



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Método de sexado de tortugas recién nacidas usando  
muestras de caparazón de *Lepidochelys olivacea***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:  
FANIA SHECCID SANTIAGO OSORIO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. DIEGO CLAUDIO CORTEZ QUEZADA**



**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DATOS DEL JURADO

1. Datos del Alumno  
Santiago  
Osorio  
Fania Sheccid  
5635308072  
[Sheccid99@ciencias.unam.mx](mailto:Sheccid99@ciencias.unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología
2. Datos del tutor  
Dr.  
Cortez  
Quezada  
Diego Claudio
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Merchán  
Larios  
Horacio
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Furlan  
Magaril  
Mayra
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Becerra  
Bracho  
Arturo Carlos II
6. Datos del sinodal 4  
Dr.  
Acosta  
Uribe  
Armando Simeón

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de seguir con mi formación académica dentro de una comunidad maravillosa de estudiantes y profesores, y por el apoyo para mis estudios.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias, por su dedicación y entusiasmo por la ciencia y la enseñanza de esta. Gracias por comunicarme su conocimiento tanto como pudieron a pesar de las adversidades que atravesamos como lo fue la pandemia del 2020 y el sismo del 2017. Gracias también por su paciencia a la hora de explicarnos los complejos procesos biológicos, químicos, físicos, etc. Y gracias por haber sido parte de mi crecimiento como estudiante de biología.

A el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, por haberme recibido en sus instalaciones y por el apoyo de su personal y sus investigadores. Así también, gracias por la beca impartida durante la realización de este proyecto.

A mis profesoras y profesores del taller de “Ciencias Genómicas: de moléculas a ecosistemas”, por habernos compartido, con mucho entusiasmo, un poco sobre su área de investigación y habernos adentrado a una gran rama de la biología que nos dejó encantados y con ganas de aprender más.

A mis sinodales, el Dr. Horacio Merchán, la Dra. Mayra Furlan, el Dr. Arturo Becerra y, el Dr. Armando Acosta, por su tiempo invertido en la lectura de este proyecto y en las aclaraciones de dudas y, por su retroalimentación y correcciones que contribuyeron a la mejora de este proyecto.

Un agradecimiento especial al Dr. Diego Cortez, mi tutor de tesis, a quién admiro muchísimo. Gracias por haberme impulsado a desarrollar este innovador proyecto que, sin duda, marca un antes para los futuros estudios en tortugas marinas. Gracias por motivarme, alentarme y apoyarme en todo este proceso. Y gracias por su sabiduría, experiencia, su orientación y sus enseñanzas. Gracias por todo. Me inspira mucho. Es un gran científico.

Y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con números de proyectos IN201218 e IN207319. Así también, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Fondo FORDECYT-PRONACES/137721/2020. Gracias a su apoyo fue posible realizar este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, por todo su amor y cariño, por creer en mí y apoyarme en todo aspecto en que se le puede ayudar a un hijo para seguir sus sueños. Gracias por estar para mí desde siempre, por alentarme y ayudarme a levantar en mis momentos más difíciles y caóticos. Así también, gracias por la educación que me brindaron y los valores que me inculcaron, y por hacer de mí una mejor persona. Los amo demasiado.

A mi querido hermano, por todo su gran amor, por inspirarme a hacer lo que realmente me gusta, la ciencia, y por apoyarme en todo este proceso que no ha sido nada fácil. Gracias por proteger, mimar, consentir y hacer reír a tu hermanita gruñona. Te amo muchísimo.

A mi querida y hermosa prima, por ser como una hermana para mí, mi compañera eterna de aventuras, mi confidente no.1, mi mejor amiga, y mi gran apoyo. Gracias por acompañarme desde el inicio en esta gran aventura de mi vida. Gracias por las risas y las lágrimas.

A los covichos, Jorge, Andrea, Ulises, Paty, Toño y los Salmoran, por su amistad desde el 2014. Ya casi 10 años de risas interminables y alocadas aventuras. Gracias por ser parte de mi vida, por su vibra tan peculiar, por sacarme de mi zona de confort, por no juzgarme, y poder ser yo misma con toda libertad. Gracias por su apoyo y sus consejos. Ha sido maravilloso verlos crecer y desempañarse en lo que más les gusta. ¡Que la amistad perduró por siempre!

A mi querida amiga Silvia, por estar para mí desde los viejos tiempos en que solíamos ir a la FES. Tu calidez, tu empatía, tu amistad, tu compromiso, y tu energía tan bonita hacen de esta, una relación maravillosa. Gracias por todo tu apoyo, tus porras y por motivarme a seguir cuando más lo necesitaba. Gracias por acompañarme en los momentos más felices y tristes.

A mi querida amiga Diana, por tu amistad desde comienzos de la carrera, por tu compañía y apoyo en las noches de desvelo, en las complejas clases del taller, y en los seminarios. Juntas perseguimos nuestros viejos sueños. Gracias también por escucharme, aconsejarme, apoyarme, alentarme y ser empática en todo momento. Te admiro mucho como bióloga y persona.

