónada, mesonefros, cerebro anterior y cerebro posterior. Los tejidos se congelaron inmediatamente y se almacenaron en un ultracongelador a -70°C hasta su utilización para extracción de RNA total.

#### **5.4. Extracción de RNA total**

El RNA total se obtuvo a partir del tejido congelado. Todas las muestras se procesaron individualmente. Se utilizó el reactivo TRIzol (Gibco, BRL), el cual se basa en el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). El protocolo recomendado por los fabricantes de TRIzol es adecuado para tejidos de mamífero, por lo que se realizaron varias modificaciones. El protocolo optimizado para tejidos de *L. olivacea* fue el siguiente: Se homogeneizó el tejido en el TRIzol. La cantidad de trizol utilizada dependió del volumen del tejido a procesar (100 a 500 µl). Se agregó cloroformo de manera proporcional (una quinta parte de la cantidad de trizol) (20 a 100 µl). Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm/4°C por 20 min. La solución acuosa se separó y se precipitó con isopropanol (50 a 250µl) a 4°C toda la noche. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm/4°C por 30 min, el botón (RNA total) se lavó con 1 ml de etanol al 75% en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), se centrifugó nuevamente, en las mismas condiciones, se decantó y se dejó secar. Finalmente se disolvió en agua tratada con DEPC (6 a 20 µl). Un alícuota del RNA total por muestra se analizó por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm. (Sambrook *et al.*,1989). Un microgramo de RNA total se utilizó inmediatamente como sustrato para la reacción de RT-PCR.

#### **5.5. Diseño de oligonucleótidos**

En la actualidad no se encuentran disponibles las secuencias de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 en *Lepidochelys olivacea*, por lo que no es posible tener una sonda homóloga para ellos. Se buscaron en la literatura y en la base de datos Gene Bank las secuencias conocidas para estos genes en diferentes

especies de vertebrados. La obtención de las secuencias de aminoácidos y sus alineamientos nos permitió escoger regiones con alta similitud, a partir de éstas, se diseñaron los oligonucleótidos degenerados. El diseño de oligonucleótidos consideró los siguientes puntos:

La longitud del oligo fue de 18 a 20 nucleótidos, el porcentaje de G/C y A/T es cercano al 50%. La Tm (Temperatura media) de los pares es similar. No existen más de 3 sitios degenerados y el valor máximo de degeneración es 16.

Los oligonucleótidos diseñados se describirán en los siguientes párrafos, uno para cada gen.

Sox9. Para el diseño de los oligonucleótidos degenerados se alinearon las secuencias de aminoácidos correspondientes al gen *Sox9* en diferentes especies de vertebrados: trucha (Takamatsu *et al.*, 1997), tortuga de orejas rojas: *Trachemys scripta* (Spotila *et al.*, 1998), cocodrilo (Western *et al.*, 1999b), pollo (Uwanogho *et al.*, 1996), ratón (Wright *et al.*, 1995) y humano (Foster *et al.*, 1994). Los resultados del alineación se muestra en el anexo1. A partir de las regiones de mayor similitud y fuera de la región HMG, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos degenerados:

Sot1: AGC AGA CCC ACA TCT C(C/T)C C, con una Tm de 49°C.

Sot2: GGG (A/C/T/G)GG CAG GTA (C/T)TG GTC , con una Tm de 50°C.

Dax1. Para el estudio del gen *Dax1* se alinearon las secuencias de aminoácidos de la proteína DAX1 en diferentes especies de vertebrados: cocodrilo (Western *et al.*, 2000), pollo (Smith *et al.*, 1999), wallabi (Pask *et al.*, 1997), ratón (Swain *et al.*, 1998) y humano (Guo *et al.*, 1996). En el anexo 1 se muestra el alineación de DAX1. A partir de las regiones de mayor similitud se diseñaron los siguientes oligonucleótidos degenerados:

Dax1-1: ACC AAG GAG TA(C/T) GC(A/C/T/G) TA(C/T) CT, con una Tm de 67°C

Dax1-2: TCC AG(A/C/T/G) AGC AT(A/G) TC(A/G) TCC AT , con una Tm de 67°C

Aromatasa P-450. Para el estudio de la aromatasa P-450 se alinearon las secuencias de aminoácidos de la misma con diferentes especies de vertebrados: trucha (Jeyasuria *et al.*, 1994), tortuga terrestre *Malaclemys terrapin* (Jeyasuria *et al.*, 1994), pollo (McPaul *et al.*, 1988), vaca (Vanselow y Furbass, 1995), cerdo (Ko *et al.*, 1994), rata (Hickey *et al.*, 1990), ratón (Terashima *et al.*, 1991) y humano (Harada, 1988). El alineación de aminoácidos se muestra en el anexo 1. El par de oligonucleótidos degenerados que se diseñó, es el siguiente:

Aro1: GAT GAT GTA ATT GAC/T GGA TA , con una Tm de 54°C

Aro2: TTC ATC ATT ACC ATG GCA/G AT, con una Tm de 55°C

### **5.6. RT-PCR (Transcripción inversa - Reacción en cadena de la polimerasa)**

Para estudiar la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P450 se utilizó la técnica de RT-PCR. En este estudio se utilizaron los siguientes reactivos: 2X mix, Superscript II RT/ Taq polimerasa (One Step:GIBCO BRL) y un par de oligonucleótidos específicos para cada gen.

Para establecer la temperatura de alineamiento para cada par de oligonucleótidos se prepararon seis diferentes tubos con la misma mezcla de reacción, probando seis temperaturas diferentes alrededor de la temperatura de alineamiento teórica calculada. Para realizar el RT-PCR correspondiente se utilizó el termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf). Una vez establecidas las condiciones de la reacción, se utilizó además el termociclador PTC-100 (MJ Research).

Como control interno de expresión se realizó la amplificación de un fragmento de 252 pb del RNAm de la  $\beta$ -actina, utilizando el siguiente par de oligonucleótidos: Actin1: TGG ATG ATG ATA TTG CTG C y Actin2: ATC TTC TCC ATA TCA TCC CA (Kost *et al.*, 1983). La reacción de amplificación de  $\beta$ -actina se realizó en paralelo con la del gen de interés con las mismas condiciones de reacción y el mismo programa de amplificación.

La reacción en todos los casos se llevo a cabo con una concentración 1X del amortiguador del reactivo One Step que contiene: 2mM de dNTPs, 1.2mM de MgSO<sub>4</sub> ,1.5 mM de oligonucleótidos y 0.5 $\mu$ l de la mezcla Superscript II RT/ Taq

polimerasa (One Step:GIBCO BRL). En cada experimento se incluyo el control sin RT, solo con Taq polimerasa, para detectar una probable contaminación con DNA genómico.

En la siguiente tabla se muestra el programa de amplificación que se utilizó para cada par de oligonucleótidos y el tamaño del fragmento obtenido.

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para el RT-PCR y programa de amplificación para cada gen analizado.**

Gen	Oligonucleótidos	Programa	Fragmento (pb)
Sox9	Sot1: AGC AGA CCC ACA TCT C(C/T)C C Sot2: GGG (A/C/T/G)GG CAG GTA (C/T)TG GTC	50°C 30 min (1 ciclo) 94°C/5min (1 ciclo) 94°C/30seg 50°C/60seg (36 ciclos) 72°C/60seg. 72°C/10 min (1 ciclo)	309
Dax1	Dax1-1: ACC AAG GAG TA(C/T) GC(A/C/T/G) TA(C/T) CT Dax1-2: TCC AG(A/C/T/G) AGC AT(A/G) TC(A/G) TCC AT	50°C 30 min (1 ciclo) 94°C/5min (1 ciclo) 94°C/30seg 60°C/60seg (36 ciclos) 72°C/60seg. 72°C/10 min (1 ciclo)	271
Aromatasa P-450	Aro1: GAT GAT GTA ATT GA(C/T) GGA TA Aro2: TTC ATC ATT ACC ATG GC(A/G) AT	50°C 30 min (1 ciclo) 94°C/5min (1 ciclo) 94°C/30seg 50°C/60seg (36 ciclos) 72°C/60seg. 72°C/10 min (1 ciclo)	205

Estos oligonucleótidos se probaron tomando como molde RNA total obtenido de gónadas de crías de *L. olivacea*, Además, como control positivo y negativo se ocupó RNA total obtenido de diferentes tejidos. Para el gen *Sox9* se utilizarón gónadas de ratón macho de 6 semanas posparto, como control negativo se ocupó RNA total de ovario de ratón de 6 semanas posparto. Para el gen *Dax1* se ocupó mesonefros de crías de *L. olivacea*. Para el gen de la aromatasa P-450 se trabajo con ovario de ratón de 6 semanas posparto.

### **5.7. Electroforesis**

Los productos de las reacciones paralelas se mezclaron, 10  $\mu$ l del tubo de reacción de  $\beta$ -actina y 10  $\mu$ l del tubo de reacción del gen correspondiente, posteriormente se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en TAE1X, con bromuro de etidio (0.1  $\mu$ g/ml) (Sambrook *et al.*, 1989). Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara polaroid DS-34.

### **5.8. Purificación y secuenciación**

El fragmento de DNA amplificado para cada gen se purificó de un gel de agarosa al 3%. La banda se cortó y se disolvió en INa 6M a 37°C, para posteriormente ser purificada por perlas de vidrio. El DNA se eluyó de estas perlas con una solución de Tris-EDTA. Una vez purificado el producto se determinó su concentración.

La secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido, para cada gen, se realizó en un secuenciador automático Applied Biosystems, utilizando un microgramo del fragmento puro y un  $\mu$ mol del oligonucleótido sentido, para la secuencia sentido y un  $\mu$ l del oligonucleótido antisentido para la secuencia complementaria. Cada secuencia se realizó por duplicado.

Una vez corroborada la identidad de cada fragmento se realizó el análisis por RT-PCR del RNA total obtenido de tejidos embrionarios de *L. olivacea* incubados a 26°C y 33 °C.

### **5.9. Densitometría**

Para tener un valor semi-cuantitativo de la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y el gen de la aromatasa P450 se realizó un análisis densitométrico. Todas las fotografías de los geles se tomaron con el mismo transiluminador U.V. Se ocupó también la misma cámara fotográfica, DS34, tomando la fotografía con una apertura de 5.6 y una exposición de medio segundo. En estas condiciones se observaron las bandas con mayor definición. La película ocupada en todas las ocasiones fue la Polaroid Polopan 667, asa 3000. En todos los casos el tiempo de revelado fue de 60 segundos.

Los geles se digitalizaron en un Scanner HP 6300, con una resolución de 300 dpi, Las imágenes se salvaron sin modificar las condiciones de brillo y de contraste. Las imágenes de los geles se analizaron por computadora, en cada imagen se delimitó una zona que incluyó las bandas del gen de interés y las del gen control ( $\beta$ -actina). La zona elegida se evaluó pixel por pixel en la escala de blanco a negro (0-256). Se calculó de las gráficas obtenidas el área de cada pico, que es el equivalente a cada banda, para poder realizar este análisis densitométrico se ocupó el programa Scion Image, el cual asigna un valor por area a cada banda. Se analizaron un total de tres geles para la aromatasa P450, cuatro para *Sox9* y cinco para *Dax1*. Se graficó el promedio de la relación gen de interes/ actina para cada etapa de desarrollo.

### **5.10. Dot Blot**

Para el estudio de la expresión del gen *Sox9*, por dot blot, se cuenta con un plásmido que tiene insertada una secuencia de 396 pb de la región PQS del gen *SOX9* humano. El plásmido pCDNA3-SOX9PQS se construyó a partir del vector pCDNA3 (Invitrogen), flanqueando la región clonada presenta promotores para las

RNA polimerasas T7 y SP6. Este plásmido presenta como marcador genético resistencia a ampicilina (Harley, 1998 comunicación personal).

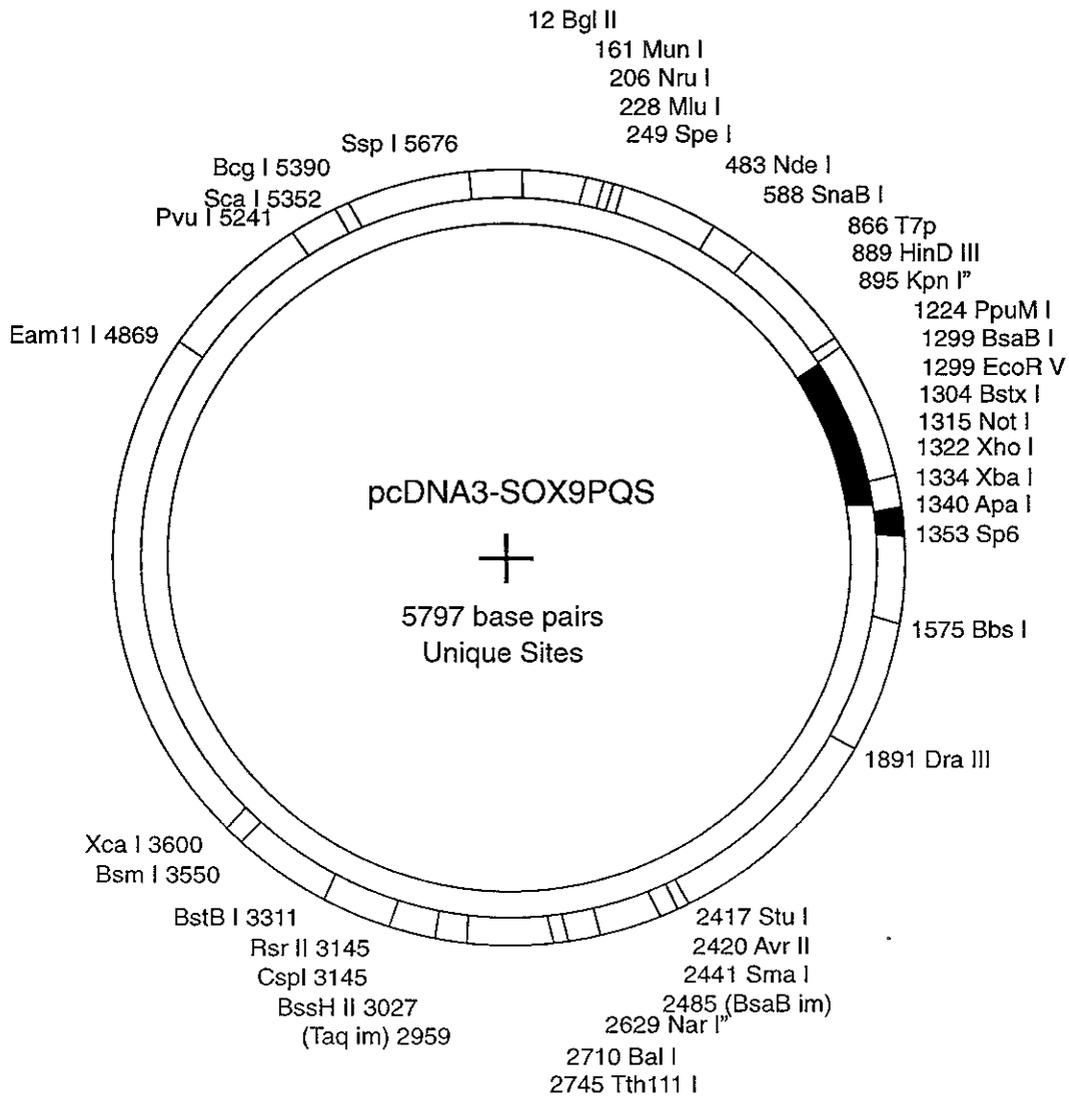


Figura 2. Plásmido pcDNA3-SOX9PQS. Se muestran los principales sitios de restricción y las regiones de los promotores SP6 y T7. En negro se encuentra marcado el fragmento de SOX9.

El plásmido pCDNA3-SOX9PQS (5797 pb) (Figura 2) se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM101. Una vez transformadas las bacterias se caracterizó el plásmido con una digestión con la enzima PvuII. De acuerdo al mapa de restricción del plásmido se deben obtener cuatro fragmentos: 666, 1069, 1097 y 2965 .

Se digirieron 10 µg de plásmido con la enzima KpnI para linearizar el plásmido de manera que el promotor para la enzima SP6 quedo disponible, para obtener la ribosonda antisentido (PSP6).

Para obtener la ribosonda sentido (PT7) se digirió con la enzima XhoI para dejar libre la región del promotor T7.

Posteriormente 1 µg del plásmido linearizado se utilizó para realizar la transcripción *in vitro* con dUTP marcado con digoxigenina (Boehringer Mannheim).

El tamaño y calidad de las ribosondas se observó en un gel de agarosa 1%. La eficiencia de marcado y la concentración fueron evaluadas colocando 1 µl de una dilución 1:10 de cada ribosonda en una membrana de nylon, fijándolas con luz ultravioleta. En la misma membrana se colocaron diferentes cantidades de la ribosonada control. Se detectó la sonda con un anticuerpo antidigoxigenina, acoplado con fosfatasa alcalina, la cual actúa sobre el NBT/BCPI dando una reacción colorida (Boehringer Mannheim). La concentración de las ribosondas PT7 y PSP6 fue de 100ng/µl.

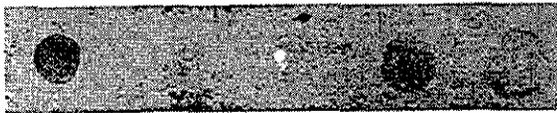
Las condiciones de hibridación de la ribosonda contra RNA obtenido a partir de tejido gonadal de *L. olivacea* se establecieron por medio de la técnica de dot blot. Se colocaron gotas de 1 µg de RNA obtenido a partir de testículos y ovarios de ratón de 17.5 dpc y de embriones de *L. olivacea* etapa 28, 26°C y 33°C.

El RNA se fijó a la membrana con luz UV. Se hibridó en una solución: formamida 50%, 5XSSC, 2% de agente de bloqueo (Boehringer Mannheim), N-lauroylsarcosina 0.1%, SDS 0.02% y 100ng de ribosonda marcada. La temperatura de hibridación se varió hasta obtener una hibridación específica. Con

la misma solución de hibridación se probaron tres distintas temperaturas: 37°C, 42°C y 40°C. (Figuras 3, 4 y 5). Ésta última resultó la mejor.

Una vez establecidas las condiciones de hibridación se estudiaron cerebros de *L. olivacea* separados en cerebro anterior y cerebro posterior. Las etapas estudiadas fueron 24, 26 y 28 tanto de embriones incubados a temperatura feminizante (33°C) como a temperatura masculinizante (26°C).

Sonda contrasentido:



P Tr Or Tt Ot

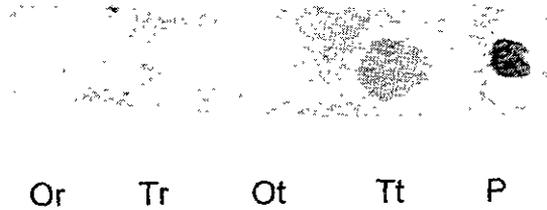
Sonda sentido:



P Tr Or Tr Ot

Figura 3. Membranas para mostrar la hibridación a 37°C. Las gotas Tr y Or corresponden a testículo y ovario de ratón de 17.5 dpc. Tt y Ot corresponden a testículo y ovario de *L. olivacea* etapa 28. La gota P corresponde al plásmido pCDNA3-SOX9PQS.

Sonda contrasentido:



Sonda sentido:

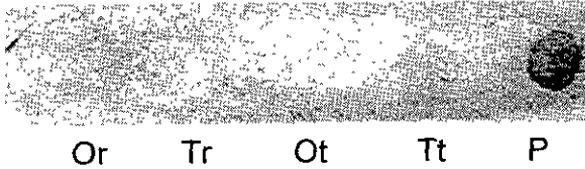


Figura 4. Membranas para mostrar la hibridación a 42°C. Las gotas Tr y Or corresponden a testículo y ovario de ratón de 17.5 dpc. Tt y Ot corresponden a testículo y ovario de *L. olivacea* etapa 28. La gota P corresponde al plásmido pCDNA3-SOX9PQS.

Sonda contrasentido:

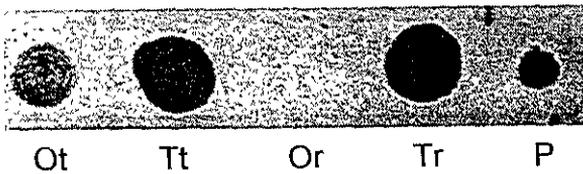


Figura 5. Membranas para mostrar la hibridación a 40°C. Las gotas Tr y Or corresponden a testículo y ovario de ratón de 17.5 dpc. Tt y Ot corresponden a testículo y ovario de *L. olivacea* etapa 24. La gota P corresponde al plásmido pCDNA3-SOX9PQS.