A mis hermosas biologuitas, Karen, Keren, y Ale, y a la godín más preciosa, Sandy, por su amistad tan hermosa. Niñas, de verdad las amo muchísimo. Siempre tendrán un lugar muy especial en mi corazoncito. Con ustedes viví algunas de las experiencias más extraordinarias de mi vida. Aprendimos a hacer ciencia, nos desvelamos juntas, aguantamos todo lo difícil de la carrera, nos dimos nuestras escapadas, bailamos y cantamos hasta no poder más, pasamos de todo en las

prácticas, nos apoyamos y motivamos, y nos dimos mucho cariño, amor y risas. Sin ustedes, mi vida en la facultad no hubiera sido la misma. Gracias también por apoyarme, escucharme, y estar para mí en las situaciones más desafiantes y tristes.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias, por acompañarme en este pequeño viaje de aprendizaje, por compartir sus sueños conmigo y motivarme aún más a realizar lo que me gusta. Es realmente bonito estar reunido con personas que aman la ciencia y que se entusiasman por hablar de ella.

A mi querida amiga y maestra, Diana Ordaz, por su dedicación, apoyo y enseñanza del inglés. Muchas gracias por ser tan paciente, comprensiva y amable conmigo. Eres la mejor maestra de inglés para mí. Gracias también, por ayudarme con los engorrosos trámites y, por alentarme y motivarme a seguir. Y, por último, gracias por tu amistad, eres una persona muy, muy linda y cariñosa.

A mis compañeros y amigos del Centro de Ciencias Genómicas, por ayudarme en mi proyecto, por darme muy buenos consejos, y hacer más amena y divertida mi estancia allá. ¡Qué científicos tan increíbles he conocido! También quiero hacer un agradecimiento especial a Andrea Fernández Duque, por su amistad y la hermosa ilustración que realizó para este proyecto.

A mi gran amiga Abi, por su bonita amistad. Eres una persona súper linda, cálida, alegre, tan única, extravagante y divertida. Muchas gracias por apoyarme en este proyecto, por llenar de alegría las instalaciones del lab y de cualquier lugar al que fuéramos. Gracias también, por escucharme, motivarme, estar para mí, compartir tus sueños conmigo y acompañarme en todo este proceso. Te quiero muchísimo, hermosa. Eres una bióloga excepcional.

Un agradecimiento muy especial a los biólogos, Maye y Armando, por ser mis amigos, maestros y segundos padres. Estoy eterna y enormemente agradecida por todo lo que han hecho por mí, el apoyo incondicional que me han dado, su amistad invaluable tan sincera y llena de cariño. Gracias por haberme enseñado a hacer ciencia en el lab, por sus consejos, regaños, su compañía, por cuidarme, abrirme las puertas de su hogar tan cálido, y ser tan buenas personas conmigo. Gracias también, por motivarme y alentarme a perseguir mis sueños, por creer en mí y en todo lo que puedo dar como bióloga. Gracias, Maye, por enseñarme a pipetear correctamente, a ser organizada en el laboratorio, a planear con anticipación mis protocolos, a realizar PCRs y un sin fin de cosas. Eres la chica más linda que he conocido, una bióloga de lo más responsable, dedicada y súper inteligente. Tú creatividad me ha sorprendido bastante, así como también tu manera de manejar las situaciones desafiantes. Eres mi modelo a seguir, una bióloga de admirar. Tu amistad, por otro lado, es muy valiosa para mí. Te agradezco las carcajadas, los bailes, las partidas de juegos, las comidas tan deliciosas que preparabas, los buenos chismecitos, las noches de sailor moon, las pláticas profundas y muchas cosas más. Eres un encanto. Y, por último, muchas

gracias, Armando, por enseñarme a hacer electroforesis, por comunicarme con tanto entusiasmo tu conocimiento sobre datos muy peculiares de biología, por darme un buen contexto de muchas cosas que no sabía por qué se hacían, por las entretenidas platicas motivacionales que me dabas, por los riquísimos platillos que preparabas, por las noches de series, pero, sobre todo, por creer en mí y ayudarme a devolver esa confianza. Te admiro enormemente como biólogo y persona. También eres mi modelo a seguir.

Y a las personas que no están mencionadas en este apartado, pero que me alentaron y motivaron a seguir, les agradezco también.



# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	9
<b>1. Introducción</b> .....	11
1.1. Determinación del sexo.....	11
1.1.1. Determinación del sexo genotípica (GSD).....	12
1.1.2. Determinación del sexo ambiental (ESD).....	14
1.1.2.1. Determinación del sexo por temperatura (TSD) .....	15
1.1.2.1.1. Patrones de la determinación del sexo por temperatura .....	16
1.1.2.1.2. Rango de transición de temperaturas y temperatura pivote .....	17
1.1.2.1.3. Mecanismo molecular de la determinación del sexo por temperatura.....	18
1.1.2.1.4. Determinación del sexo por temperatura en tortugas marinas....	20
1.2. Aspectos biológicos de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	20
1.2.1. Descripción de la especie .....	20
1.2.2. Distribución de la especie .....	21
1.2.3. Reproducción y comportamientos de anidación .....	22
1.2.4. Período termosensible (TSP) y determinación del sexo por temperatura de <i>L. olivacea</i> .....	24
1.3. El cambio climático influye en la proporción de sexos de crías de tortuga marina.....	27
1.4. Métodos de sexado de crías de tortuga marina .....	30
1.4.1. Métodos indirectos de sexado .....	30
1.4.2. Métodos directos de sexado.....	31
1.5. <i>Splicing</i> alternativo dependiente de la temperatura en <i>JARID2</i> y su función como represor transcripcional.....	36
<b>2. Justificación</b> .....	39
<b>3. Objetivo General</b> .....	40
3.1. Objetivos Específicos.....	40
<b>4. Hipótesis</b> .....	40
<b>5. Metodología</b> .....	41
5.1. Material biológico .....	41
5.2. Extracción de RNA de caparazón de crías de <i>L. olivacea</i> .....	41
5.3. Extracción de DNA genómico proveniente de tejidos embrionarios de <i>L. olivacea</i> .....	43

5.4. Verificación de la integridad del DNA genómico por electroforesis en geles de agarosa .....	44
5.5. Diseño de oligonucleótidos para las isoformas (completa y truncada) de <i>JARID2</i> .....	45
5.6. Pruebas PCR de punto final con los oligonucleótidos diseñados en DNA genómico de tejidos embrionarios de <i>L. olivacea</i> .....	48
5.7. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	49
5.8. Pruebas PCR de punto final con los oligonucleótidos diseñados en cDNA de tejido de caparazón de crías de <i>L. olivacea</i> .....	49
5.9. Ensayos de competencia entre oligonucleótidos en cDNA de tejido de caparazón de crías de <i>L. olivacea</i> .....	50
5.10. Electroforesis en geles de agarosa.....	55
<b>6. Resultados</b> .....	<b>56</b>
6.1. Cuantificación, pureza y valoración de la integridad del DNA genómico ....	56
6.2. Pruebas con los oligonucleótidos diseñados de <i>JARID2</i> en DNA genómico de tejidos embrionarios de <i>L. olivacea</i> .....	58
6.3. Cuantificación y pureza del RNA.....	60
6.4. Resultados de la reverso transcripción y amplificación de las isoformas de <i>JARID2</i> en cDNA de tejido de caparazón de crías de <i>L. olivacea</i> .....	62
6.5. Primer ensayo de competencia entre parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma de <i>JARID2</i> en cDNA de caparazón.....	80
6.6. Segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas de <i>JARID2</i> en cDNA de caparazón .....	83
<b>7. Discusión</b> .....	<b>98</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>117</b>
<b>9. Referencias</b> .....	<b>118</b>

## Resumen

Las tortugas marinas forman parte de un grupo de vertebrados cuya determinación del sexo es través de la temperatura ambiental (TSD), estrictamente durante el período termosensible (TSP). Las crías de tortuga marina no presentan diferencias morfológicas ni genéticas consistentes, lo cual ha dificultado la identificación de su sexo. Si bien se han propuesto diferentes metodologías a lo largo de los años, ninguna ha sido totalmente precisa y no invasiva. El sexado de las crías en poblaciones naturales resulta de gran importancia, ya que el efecto del cambio climático ha ocasionado preocupantes sesgos hacia el sexo femenino que podrían conllevar a extinciones locales. Con la creciente elevación de la temperatura, más estudios para conocer la dinámica poblacional son necesarios. Por lo anterior y en pos de un protocolo no invasivo, el objetivo de la presente tesis fue determinar el sexo de crías de la especie *Lepidochelys olivacea*, una tortuga marina cuyos huevos incubados a 26°C producen 100% machos y aquellos incubados a 33°C producen 100% hembras, a partir de muestras de tejido de caparazón (3mm<sup>2</sup>), utilizando parejas de cebadores específicas de las isoformas (completa y truncada) del gen *JARID2* de la familia *Jumonji*. Para la distinción del sexo, nos basamos en un estudio de RNA-seq previo, donde se observó que, en tejidos embrionarios de *L. olivacea*, la isoforma completa (conformada únicamente por exones) se expresa más a una temperatura de incubación de 33°C; mientras que, la isoforma truncada, la cual retiene un intrón con un codón de paro prematuro, lo hace a una temperatura de 26°C. Realizamos el diseño de los oligonucleótidos específicos de las variantes de *JARID2*, que fueron primero probados en DNA genómico de tejidos embrionarios de *L. olivacea* por PCRs de punto final, para después ser probados en muestras de RNA de tejido de caparazón de crías de la misma especie por ensayos RT-PCR convencionales. Analizamos la abundancia relativa diferencial de dichas isoformas a través de los resultados de electroforesis en geles de agarosa. Finalmente, hicimos ensayos de competencia entre parejas de cebadores a través de PCRs dúplex como una forma alternativa. En el primer ensayo, se pusieron a competir parejas que tenían especificidad opuesta por la isoforma, es decir, una de las parejas estaba dirigida a la isoforma completa y la otra a la truncada. Un segundo ensayo de competencia fue también llevado a cabo, pero contrario al primero, las parejas podían ser específicas