### **5.11. Experimentos de intercambio**

Los experimentos de intercambio consisten en incubar a una temperatura inicial uno o varios nidos, divididos en grupos de 10 huevos. Estos grupos se cambiaron de temperatura en diferentes intervalos de tiempo y/o de desarrollo. Se dejaron incubar en la nueva temperatura hasta alcanzar una etapa en la que puedan ser sexados por histología de la gónada. Se deja un grupo de 10 huevos en la temperatura inicial como control del nido. En el presente trabajo se intercambiaron grupos de embriones de 26°C a 33°C en las etapas 21, 22, 23, 24, 25 y 26 que corresponden a los días 19, 24, 27, 34, 41 y 49. También se intercambiaron de 33°C a 26°C en las etapas 21, 22, 23, 24, 25 y 26 que corresponden a los días 12, 15, 17, 19, 25, 27 y 28. Se incubaron los embriones intercambiados hasta alcanzar la etapa 29-30, se muestrearon y se realizó la microdissección de las gónadas. Se utilizó una gónada para el sexado histológico y la contralateral para analizar la expresión de Sox9 por RT-PCR.

### **5.12. Regulación negativa de la expresión de Sox9**

De acuerdo a los estudios de intercambio realizados en *L. olivacea* (Merchant *et al.*, 1997) se sabe que todos los embriones que se incuban a 26°C se feminizan cuando se intercambian en el día 27 (etapa 23) a 33°C. Con este antecedente se eligió realizar este intercambio para conocer el momento en que el Sox9 se regula negativamente a temperatura feminizante. Se incubaron 100 embriones a 26°C hasta alcanzar la etapa 23, entonces se intercambiaron a temperatura feminizante 33°C (intercambio sencillo). Se muestrearon 10 embriones en los días 6, 8, 10, 12 y 14 después del intercambio, disecando las gónadas para el análisis de la expresión del gen Sox9 por RT-PCR. En los mismos días se regresaron 10 embriones a la incubadora de 26°C (doble intercambio) hasta la etapa 29-30, se muestrearon y se disectaron las gónadas para sexado histológico.

### 5.13. Sexado histológico

Para el análisis histológico de las gónadas se disectaron y se fijaron en solución de Karnovsky , sin calcio y con pH 7.4 (Karnovsky, 1965) por una hora a 4°C. Posteriormente se lavaron con buffer cacodilatos pH 7.3, una hora a 4°C. Se posfijaron en una solución de tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956) por una hora a 4°C. Las muestras se deshidrataron en alcoholes porcentuales 70, 80, 90, 95 y 100, 10 minutos en cada uno a temperatura ambiente. Se colocaron en óxido de propileno 20 min, epon 812: óxido de propileno (1:1) por una hora, epon 812: óxido de propileno (2:1) por una hora, epon puro por 12 a 24 horas. Se incluyeron en epon 812 a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de una micra de grosor y se tiñeron con azul de toluidina para microscopia de luz. Las laminillas se observaron en un microscopio óptico (Nikon HFX-DX).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Desarrollo embrionario

En la tabla 2 se muestra la comparación del desarrollo entre los embriones incubados a 26°C (temperatura masculinizante, TM) y los incubados a 33°C (temperatura feminizante, TF). En el anexo 2 se muestran el análisis de los datos de días y etapas de los distintos nidos incubados a 26°C y a 33°C, también se muestran las gráficas correspondientes, la tabla 2 es el resultado de dicho análisis. En la figura 6 se muestra la comparación de las etapas alcanzadas a TM y a TF en los días de incubación 15, 19, 27, 34 y 46.

**Tabla 2. Tiempo de incubación a 26°C y 33 °C. Comparación de las etapas de desarrollo.**

Etapas de Desarrollo								
	21	22	23	24	25	26	27	Eclosión
Días de Incubación 26°C	19	24	27	34	41	49	56	75
Días de incubación 33°C	12	15	17	19	25	30	35	46

### 6.2. Desarrollo de la gónada

El embrión se desarrolla más rápido a temperatura feminizante que a temperatura masculinizante. En correlación con lo anterior, las gónadas crecen más rápido a la temperatura feminizante.

A 33°C (TF) el desarrollo gonadal es el siguiente:

En las etapas 21-23 las células mesenquimáticas se condensan en grupos cerca del epitelio celómico de la cresta genital.

En las etapas 23-24 la gónada se encuentra en estado indiferenciado con cordones sexuales no desarrollados. La corteza está compuesta de células epiteliales cuboidales y células germinales.

En las etapas 25-26 se forman los cordones sexuales y permanecen continuos con la superficie del epitelio en algunas regiones.

En las etapas 27-28 se nota una diferencia histológica al compararlas con las de 26°C, el epitelio superficial aumenta de espesor y contiene muchas de las células germinales, los cordones medulares todavía son evidentes.

En la etapa 29 los cordones medulares aparecen fragmentados.

En las crías los ovarios se aprecia una corteza desarrollada y se aprecia la fragmentación de los cordones sexuales medulares.

A 26°C el desarrollo gonadal es semejante al de 33°C en las primeras etapas:

En la etapa 23-24 se encuentra en estado indiferenciado, similar al encontrado a 33°C.

En la etapa 25-26 se distinguen los cordones sexuales rodeados de tejido estromático y permanecen continuos con el epitelio superficial en algunas regiones.

En la etapa 28 se distinguen los cordones sexuales en la médula y el epitelio superficial se ve delgado sin células germinales.

En los testículos de las crías son notables los cordones testiculares en la región medular y están separados del epitelio celómico por tejido estromático.

En la figura 7 se muestran cortes histológicos semifinos de gónadas en etapas 24, 26 y 28 de embriones incubados a TF (A,B,C) y a TM (D,E,F).

### **6.3. Secuenciación**

Las secuencias de los fragmentos de RT-PCR obtenidos de los genes *Sox9*, *Dax1* y aromatasa P-450 de *Lepidochelys olivacea* se muestran de manera independiente. Así como la comparación de la secuencia de aminoácidos obtenida para *L. olivacea* y la de otros vertebrados.

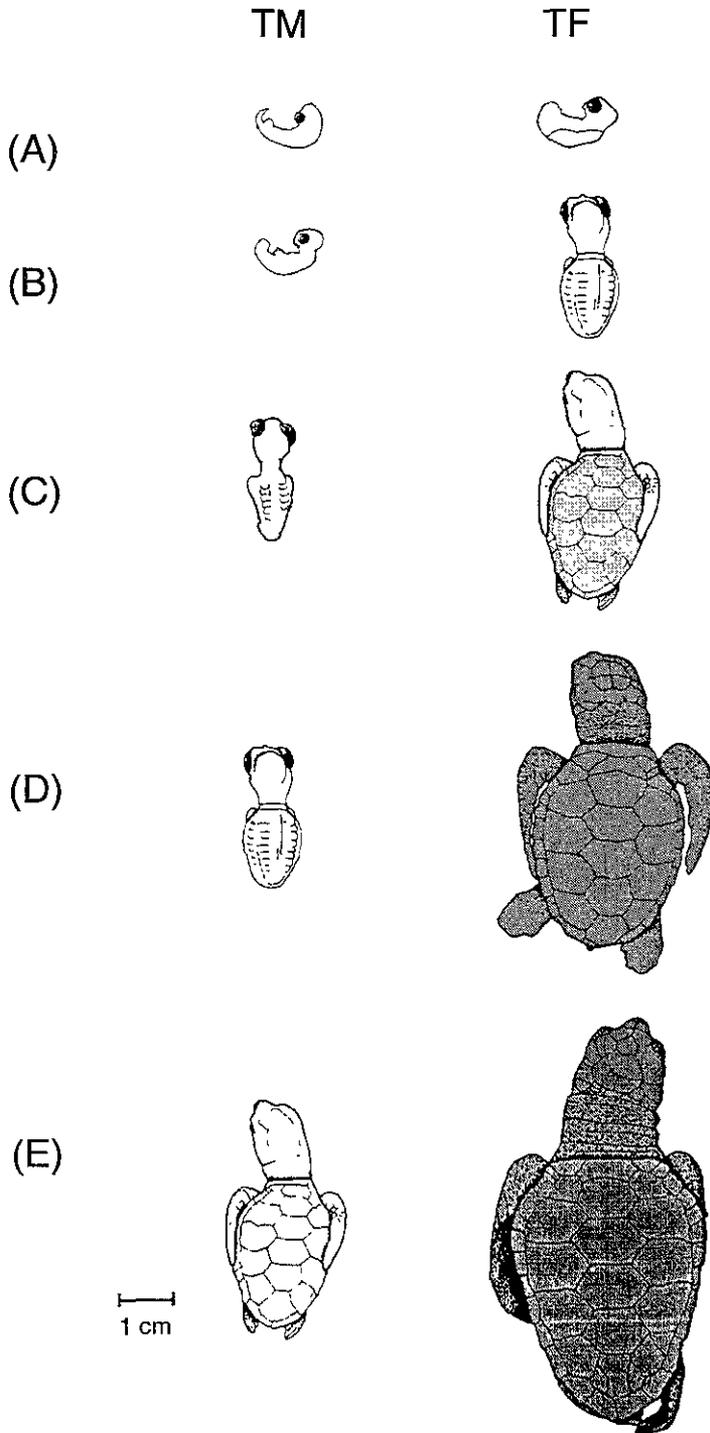
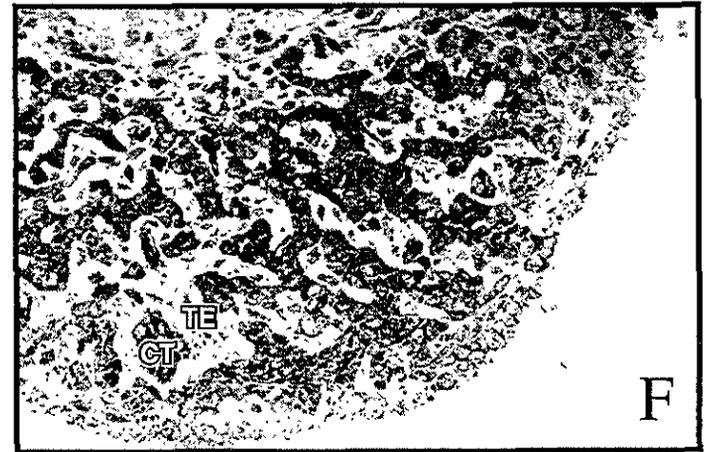
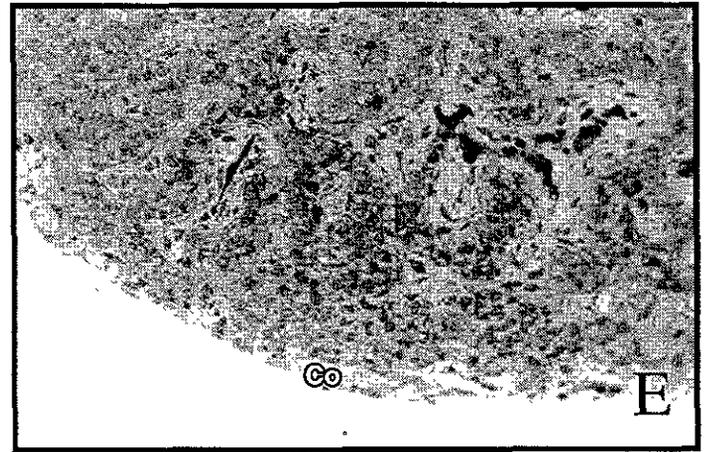
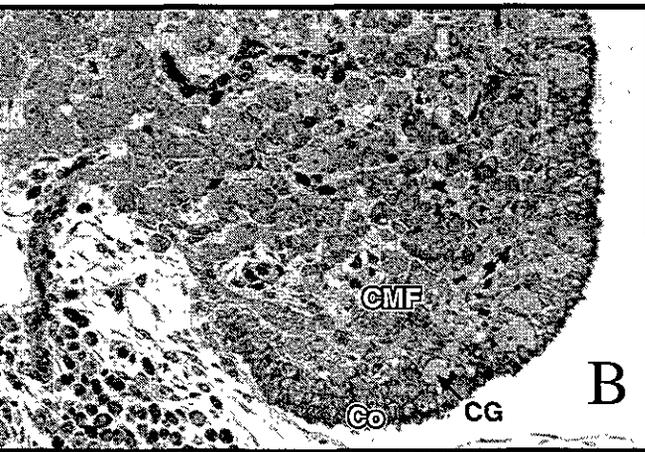
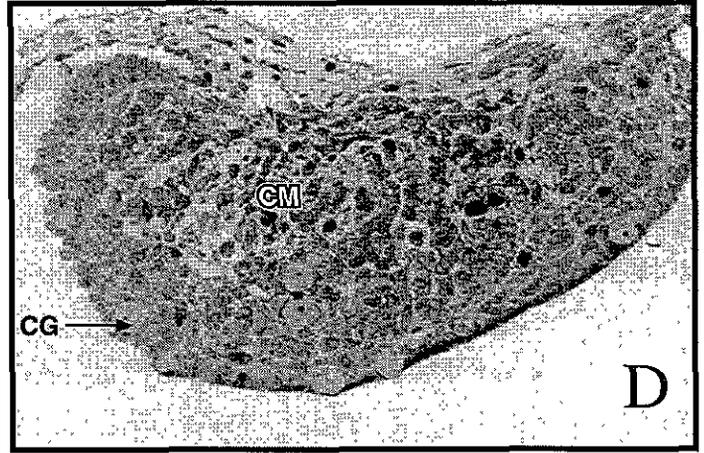
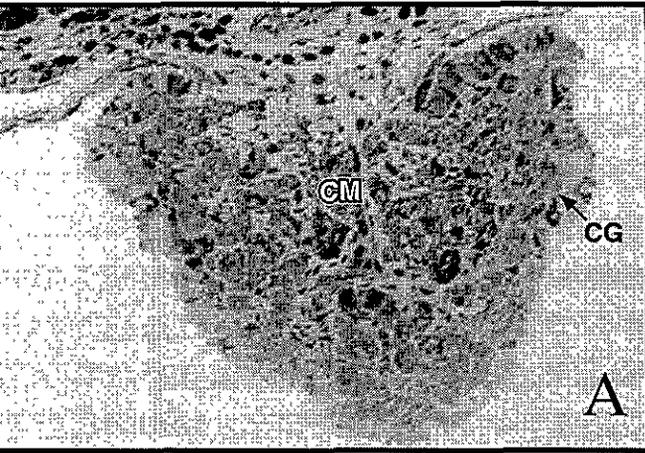


Figura 6. Esquemas que muestran la diferente velocidad de desarrollo de los embriones incubados a **TM** (Columna izquierda) o a **TF** (Columna derecha). **(A)**: 15 días de incubación. TM: etapa 20, TF: etapa 22 **(B)**: 19 días de incubación TM: etapa 21, TF: etapa 24 **(C)** 27 días de incubación TM: etapa 23, TF: etapa 25-26. **(D)** 34 días de incubación TM: etapa 24, TF: etapa 27 y **(E)** 46 días de incubación TM: etapa 25-26, TF: cria. (Esquemas modificados de Miller, 1985).



100µm

Figura 7. Histología de las gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante (TF)(A,B,C). A: Etapa 24. B: Etapa 26 y C: Etapa 28. Embriones incubados a temperatura masculinizante (TM)(D,E,F). D: Etapa 24. E: Etapa 26 y F: Etapa 28. **CM**: cordones medulares. **CMF**: cordones medulares fragmentados. **CG**: células germinales. **Co**: corteza. **CT**: cordones testiculares. **TE**: tejido estromático Barra 100µm. (Fotografías: H.Merchant).

### 6.3.1. Sox9

La secuencia obtenida del fragmento de RT- PCR purificado fue la siguiente:

```

          10           20           30           40           50
          |           |           |           |           |
GTT CAC TCT CCA GGA GAG CAT TCA GGG CAG TCC CAG GGG CCC CCG CTC CTC
 V  H  S  P  G  E  H  S  G  Q  S  Q  G  P  P  L  L

          60           70           80           90           100
          |           |           |           |           |
ATA ACT ACA CCA AAA ACA GAT ATC CAG CCT GGG AAG CAA GAC CTA AAG CAA
 I  T  T  P  K  T  D  I  Q  P  G  K  Q  D  Q  K  Q

          110          120          130          140
          |           |           |           |
GAA GGG CAC CCT TTC AGG AAG AGG GGA AGA CAA CCG CCA CAT
 E  G  H  P  F  R  K  R  G  R  Q  P  P  H

```

Esto corrobora la identidad del fragmento como parte del gen Sox9. La secuencia se incorporó a la base de datos Gene Bank, el número de acceso es AF335422. Se muestra solamente la región más legible del fragmento secuenciado.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de SOX9 en *L. olivacea* y otros vertebrados es la siguiente:

Trucha ( <i>O. mikyss</i> )	<b>VHSPSEHSGQSQGPPTPPTTPKTDLA-</b>
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	<b>VHSPGEHSGQSQGPPTPPTTPKTDVQ-</b>
Cocodrilo ( <i>A. mississippiensis</i> )	<b>VHSPGEHSGQSQGPPTPPTTPKTDVQ-</b>
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	<b>VHSPGEHSGQSQGPPTPPTTPQTDAAQ</b>
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	<b>VHSPGEHSGQSQGPPTPPTTPKTDVQ-</b>
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	<b>VHSPGEHSGQSQGPPTPPTTPKTDVQ-</b>
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	<b>VHSPGEHSGQSQGPPLLITTPKTDIQ-</b>

Trucha ( <i>O. mikyss</i> )	<b>VGKADLKREGRPLQEGTGRQLN</b>
Tortuga ( <i>T. scripta</i> )	<b>PGKQDLKREGRPLQEGGRQPPH</b>
Cocodrilo ( <i>A. mississippiensis</i> )	<b>PGKQDLKREGRPLQEGGRQPPH</b>
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	<b>PGKQDLKREG-PLAEGGRQPPH</b>
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	<b>AGKVDLKREGRPLAEGGRQPP-</b>
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	<b>PGKADLKREGRPLPEGGRQPP-</b>
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	<b>PGKQDQKQEGHPFRKRGRQPPH</b>

Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias se indican en negritas.

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de similitud entre las secuencias.