para la misma isoforma. No encontramos parejas de cebadores candidatas para sexar crías de la tortuga olivácea. Los resultados de las PCRs monoplex apuntaron a una abundancia similar de cada isoforma en las muestras de ambos sexos, con una tendencia de una mayor expresión de la isoforma truncada. En cuanto a los ensayos de competencia, los resultados generados fueron diversos y ambiguos. En conjunto, ambos ensayos (mono y dúplex) sugieren que los niveles de expresión de las dos variantes tratan de alcanzar el equilibrio entre los 26° y 33°C después de concluir la etapa final del TSP (26). Por lo tanto, resulta imposible detectar un patrón para la identificación del sexo de las crías. Es necesario reanalizar el perfil de expresión de las variantes de *JARID2* en tortugas marinas con un enfoque lo más cuantitativo posible, priorizando el uso de tejido de caparazón como fuente de material genético en los estudios sucesivos.

# 1. Introducción



## 1.1. Determinación del sexo

A menudo se asume que la determinación del sexo está definida únicamente por los cromosomas sexuales. Sin embargo, esto es una aseveración errónea fortalecida por hallazgos en organismos modelo como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, así como en el humano y otros mamíferos. En realidad, existe una vasta diversidad de mecanismos que determinan el sexo entre los diferentes organismos e incluso, en algunos casos, puede haber transiciones de un mecanismo a otro (Bachtrog, et al., 2014; van Doorn & Kirkpatrick, 2010).

De manera general, las especies gonocóricas<sup>1</sup> presentan dos tipos de mecanismos que determinan el sexo: 1) determinación del sexo genotípica o singámica (GSD<sup>2</sup>, por sus siglas en inglés), en la cual el sexo del individuo se determina, generalmente, por uno o más loci localizados usualmente en los cromosomas sexuales al momento de la fertilización; y 2) determinación del sexo ambiental o metagámica (ESD<sup>3</sup>, por sus siglas en inglés), donde el sexo del individuo es asignado después de la fertilización y establecido por factores o estímulos ambientales tales como la temperatura, el pH, las interacciones sociales, la estacionalidad, entre otros (Valenzuela, et al., 2003; Bachtrog, et al., 2014; Ellegren, 2011). En este tipo de mecanismo, el sexo no puede ser establecido por el genotipo del cigoto, en su lugar, la presencia de un interruptor sensible al ambiente decide el fenotipo (macho o hembra) que desarrollará el individuo durante el período sensible embrionario; por ello se dice que, la ESD es un caso de polifenismo<sup>4</sup>. Contrario a esto, la GSD sí conlleva diferencias genéticas consistentes entre los sexos, lo cual, ha llevado a que se considere como un caso especial de polimorfismo<sup>5</sup> genético que controla un rasgo fenotípico (Straková, et al., 2020).

---

<sup>1</sup> Especies cuyos individuos desarrollan un único sexo, clasificándose como machos o hembras.

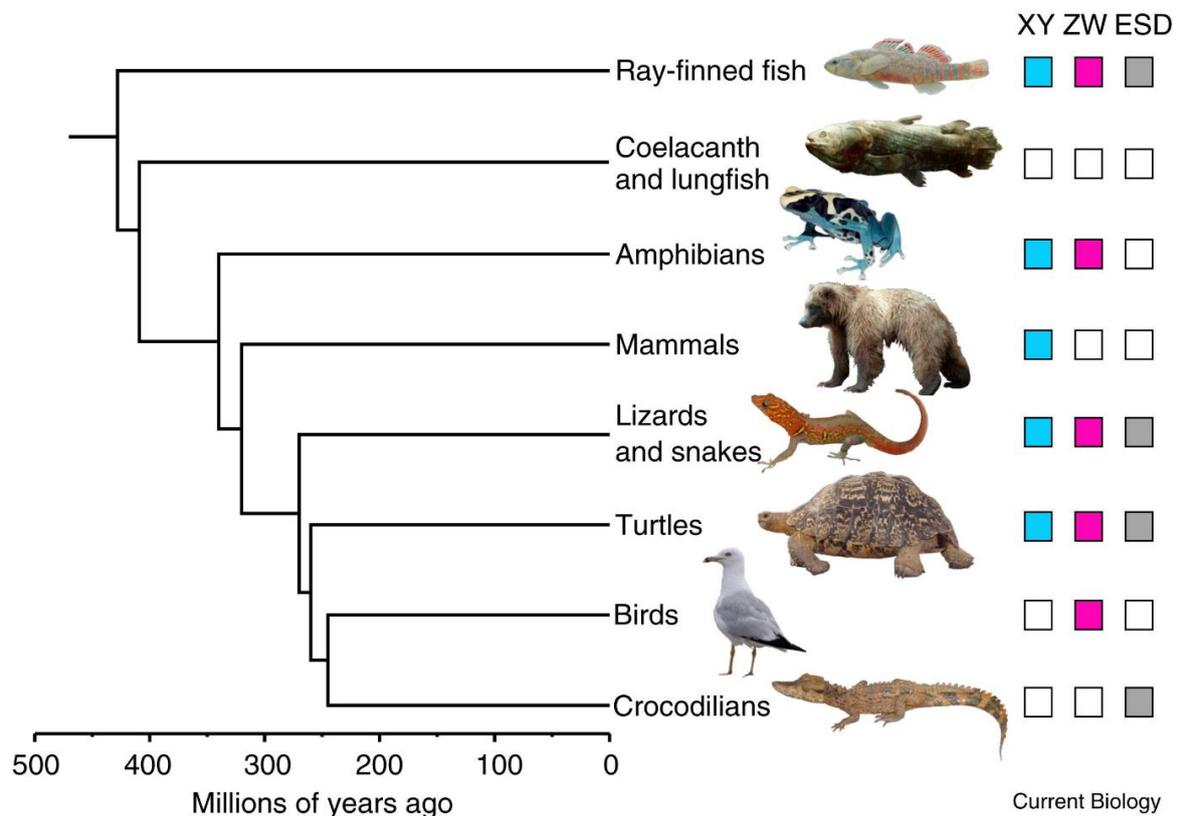
<sup>2</sup> Genotypic Sex Determination.