**Tabla 3. Porcentaje de similitud de la secuencia parcial de aminoácidos de SOX9 entre distintos vertebrados.**

	Trucha	Tortuga	Cocodrilo	Pollo	Ratón	Humano	Golfina
Trucha	100.00						
Tortuga	82.95	100.00					
Cocodrilo	82.95	100.00	100.00				
Pollo	79.38	95.24	95.24	100.00			
Ratón	82.58	95.24	95.24	93.52	100.00		
Humano	84.15	96.80	96.80	93.52	95.24	100.00	
Golfina	67.40	82.95	82.95	82.58	79.38	81.02	100.00

### 6.3.2. *Dax1*

La identidad del fragmento obtenido por RT-PCR para *Dax1* se comprobó por secuenciación:

```

          10           20           30           40           50
          |           |           |           |           |
ACC AAG GAG TAC GCC TAC CTC AAG GGG ACT GTG CTC TTC AAC CCG GAT CTG
 T   K   E   Y   A   Y   L   K   G   T   V   L   F   N   P   D   L

          60           70           80           90           100
          |           |           |           |           |
CCA GGG CTG CAG TGT GTA CAA TAT ATC CAG GGA CTG CAG AGG GAA GCA CAG
 P   G   L   Q   C   V   Q   Y   I   Q   G   L   Q   R   E   A   Q

          110          120          130          140          150
          |           |           |           |           |
CAA GCT CTA AAT GAA CGC GTC AGA CTG CTA CAT CGA GGG GAC CAG GCC AGA
 Q   A   L   N   E   R   V   R   L   L   H   R   G   D   Q   A   R

          160          170          180          190          200
          |           |           |           |           |
TTT GCC AAG CTG AAT GTT GTT CTT TCC TTG CTA AGA TCC ATT AAT GCT AAC
 F   A   K   L   N   V   V   L   S   L   L   R   S   I   N   A   N

          210          220          230          240          250
          |           |           |           |           |
GTA ATT GCC GAA CTA TTC TTT AGG CCC ATC ATT GGA ACA GTC NNN AAC ATG
 V   I   A   E   L   F   F   R   P   I   I   G   T   V   x   N   M

          260          270
          |           |
CAA GAC ATG GAG GGA C
 Q   D   M   R   D

```

La comparación de la secuencia de aminoácidos del fragmento de la proteína DAX1 de *L. olivacea* y otros vertebrados se muestra a continuación:

Cocodrilo (*A. mississippiensis*) **PKEYAYLK**GAVLFNPDLPGLQCTQYIQGLQREAAQQ  
 Pollo (*G. gallus*) **TKEYAYLK**GTVLFNPDLPGLQCTQYIEGLQKEAAQE  
 Ratón (*M. musculus*) **TKEYAYLK**GTVLFNPDLPGLQCVKYIEGLQWRTQQ  
 Humano (*H. sapiens*) **TKEYAYLK**GTVLFNPDVPGLQCVKYIQGLQWGTQQ  
 Golfina (*L. olivacea*) **TKEYAYLK**GTVLFNPDLPGLQCVQYIQGLQREAAQQ

Cocodrilo (*A. mississippiensis*) **ALNEHVRLI**HRGDQARFAKLNIALSLLRSINAN--  
 Pollo (*G. gallus*) **ALNEHVRLI**HRGDQARFAKLNVVLSLLRSINANVI  
 Ratón (*M. musculus*) **ILTEHIR**MMQREYQIRSAELNSALELLRFINSDVV  
 Humano (*H. sapiens*) **ILSEHTR**MT HQGPHDRFIELNSTLELLRFINANVI  
 Golfina (*L. olivacea*) **ALNERVRL**LLHRGDQARFAKLNVVLSLLRSINANVI

Cocodrilo (*A. mississippiensis*) -----  
 Pollo (*G. gallus*) **AELFFRPII**GTVMDDMML  
 Ratón (*M. musculus*) **TELEFFRPII**GA VSMDDMML  
 Humano (*H. sapiens*) **AELFFRPII**GTVSMDDMML  
 Golfina (*L. olivacea*) **AELFFRPII**GTVMQDMRD

Los aminoácidos que son iguales en todos los vertebrados considerados se indican en negritas.

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de similitud entre las secuencias.

**Tabla 4. Porcentaje de similitud de la secuencia parcial de aminoácidos de DAX1 entre distintos vertebrados.**

	Cocodrilo	Pollo	Ratón	Humano	Golfina
Cocodrilo	100.00				
Pollo	90.13	100.00			
Ratón	66.17	72.01	100.00		
Humano	67.60	73.07	78.05	100.00	
Golfina	90.13	90.32	67.70	73.07	100.00

### 6.3.3. Aromatasa P-450

El fragmento obtenido por RT-PCR para el gen de la aromatasa P-450 se secuenció para corroborar su identidad. La secuencia correspondiente se muestra a continuación:

```

      10      20      30      40      50
GGT TAT AAG GGA ACT AAC ATC ATT CTG AAC ATC GGA AGA ATG CAC AGG CTC GAG
 G   Y   K   G   T   N   I   I   L   N   I   G   R   M   H   R   L   E

      60      70      80      90      100
TAC TTC CCT AAG CCC AAT GAA TTT ACC CTT GAA AAC TTT GAG AAG AAT GTT CCC
 Y   F   P   K   P   N   E   F   T   L   E   N   F   E   K   N   V   P

      110      120      130      140      150      160
TAC AGG TAC TTT CAG CCT TTT GGC TTT GGG CCC CGC GGC TGT GCT GGG AAG TAC
 Y   R   Y   F   Q   P   F   G   F   G   P   R   G   C   A   G   K   Y

      170      180      190
ATC GCC ATG GTA ATG ATN GAA NCA NCT CA
 I   A   M   V   M   X   E   X   X

```

La comparación de la secuencia parcial de aminoácidos de la aromatasa P450 de *L. olivacea* con la de otros vertebrados es la siguiente:

Trucha ( <i>O. mykiss</i> )	VPKGTNIILNMGRMHRSEFFLKPNEFSLDNFEK
Tortuga ( <i>M. terrapin</i> )	VKRGTNIILNIGRMHKLEEFPKPNEFSLENFEK
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	VKKGTNIILNIGRMHKLEFFPKPNEFSLENFEK
Vaca ( <i>B. taurus</i> )	VKKGTNIILNLGRMHRLEFFPKPNEFTLENFAK
Rata ( <i>R. rattus</i> )	VKKGTNIILNIGRMHRLEYFPKPNEFTLENFEK
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	VKKGTNIILNIGRMHRLEYFPKPNEFTLENFEK
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	VKKGTNIILNIGRMHRLEFFPKPNEFTLENFAK
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	GYKGTNIILNIGRMHRLEYFPKPNEFTLENFEK

Trucha ( <i>O. mykiss</i> )	<b>NIPNRFFQPF</b> SGPRSCV <b>GKHIAMVMMKSI</b>
Tortuga ( <i>M. terrapin</i> )	<b>NVPSRYFQPF</b> FGPRACV <b>GKFIAMVMMKAI</b>
Pollo ( <i>G. gallus</i> )	<b>NVPSRYFQPF</b> FGPRGCV <b>GKFIAMVMMKAI</b>
Vaca ( <i>B. taurus</i> )	<b>NVPYRYFQPF</b> FGPRACAGKYIT <b>MVMMKVV</b>
Rata ( <i>R. rattus</i> )	<b>NVPYRYFQPF</b> FGPRSCAGKYIAM <b>VMMKVV</b>
Ratón ( <i>M. musculus</i> )	<b>NVPYRYFQPF</b> FGPRGCAGKYIAM <b>VMMKVV</b>
Humano ( <i>H. sapiens</i> )	<b>NVPYRYFQPF</b> FGPRGCAGKYIAM <b>VMMKAI</b>
Golfina ( <i>L. olivacea</i> )	<b>NVPYRYFQPF</b> FGPRGCAGKYIAM <b>VMMXEXX</b>

Los aminoácidos que son iguales en todos los vertebrados mencionados se indican en negritas.

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de similitud entre las secuencias.

**Tabla 5. Porcentaje de similitud de la secuencia parcial de aminoácidos de la Aromatasa P450 entre distintos vertebrados.**

	Trucha	Tortuga	Pollo	Vaca	Rata	Ratón	Humano	Golfina
Trucha	100.00							
Tortuga	77.00	100.00						
Pollo	80.30	95.10	100.00					
Vaca	75.40	83.60	85.20	100.00				
Rata	78.70	86.90	88.50	91.80	100.00			
Ratón	77.00	86.90	90.20	91.80	98.40	100.00		
Humano	77.00	85.20	90.20	95.10	95.10	96.70	100.00	
Golfina	73.30	81.70	85.00	86.70	93.30	95.00	91.70	100.00

## 6.4. RT-PCR.

Los resultados del análisis de la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y aromatasa P-450 por RT-PCR se muestran a continuación de manera independiente.

### 6.4.1. *Sox9*

La expresión de *Sox9* se estudió en embriones incubados a temperatura masculinizante (TM)(26°C) y en embriones incubados a temperatura feminizante (TF)(33°C). El número de gónadas estudiadas por etapa se muestra entre paréntesis. Grupo 26°C: Etapa 21/22 (5), Etapa 23/24 (10), Etapa 24 (16), Etapa 24/25 (6), Etapa 25 (22), Etapa 26 (17), Etapa 27 (16).

Grupo 33°C: Etapa 21/22 (3), Etapa 23/24 (9), Etapa 24 (25), Etapa 24/25(11), Etapa 25 (23), Etapa 25/26 (14) Etapa 26 (14), Etapa 27 (16).

El análisis por RT-PCR del patrón de expresión de *Sox9* en la gónada se muestra en la figura 8.

En los embriones incubados a 26°C se observó la expresión de *Sox9* en todas las etapas analizadas. En los embriones incubados a 33°C se observó expresión en las etapas 23, 24 y 25. En la etapa 25/26 el 25% de los embriones expresaron *Sox9*. A partir de la etapa 26 no se detecta transcrito.

En la gráfica 1 se muestra el patrón de de expresión en las gónadas de embriones incubados a TM y a TF.

Para estudiar la expresión en cerebro anterior y posterior se utilizó la técnica de de Dot Blot. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos, en cerebros de embriones incubados a TM y a TF de las etapas 24, 26 y 28. El transcrito esta presente en ambas regiones del cerebro en todas las etapas estudiadas a ambas temperaturas.

Para confirmar estos datos se realizó un RT-PCR en las mismas etapas, se observó expresión de *Sox9* en ambas regiones del cerebro, en todas las etapas, a TM y a TF (no se muestran los resultados).

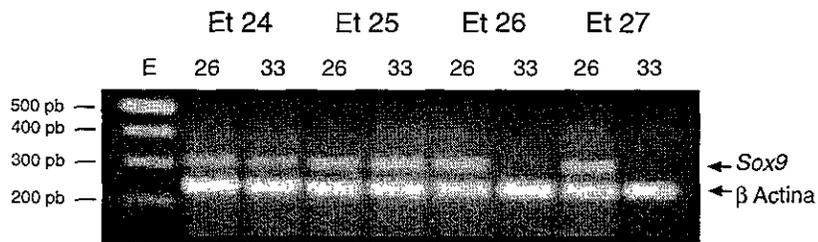
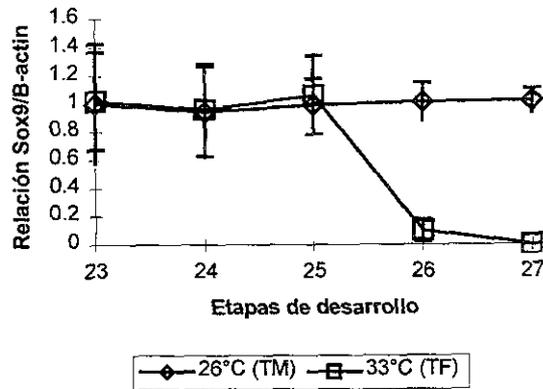


Figura 8. Electroforesis en agarosa del RT-PCR del gen *Sox9*. Carril **E**: marcador de peso molecular (100 pb). Carriles **26**: gónadas de embriones incubados a 26°C (TM). Carriles **33**: gónadas de embriones incubados a 33°C (TF). Carriles **Et**: etapas de desarrollo de los embriones analizados. **Et24**: etapa 24. **Et25**: etapa 25. **Et26**: etapa 26. **Et27**: etapa 27. Todos los carriles muestran el fragmento de 252 pb correspondiente a la  $\beta$ -actina; los carriles de las etapas 24 y 25 muestran el fragmento de 309 pb correspondiente a *Sox9* en ambas temperaturas. En las etapas 26 y 27 sólo se observa en los embriones de 26°C.

### Patrón de expresión de Sox9



Gráfica 1. Patrón de expresión del gen *Sox9* en gónadas de embriones incubados a 26°C (TM) y de embriones incubados a 33°C (TF). En el eje de las X se muestran las etapas de desarrollo de los embriones analizados (etapas 23 a 27). En el eje de las Y se muestra el promedio y la desviación estándar de la relación *Sox9*/ $\beta$ -actina, calculada a partir de los valores de densidad.

Sonda contrasentido:

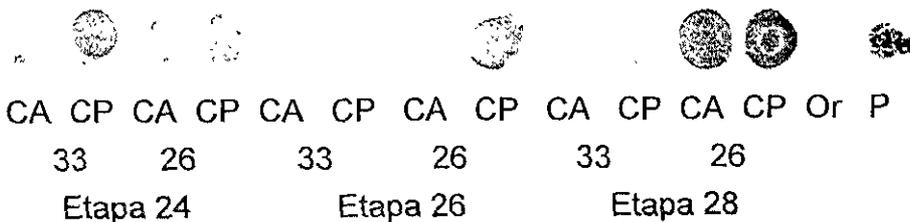


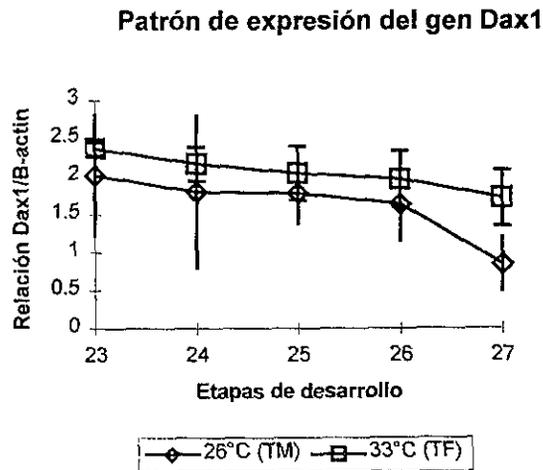
Figura 9. Dot blot para mostrar hibridación RNA-RNA. Se analizó RNA obtenido de cerebro anterior (puntos CA) y posterior (puntos CP). 26: embriones incubados a 26°C (TM). 33: embriones incubados a 33°C (TF). Or: ovario de ratón 17.5 dpc. P: plásmido pCDNA3-SOX9PQS.

### 6.4.2. *Dax1*

La expresión del gen *Dax1* se estudió en las gónadas de embriones incubados a TM (26°C) y en embriones incubados a TF (33°C). Las etapas estudiadas para cada grupo fueron: 23, 24, 25, 26 y 27, para cada etapa se analizaron 10 gónadas.

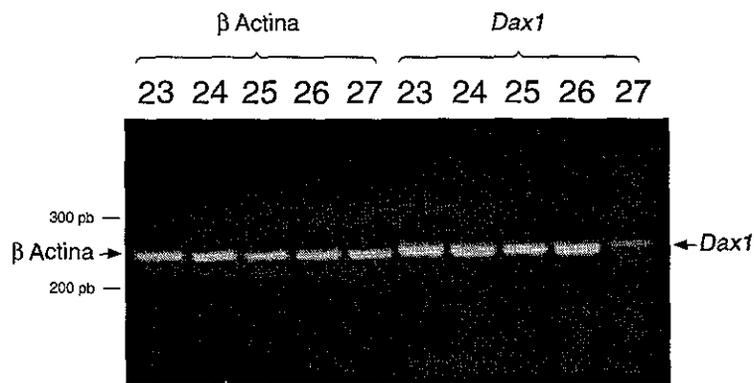
En la gráfica 2 se muestra el patrón de expresión en las gónadas de embriones incubados a TM y a TF.

El análisis por RT-PCR se muestra en la figura 10. En los embriones incubados a TM y TF se observa expresión en ambos grupos en todas las etapas estudiadas. A TF *Dax1* se expresó en niveles similares en todas las etapas, mientras que a TM su expresión disminuyó a partir de la etapa 26.



Gráfica 2. Patrón de expresión del gen *Dax1* en gónadas de embriones incubados a 26°C (TM) y de embriones incubados a 33°C (TF). En el eje de las X se muestran las etapas de desarrollo de los embriones analizados (etapas 23 a 27). En el eje de las Y se muestra el promedio y la desviación estándar de la relación *Dax1*/β-actina, calculada a partir de los valores de densidad.

**A**



**B**

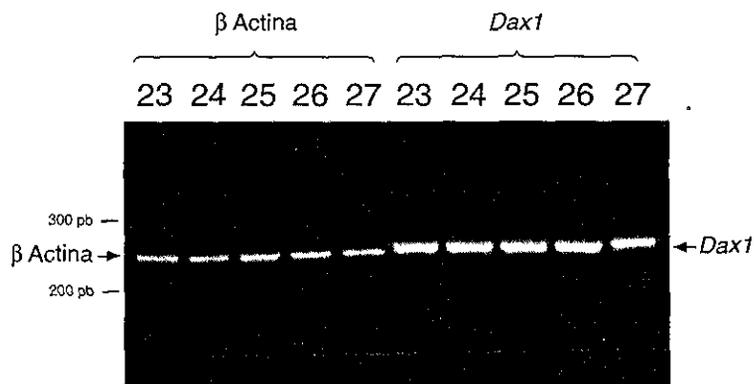


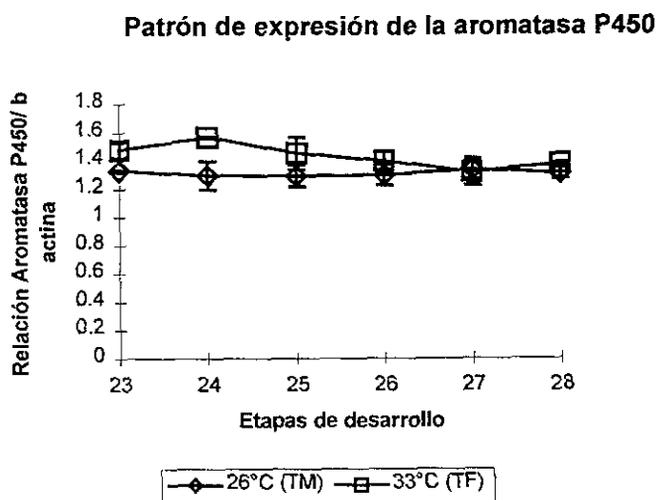
Figura 10. Electroforesis en agarosa del RT-PCR del gen *Dax1*. RNA obtenido de gónadas de embriones de *L. olivacea*. **A)** Embriones incubados a 26°C (TM). **B)** Embriones incubados a 33°C (TF). Carriles 23, 24, 25, 26 y 27: etapas de desarrollo estudiadas. Los primeros cinco carriles muestran el fragmento de 252 pb correspondiente a la  $\beta$ -actina. Los cinco siguientes muestran el fragmento de 271 pb correspondiente a *Dax1*. Marcador de peso molecular: escalera de 100 pb.

### 6.4.3. Aromatasa P-450

La expresión del gen del aromatasa P-450 se estudió en embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) y en embriones incubados a temperatura feminizante (33°C). Las etapas estudiadas para cada grupo fueron: 23, 24, 25, 26, 27 y 28. Para cada etapa se analizaron 10 pares de gónadas, 4 cerebros anteriores y 4 cerebros posteriores.

En la gráfica 3 se muestra el patrón de expresión en las gónadas de embriones incubados a TM y a TF.

El análisis por RT-PCR de la expresión del gen de la aromatasa P-450 en gónada se muestra en la figura 11.



Gráfica 3. Patrón de expresión del gen de la aromatasa P450 en gónadas de embriones incubados a 26°C (TM) y de embriones incubados a 33°C (TF). En el eje de las X se muestran las etapas de desarrollo de los embriones analizados (etapas 23 a 28). En el eje de las Y se muestra el promedio y la desviación estándar de la relación aromatasa P450/  $\beta$ -actina, calculada a partir de los valores de densidad.

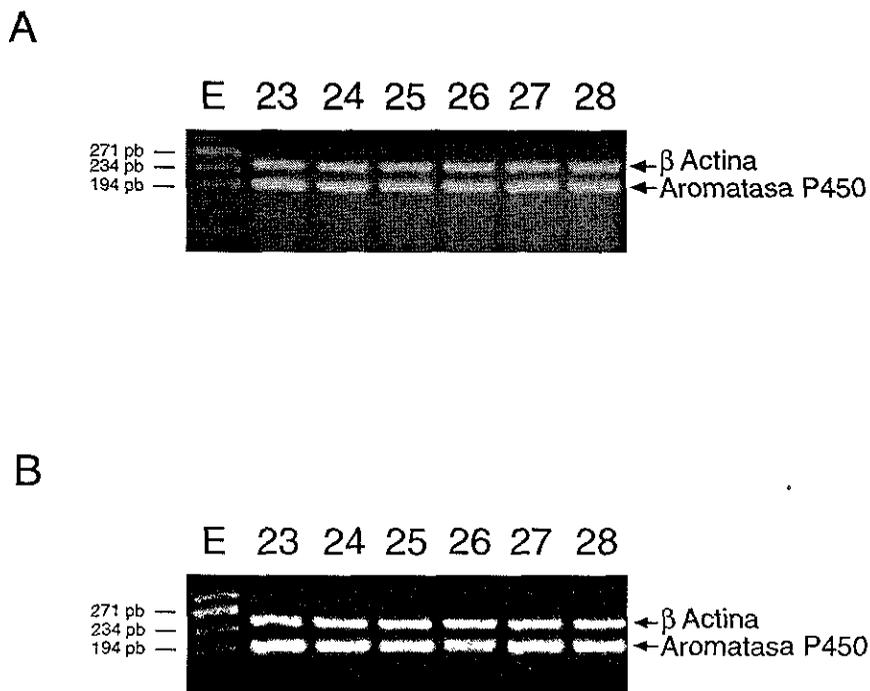
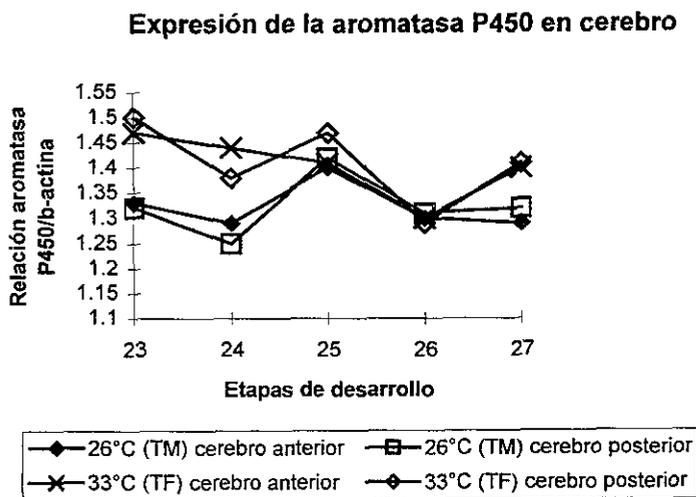


Figura 11. Electroforesis en agarosa del RT-PCR del gen de la aromatasa P450. RNA obtenido de gónadas de embriones de *L. olivacea*. **A)** Embriones incubados a 26°C (TM). **B)** Embriones incubados a 33°C (TF). Carril **E**: marcador de peso molecular ( $\Phi$ X174/HaeIII). Carriles **23**, **24**, **25**, **26**, **27** y **28**: etapas de desarrollo analizadas. Todos los carriles muestran el fragmento de 252 pb correspondiente a la  $\beta$ -actina, también muestran el fragmento de 205 pb correspondiente al gen de la aromatasa P450.