<sup>3</sup> Environmental Sex Determination.

<sup>4</sup> Fenómeno en el que un mismo genotipo produce fenotipos alternativos en respuesta a diferentes estímulos ambientales.

<sup>5</sup> En genómica, se refiere a la existencia de una de dos o más variantes de una secuencia de ADN particular, que aparece en al menos el 1% de la población.

Hay taxones como las tortugas, lagartos y peces que pueden presentar alguna de las variantes de la GSD (XY/ZW) además de ESD, tal como se muestra en la fig.1 (Lang & Andrews, 1994; Georges, et al., 2010; Pieau, 1996).



**Figura 1.** Diversidad en los mecanismos que determinan el sexo en clados de vertebrados como resultado de repetidas transiciones ocurridas entre ellos a lo largo de la línea evolutiva. Taxones como los peces y reptiles exhiben determinación del sexo genotípica (GSD) (XY/ZW) y determinación del sexo ambiental (ESD); mientras que, mamíferos y aves cuentan solo con mecanismos genotípicos aparentemente estables. Para los cocodrilos, sucede algo parecido, ya que poseen únicamente determinación del sexo ambiental (ESD). Las variantes del sistema del sexo heterogámico masculino (XY) y femenino (ZW) que hacen referencia a la ausencia de un cromosoma sexual o la presencia de uno o más cromosomas sexuales, no se muestran aquí. [Imagen recuperada de Gamble & Zarkower, 2012].

### 1.1.1. Determinación del sexo genotípica (GSD)

La determinación del sexo genotípica que está ampliamente extendida en el reino animal (y en menor proporción, en el reino vegetal) es regida, en la mayoría de los vertebrados, por genes relacionados al sexo o factores sexuales, como también se les conoce, que se albergan en cromosomas sexuales que pueden ser conspicuos y diferenciarse morfológicamente entre ellos (heteromórficos), o bien, pueden no estarlo (homomórficos) (Bull, 1985; Solari, 1993; Valenzuela, et al., 2003). En los mamíferos, el cromosoma Y contiene el gen que determina el sexo (*Sry*), pero en otros

organismos como las moscas de la fruta (*D. melanogaster*), ocurre que el sexo es determinado por la proporción de cromosomas X a autosomas (X:A). De este modo, el sexo masculino se define por una proporción XY:2A y el femenino por una de 2X:2A. En este caso, el cromosoma Y no tiene un papel en la determinación del sexo, pero sí en la fertilidad masculina. Algo similar sucede con el gusano *C. elegans*, donde las hembras tienen una proporción 2X:2A y los machos una de X0:2A, pues carecen del cromosoma Y (Sánchez, 1997; Gamble & Zarkower, 2012).