En la gráfica 4 se muestra el patrón de expresión en el cerebro anterior y posterior de embriones incubados a TM y a TF. El análisis por RT-PCR de la expresión del gen de la aromatasa P-450 en cerebro se muestra en la figura 12.

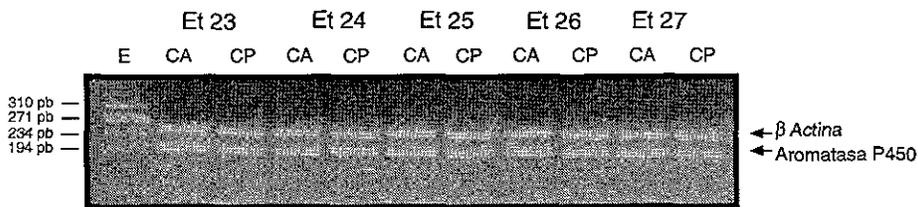
En ambas temperaturas se observó la expresión del gen de la aromatasa P-450 en todos los tejidos analizados (gónada, cerebro anterior y cerebro posterior), en todas las etapas estudiadas.

El nivel de expresión es similar en todos los tejidos y etapas a ambas temperaturas.



Gráfica 4. Patrón de expresión del gen de la aromatasa P450 en cerebros (regiones anterior y posterior) de embriones incubados a 26°C (TM) y de embriones incubados a 33°C (TF). En el eje de las X se muestran las etapas de desarrollo de los embriones analizados (etapas 24 a 27). En el eje de las Y se muestra el promedio y la desviación estándar de la relación aromatasa P450/  $\beta$ -actina, calculada a partir de los valores de densidad.

**A**



**B**



Figura 12. Electroforesis en agarosa del RT-PCR del gen de la aromatasa P450. RNA obtenido de cerebros de embriones de *L. olivacea*. **A)** Embriones incubados a 26°C (TM). **B)** Embriones incubados a 33°C (TF) Carril E: marcador de peso molecular ( $\phi$ X174/HaeIII). Carriles **Et23**, **Et24**, **Et25**, **Et26** y **Et27**: etapas de desarrollo analizadas. **CA**: cerebro anterior. **CP**: cerebro posterior. Todos los carriles muestran el fragmento de 252 pb correspondiente a la  $\beta$ -actina, también muestran el fragmento de 205 pb correspondiente al gen de la aromatasa P450.

## 6.5. Intercambios y expresión de Sox9

En la tabla 6 se muestran los resultados de los intercambios de 26°C a 33°C, se pueden reconocer tres períodos. En el primero de ellos todos los embriones respondieron al cambio de temperatura, es decir, que todos se desarrollaron como hembras, a este período se le llama período indiferenciado (PI) y abarca de los días 19 a 24 (etapas 21 a 22). En el segundo período algunos embriones responden al cambio de temperatura, al final de la incubación se obtuvieron hembras y machos, a este período se le llama período sensible a la temperatura (PST) y abarca de los días 27 a 34 (etapas 23 a 24). En el tercer período ningún embrión respondió al cambio, es decir, todos se desarrollaron como machos, a este período se le llama período determinado (PD) y abarca de los días 41 en adelante (etapas 25 en adelante).

En la tabla 7 se muestran los resultados de los intercambios de 33°C a 26°C, en esta se pueden reconocer también los tres períodos. El PI abarca de los días 12 a 19 (etapas 21 a 24), todos los embriones se desarrollaron como machos. El PST abarca de los días 20 a 26 (etapas 24 a 25), algunos embriones respondieron al cambio de temperatura, al final de la incubación se obtuvieron hembras y machos. En el PD, a partir del día 27, etapa 25 ningún embrión responde al cambio, es decir, todos los embriones se desarrollaron como hembras.

La expresión de Sox9 en el momento de sexar las crías coincide en todos los casos el sexo histológico, es decir, los machos expresan Sox9 y las hembras no.

Tabla 6. Experimentos de intercambio en *Lepidochelys olivacea*. Intercambio de temperatura masculinizante (26°C) a temperatura feminizante (33°C).

Días de incubación	Etapas	Núm. Huevos (nidos)	Núm. Embriones sobrevivientes	Núm. Machos	Núm. Hembras	% Respuesta	Expresión Sox9 RT-PCR		
							Analizados	Positivos	Negativos
Intercambio de 26 ± 0.2 °C a 33 ± 0.1°C									
19	21	20(4)	14	0	14	100	6	0	6
24	22	20(4)	10	0	10	100	5	0	5
27	23	25(4)	13	2	11	85	7	2	5
34	24	25(4)	22	14	8	36	14	13	1
41	25	25(4)	23	23	0	0	14	14	0
49	26	25(4)	24	24	0	0	-	-	-

Tabla 7. Experimentos de intercambio en *Lepidochelys olivacea*. Intercambio de temperatura feminizante (33°C) a temperatura masculinizante (26°C).

Días de incubación	Etapas	Núm. Huevos (nidos)	Núm. Embriones sobrevivientes	Núm. Machos	Núm. Hembras	% Respuesta	Expresión Sox9 RT-PCR		
							Analizados	Positivos	Negativos
Intercambio de 33 ± 0.1 °C a 26 ± 0.2°C									
12	21	20(4)	18	18	0	100	-	-	-
15	22	20(4)	14	14	0	100	-	-	-
17	23	30(4)	18	18	0	100	-	-	-
19	24	30(4)	27	27	0	100	16	16	0
25	25	30(4)	24	4	20	83	23	4	19
27	25	15(2)	9	0	9	0	9	0	9
28	26	25(4)	24	0	24	0	24	0	24

## 6.6. Regulación negativa de la expresión de Sox9

El análisis de la expresión de *Sox9* por RT-PCR en las gónadas muestreadas en los días 6, 8, 10, 12 y 14 después del intercambio se muestra en la figura 13. El transcrito de *Sox9* se detecta en los días 6 y 8 en todos los individuos analizados, en el día 10 se detecta en el 80% de los individuos, en el día 12 en el 45% de los individuos y desaparece en el día 14.

Para correlacionar la expresión de *Sox9* con la determinación del sexo se sexaron histológicamente las gónadas del doble intercambio. Los resultados se muestran en la figura 14, en donde se observa que en contraste con el descenso gradual en el porcentaje de embriones que expresan *Sox9* en los días 10 y 12 después del intercambio, existe una respuesta todo o nada en los embriones del doble intercambio, todos los embriones que se regresaron a 26°C en los días 6 y 8 se desarrollaron como machos, mientras que los que se regresaron a 26°C en los días 10, 12 y 14 todos se desarrollaron como hembras.

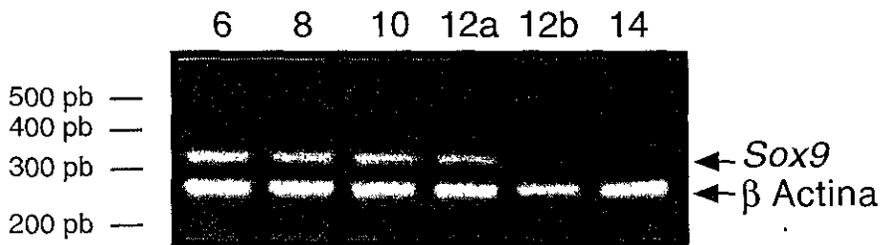


Figura 13. Electroforesis en agarosa del seguimiento de la expresión de *Sox9* por RT-PCR después del intercambio de 26°C (TM) (27 días, etapa 23) a 33°C (TF). Se observa expresión de *Sox9* (fragmento de 309 pb) en los días 6, 8 y 10 después del intercambio. Hay expresión en algunas gónadas en el día 12 (12a), mientras está ausente en los días 12 (12b) y 14. Todos los carriles muestran el fragmento de 252 pb correspondiente a la  $\beta$ -actina. Marcador de peso molecular: escalera de 100 pb.

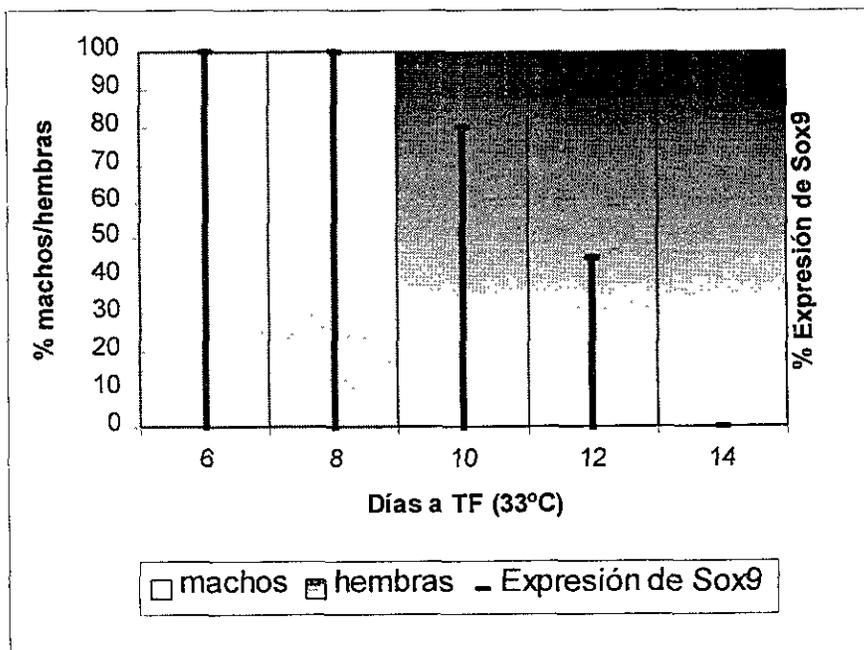


Figura 14. Correlación entre el porcentaje de expresión de Sox9 en los días 6, 8, 10, 12 y 14 después del intercambio de TM a TF (intercambio sencillo) con el sexo gonadal de los embriones que se regresaron a TM (doble intercambio) en los días 6, 8, 10, 12 y 14. El sexo histológico se definió en las etapas 29-30.

## 7. DISCUSION

En la tabla 2 y en la figura 6 se muestra la comparación del desarrollo entre los embriones incubados a 26°C (temperatura masculinizante) y los incubados a 33°C (temperatura feminizante). La velocidad de desarrollo es mayor en los incubados a 33°C, que tardan de 3 a 5 días en pasar de una etapa a otra, mientras que los incubados a 26°C tardan de 7 a 10 días en pasar de una etapa a otra, la diferencia del número de días en la misma temperatura se debe a las características de cada individuo y de cada nido.

La similitud a nivel de aminoácidos entre la secuencia de SOX9 de *Lepidochelys olivacea* y los otros vertebrados se muestra en la tabla 3. El porcentaje menor de similitud es del 67.40% con la trucha (Takamatsu *et al.*, 1997), mientras que el porcentaje mayor de similitud es del 82.95% con la tortuga *Trachemys scripta* (Spotila *et al.*, 1998) y con el cocodrilo (Western *et al.*, 1999b). Los datos muestran un alto porcentaje de similitud en la secuencia de la proteína SOX9 en todos los vertebrados comparados. Por otra parte, el gen Sox9 es parte de la familia SOX (SRY-like HMG-box gene), familia de factores de transcripción que presentan un dominio de unión a DNA, la caja HMG, característica que apoya su papel como regulador en el desarrollo embrionario.

Al comparar el patrón de expresión del gen Sox9 de la tortuga marina *L. olivacea* con el patrón de expresión en otros vertebrados también se observa gran similitud. En *L. olivacea* se observó expresión de Sox9 en las gónadas de los embriones incubados a TM en todas las etapas analizadas, mientras que en los embriones incubados a TF a partir de la etapa 25 disminuye la expresión, y no se detecta a partir de la etapa 26. La evaluación densitométrica muestra que los niveles de expresión de Sox9 a TM son similares en todas las etapas analizadas, mientras que a TF después de la etapa 25 hay un descenso súbito en los niveles de expresión.

En el ratón los transcritos se observan desde los 10.5 dpc en ambos sexos en la cresta urogenital. A los 11.5 dpc sólo hay expresión en machos. A los 12.5-13.5 dpc la expresión se localiza en las células somáticas de los cordones sexuales en los testículos. En la etapa posnatal se expresa en testículo en las células somáticas hasta la edad adulta (Morais da Silva *et al.*, 1996), el patrón de expresión *L. olivacea* es similar al de ratón, ya que se apaga en las hembras después de la determinación del sexo.

El gen *Sox9* también se ha encontrado en aves como el pollo y se ha estudiado su expresión, observando transcritos en ambos sexos en etapas tempranas (etapa 28) y a partir de la etapa 32 sólo se observó su expresión en embriones ZZ, demostrando que en aves juega un papel importante en la diferenciación testicular (Morais da Silva *et al.*, 1996). Hay que mencionar que otros estudios realizados en pollo muestran observaciones diferentes, ya que no observan expresión de *Sox9* en los embriones hembras (ZW) en ninguna de las etapas estudiadas (28-40). El mensajero de *Sox9* sólo lo detectan en los machos (Kent *et al.*, 1996; Oreal *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). Por lo general, las observaciones diferentes se relacionan con la sensibilidad de la técnica empleada para la detección de la expresión del gen.

En la tortuga *Trachemys scripta* (Spotila *et al.*, 1998) y en el cocodrilo americano *Alligator mississippiensis* (Western *et al.*, 1999b) *Sox9* es regulado positivamente en las gónadas de los embriones incubados a temperatura masculinizante (TM). Utilizando Northern blot, Spotila y cols. (1998) reportaron que la expresión de *Sox9* es más alta en las gónadas de embriones incubados a TM que los incubados a temperatura feminizante (TF) en *Trachemys scripta*. El patrón de expresión en *T. scripta*, especie que presenta TSD indica que *Sox9* participa en la diferenciación testicular, al igual que en los otros vertebrados descritos.

En el presente estudio se observó que los transcritos de *Sox9* se detectan en las gónadas de la tortuga golfinia a ambas temperaturas en las etapas 23 a 25. En la etapa 25-26 se detecta en el 25% de las gónadas a TF y en todas las gónadas TM. A partir de la etapa 26 sólo se detecta en las gónadas de los embriones

incubados a TM, mientras que ya no se detecta en los incubados a TF, estas observaciones coinciden con un estudio previo en el cual se analizó por inmunohistoquímica la presencia de la proteína SOX9 en gónadas de *L. olivacea*, incubadas tanto a TM como a TF (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999). Se observó la presencia de la proteína en ambas temperaturas en los núcleos de células somáticas en la médula de la gónada hasta la etapa 24. En la etapa 25 empezó a disminuir en las gónadas de embriones incubados a TF, ya que se encontraron sólo algunos núcleos marcados, mientras que se siguió observando en las de los embriones de TM. A partir de la etapa 26 ya no se detectó en las gónadas de TF, y siguió presente en las de TM. Todas estas observaciones nos indican que en *L. olivacea* la regulación de la expresión del gen Sox9 es a nivel transcripcional y que existe una regulación negativa en la etapa 25 en los embriones incubados a TF.

El hecho de que se presente un porcentaje mayor de detección de Sox9 en la etapa 25 en TF por la técnica de RT-PCR en comparación con la técnica de inmunohistoquímica se debe a las características intrínsecas de la técnica de RT-PCR. Esta técnica detecta niveles de expresión bajos.

Retomando los datos de semejanza en secuencia y semejanza en función de Sox9 en todos los vertebrados aún con diferente tipo de determinación sexual, se puede decir que es un gen conservado en la escala filogenética, como participante en la diferenciación testicular.

La similitud entre la secuencia parcial de DAX1 de *Lepidochelys olivacea* y los otros vertebrados es la siguiente: 67.70% de similitud con la de ratón (Swain *et al.*, 1998), 73.07 % con la de humano (Guo *et al.*, 1996), 90.13% con la de cocodrilo (Western *et al.*, 2000) y 90.32 % con la de pollo (Smith *et al.*, 1999). Ni la secuencia ni la función de *Dax1* esta conservada en la escala filogenética, por ejemplo en el ratón se ha detectado expresión desde los 11.5 dpc en machos y en hembras en el componente somático de la cresta urogenital, a los 12.5 dpc decrece dramáticamente en los cordones testiculares, en la gónada femenina se

continúa expresando en las células de la teca, sugiriendo que *Dax1* se requiere para la diferenciación ovárica pero no para la testicular (Swain *et al.*, 1996). En el pollo no se observa una diferencia en la expresión entre hembras y machos, en gónadas embrionarias de ambos sexos se detectan transcritos, puede ser que en esta especie tenga un papel en la diferenciación de ambos sexos (Smith *et al.*, 1999). En el cocodrilo se ha observado expresión de *Dax1* durante la gonadogénesis, en embriones incubados a TF y a TM, al parecer no hay diferencias entre los patrones de expresión de hembras y machos, por lo que no queda clara la función de *Dax1* en esta especie (Western *et al.*, 2000).

En el presente estudio se analizó la expresión de *Dax1* en las gónadas de embriones de *L. olivacea* incubados a TM y en embriones incubados a TF, se realizó además un análisis densitométrico para evaluar los niveles de expresión en ambas temperaturas. *Dax1* se expresa en gónadas de embriones incubados a TF en niveles semejantes en todas las etapas estudiadas (23 a 27), en embriones incubados a TM en la etapa 26 empieza a bajar el nivel de expresión. Este resultado es similar a lo observado en el cocodrilo, que presenta transcritos de *Dax1* en embriones a TF y a TM, con la diferencia que en el cocodrilo no se analizó el nivel de expresión (Western *et al.*, 2000).

La similitud entre la secuencia parcial de la aromatasa P-450 de los vertebrados comparados se muestra en la tabla 5, en el caso de *Lepidochelys olivacea* y los otros vertebrados el porcentaje menor es de: 73.30% con la de la trucha trucha (Jeyasuria *et al.*, 1994) y el mayor de 95.00% similitud con la de ratón (Terashima *et al.*, 1991). La secuencia de la aromatasa P450 es muy similar en todos los vertebrados comparados, esta enzima y su función es también muy conservada en la escala filogenética.

El patrón de expresión del gen de la aromatasa P-450 en *L. olivacea* muestra niveles de expresión semejantes en gónada en todas las etapas analizadas, estos resultados coinciden con un estudio anterior (Salame *et al.*, 1998) en el que se evaluaron las concentraciones de estradiol en las gónadas de embriones

incubados a TF y TM antes y durante el período termosensible, y no se observaron diferencias significativas al comparar las concentraciones en gónadas de embriones a TM y a TF.