El modo más frecuente que se ha reportado del sistema de GSD, es el sexo heterogamético, donde el par de cromosomas sexuales difiere morfológicamente. En vertebrados e invertebrados, como también en algunas plantas con flor dioicas, encontramos dos tipos de sexo heterogamético, uno de ellos es el XY y el otro es el ZW. El más conocido, es el sexo heterogamético masculino (XY), denominado así debido a que los machos son los que poseen cromosomas sexuales diferentes, X y Y (heteromórficos); mientras que las hembras albergan dos cromosomas sexuales idénticos X (homomórficas) (Bull, 1985; Miura, 2007; Alfonsi & Pérez, 1994). Este tipo de mecanismo está presente en la gran mayoría de los mamíferos (incluyendo al humano), algunos peces e insectos como escarabajos y moscas, y otros invertebrados como lo son nematodos y arácnidos (Bachtrog, et al., 2014; Alfonsi & Pérez, 1994; Matta, et al., 2008; Bull, 1985). Por otro lado, organismos como las aves, serpientes y algunos insectos (e.g. polillas y mariposas) presentan un sistema de cromosomas sexuales ZW, en el cual, son las hembras quienes son el sexo heterogamético (ZW) y los machos, el homogamético (ZZ) (Matta, et al., 2008; Alfonsi & Pérez, 1994; Ellegren, 2011; Bachtrog, et al., 2014; Bull, 1985). Ambos tipos de mecanismos (XY y ZW) se comparten entre el orden de los dípteros y los grupos de reptiles, peces teleósteos y anfibios. De hecho, dentro de este último grupo se les ha encontrado en diferentes poblaciones de la especie *Rana rugosa*. Las mezclas cromosómicas que se forman como resultando de la entrecruza de estas poblaciones, son posibles porque los dos sistemas son complementarios a pesar de sus diferencias; y en ellos, podemos apreciar la dinámica en donde el cromosoma W rige sobre el Y, y, a su vez éste sobre el cromosoma X (Bull, 1985; Ellegren, 2011).

Así también, es de resaltar aquellos sistemas que han perdido alguno de los cromosomas sexuales (un caso de aneuploidía), ya sea el Y o W, debido, por ejemplo, a un caso extremo de recombinación suprimida. Estos sistemas XX/X0 y ZZ/Z0, se han documentado en insectos y gusanos, e inclusive, en mamíferos como el humano

y el ratón, el sexo femenino puede carecer de uno de los cromosomas X (Ellegren, 2011; Ferretti, et al., 2020; Bull, 1985). Por otra parte, también se han encontrado sistemas que implican cromosomas que han evolucionado recientemente (cromosomas neo-sexuales) por medio de fusiones centroméricas o bien translocaciones, donde participan los autosomas (Pala, et al., 2011; Bergero & Charlesworth, 2009). Por ejemplo, en el anfibio *Eleutherodactylus maussi* podemos encontrar el sistema:  $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ , que fue resultado de una fusión centromérica entre un autosoma y un cromosoma Y. O en el caso contrario, el sistema:  $XY_1Y_2/XX$ , presente por ejemplo en el pez *Hoplias malabaricus*, en el que ocurrió una fusión entre un autosoma y el cromosoma X (Yoshida & Kitano, 2012; Li & Gui, 2018). Asimismo, también se han reportado en lepidópteros sistemas como:  $Z_1Z_2W/Z_1Z_1Z_2Z_2$  y  $ZW_1W_2/ZZ$ , que son variantes derivadas del sistema de cromosomas sexuales ZW (Nguyen, et al., 2013; Ellegren, 2011). Pero eso no es todo, puesto que se han registrado muchos taxones que cuentan con un increíble sistema de determinación sexual que consiste en cadenas de múltiples meióticos de cromosomas sexuales, tal como se puede encontrar en los monotremas, cuya cadena de cromosomas es bastante compleja:  $X_1X_2 X_3 X_4 X_5/Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5$  (Howell, et al., 2009; Ellegren, 2011). En un porcentaje menor de organismos (e.g. peces como *Xiphophorus helleri*), el sexo es definido por varios loci sexuales que tienen efectos aditivos, los cuales, en suma, pueden superar un valor umbral y definir uno de los sexos (macho o hembra). A este mecanismo se le conoce como determinación polifactorial del sexo (Valenzuela, et al., 2003).

### **1.1.2. Determinación del sexo ambiental (ESD)**

Existen diversos estímulos ambientales que juegan un rol principal sobre la determinación del sexo. Entre ellos, se halla la proporción de sexos y/o el tamaño relativo, los cuales pueden influir en la asignación del sexo, tal como se ha visto que ocurre en ciertos peces teleósteos con hermafroditismo secuencial; es decir, peces que de manera reversible cambian de sexo, ya sea de machos a hembras (cambio de sexo protándrico) o en la dirección contraria, de hembras a machos (cambio de sexo protógino) (Guerreo & Moreno, 2010; Kobayashi, et al., 2013). Un claro ejemplo de este caso es observado en los peces payaso que habitan en los arrecifes coralinos. En cada grupo de peces payaso que está asociado a una anémona existe una