En la figura 15 se correlaciona la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P-450 con el período termosensible en *L. olivacea*, es en este período termosensible en donde se determina el sexo de los embriones. Por los resultados de los experimentos de intercambio se sabe que los embriones incubados a TM se determinan en la etapas 20 a 23, en la etapa 24 ya están determinados y los embriones incubados a TF se determinan en la etapa 24-25, en la etapa 25 ya están determinados. La morfología de la gónada en etapa 24 es igual a ambas temperaturas (Figura 7), es una gónada indiferenciada, en esta etapa los embriones incubados a TM ya están determinados, es decir, que las gónadas a TM y a TF son morfológicamente iguales pero a TM ya existe una señal molecular para la diferenciación testicular.

Hay que resaltar que en esta especie el gen *Sox9* es el único que presenta una clara regulación en este período, pues se regula negativamente en las hembras en la etapa 25, mientras que en los machos su expresión continúa. El gen *Dax1* se mantiene en los mismos niveles en TF, y pudiera participar en la diferenciación ovárica. Sus niveles de expresión disminuyen a TM en la etapa 26, cuando ya el testículo está determinado. El patrón de expresión de la aromatasa P-450 en la gónada es similar en ambas temperaturas en este período lo que podría apoyar la hipótesis de un sensor extragonadal de la temperatura.

Para evaluar el papel del sistema nervioso central como un posible sensor extragonadal, como propusieron Salame y colaboradores en 1998, se analizó la expresión de los genes *Sox9* y de la aromatasa P-450 en el cerebro de embriones de *L. olivacea* incubados a TM y a TF comparando las regiones anterior y posterior.

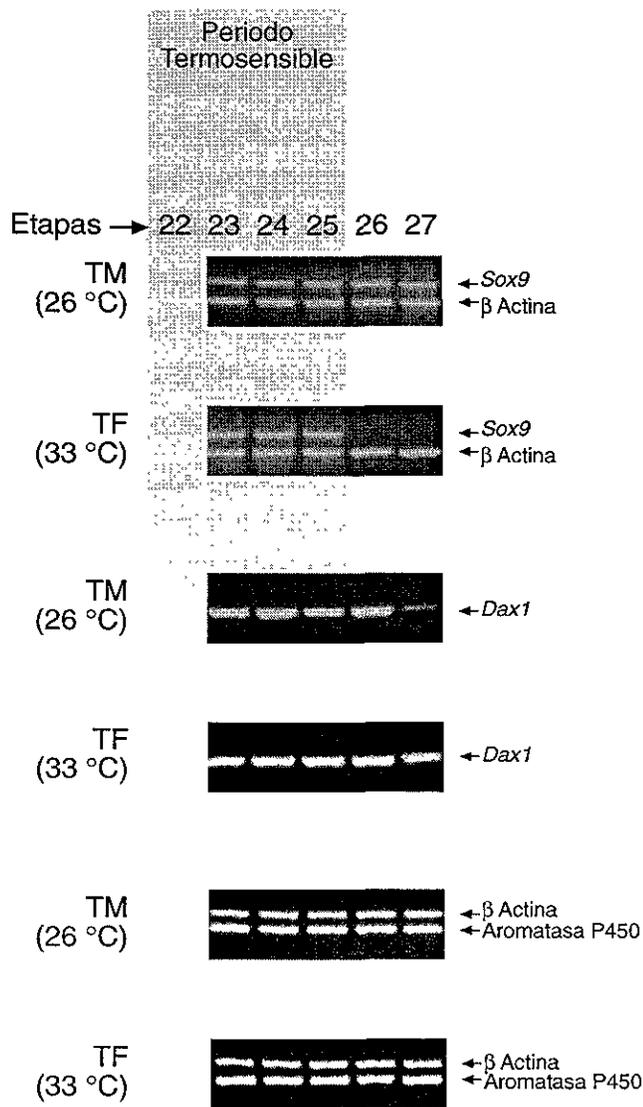


Figura 15. Correlación entre la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y de la aromatasa P450 con el período termosensible en *Lepidochelys olivacea*. **TM**: temperatura masculinizante. **TF**: temperatura feminizante. Etapas estudiadas: 23 a 27.

El RNA mensajero del gen *Sox9* está presente en ambas regiones del cerebro, en ambas temperaturas (TM y TF), en todas las etapas analizadas. El gen *Sox9* en vertebrados, no se expresa únicamente en la gónada en desarrollo, también se detecta en diferentes tejidos como cartilago (Wright *et al.*, 1995) y en cerebro (Ng *et al.*, 1997 y Takamatsu *et al.*, 1997) probablemente si sea parte de la regulación del desarrollo del cerebro pero no está relacionado con la determinación del sexo en *L. olivacea*.

En cuanto a la expresión de la aromatasa P450 en cerebro anterior y posterior no se observaron diferencias entre las dos temperaturas en todas las etapas estudiadas. Dicho resultado no coincide con los hallazgos de Salame y cols. (1998), quienes reportaron diferentes concentraciones de estradiol en cerebro posterior de *L. olivacea*. En el cerebro posterior de embriones incubados a TF se reportó una concentración de estradiol de 40 pg/mg de proteína, mientras que en embriones incubados a TM la concentración reportada fue de 5 pg/mg de proteína. Una posible explicación de esta discrepancia, es que exista una regulación de la expresión a nivel postranscripcional.

Tampoco coincide con los estudios realizados en la tortuga terrestre *Malaclemys terrapin* (Jeyasuria y Place, 1998) en donde hay una disminución de los transcritos de la aromatasa P450 en cerebros de hembras en desarrollo al momento en que aumenta la expresión en el ovario en desarrollo. Aquí, además de las diferencias entre especies, no se consideró con cuidado el período sensible a la temperatura.

Los patrones de expresión de los genes *Sox9* y de la aromatasa P-450 en el cerebro de *L. olivacea* indican que la temperatura de incubación no tiene efecto sobre la expresión de éstos en el sistema nervioso central, sugiriendo que su regulación a nivel transcripcional no participa en la determinación del sexo. Sin embargo, no puede descartarse el probable papel del sistema nervioso central en el mantenimiento de la gónada diferenciada. Estudios realizados en *L. olivacea* demostraron la presencia de fibras nerviosas en gónadas en desarrollo (Merchant

*et al.*, 1989; Gutierrez-Ospina *et al.*, 1999). Los resultados muestran la presencia de fibras nerviosas en el parénquima durante el período termosensible. Estas fibras se identificaron claramente en las etapas 24-27, etapas en las que se determina el ovario a TF. Aunque la presencia de los nervios no es suficiente para afirmar su participación en la determinación del sexo dependiente de temperatura si pudiera sugerirla.

El papel del sistema nervioso puede ser más importante en las hembras que en los machos, pues la determinación del testículo ocurre antes (etapas 20-23) que en los ovarios (etapas 24-25) (Gutierrez-Ospina *et al.*, 1999). Un estudio reciente de cultivo de órganos demostró que las gónadas aisladas en cultivo son capaces de responder al cambio de la temperatura y regulan la expresión de Sox9 de manera similar a como ocurre *in vivo* (Moreno *et al.*, 2001). Este resultado hace improbable la participación del SNC en la determinación sexual de las gónadas de *L. olivacea*.

Los resultados de los intercambios que se muestran en las tablas 6 y 7 confirman resultados previos en la misma especie (Merchant *et al.*, 1997). En la tabla 6 se muestran los resultados de los intercambios de 26°C a 33°C, se pueden reconocer tres períodos. En el primero de ellos todos los embriones respondieron al cambio de temperatura, es decir, que todos se desarrollaron como hembras, a este período se le llamó período indiferenciado (PI) y abarca de los días 19 a 24 (etapas 21 a 22). En el segundo período algunos embriones responden al cambio de temperatura, al final de la incubación se obtuvieron hembras y machos, a este período se le llamó período sensible a la temperatura (PST) y abarca de los días 27 a 34 (etapas 23 a 24). En el tercer período ningún embrión respondió al cambio, es decir, todos se desarrollaron como machos, a este período se le llamó período determinado (PD) y abarca de los días 41 en adelante (etapas 25 en adelante).

En la tabla 7 se muestran los resultados de los intercambios de 33°C a 26°C, en esta se pueden reconocer también los tres períodos. El PI abarca de los días 12 a

19 (etapas 21 a 24), todos los embriones se desarrollaron como machos. El PST abarca de los días 20 a 26 (etapas 24 a 25), algunos embriones respondieron al cambio de temperatura, al final de la incubación se obtuvieron hembras y machos. En el PD, a partir del día 27, etapa 25 ningún embrión responde al cambio, es decir, todos los embriones se desarrollaron como hembras.

El intervalo de tiempo entre el momento en que se intercambiaron los embriones y el momento en que se determinan depende de la temperatura inicial de incubación. Para los embriones que inicialmente se incubaron a temperatura feminizante de 33 °C, la ventana es de alrededor de tres días, mientras que para los embriones que se incubaron inicialmente a temperatura masculinizante de 26°C es alrededor de nueve días. Los resultados muestran que los embriones incubados a TM ya están determinados en la etapa 24, mientras que los que se incubaron a TF se determinan en la etapa 24-25, el período de determinación del sexo de la gónada por temperatura puede definirse como el periodo de tiempo requerido para establecer un proceso molecular irreversible que lleva a la gónada indiferenciada a formar un ovario o un testículo.

La expresión de *Sox9* en el momento de sexar las crías coincide en todos los casos con el sexo histológico, es decir, los machos expresan *Sox9* y las hembras no.

Por su patrón de expresión el gen *Sox9* es un marcador genético de la determinación del sexo en *L. olivacea*, por lo que puede utilizarse para evaluar los experimentos de intercambio. Para establecer el momento en que existe una regulación negativa del *Sox9* en *L. olivacea* se realizaron los experimentos de intercambio de embriones incubados a TM hasta el día 23, etapa 27 a TF se muestrearon en distintos días (6, 8, 10, 12 y 14) después del intercambio. En la figura 13 se muestran los resultados del RT-PCR. El RNA mensajero del gen *Sox9* se detecta en los días 6 y 8 en todos los individuos analizados, en el día 10 se detecta en el 80% de los individuos, en el día 12 en el 45% y desaparece en el día 14. Se observa que la expresión de *Sox9* se regula negativamente en el día 10,

cuando alcanzan la etapa 25, que en condiciones normales de incubación en la etapa 25 a 33°C se empieza a apagar la expresión de Sox9, ya que se observan los transcritos por RT-PCR (Torres-Maldonado *et al.*, 2001), y algunos núcleos marcados por ICQ (Moreno *et al.*, 1999).

Estos hallazgos coinciden con el estudio de cultivo de gónadas aisladas en esta misma especie (Moreno *et al.*, 2001), en donde se observó que las gónadas aisladas de embriones que se habían incubado a 26°C por 23 días y luego fueron cultivadas a 33°C expresaron la proteína SOX9 hasta el día 10, no detectándola en el día 13 de cultivo.

Para correlacionar la expresión de Sox9 con la determinación del sexo se asignó el sexo de las crías a través de cortes histológicos de las gónadas del doble intercambio. Los resultados se muestran en la figura 14, en donde se observa que en contraste con el descenso gradual en el porcentaje de embriones que expresan Sox9 en los días 10 y 12 después del intercambio, existe una respuesta todo o nada en los embriones del doble intercambio, todos los embriones que se regresaron a 26°C en los días 6 y 8 se desarrollaron como machos. En contraste los embriones que se regresaron a 26°C en los días 10, 12 y 14 se desarrollaron como hembras. Aunque se detectó en los días 10 y 12 un número decreciente de embriones con transcritos de Sox9, el mecanismo molecular responsable de bloquear la transcripción de este gen en todos los embriones, se establece entre los días 9 y 13 de incubación después del intercambio a TF. Queda todavía por delucidar cual es el mecanismo molecular que responde directamente a la TF, el cual al apagar al Sox9 garantiza la diferenciación del ovario y con ello la determinación del sexo en *L. olivacea*.

## 8. CONCLUSIONES

- 1.- Se sugiere que en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* el sexo masculino es el que se determina de forma pasiva, porque no hay una diferencia en la expresión de los genes estudiados proxima al período de la determinación sexual.
- 2.- En *L. olivacea* la temperatura de incubación feminizante tiene efecto sobre la expresión del gen *Sox9*, ya que se presenta una disminución en la expresión en la etapa 25 y deja de expresarse en la etapa 26.
- 3.- A temperatura masculinizante su expresión es continua por lo que se sugiere que el gen *Sox9* puede participar en la cascada de genes que regulan la diferenciación testicular en *L. olivacea*.
- 4.- La temperatura de incubación influye en la expresión del gen *Dax1*, que presenta una evidente disminución de su expresión en embriones incubados a TM en la etapa 26 y se mantiene en los embriones incubados a TF. Esto sugiere que el gen *Dax1* podría formar parte de la cascada de genes que regulan la diferenciación ovárica en *L. olivacea*.
- 5.- Al comparar la clara diferencia en las concentraciones de estradiol en cerebro posterior entre los embriones incubados a TM y TF, con la similitud en el patrón de expresión a nivel del RNA mensajero del gen de la aromatasa P-450 en todos los tejidos y etapas analizadas tanto a TM como a TF, nos indica que la regulación de este gen puede ser a nivel postranscripcional.
- 6.- La temperatura de incubación no tiene efecto sobre la expresión de los genes *Sox9* y de la aromatasa P450 en el sistema nervioso central.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Armstrong JF., Pritchard-Jones K., Bickmore WA., Hastie ND., Bard JBL. (1992). The Expression of the Wilms'tumor Gene, WT1, in the Developing Mammalian Embryo. *Mechanims of Development* 40: 85-97.
- Benabib M. y Cruz LE. (1981). Las tortugas marinas en México. *Naturaleza* 3: 157-166.
- Bern HA. (1990). The "New" Endocrinology: Its Scope and its Impact. *American Zoology* 30: 877-885.
- Bitgood MJ., ShenL., McMahon AP. (1996). Sertolli cell signalling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current Biology* 6: 298-304.
- Buckler AJ., Pelletier J., Haber DA., Glaser T., Housman DE. (1991). Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development. *Molecular and Cell Biology* 11: 1707-1712.
- Bowles J., Bullejos M., Koopman P. (2000). A Subtractive Gene Expression Screen Suggests a Role for *vanin-1* in Testis Development in Mice. *Genesis*. 27: 124-135.
- Bull JJ. (1980). Sex Determination in Reptiles. *The Quarterly Review of Biology* 55: 3-21.
- Behringer RR. (1994). The *In Vivo* Roles of Müllerian-Inhibiting Substance. *Current Topics in Developmental Biology* 29: 171-187.
- Chomczynski P.y Sacchi N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate - Phenol - Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Crews D., Bergeron J.M., Bull J.J., Flores D., Tousignant A., Skipper J.K., Wibbels T. (1994). Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles: Proximate Mechanisms, Ultimate Outcomes, and Practical Applications. *Developmental Genetics* 15: 297-312.
- Darlymple GH., Hampp JC., Wellins DJ. (1985). Male-biased Sex Ratio in a Cold Nest of a Hawksbill Sea Turtle *Eretmochelys imbricata*. *Journal of Herpetology* 19: 1219-1229.

- Desvages G., Girondot M., Pieau C. (1993). Sensitive Stages for the Effects of Temperature on Gonadal Aromatase Activity in Embryos of the Marine Turtle *Dermochelys coriacea*. *General and Comparative Endocrinology* 92: 54-61.
- Dollé P., Duboule D. (1989). Two Gene Members of the Murine *HOX-5* Complex Show Regional and Cell-Type Specific Expression in Developing Limbs and Gonads. *EMBO Journal* 8(5): 1507-1515.
- Dorizzi M., Mignot TM., Guichard A., Desvages G., Pieau C. (1991). Oestrogens in Sexual Differentiation of Gonads as a Function of Temperature in Turtles. *Differentiation* 47: 9-18.
- Erdman SE. y Burtis KC. (1993). The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO Journal* 12: 527-535.
- Fleming A., Wibbels T., Skipper JK., Crews D. (1999). Developmental Expression of Steroidogenic Factor mRNA in the Red Eared Slider Turtle, a Species with Temperature-Dependent Sex Determination. *General and Comparative Endocrinology* 116: 336-346.
- Foster JW., Dominguez-Steglich MA., Guioli S., Kwok C., Weller PA., Stevanovic M., Weisenbach J., Mansour S., Young ID., Goodfellow PN. (1994). Campomelic Dysplasia and Autosomal Sex Reversal Caused by Mutations in a SRY-related Gene. *Nature* 372: 525-530.
- Foster JW. y Marshall- Graves JA. (1994). An SRY-related Sequence on the Marsupial X Chromosome: Implications for the Evolution of the Mammalian Testis-determining Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1927-1931.
- Gahr M., Wibbels T., Crews D. (1992). Sites of Oestrogen Uptake in Embryonic *Trachemys scripta*, a Turtle with Temperature-Dependent Sex Determination. *Biology of Reproduction* 46: 458-463.
- Gessler M., König A., Bruns GAP. (1992). The Genomic Organization and Expression of the *WT1* Gene. *Genomics* 12: 807-813.
- Gutierrez-Ospina G., Jiménez-Trejo FJ., Favila R., Moreno-Mendoza N., Granados-Rojas L., Barrios FA., 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. *Journal of Comparative Neurology* 410: 90-98.

- Guo W., Lovell RS., Zhang YH., Huang B., Burris TP., Craigen WJ. (1996). *Ahch*, the mouse homologue of *DAX1*: cloning, characterization and synteny with *GyK*, the glycerol kinase locus. *Gene* 178: 31-34.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1995). Expression of *Sry*, the Mouse Sex Determining Gene. *Development* 121: 1603-1614.
- Hanley NA., Ball SG., Clement-Jones M., Hagan DM., Strachan T., Lindsay S., Robson S., Ostrer H., Parker KL., Wilson DI. (1999). Expression of Steroidogenic Factor 1 and Wilms' Tumor 1 During Early Human Gonadal Development and Sex Determination. *Mechanisms of Development* 87: 175-180.
- Harada N. (1988). Cloning of a Complete cDNA Encoding Human Aromatase: Immunochemical Identification and Sequence Analysis. *Biochem and Biophys Research Commu* 156(2): 725-732.
- Hickey GJ., Krasnow JS., Beattie WG., Richards JS. (1990). Aromatase Cytochrome P450 in Rat Ovarian Granulosa Cells Before and After Luteinization: Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent and Independent Regulation. Cloning and Sequencing of Rat Aromatase cDNA and 5' Genomic DNA. *Molecular Endocrinology* 4: 3-12.
- Hiort O. y Holterhus PM. (2000). The molecular basis of male sexual differentiation. *European Journal of Endocrinology* 142:101-110.
- Ingham PW. y Martínez-Arias A. (1992). Boundaries and fields in early embryos. *Cell* 68: 221-235.
- Ikeda Y., Shen WH., Ingraham HA., Parker KL. (1994). Developmental Expression of Mouse Steroidogenic Factor-1, an Essential Regulator of the Steroid Hydroxylases. *Molecular Endocrinology* 8: 654-662.
- Jiménez R., Sánchez A., Burgos M., Díaz de la Guardia R. (1996). Puzzling out the Genetics of Mammalian Sex Determination. *Trends in Genetics* 12(5): 166-169
- Jeyasuria P., Roosenburg W.M., Place AR. (1994). Role of P-450 Aromatase in Sex Determination of the Diamondback Terrapin, *Malaclemys terrapin*. *Journal of Experimental Zoology* 270: 95-111.
- Jeyasuria P. y Place AR. (1997). Temperature-dependent Aromatase Expression in Developing Diamondback Terrapin (*Malaclemys terrapin*) Embryos. *Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology* 61: 415-425.

- Jeyasuria P. y Place AR. (1998). Embryonic Brain-Gonadal Axis in Temperature Sex Determination of Reptiles : A Role of P-450 Aromatase (CYP19). *Journal of Experimental Zoology* 281: 428-449.
- Just W., Rau W., Vogel W., Akheverdian M., Fredga K., Marshall-Graves J.A., Lyapunova E. (1995). Absence of Sry in Species of the Vole *Ellobius*. *Nature Genetics* 11: 117-118.
- Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol* 27: 137A.
- Kathoh-Fukui Y., Tsuchiya R., Shiroishi T., Nakahara Y., Hashimoto N., Noguchi K., Higashinakagawa T. (1998) Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 393: 686-692.
- Kent J., Coriat AM., Sharpe PT., Hastie ND., van Heyningen V. (1995). The Evolution of WT1 Sequence and Expression Pattern in the Vertebrates. *Oncogene* 11: 1781-1792.
- Kent J., Wheatley SC., Andrews JE., Sinclair AH., Koopman P. (1996). A Male-Specific Role for SOX9 in Vertebrate Sex Determination. *Development* 122: 2813-2822.
- Kettlewell JR., Raymond ChS., Zarkower D. (2000). Temperature-Dependent Expression of Turtle *Dmrt1* Prior to Sexual Determination. *Genesis* 26: 174-178.
- Ko Y., Choi Y., Green ML., Simmen FA., Simmen RC. (1994). Transient Expression of the Cytochrome P450 Aromatase Gene in Elongation Porcine Blastocysts is Correlated with Uterine Insulin-like Growth Factor Levels During Peri-implantation Development. *Molecular Reproduction and Development* 37(1): 1-11.
- Koopman P, Gubbay J., Collignon J., Lovell-Bagde R. (1989). *Zfy* Gene Expression Patterns are not Compatible with a Primary Role in Mouse Sex Determination. *Nature* 342: 940-942.
- Kost TA., Theodorakis N., Hughes SH (1983). The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acid Research* 11: 8287-8301.
- Luo X., Ikeda Y., Parker KL. (1994). A Cell-Specific Nuclear Receptor is Essential for Adrenal and Gonadal Development and Sexual Differentiation. *Cell* 77: 481-490.

- McPaul MJ., Noble JF., Simpson ER., Mendelson CR., Wilson JD. (1988). The Expression of a Functional cDNA Encoding the Chicken Cytochrome P-450<sub>arom</sub> (Aromatase) that Catalyses the Formation of Estrogen from Androgen. *J Biol Chem* 263(31): 16358-16363.
- Merchant-Larios H., Villalpando Fierro I., Centeno Urruiza B. (1989). Gonadal Morphogenesis Under Controlled Temperature in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs* 3: 43-61.
- Merchant-Larios H. y Villalpando I. (1990). Effect of Temperature on Gonadal Sex Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*: An Organ Culture Study. *Journal of Experimental Zoology* 254: 327-331.
- Merchant-Larios H., Ruiz-Ramirez S., Moreno-Mendoza N., Marmolejo-Valencia A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 107: 373-385.
- Miller JD. (1985). Embriology of Marine Turtles. En: *Biology of the Reptilia*. Gans C., Billet F., Maderson PF. eds. Wiley, New York; 14: 270-328.
- Miller JD. y Limpus CJ. (1980). Incubation period and sexual differentiation in the green turtle, *Chelonia mydas*. En: *Zoological Board of Victoria*. Banks CB and Martin AA. eds. Proc Melbourne Herpetological Symp Victoria.
- Miyamoto N., Yoshida M., Kurutani S., Matsuo Y., Aizawa S (1997). Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124: 1653-1664.
- Molketin JD., Lin Q., Duncan SA., Olson EN. (1997). Requirement of the transcription factor GATA-4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes and Development* 11: 1061-1072.
- Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A., Lovell-Badge R. (1996). Sox9 Expression during Gonadal Development Implies a Conserved Role for the Gene in Testis Differentiation in Mammals and Birds. *Nature Genetics* 14: 62-68.
- Moreno-Mendoza N., Harley V.R., Merchant-Larios H. (1999). Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*, at Male or Female Promoting Temperatures. *Journal of Experimental Zoology* 284: 705-710.

- Moreno-Mendoza N., Harley V.R., Merchant-Larios H. (2001). Temperature Regulates SOX9 Expression in Cultured Gonads of *Lepidochelys olivacea*, a Species with Temperature Sex Determination. *Developmental Biology* 229: 319-326.
- Morreale S.J., Ruiz G.J., Spotila J.R. y Standora E.A. (1982). Temperature-dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles. *Science* 216: 1245-1246.
- Muscatelli F., Strom T.M., Walker A.P., Zanaria E. (1994). Mutations in the DAX-1 Gene Give Rise to Both X-linked Adrenal Hypoplasia Congenital and Hypogonadotropic Hypogonadism. *Nature* 372: 672-676.
- Nanda I., Zend-Ajusch E., Shan Z., Grutzner F., Scharf M., Burt D.W., Koehler M., Fowler V.M., Goodwin G., Schneider W.J., Mizuno S., Dechant G., Haaf T., Schmid M. (2000). Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet* 89: 67-78.
- Ng L.-J., Wheatley S., Muscat G.E.O., Conway-Campbell J., Bowles J., Wright E., Bell D.M., Tam P.P.L., Cheah K.S.E., Koopman P. (1997). *Sox9* Binds DNA, Activates Transcription, and Coexpressed with Type II Collagen During Chondrogenesis in the Mouse. *Developmental Biology* 183: 108-121.
- Ohno S. (1967). Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes and Genomes. En *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*. Ohno S de. Springer-Verlag. Berlín, pp 5-73.
- Oreal E., Pieau C., Mattel M.-G., Josso N., Picard J.Y., Carré-Eusebe D., Magre S. (1998). Early Expression of AMH in Chicken Embryonic Gonads Precedes Testicular SOX9 Expression. *Developmental Dynamics* 212: 522-532.
- Page D, Mosher R., Simpson E.M., Fisher E.M., Mardon G., Pollack A.J., McGillivray P., De la Chapelle A., Brown L.G. (1987) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.
- Palmieri S.L., Peter W., Hess H., Schöler H.R. (1994). Oct-4 Transcription Factor is Differentially Expressed in the Mouse Embryo During Establishment of the First Two Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation. *Developmental Biology* 166: 259-267.
- Parker K.L., Ikeda Y., Lou X. (1996). The Roles of Steroidogenic Factor-1 in Reproductive Function. *Steroids* 61: 161-165.

- Pask A., Toder R., Wilcox SA., Camerino G., Marshall-Graves JA. (1997). The Candidate Sex-Reversing DAX1 Gene is Autosomal in Marsupials: Implications for the Evolution of Sex Determination in Mammals. *Genomics* 41: 422-426.
- Pelletier J., Schalling M., Buckler AJ., Rogers A., Haber DA., Housman D. (1991). Expression of the Wilms' Tumor Gene WT1 in the Murine Urogenital System. *Genes & Development* 5: 1345-1356.
- Pesce M., Wang X., Wolgemuth DJ., Schöler H. (1998). Differential Expression of the Oct-4 Transcription Factor during Mouse Germ Cell Differentiation. *Mechanisms of Development* 71: 89-98.
- Pieau C. (1973). Variation de L'activité Enzymatique Delta5-3Beta-hydroxysteroide deshydrogenasique dans les Glandes Genitales d'embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chelonien), en Fonction de la Temperature d'incubation. *CR Hebd Sen Acad Sci Paris Ser D* 276: 197-200.
- Pieau C, Girondot M., Richard-Mercier N., Desvages G., Dorizzi M., Zaburski P. (1994). Temperature Sensitivity of Sexual Differentiation of Gonads in the European Pond Turtle: Hormonal Involvement. *J Exp Zool* 270: 86-94.
- Raymond ChS., Shamu CE., Shen MM., Seifert KJ., Hirsch B., Hodgkin J., Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.
- Raymond ChS., Parker DE., Kettlewell JR., Brown LG., Page DC., Kusz K., Jaruzelska J., Reinberg Y., Flejter WL., Bardwell VJ., Hirsch B., Zarkower D. (1999a) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Human Molecular Genetics* 8(6): 989-996.
- Raymond ChS., Kettlewell JR. Hirsch B., Bardwell V.J., Zarkower D. (1999b) Expression of *Dmrt1* in the Gonadal Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development. *Developmental Biology* 215: 208-220.
- Raymond ChS., Murphy M.W., O'Sullivan M.G., Bardwell V.J., Zarkower D. (2000). *Dmrt1*, a Gene Related to Worm and Fly Sexual Regulators, is Required for Mammalian Testis Differentiation. *Genes and Development* 14: 2587-2595.
- Rimblot F., Fretey J., Mrosovsky J., Lescure J., Pieau C. (1985). Sexual differentiation as a function of incubation temperature of eggs in the sea turtle *Dermochelys coriacea* (Vandell 1761). *Amphibia-Reptilia* 6: 83-92.

- Salame Méndez A. (1992). La Temperatura de Incubación como Modulador de Hormonas Esteroides Sexuales y su Relación con el Establecimiento Gonadal de la Tortuga Marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). Tesis Maestría, Facultad de Ciencias. UNAM.
- Salame-Méndez A., Ruiz S., Herrera J., Moreno-Mendoza N., Merchant-Larios H. (1998). The Diencephalon but not the Gonad Responds to Female-Promoting Temperature with Elevated Estradiol Levels in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Experimental Zoology*. 280: 304-313.
- Sambrook S., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York,
- Shawlot W and Behringer RR. (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374: 425-430.
- Schneider-Gadicke A., Beer-Romero P., Brown LG., Nussbaum R., Page DC. (1989). *ZFX* has a gene structure similar to *ZFY*, the putative human sex determinant, and scapes X inactivation. *Cell* 57: 1247-1258.
- Shen WH., Moore CCD, Ikeda Y., Parker KL., Ingraham HA. (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.
- Sinclair AH., Berta P., Palmer MS., Hawkins JR., Griffiths BL., Smith MJ, Foster JW., Frischauf AM., Lovell-Badge R., Goodfellow PN. (1990). A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif. *Nature* 346: 240-244.
- Smith CA., Smith MJ., Sinclair AH. (1999). Gene Expression During Gonadogenesis in the Chicken Embryo. *Gene* 234: 395-402.
- Spotila JR., Spotila LD., Kaufer NF. (1994a). Molecular Mechanisms of TSD in Reptiles: A Search for the Magic Bullet. *Journal of Experimental Zoology* 270: 117-127.
- Spotila LD., Kaufer NF., Theriot E., Ryan KM., Penick DN., Spotila JR. (1994b). Sequence Analysis of *ZFY* and *Sox* Genes in the Turtle *Chelydra serpentina*. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 3 (1): 1-9.
- Spotila LD., Spotila JR., Hall S. (1998). Sequence and Expression of *WT1* and *Sox9* in the Red-Eared Slider Turtle *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology* 281: 417-427.

- Swain A., Zanaria E., Hacker A., Lovell-Bagde R., Camerino G. (1996). Mouse *Dax1* Expression is Consistent with a Role in Sex Determination as Well as in Adrenal and Hypothalamus Function. *Nature Genetics* 12: 404-409.
- Swain A., Narvaez V., Burgoyne P., Camerino G. y Lovell-Bagde R. (1998). *Dax1* Antagonizes *Sry* Action in Mammalian Sex Determination. *Nature* 391: 761-767.
- Swain A. and Lovell-Bagde R. (1999). Mammalian Sex Determination: A Molecular Drama. *Genes and Development* 13 (7): 755-767.
- Takamatsu N., Kanda H., Ito M., Yamashita A., Yamashita S., Shiba T. (1997). Rainbow Trout *SOX9*: cDNA Cloning, Gene Structure and Expression. *Gene* 202: 167-170.
- Terashima M., Toda K., Kawamoto T., Kuribayashi Y., Ogawa Y., Maeda T., Shizuta Y. (1991). Isolation of a Full-Length cDNA Encoding Mouse aromatase P-450. *Arch Biochem Biophys* 285: 231-237.
- Tiersch TR., Mitchell MJ., Wachtel SS. (1991). Studies on the Phylogenetic Conservation of the *SRY* Gene. *Human Genetics* 87: 571-573.
- Torres-Maldonado L., Moreno-Mendoza N., Landa A., Merchant-Larios H. (2001). Timing of *Sox9* downregulation and female sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Experimental Zoology*. 290: 498-503.
- Tsang T, Shawlot W, Kinder SJ, Kobayashi A., Mingkwan K., Schughart K., Kania A., Jessel TM., Behringer RR., Tam PPL. (2000). *Lim1* activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Developmental Biology* 223: 77-90.
- Tsurutani N., Oda H., Nakatsuru Y., Imai Y., Zhang S., Ueno Y., Ishikawa T. (1998). cDNA Cloning and Developmental Expression of the Porcine Homologue of *WT1*. *Gene* 211: 215-220.
- Uwanogho D., Rex M., Carwright E.J. Pearl G., Scotting P.J. , Sharpe P.T. Gene Bank Accession U12533. *Gallus gallus Sox9* Transcription Factor (*Sox9*) mRNA, complete cds. 3 oct 1996.
- Vaiman D. y Pailoux E. (2000). Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends in Genetics* 16: 488-494.

- Vainio S., Heikkilä M., Kispert A., Chin N., McMahon AP. (1999). Female Development in Mammals is Regulated by Wnt-4 Signalling. *Nature* 397 (6718): 405-409.
- Vanselow J. y Furbass R. (1995). Novel Aromatase Transcripts from Bovine Placenta Contain Repeated Sequence Motifs. *Gene* 154(2): 281-286.
- Vogt R.C. y Bull J.J. (1979). Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles. *Science* 206: 1186-1188.
- Western PS., Harry JL., Marshal-Graves JA., Sinclair AH. (1999a). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: *AMH* precedes *SOX9* expression. *Developmental Dynamics* 216: 411-419.
- Western PS., Harry JL., Marshal-Graves JA., Sinclair AH. (1999b). Temperature-dependent sex determination: Upregulation of *SOX9* expression after commitment to male development. *Developmental Dynamics* 214: 171-177.
- Western PS., Harry JL., Marshal-Graves JA., Sinclair AH. (2000). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of *SF1*, *WT1* and *DAX1* during gonadogenesis. *Gene* 241: 223-232.
- Witschi E. (1959). Age of Sex Determining Mechanisms in Vertebrates. *Science* 130: 372-375.
- Wright E., Hargrave M.R., Christiensen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A., Koopman P. (1995). The *Sry*-related Gene *Sox9* is Expressed During Chondrogenesis in Mouse Embryos. *Nature Genetics* 9: 15-20.
- Yntema C.L. y Mrosovsky N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology* 60: 1012-1016.
- Zanaria E, Muscatelli F., Bardoni B., Strom TM., Guioi S., Guo W., Lalli E., Moser C., Walker AP., McCabe ERB., Meitlinger T., Monaco AP., Sassone-Corsi P., Camerino G. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for the X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372: 635-641.
- Zetterqvist H. 1956. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. PhD Thesis. Karolinska Institute, Stockholm.

## 10. ANEXOS

### 10.1 ANEXO 1

Alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SOX9, DAX1 y Aromatasa P450.

#### SOX9: ALINEACIÓN SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Trucha	MNLLDPFLKMTDEQEKCFSDAPSPMSSEDSVGSPCPSGSG
Tortuga	MNLLDPFMKMTTEEQDKCISGAPSPTMSDDSAGSPCPSGSG
Cocodrilo	MNLLDPFLKMTDEQEKCFSDAPSPMSSEDSVGSPCPSGSG
Pollo	MNLLDPFMKMTTEEQDKGLSGAPSPTMSDDSAGSPCPSGSG
Ratón	MNLLDPFMKMTDEQEKGLSGAPSPTMSEDSAGSPCPSGSG
Humano	MNLLDPFMKMTDEQEKGLSGAPSPTMSEDSAGSPCPSGSG

Trucha	SDTENTRP-SDNHLLLGPDGVLGFEFKKADQDKFPVCIRDA
Tortuga	SDTENTRP-QENTF---PKGDPDLKKESEDQDKFPVCIREA
Cocodrilo	SDTENTRP-SDNTF---PKGDPDLKKDSEEDKFPVCIREA
Pollo	SDTENTRPPQENTF---PKGDPDLKKESEDEKFPVCIREA
Ratón	SDTENTRP-QENTF---PKGEPDLKKESEEDKFPVCIREA
Humano	SDTENTRP-QENTF---PKGEPDLKKESEEDKFPVCIREA

Trucha	VSQVLKGYDWTLPMPVRLNGSSKNKPHVKRPMNAFMVWA
Tortuga	VSQVLKGYDWTLPMPVVRVNGSSKNKPHVKRPMNAFMVWA
Cocodrilo	VSQVLKGYDWTLPMPVVRVNGSSKNKPHVKRPMNAFMVWA
Pollo	VSQVLKGYDWTLPMPVVRVNGSSKNKPHVKRPMNAFMVWA
Ratón	VSQVLKGYDWTLPMPVVRVNGSSKNKPHVKRPMNAFMVMA
Humano	VSQVLKGYDWTLPMPVVRVNGSSKNKPHVKRPMNAFMVWA

Trucha	<b>QAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLLNEGEKRPFVE</b>
Tortuga	<b>QAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLLNESEKRPFVE</b>
Cocodrilo	<b>QAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLLNESEKRPFVE</b>
Pollo	<b>QAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLLNESKKRPFVE</b>
Ratón	<b>QAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLLNESEKRPFVE</b>
Humano	<b>QAARRKLADQYPHLHNAELSKTLGKLWRLLLNESEKRPFVE</b>

Trucha	<b>EAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKSVKNGQSEPEDG-EQT</b>
Tortuga	<b>EAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKSVKNGQSEQE-GSEQT</b>
Cocodrilo	<b>EAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKSVKNGQSEQEEGSEQT</b>
Pollo	<b>EAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKTVKNGQSEQEEGSEQT</b>
Ratón	<b>EAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKSVKNGQAEAEATEEQT</b>
Humano	<b>EAERLRVQHKKDHPDYKYQPRRRKSVKNGQAEAEATEEQT</b>

Trucha HISSGDIFKALQ-QADSPASSMGEVHSPSEHSGQSQGPPT  
Tortuga HISPNAIFKALQADSPQSSSGMSEVHSPGEHSGQSQGPPT  
Cocodrilo HISPNAIFKALQADSPQSSSSMSEVHSPGEHSGQSQGPPT  
Pollo HISPNAIFKALQADSPQSSSSI SEVHSPGEHSGQSQGPPT  
Ratón HISPNAIFKALQADSPHSSSGMSEVHSPGEHSGQSQGPPT  
Humano HISPNAIFKALQADSPHSSSGMSEVHSPGEHSGQSQGPPT

Trucha PPTTPKTDLA-VGKADLKREGRPLQEGTGRQLNIDFRDVD  
Tortuga PPTTPKTDVQ-PGKQDLKREGRPLQEGGRQPPHIDFRDVD  
Cocodrilo PPTTPKTDVQ-PGKQDLKREGRPLQEGGRQPPHIDFRDVD  
Pollo PPTTPQTDAAQPPGKQDLKREG-PLAEGGRQPPHIDFRDVD  
Ratón PPTTPKTDVQ-AGKVDLKREGRPLAEGGRQPP-IDFRDVD  
Humano PPTTPKTDVQ-PGKADLKREGRPLPEGGRQPP-IDFRDVD

Trucha IGELSSDVISNIEAFDVHEFDQYLPPHGHGMPGING--A  
Tortuga IGEFSSREVISNIETFDVNELDQYVPPNGHGGVPATHGQPG  
Cocodrilo IGELSSDVISNIETFDVNEFDQYLPPNGHGPVPATHGQPG  
Pollo IGELSSDVISNIETFDVNEFDQYLPPNGHGPVPATHGQVT  
Ratón IGELSSDVISNIETFDVNEFDQYLPPNGHGPVPATHGQ--  
Humano IGELSSDVISNIETFDVNEFDQYLPPNGHGPVPATHGQ--

Trucha QTSYTGSYRGISSNSIGQVGAGGHGWSKQQ-----QQP  
Tortuga QVTYSGRY-GISSTSATQGGAG-PVWMSKQ--PPOPQQQP  
Cocodrilo QVTYTGSY-GISSTAATPTGAG-HVWMSKQ---PQPQQP  
Pollo --TYSPTY-GISSASSPAGAG-HAWMAKQQ--PQPQQP  
Ratón -VTYTGSY-GISSTAPTATAG-HVWMSKQQAPPPPPQP  
Humano -VTYTGSY-GISSTAATPASAG-HVWMSKQQAPPPPPQP

Trucha ----- ISILSGGG-----T-GGEQ  
Tortuga PPAPGPAPAA-----AHTMTTVSSEQ  
Cocodrilo QPPQPPPPQAQPQA-----AHTMTPLSSEQ  
Pollo AQPPAQ-----HTLPSTEREQ  
Ratón PQAPQAPQAPPQ-QQAPPQQPQA-PQQQAHTLTLSSEP  
Humano PQAPPAPQAPPQPQAAPPQQAAPPQQPQAHTLTLSSEP

Trucha GQSQGRRTQIKTEQLSPSHYSEQQGSPPQHVT-----YG  
Tortuga GQSQQRT-HIKTEQLSPSHYSEQQHSPPQVN-----YR  
Cocodrilo GQSQQRP-HIKTEQLSPSHYSEQQHSPPQIN-----YS  
Pollo GPAQQRP-HIKTEQLSPSHNSEQQQHPEQQQQQQQLGYG  
Ratón GQSQ-RT-HIKTEQLSPSHYREQQHSPPQIS-----YS  
Humano GQSQ-RT-HIKTEQLSPSHYSEQQHSPPQIA-----YS

Trucha SFNLQHYSASSYPSITRTQYDYS DHQGGANSYYSHAGAQQ  
Tortuga SFNPQQYSSS-YPTITGWQYDYTDHQSSN-SYYSHAASQS  
Cocodrilo SFNLQHYSSS-YPTITRSQYDYTDHQSSN-SYYSHAAGQS  
Pollo SFNLQHYGFS-YPPITRSEYDYTEHQNSG-SYYSHAAGQS  
Ratón PFNLPHYRPS-YPPITRSEYDYADHQNSG-SYYSHAAGQG  
Humano PFNLPHYSFS-YPPITRSQYDYDHDQNSS-SYYSHAAGQG

Trucha	SGLYSFSSYMSPSQRPMYTP <sup><b>PIADPT</b></sup> GVPSVPTQTHSPQHW
Tortuga	TSLYSTFTYMNPAQRPMYTP <sup><b>PIADST</b></sup> GVRSIP-QTHSPQHW
Cocodrilo	TSLYSTFTYMNPTQRPMYTP <sup><b>PIADT</b></sup> SGVPSIP-QTHSPQHW
Pollo	GSLYSTFTYMNPTQRPMYTP <sup><b>PIADT</b></sup> SGVPTIP-QTHSPQHW
Ratón	SGLYSTFTYMNPAQRPMYTP <sup><b>IGDT</b></sup> SGVPSIP-QTHSPQDW
Humano	TGLYSTFTYMNPAQRPMYTP <sup><b>PIADT</b></sup> SGVPSIP-QTHSPQHW

Trucha	EQQP <sup><b>VY</b></sup> TQLSRP
Tortuga	EQ-PV <sup><b>Y</b></sup> TQLTRP
Cocodrilo	EQ-PV <sup><b>Y</b></sup> TQLTRP
Pollo	EQ-PV <sup><b>Y</b></sup> TQLTRP
Ratón	EQ-PV <sup><b>Y</b></sup> TQVTRP
Humano	EQ-PV <sup><b>Y</b></sup> TQLTRP

La región HMG (High Mobility Group), que se encuentra señalada en negritas.