jerarquía tamaño-dominancia, en la cual, la única hembra reproductora mantiene la posición dominante debido a su gran tamaño, que sobrepasa al del macho reproductor, que a su vez supera al de los otros miembros no reproductores. Al momento que la hembra dominante desaparece o muere, se desencadena el cambio de sexo protándrico del macho reproductor que pasa a ser el miembro más dominante (Kobayashi, et al., 2013). Otro modo de ESD ha sido observado en anfípodos marinos, por ejemplo, en la especie *Echinogammarus marinus*, cuya determinación del sexo se ha vinculado al fotoperíodo, dado que muestra un sesgo masculino dentro de un régimen de fotoperíodo de días largos, y un sesgo femenino sobre un régimen de fotoperíodo de días cortos (Guler, et al., 2012). Un ejemplo más clásico de la ESD, y que se debatió hace algunos años, se da en el gusano marino *Bonellia viridis*, un caso donde la mayoría de las larvas sexualmente indiferenciadas y parecidas a trocóforos se desarrollan como machos de apenas 1-3 mm de longitud, al estar en contacto con la larga probóscide de una hembra adulta que mide cerca de 80 mm de largo. Estos machos, que asemejan a planarias, se vuelven parásitos cuando penetran en el útero de la hembra. En cuanto a las larvas que se desarrollan en ausencia de alguna hembra adulta, éstas se metamorfosean como hembras (Berec, et al., 2005; Leutert, 1975). Por último, nos encontramos con los nematodos mermítidos que, durante su fase juvenil, en la cual viven como parásitos de insectos, el sexo se define acorde a la nutrición de su hospedero; de este modo, si el nematodo se desarrolla dentro de un hospedero de cuerpo grande y bien nutrido, entonces se diferencia como hembra, pero si el hospedero está mal nutrido, el gusano se convierte en macho (Bull, 1985).

#### **1.1.2.1. Determinación del sexo por temperatura (TSD)**

En los vertebrados con ESD, la forma más predominante es la TSD; un sistema bajo el cual, el sexo de la progenie es determinado por la temperatura ambiental durante el periodo termosensible (TPS<sup>6</sup>) de incubación de los huevos (Janzen & Paukstis, 1991; Warner & Shine 2008; Santidrián, et al., 2015; Kohno, et al., 2015). La determinación del sexo por temperatura (TSD<sup>7</sup>, por sus siglas en inglés) se designó por primera vez en lagartijas de la especie *Agama agama* (Charnier, 1966), y tiempo después se encontró en cocodrilos, tuátaras, la mayoría de las tortugas, en algunos

---

<sup>6</sup> Etapas embrionarias donde la temperatura genera una respuesta en las gónadas en desarrollo.

<sup>7</sup> Temperature-Dependent Sex Determination.

lagartos y peces e incluso aves como *Alectura lathanii* (Valenzuela, et al., 2003; Bachtrog, et al., 2014; Muralidhar & Veller, 2018; Kallimanis, 2010).

Los organismos con TSD no poseen cromosomas sexuales (sean de tipo heteromórficos u homomórficos), ni tampoco presentan diferencias genéticas consistentes que permitan diferenciar un sexo del otro (Valenzuela et al. 2003; Bull, 1985). Sin embargo, es sabido que, el estado de diferenciación sexual, se mantiene río abajo a través de patrones de expresión de ciertos genes, muchos de los cuales se comparten entre los sistemas GSD y TSD (Valenzuela, et al., 2003; Devlin & Nagahama, 2002).

A diferencia de un sistema heterogamético (GSD), de uno controlado por estímulos ambientales, como lo es la TSD, la proporción primaria de sexos no siempre se mantiene equilibrada en 1:1, ya que puede sesgarse debido a que la determinación del sexo estará a merced del ambiente, el cual sabemos es fluctuante. Además, las proporciones primarias de sexos en la TSD se establecen después de la fertilización (momento en el que se determina el sexo), y no en el momento de la concepción como sucede con la GSD (Valenzuela, et al., 2003; Valenzuela & Lance, 2004).

Ahora bien, probables casos de TSD pueden ser confundidos con otros fenómenos, por ello, es de tener cuidado con el hecho de que no siempre el efecto que tiene la temperatura como distorsionador de la proporción de sexos resulta en TSD, a menos que sea responsable de la determinación de la proporción de sexos primaria, y más no de la secundaria (proporción de sexos en la eclosión o nacimiento). Dado lo anterior, la TSD excluye los siguientes escenarios: mortalidad diferencial inducida por la temperatura, aborto del embrión, fertilización diferencial e inversión sexual (Valenzuela, et al., 2003; Valenzuela & Lance, 2004).

#### **1.1.2.1.1. Patrones de la determinación del sexo por temperatura**

Estudios de incubación a temperatura constante en laboratorio han permitido reconocer tres patrones principales en cuanto a la relación temperatura-proporción de sexos en reptiles. El patrón más común que se ha reportado es aquel en el cual, las temperaturas cálidas (31°C y superiores) producen hembras; mientras que, temperaturas frías (24 a 27°C) producen machos (patrón *la*). Por su parte, el segundo patrón es el caso contrario donde las hembras se desarrollan a bajas temperaturas de incubación y los machos a altas temperaturas (patrón *lb*). Y, por último, está el patrón donde la mayoría de las hembras se producen a bajas y altas temperaturas, y

en cambio, los machos se desarrollan a una temperatura intermedia (patrón *II*) (Kallimanis, 2010; Bowden & Paitz, 2018; Li & Gui, 2018; Pieau, 1996; Bull & Vogt 1979; Carter, et al., 2018). El patrón *Ia* ha sido reportado en muchas tortugas como la de orejas rojas (*T. scripta*), aunque, en otras como la tortuga mordedora (*C. serpentina*) y pintada (*C. picta*), se ha visto que presentan el patrón *II*, el cual, a su vez, ocurre en cocodrilos, lagartos y caimanes como la especie *A. mississippiensis*. Este caimán al igual que la especie de lagarto *E. maculariudi*, fueron en un principio designados con el patrón *Ib*, pero más tarde, se observó que también presentaban el patrón *II*. El patrón *Ib* se ha documentado para caimanes, cocodrilos, lagartos como *Agama agama* y tuátaras como es el caso de *Sphenodon guntheri* (Li & Gui, 2018; Pieau, 1996; Pierce, 2010; Janzen & Paukstis, 1991).