Las secuencias de aminoácidos ocupadas para el diseño del par de oligonucleótidos Sot1 y Sot2 se encuentran subrayadas.

# DAX1.COMPARACION SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Cocodrilo -----  
 Pollo -----  
 Wallabi -----  
 Ratón MAGEDHPWQGSILYNLLMSAKQKHASQEEREVRLGAQCWG  
 Humano MAGQNHQWQGSILYNMLMSAKQTRAAPEAPETRLVDQCWG

Cocodrilo --CVGR--G-----RCCAGGR---RQGSIL  
 Pollo MACLER---C-----HCCADGR---RHGSIL  
 Wallabi -----  
 Ratón CACGAQPVLGGERLSGGQARSLLYRCCFCGENHPRQGGIL  
 Humano CSCGDEPGVGREGLLGGRNVALLYRCCFCGKDHPRQGSIL

Cocodrilo YHILRSEEQPR-GSGP-----GCSCGARGRGRGRS  
 Pollo YSILKSHDQAAEGPGRRGQAG---RGCSCGSQRRVALKS  
 Wallabi -----  
 Ratón YSMLTNARQPSVATQAPRARFGAPCWGCACGSAEPLVGRE  
 Humano YSMLTSAKQTYAAPKAPEATLG-PCWGCSCG-SDPGVGRA

Cocodrilo RAA-----  
 Pollo -----  
 Wallabi -----  
 Ratón GLPAGQAPSLLYRCCFCGEEHPRQGSILYSLLTSAQQTHV  
 Humano GLPGGRPVALLYRCCFCGEDHPRQGSILYSLLTSSKQTHV

Cocodrilo -----  
 Pollo -----  
 Wallabi -----  
 Ratón SREAPEAHRRGEWWQLSYCTQSVGGPEGLQSTQAMAFLYR  
 Humano APAAPEARPGGAWWDRSYFAQRPGGKEALPGGRATALLYR

Cocodrilo -----  
 Pollo -----  
 Wallabi -----  
 Ratón SYVCGEEQPQQISVASGTPVSADQTPATPQEQPRAPWWDA  
 Humano CCFCGEDHPQQGSTLYCVPTSTNQAAPEERPRAPWWDT

Cocodrilo -----AGGERAAAAVLVKTLRFVKGVPFCFQQL  
 Pollo -----PQVVCKAASAVLVKTLRFVQNVPCFQEL  
 Wallabi -----VALKSPQVACKAASAVLVKQLRFVKNVPCFQEL  
 Ratón SPGVQRLITLKDPOVVCEAASAGLLKTLRFVKYLPFCFQIL  
 Humano SSGALRPVALKSPQVVCEAASAGLLKTLRFVKYLPFCFQVL

Cocodrilo PLAEQLVLVRAAWAPLLVLGLAQDGVALPAHEAAQPSMLQ  
 Pollo PLDEQLVLVRSWAPLLVLGLAQERVHLETVESAEPSMLQ  
 Wallabi PLDEQLVLVRSWAPLLVLGLAQDRVHFETVETSEPSMLQ  
 Ratón PLDQQLVLVRSWAPLLMLELAQDHLHFEMMEIPETNTTQ  
 Humano PLDQQLVLVRNCWASLLMLELAQDRLQFETVEVSEPSMLQ

Cocodrilo RILTAR-----PPP-----PPAADL  
 Pollo RILTTRRL----GEHAPAPGRQHP-----PSAGEI  
 Wallabi RILTTRRRDPDGPEPPLSSSLSSDGVALPAHEAAEPPALTD  
 Ratón EMLTTRRQETEGPEPAEPQATEQPQMVSAAEAGHLLPAAAV  
 Humano KILTTRRRRETGGNEPLPVPTLQHHLAPPAEARKVPSASQV

Cocodrilo QALHGVLAKCWSLDIGPKEYAYLKGAVLFNPDLPGLQCTQ  
 Pollo QAIKGFLAKCWSLDISTKEYAYLKGTVLFNPDLPGLQCTQ  
 Wallabi QAIKGFLTKCWSLDISTKEYAYLKGTLLFNPG-----  
 Ratón QAIKSFFFKCWSLNIDTKEYAYLKGTVLFNPDLPGLQCVK  
 Humano QAIKCFLSKCWSLNISTKEYAYLKGTVLFNPDVPGLOCVK

Cocodrilo YIQGLQREAAQQALNEHVRLIHRGDQARFAKLNIALSLLRS  
 Pollo YIEGLQKEAQEALNEHVRLIHRGDQARFAKLNIVLSLLRS  
 Wallabi -----  
 Ratón YIEGLQWRTQQILTEHIRMMQREYQIRSAELNSALFLLRF  
 Humano YIQGLQWGTQQILSEHTRMTHQGPDRFIELNSTLFLLLRF

Cocodrilo INANVIAELFFRPIIGTVNMDDMLLEMLCAKL  
 Pollo INANVIAELFFRPIIGSVNMDDMLLEMLCAKL  
 Wallabi -----  
 Ratón INSDVVTELEFFRPIIGAVSMDDMMLEMLCAKL  
 Humano INANVIAELFFRPIIGTVSMDDMMLEMLCTKI

Las secuencias de aminoácidos ocupadas para el diseño de los oligonucleótidos Dax1-1 y Dax1-2 se encuentran subrayadas.

AROMATASA P-450: ALINEACIÓN SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Trucha -----  
 Tortuga -----  
 Pollo MIPETLNPLNYFTSLVPDLMPVATVPIIILICFLFLIWNH  
 Vaca MLEVLNPRHYNVTSMVSEVVPIASIAILLTGFLLLVWN  
 Cerdo -----  
 Rata MFLEMLNPMHYNVTIMVPETVPVSAMPLLLIMGLLLIIRN  
 Ratón MFLEMLNPMQYNVTIMVPETVTVSAMPLLLIMGLLLIWN  
 Humano MVLEMLNPIHYNITSIVPEAMPAATMPVLLLTGLFLLVWN

Trucha -----  
 Tortuga -----  
 Pollo EETSS-IPGPGYCMGIGPLISHGRFLWMGVGNACNYNKT  
 Vaca YEDTSSIPGPSYFLGIGPLISHCRFLWMGIGSACNYNKM  
 Cerdo -----  
 Rata CESSSSIPGPGYCLGIGPLISHGRFLWMGIGSACNYNKM  
 Ratón CESSSSIPGPGYCLGIGPLISHGRFLWMGIGSACNYNKM  
 Humano YEGTSSIPGPGYCMGIGPLISHGRFLWMGIGSACNYNRV

Trucha -----  
 Tortuga -----  
 Pollo YGEFVRVWISGEETFIISKSSSVFHVMMKHWNYSRFGSKL  
 Vaca YGEFMRVWVCGEETLIISKSSSMFHVMMKHSYISRFGSKL  
 Cerdo -----  
 Rata YGEFMRVWISGEETLIISKSSSMVHVMMKHSNYSRFGSKR  
 Ratón YGEFMRVWISGEETLIISKSSSMFHVMMKHSYISRFGSKR  
 Humano YGEFMRVWISGEETLIISKSSSMFHIMKHNHYSSRFGSKL

Trucha -----  
 Tortuga -----  
 Pollo GLQCIGMYENGIIFNNNPAHWKEIRPFFTKALSGPGLVRM  
 Vaca GLQFIGMHEKGIIFNNNPALWKAVRPFPTKALSGPGLVRM  
 Cerdo -----  
 Rata GLQCIGMHENGIIFNNNPSLWRTVRPFFMKALTGPGLIRM  
 Ratón GLQCIGMHENGIIFNNNPSLWRTIRPFFMKALTGPGLVRM  
 Humano GLQCIGMHEKGIIFNNNPELWKTTRPFFMKALSGPGLVRM

Trucha -----  
 Tortuga -----  
 Pollo IAICVESTIVHLDKLEEVTTTEVGNVNVNLNLMRRIMLDTSN  
 Vaca VITCADSITKHLDRLEEVVNDLGYVDVLTLMRRIMLDTSN  
 Cerdo -----  
 Rata VEVCVESIKQHLDRLGDVTDNSGYVDVTLMRHIMLDTSN  
 Ratón VEVCVESIKQHLDRLGEVTDTSYVDVTLMRHIMLDTSN  
 Humano VTVCAESLKTHLDRLEEVVTNESGYVDVLTLLRRVMLDTSN

Trucha -----  
Tortuga -----  
Pollo KLFLGVPLDESAIVLKIQNYFDAWQALLLKPDIFFKISWL  
Vaca MLFLGIPLDESAIVVKIQGYFDAWQALLLKPDIFFKISWL  
Cerdo -----  
Rata TFLFLGIPLDESSIVKKIQGYFNAWQALLIKPNIFFKISWL  
Ratón MLFLGIPLDESAIVVKIQGYFNAWQALLIKPNIFFKISWL  
Humano TFLRIPPLDESAIVVKIQGYFDAWQALLIKPDIFFKISWL

Trucha -----  
Tortuga -----  
Pollo CKKYEEAAKDLKGAMEILIEQKRQKLSTVEKLDEHMDFAS  
Vaca CRKYEKSVKDLKDAMEILIEEKRHRI STA EKLEDSIDFAT  
Cerdo -----  
Rata YRKYERSVKDLKDEIEILVEKKRQKVSSAEKLEDCMDFAT  
Ratón YRKYERSVKDLKDEIAVLVEKKRHKVSTA EKLEDCMDFAT  
Humano YK KYEKSVKDLKDAIEVLIAEKRRRISTEEKLEECMDFAT

Trucha -----  
Tortuga -----  
Pollo QLIFAQNRGDLTAENVNQCIVLEMMIAAPDTLSVTLFIMLI  
Vaca ELIFA EKRGELTRENVNQCILEMLIAAPDTMSVSVFFMLF  
Cerdo -----  
Rata DLIFA ERGDLTKENVNQCILEMLIAAPDTMSVTLYVMLL  
Ratón DLIFA ERGDLTKENVNQCILEMLIAAPDTMSVTLYFMLL  
Humano ELILA EKRGDLTRENVNQCILEMLIAAPDTMSVSLFFMLF

Trucha -----  
Tortuga -----  
Pollo LIADDPVVEEKMMREIETVMGDREVQSDMPNLKIVENFI  
Vaca LIAKHPQVEEAIIREIQTVVGERDIRIDDMQKLKVVENFI  
Cerdo -----ERDIRNDDMQKLEVVENFI  
Rata LIAEYPEVETAILKEIHTVVGDRDIRIGDVQNLKVVENFI  
Ratón LVAEYPEVEAAILKEIHTVVGDRDIKIEDIQNLKVVENFI  
Humano LIAKHPNVEEAIKEIQTVIGERDIKIDDIQKLKVMENFI

Trucha -----DDVISGYRVPKGTNIILNMGR  
Tortuga -----DDVIDGYPVKGTNIILNIGR  
Pollo YESMRYQPVVDLIMRKALQDDVIDGYPVKKGTNIILNIGR  
Vaca NESMRYQPVVDLVMRKALEDDVIDGYPVKKGTNIILNLGR  
Cerdo YESMRYQPVVDLVMRKALEDDVIDGYPVKKGTNIILNIGR  
Rata NESLRYQPVVDLVMRRALEDDVIDGYPVKKGTNIILNIGR  
Ratón NESMRYQPVVDLVMRRALEDDVIDGYPVKKGTNIILNIGR  
Humano YESMRYQPVVDLVMRKALEDDVIDGYPVKKGTNIILNIGR

Trucha	MHRSEFFLKPNEFSLDNFEKNI PNRFFQPF GSGPRSCVGK
Tortuga	MHKLEEFKPKNEFSLNF EKNVPSRYFQPF GFGPRACVGK
Pollo	MHKLEEFKPKNEFSLNF EKNVPSRYFQPF GFGPRGCVGK
Vaca	MHRLEFFKPKNEFTLENFAKNVPYRYFQPF GFGPRACAGK
Cerdo	MHRLEFFKPKNEFTLENFAKN-----
Rata	MHRLEYFKPKNEFTLENFEKNVPYRYFQPF GFGPRSCAGK
Ratón	MHRLEYFKPKNEFTLENFEKNVPYRYFQPF GFGPRGCAGK
Humano	MHRLEFFKPKNEFTLENFAKNVPYRYFQPF GFGPRGCAGK

Trucha	HIAMVMMKSI LVTLLSRYSVCPHEGLTLDCLPQTNNLSQ-
Tortuga	FIAMVMMKAI LVTLLRRYRVQTPKGRGLKNIQKSNDSLMS-
Pollo	FIAMVMMKAI LVTLLRRCRVQTMKGRGLNNIQKNNDSLMSH
Vaca	YITM <u>VMMKV</u> VLVTLLRRFHVQTLQGRCVEKMQKKNDSLH
Cerdo	-----
Rata	YIAM <u>VMMKV</u> VLVTLLKRFHVKTLOKRCIENMPKNNDSLH
Ratón	YIAM <u>VMMKV</u> VLVTLLRRFQVKTLOKRCIENIPKKNDSLH
Humano	YIAM <u>VMMKAI</u> LVTLLRRFHVKTLOGQCVESIQKIHDLSLH

Trucha	-----
Tortuga	-----
Pollo	HPIERQPLLEMVFTQEAQTRIRVTKVDQH
Vaca	HPDETRDRLEMI FT PRNSDKCLER-----
Cerdo	-----
Rata	HLDEDSPIVEIIFRHFINTPFLQCLYISL
Ratón	HPNEDRHLVEIIFSPRNSDKYLQQ-----
Humano	HPDETKNMLEMI FT PRNSDRCLEH-----

Las región subrayadas son las que se ocuparon para el diseño del par de oligonucleótidos degenerados Aro1 y Aro2.

## 10.2. ANEXO 2

Tablas y promedios de las etapas de desarrollo embrionario a TM y TF.

**Tabla 4. Incubación a 26°C (TM) , etapas de desarrollo en los distintos días de incubación en diferentes nidos muestreados.**

Días de incubación	Etapa de desarrollo embrionario en diferentes nidos										Etapa promedio
12	15	15	15								15
15	19	19									19
19	20	20-21	20								20
22	21	20-21									21
25	22-23	22-23	21-22								22
27	23	22	23	23	23	23-24	23	23	23	23	23
28	23	23	23	23	22	23					23
31	24	23-24	23-24								23-24
32	24	23-24	23-24								23-24
33	24	24-25	23-24	24							24
34	24										24
35	24	24	24								24
36	24										24
37	24	24-25									24-25
38	24	24	24-25	24-25	25						24-25
39	24-25	25	24								24-25
41	25										25
43	25	24-25	25								25
44	24-25	25	25								25
45	25										25
46	25	25									25
48	25-26										25-26
49	26	26									26
51	26										26
52	26	26									26
53	26-27										26-27
55	27	27									27
57	27	27									27
60	27										27
62	27-28	27-28									27-28

continua...

64	27-28										27-28
68	28	28									28
69	28-29										28-29
75	cría	cría									cría

**Tabla 5. Incubación a 33 °C (TF), etapas de desarrollo en los distintos días de incubación en diferentes nidos muestreados.**

Días de incubación	Etapa de desarrollo embrionario en diferentes nidos											Etapa promedio
10	20	20										20
11	21											21
13	21	21	21									21
14	21	23	23	21-22								21-22
15	23	22	23									22
16	22	22	21	22-23	22-23							22-23
18	23	23	23-24	23-24	23-24	23-24	23-24	23-24	23-24	23-24		23-24
19	24	24	24	23-24	24	24	24	24	24	24	24	24
20	24	23-24	23-24	24-25								24
21	24	24-25	24-25	24-25	24	24	24					24-25
22	24	24-25	24-25	24	24							24-25
23	24	24-25	24-25	25								24-25
24	25	24-25	24-25	24								24-25
25	25	24-25	25	25	25	25	25					25
26	25											25
27	25	25	25	25-26								25-26
30	26	26	26	26								26
31	26	26-27										26
32	27	26										26-27
35	27	27	27									27
36	27	27										27
41	28	27-28										28
43	29	29										29
44	29											29
46	cría	cría										Cría

# Timing of SOX9 Downregulation and Female Sex Determination in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*

LEDA TORRES-MALDONADO,<sup>1</sup> NORMA MORENO-MENDOZA,<sup>1</sup>  
ABRAHAM LANDA,<sup>2</sup> AND HORACIO MERCHANT-LARIOS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biológicas,  
UNAM, Mexico 04510

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina,  
UNAM, Mexico 04510

**ABSTRACT** The *SRY*-related gene *SOX9* is involved in the differentiation of Sertoli cells in male gonads of vertebrates with different kinds of sex determination. In the olive ridley *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination (TSD), the *SOX9* protein is expressed at stages 21–24 in medullary cells in gonads of embryos incubated at both male-(MPT) or female-promoting temperatures (FPT). However, at FPT the expression of *SOX9* protein decreases at stage 25 and disappears at stage 26, suggesting this as the critical period for *SOX9* regulation by temperature. Here, we used reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect *SOX9* transcripts in gonads of embryos switched from MPT to FPT at stage 23 and sampled at days 6–14. Simultaneously, groups of embryos were switched back to MPT and gonadal sex was established. *SOX9* transcripts were detected at days 6–12 of switching, when embryos reached stage 25 and were no longer detected at day 14, when the embryos were at stage 26. Embryos switched back to MPT at days 6 or 8 formed testes, whereas embryos switched at days 10 or 14 developed ovaries. Results suggest that at MPT the male sex-determining pathway that maintains *SOX9* expression in male gonads is established at stage 24. In contrast, at FPT, the female sex-determining pathway involved in downregulation of *SOX9* in female gonads occurs within two days at stage 25. *J. Exp. Zool.* 290:498–503, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Alfred Jost ('47) demonstrated that sex factors produced by fetal testes induce differentiation of male reproductive organs, whereas the female phenotype differentiates from castrated mammalian embryos. Thus, the problem of sex differentiation was essentially reduced to understanding testis differentiation. In mammals, sex determination depends on the inheritance of the Y-linked gene *SRY* (Koopman et al., '91). However, *SRY* has evolved as a male determinant coincident with the evolution of eutherian mammals and there is no evidence that it plays a role in the sex determination of other vertebrates (Graves, '95; Collignon et al., '96).

The *SRY*-related gene *Sox9* is highly conserved in vertebrate evolution (Foster et al., '94; Wagner et al., '94; Kent et al., '96; Morais da Silva et al., '96). At the onset of gonadal sex differentiation, *Sox9* is upregulated in testes but downregulated in ovaries. *Sox9* is an autosomal gene involved in the differentiation of Sertoli cells in mouse and chicken, two species with different genetic mecha-

nisms of sex determination (Kent et al., '96; Morais da Silva et al., '96). Studies in some species of reptiles that lack sex chromosomes have shown that temperature acts as an epigenetic factor for sex determination (see Pieau, '96 and Lance, '97, for recent reviews). It was found that *SOX9* expression is upregulated in male gonads in species with temperature sex determination (TSD), including the fresh-water turtle *Trachemys scripta* (Spotila et al., '98), the American alligator *Alligator mississippiensis* (Western et al., '99), and the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza et al., '99). In *A. mississippiensis*, *Sox9* is expressed only in gonads of embryos incubated at MPT (33°C), whereas at FPT (30°C or 34.5°C) (*FPT*) *SOX9* is expressed at basal levels at all

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Grant number: 26697N.

\*Correspondence to: Horacio Merchant-Larios, Instituto de Investigaciones Biológicas, UNAM, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F., Mexico 04510  
E-mail: merchant@servidor.unam.mx

Received 19 September 2000. Accepted 30 April 2001

stages (Western et al., '99). Since upregulation of *Sox9* occurs after sex determination and coincides with the histological differentiation of testis, Western et al. ('99) concluded that this gene does not operate during temperature sex determination. In contrast, in *L. olivacea*, immunohistochemical detection of the SOX9 protein is positive in undifferentiated gonads of embryos at both MPT (26°C) and FPT (33°C) at stages 21–25. At the onset of gonadal differentiation, SOX9 was negative in female gonads and remained positive in male gonads (Moreno-Mendoza et al., '99). Unlike the American alligator, the olive ridley SOX9 features regulation during the temperature-sensitive period (TSP). Because of the different range of temperatures for sex determination, it is reasonable to assume that the *Sox9* gene may be regulated by different mechanisms in each species.

In the present study, we undertook a time course study of the expression of the *Sox9* gene in gonads of the olive ridley *L. olivacea* incubated at MPT or FPT using RT-PCR. To investigate the time period for *Sox9* downregulation and its correlation with sex determination, embryos were switched from MPT to FPT at stage 23 and their gonads were sampled for *Sox9* expression at days 6–14.

## MATERIALS AND METHODS

### Embryos

Eggs of *Lepidochelys olivacea* were obtained from La Escobilla beach on the Pacific Coast of Oaxaca, Mexico (96°27'16"W, 15°40'36"N) and transported to Mexico City. The eggs were divided into two batches and incubated at 26 ± 0.2°C or 33 ± 0.1°C, the MPT or FPT, respectively. The experiments were performed using eggs from six clutches. The developmental stages were determined following some of Miller's criteria ('85) as total length, head length and width, straight carapace length and width, bridge length and plastron length, gradual pigmentation, and definition of the scales. Embryos were sampled at stages 21–26.

### RNA isolation and RT-PCR

Gonads were microdissected from embryos incubated at MPT or FPT, immediately frozen in dry ice, and stored at -70°C. We examined one gonad per embryo. The number of gonads per group at different stages (St) is indicated in brackets. Group MPT (26°C): St 21/22 (4), St 23/24 (9), St 24 (11), St 24/25 (5), St 25 (17), St 26 (12), St

27 (11); group FPT (33°C): St 21/22 (2), St 23/24 (8), St 24 (20), St 24/25 (10), St 25 (18), St 26 (9), St 27 (11). Total RNA was isolated from tissue samples using Trizol reagent (Gibco-BRL) according to Chomczynski and Sacchi ('87). A few modifications were introduced to improve the RNA isolation from *L. olivacea*. The times of reaction and the quantities of reagents were increased to twice the values recommended by the manufacturer. At all stages the tissue samples were processed individually. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplifications were performed using primers designed on the basis of known sequences for the SOX9 gene in other vertebrates. The sequences used were those for trout (Takamatsu et al., '97), chicken (Uwanogho et al., '96), human (Foster et al., '94), mouse (Wright et al., '95), red-eared slider turtle (Spotila et al., '98), and alligator (Western et al., '99). The primers designed and used for SOX9 amplification were the SOT (SOX9 of sea Turtle) pair: SOT1: AGC AGA CCC ACA TCT CC/TC C and SOT2: GGG A/C/T/GGG CAG GTA C/TTG GTC. For expression control, amplification of  $\beta$ -actin mRNA was performed using the following primers: Actin1: TGG ATG ATG ATA TTG CTG C and Actin2: ATC TTC TCC ATA TCA TCC CA (Kost et al., '83). The amplification reactions were carried out by means of the One Step RT-PCR kit (Gibco-BRL), using 1  $\mu$ g of total RNA per sample, 1 $\times$  buffer reaction mix containing 0.2 mM of each dNTP, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> and 250 ng of actin, or 300 ng of SOT9 primers in separate tubes; the enzyme used was a mix of Superscript II RT and Taq DNA polymerase (Gibco-BRL). The amplification program was 50°C for 30 min (once); 94°C/5 min (once), 94°C/30 sec, 50°C/60 sec, 72°C/60 sec (36 times), 72°C/10 min (once). A total of 20 separate experiments were performed. Two controls were used for each RT-PCR experiment, a water control (no RNA added) and a free RT control (only Taq DNA polymerase added), in order to confirm that the amplified products were not genomic DNA in origin. The RT-PCR reactions were run in a PTC-100 MJ Research thermal cycler and in a 9700 geneamp PCR system (Perkin Elmer). Products from parallel reactions were mixed and analyzed by electrophoresis on a 2.5% agarose gel, with 0.1  $\mu$ g/ml ethidium bromide (Sambrook et al., '89). Gels were visualized by ultraviolet transillumination and photographed with a DS-34 polaroid camera. The weight of the amplified products was 310 bp for SOX9 and 291 bp for  $\beta$ -actin. The identity of the PCR fragments for *L. olivacea* was con-

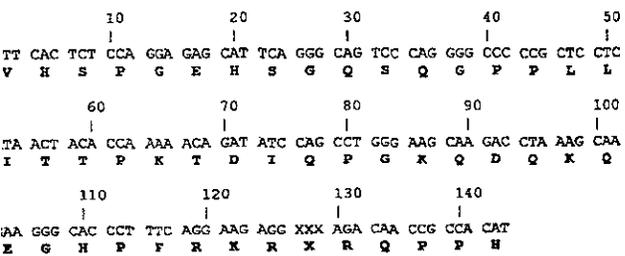


Fig. 1. Partial nucleotide sequence of the PCR fragment obtained for olive ridley (*Lepidochelys olivacea*). The corresponding amino acid sequence is shown in bold capital letters.

confirmed by automatic sequencing using an Applied Biosystem sequencer, based on fluorescent PCR sequencing (Perkin Elmer).

### Switching experiments

A total of 100 embryos were switched at stage 23 from MPT to FPT. They were distributed in five groups of 20 embryos. From each group, the gonads of 10 embryos were analyzed for *Sox9* expression at days 6, 8, 10, 12, and 14 after being switched from MPT to FPT (single switch). The other 10 embryos of each group were switched back to MPT (double switch) at days 6, 8, 10, 12, and 14, and sex was determined at stages 29–30.

## RESULTS

The *SOX9* fragment amplified with the pair of oligonucleotides designed for the present study was identified by sequencing as shown in Figs. 1 and 2 (gene bank accession No. AF335422). The region of oligonucleotide design was a PQS domain, placed between the HMG box and the carboxyl terminal, exclusive of *SOX9*. We did not select the HMG box region in order to avoid cross-reaction with other members of the *SOX* family. We compared the protein sequence obtained from this fragment with sequences reported in other vertebrates.

### Time course expression of *SOX9* at MPT or FPT

Fig. 3 summarizes the detection of *SOX9* transcripts in gonads of embryos incubated at MPT

(26°C) or at FPT (33°C). Between stages 23 and 25, *SOX9* expression was found in all samples from embryos incubated at both temperatures. However, while at stage 26 and onwards *SOX9* transcripts remained present in gonads of embryos incubated at MPT, they disappeared in gonads of embryos incubated at FPT. The time period to pass from one stage to the next (the developing rate) was shorter at FPT than at MPT. Embryos at FPT took around 4 to 5 days; at MPT, they required 9 or 10 days.

### Correlation of *SOX9* downregulation and female sex determination

Knowing that almost all embryos incubated at MPT become feminized when switched to FPT at day 27 (stage 23) (Merchant-Larios et al. '97), in the current work we chose to analyze *SOX9* expression at different days with RT-PCR using this model. Fig. 4 shows an example of the time course study in pairs of gonads processed at days 6 to 14 after switching the embryos at stage 23 from MPT to FPT. Although *SOX9* transcripts were detected at days 6 to 12, they disappeared at day 14. However, the percentage of individual embryos with gonads expressing *SOX9* decreased at days 10 and 12. Fig. 5 summarizes the results obtained in all the sampled gonads in the time course experiment; we analyzed seven individuals for each day of sample. While at days 6 and 8 *SOX9* transcripts were detected in all sampled gonads, at days 10, 12, and 14 they were found in 80%, 45%, and 0%, respectively. To correlate the time course expression of *SOX9* with sex determination, groups of 10 eggs of the same clutch were switched back to MPT at days 6, 8, 10, 12, and 14 and their gonads were histologically sexed at stages 29–30. Results are shown in Fig. 5. In contrast to the gradually decreasing percentage of embryos expressing *SOX9* at days 10 and 12, there was an all-or-none response in the double switched embryos. All embryos switched back to MPT at days 6 and 8 developed as males, whereas at days 10 to 14 all developed as females. It is worthwhile to emphasize that the embryos were at stages 24,

Trout	VHSPSEHSGSQGPPTPPTTPKTDLA-VGKADLKREGRPLQEGTGRQLN-
Chicken	VHSPGEHSGSQGPPTPPTTPQTDAAQPGKQDLKREG-FLAEG-GRQPPH
Mouse	VHSPGEHSGSQGPPTPPTTPKTDVQ-AGKVDLKREGRPLAEG-GRQPP-
Human	VHSPGEHSGSQGPPTPPTTPKTDVQ-PGKADLKREGRPLPEG-GRQPP-
Red slider	VHSPGEHSGSQGPPTPPTTPKTDVQ-PGKQDLKREGRPLQEG-GRQPPH
Alligator	VHSPGEHSGSQGPPTPPTTPKTDVQ-PGKQDLKREGRPLQEG-GRQPPH
Olive ridley	VHSPGEHSGSQGPPLLIITPKTDIQ-PGKQDQKQEGHPFRKR--RQPPH

Fig. 2. Amino acid sequence alignment of *SOX9* partial sequence from trout, chicken, mouse, human, red slider, alligator, and olive ridley. Identical aminoacids in all sequences are in bold.

gator, and olive ridley. Identical aminoacids in all sequences are in bold.

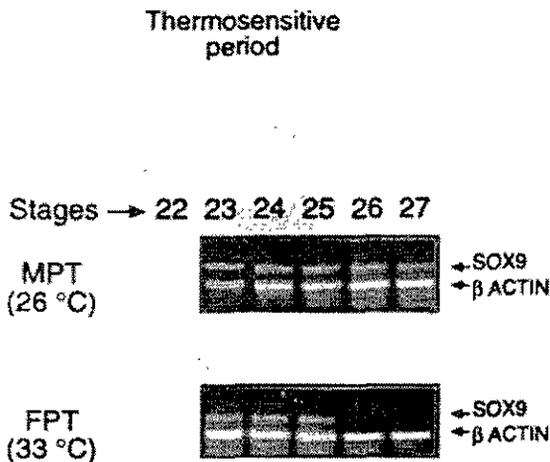


Fig. 3. The thermosensitive period (TSP) in the olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) is overlaid on the SOX9 RT-PCR pattern of expression. The TSP covers stages 22 to 25. At MPT (26°C) the SOX9 expression is present at all stages (310-bp fragment). At FPT (33°C) the SOX9 expression is observed at stages 23, 24, and 25 (310-bp fragment), and it is absent at stages 26 and 27. In both MPT and FPT, in all stages  $\beta$ -actin fragment (291-bp fragment) is present and provides a positive control for the RT-PCR.

4+, 25, 25+, and 26 when switched at days 6, 8, 10, 12, and 14, respectively.

## DISCUSSION

The similarity at amino acid level between *L. olivacea* and other vertebrates is as follows: trout 77.4%, chicken 77.5%, mouse 73.5%, human 75.5%, red-eared slider 79.6%, and alligator 79.6%. The similarity at nucleotide level between *L. olivacea* and other vertebrates is as follows: trout 71.2%, chicken 71.4%, mouse 70.7%, human 72.8%, red-eared slider 85.0%, and alligator 78.0%. Besides, the similarity between species, the presence of  $\beta$ -actin as an ubiquitous control of expression, and the lack of SOX9 mRNA or  $\beta$ -actin amplification in controls with no reverse transcriptase added strongly supports our RT-PCR re-

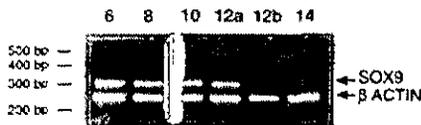


Fig. 4. Time course study of expression of SOX9 after switching. The SOX9 expression is present (310-bp fragment) at days 6, 8, and 10 days after switch, present in some gonads at day 12 (12a), and absent in days 12 (12b) and 14. In all days the  $\beta$ -actin fragment (291-bp fragment) is present and provides a positive control for the RT-PCR.

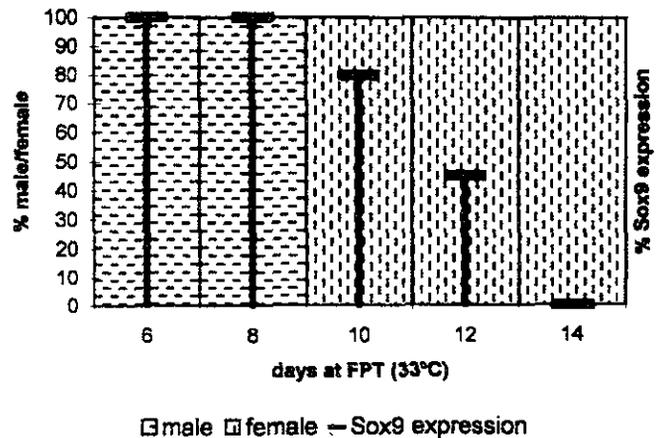


Fig. 5. Comparison of the percentage of embryos expressing Sox9 at days 6, 8, 10, 12, and 14 after switching from MPT to FPT (single switch) with the gonadal sex of embryos switched back to MPT (double switch) at days 6, 8, 10, 12, and 14. Histological sex was determined at stages 29–30.

sults. It is known that different techniques for mRNA detection can lead to different interpretations. Thus, in chicken embryos, one group using in situ hybridization (Morais da Silva et al., '96) reported SOX9 expression in undifferentiated gonads of genetic females, whereas other groups found no expression of this gene at any stage (Kent et al., '96; Oreal et al., '98).

The molecular mechanism for temperature sex determination remains unknown. In the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta* (Spotila et al., '98), and in the American alligator, *Alligator mississippiensis* (Western et al., '99), SOX9 is upregulated in gonads of embryos incubated at MPT. Using Northern blot, Spotila et al. ('98) reported that SOX9 expression is higher in gonads at MPT than at FPT in *T. scripta*, whereas Western et al. ('99) used RT-PCR and in situ hybridization and found that SOX9 is expressed only in gonads of embryos incubated at MPT. In contrast to the American alligator study, we find that SOX9 transcripts are detected in gonads of the olive ridley at both temperatures up to stage 25. Thereafter, from stage 26 onwards, SOX9 transcripts are undetectable in female gonads but remain clearly detectable in testis.

At first sight, current results indicate that there is no clear correlation between SOX9 down-regulation and female sex determination. Although at days 6 and 8 all embryos switched back to MPT developed as males in correlation with the percentage of embryos expressing SOX9 at the time of switching, in contrast, all embryos de-

veloped as females at days 10 and 12 when still high percentage showed SOX9 transcripts in their gonads. An explanation for this apparent lack of correlation is the capacity of the RT-PCR technique to amplify low amounts of SOX9 transcripts present in gonads at days 10 and 12. Immunohistochemical detection of SOX9 protein showed that at FPT the gonads have a lower number of positive cells at stage 25 than at stage 24 (Moreno-Mendoza et al., '99). Thus, although the SOX9 transcripts present in these cells were amplified by RT-PCR in several gonads at days 10 and 12, when the embryos were at stage 25, immunohistochemical results showed that SOX9 was downregulated in most cells at this time (results not shown).

In *L. olivacea*, single temperature switch experiments showed that the stage for sex commitment depends on the initial temperature. At MPT, the male sex-determining pathway is established at stage 24–25, whereas at FPT, the female sex-determining pathway is set at stages 25–26 (Merchant-Larios et al., '97). In the current work, the slowly developing embryos incubated at MPT accelerated their developing rate when switched to FPT. First, they passed from stage 23 to stage 24, 6 days after switching. Thereafter, they reached stage 25 around day 10, and, and at day 14, they were near stage 26.

Using SOX9 expression as reference for sex determination in *L. olivacea*, the present results suggest that at MPT the male sex-determining pathway that maintains SOX9 expression in the gonads occurs at stage 24+. On the other hand, in gonads of embryos exposed to FPT at stage 25, downregulation of SOX9 occurs within two days and the female sex-determining pathway is established.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Javier Vasconcelos and Martha Harshush from the Centro Mexicano de la Tortuga, Mazunte, Oaxaca, for his enthusiastic support and facilities to collect the eggs under permit by SEMARNAP No. 230998-213-03. The technical assistance of Alejandro Marmolejo-Valencia and Jose Guadalupe Baltazar is gratefully acknowledged. We are indebted to Dr. Cinna Lomnitz for kindly reviewing the manuscript and to Ada Torres for the artwork.

### LITERATURE CITED

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159

- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Dominic N, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1996. A comparison of the properties of *Sox-3* with *Sry* and two related genes, *Sox-1* and *Sox-2*. *Development* 122:509–520.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weisenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in a *SRY*-related gene. *Nature* 372:525–530.
- Graves JAM. 1995. The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex-determining genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:305–311.
- Jost A. 1947. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Micr Morph Exp* 36:271–315.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair A, Koopman P. 1996. A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813–2822.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *SRY*. *Nature* 351:117–121.
- Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH. 1983. The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucl Acid Res* 11:8287–8301.
- Lance VA. 1997. Sex determination in reptiles: an update. *Am Zool* 37:504–513.
- Merchant-Larios H, Ruiz-Ramírez S, Moreno-Mendoza N, Marmolejo-Valencia A. 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Comp Endocrinol* 107:373–385.
- Miller JD. 1985. Embryology of marine turtles. In: Gans C, Billet F, Maderson PF, editors. *Biology of the Reptilia*. New York: Wiley-Liss, p 270–328.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet* 14:62–67.
- Moreno-Mendoza N, Harley VR, Merchant-Larios H. 1999. Differential expression of *SOX9* in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *J Exp Zool* 284:705–710.
- Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D, Magre S. 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular *SOX9* expression. *Dev Dyn* 212:522–532.
- Pieau C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18:19–26.
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Spotila LD, Spotila JR, Hall SH. 1998. Sequence and expression analysis of *WT1* and *Sox9* in the Red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J Exp Zool* 281:417–427.
- Takamatsu N, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S, Shiba T. 1997. Rainbow trout *SOX9*: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene* 202:167–170.
- Uwanogho D, Rex M, Carwright EJ, Pearl G, Scotting PJ, Sharpe PT. Gene Bank Accession U12533. *Gallus gallus Sox9 Transcription Factor (Sox9) mRNA*, complete cds. 3 Oct 1996.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Heid M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Huster E, Wolf U,

Tommerup N, Schempp W, Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*. *Cell* 79:1111-1120.

Stearns P, Harry JL, Graves JAM, Sinclair AW. 1999. Temperature-dependent sex determination: upregulation of

*SOX9* expression after commitment to male development. *Dev Dyn* 214:171-177.

Wright E, Hargrave MR, Christensen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. 1995. The *Sry*-related gene *Sox9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genet* 9:15-20.