#### **1.1.2.1.2. Rango de transición de temperaturas y temperatura pivote**

En la mayoría de los casos, el rango que existe entre las temperaturas que dan lugar a machos y las que producen hembras (rango de transición de temperaturas, TRT) es bastante estrecho (1-2°C), aunque esto depende de la especie y, por tanto, puede llegar a ser más amplio, tal como sucede en la tortuga verde (*Chelonia mydas*), cuyo rango es de alrededor de 4°C (Bowden & Paitz, 2018; Pieau, 1996). Dentro del rango de transición se producen proporciones de sexos mixtas y, además, se encuentra la temperatura pivote o pivotal que conduce a una proporción de sexos 50:50 en la descendencia (Carter et al., 2018; Bowden & Paitz, 2018). A menudo se hace referencia a la temperatura pivote como temperatura umbral. Sin embargo, se sabe que estos dos términos no pueden ser usados como sinónimos, pues la temperatura umbral se usa para definir la temperatura a la que un individuo de una población es susceptible para la diferenciación sexual, o bien, aquella sobre la cual un individuo se diferencia en un sexo, y por debajo de la que se desarrolla en el otro sexo. La temperatura umbral es única para cada individuo de una población y, por lo tanto, se considera que la temperatura pivote es el promedio de las temperaturas umbral de todos los individuos en una población (Valenzuela & Ceballos, 2012).

En las tortugas marinas la temperatura pivote es bastante similar tanto de manera interespecífica como intraespecífica, llegando a oscilar entre los 28° y 30°C (Bowden & Paitz, 2018). En la tortuga boba (*Caretta caretta*), por dar un ejemplo, se ha reportado una temperatura pivote de 30°C (Yntema & Mrosovsky, 1982; Standora & Spotila, 1985), muy cercana a la que se ha estimado para la tortuga verde (*C.*

*mydas*), de poco más de 29°C (Godfrey & Mrosovsky, 2006). Sin embargo, las temperaturas pivote varían no solo entre especies, sino también entre poblaciones (Wibbels, 2003).

#### **1.1.2.1.3. Mecanismo molecular de la determinación del sexo por temperatura**

A principios de la gonadogénesis, en los individuos con TSD, la gónada es bipotencial, pudiendo desarrollarse como ovario o testículo (Shoemaker & Crews, 2009; Kettlewell, et al., 2000). Para alcanzar alguno de estos dos destinos sexuales, se tienen que suscitar las primeras instrucciones o eventos que definirán el sexo embrionario y también, la proporción primaria de sexos (i.e. determinación del sexo) (Valenzuela, et al., 2003). Este primer paso se da cuando se abre la ventana del TSP, de modo que la temperatura puede ser detectada por moléculas diana (Shoemaker & Crews, 2009; Kettlewell, et al., 2000; Merchant, et al., 2010; Urbano, 2013). En este punto comienza la diferenciación molecular que provocará que se desencadenen vías específicas del sexo que conducirán hacia el esperado destino sexual del individuo. Durante este proceso, las gónadas pueden sufrir una reversión del sexo si ocurre un cambio en la temperatura de incubación, aunque ya presentan diferencias sexuales como resultado de la temperatura a las que están sometidas, siempre y cuando la ventana del TSP continúe estando abierta. Posteriormente, comienza la diferenciación morfológica (o gonadal) y eventualmente la ventana del TSP se cierra, y entonces el sexo es irreversible (Shoemaker & Crews, 2009; Kettlewell, et al., 2000).

El mecanismo molecular de la determinación del sexo por temperatura no ha sido dilucidado hasta la fecha (Torres-Maldonado, et al., 2002; Tezak, et al., 2020). Y a diferencia de los mamíferos donde *Sry*, el gen maestro determinante del sexo ligado al cromosoma Y, funciona como un interruptor o “switch” que desencadena la vía del desarrollo de los testículos (Hernández, et al., 2008), no se tiene conocimiento del desencadenante de la determinación del sexo ambiental.

Algunos estudios han reportado la expresión diferencial de ciertos genes a temperaturas que producen machos (MPTs<sup>8</sup>, por sus siglas en inglés) y temperaturas que producen hembras (FPTs<sup>9</sup>, por sus siglas en inglés) en especies con TSD (Torres-Maldonado, et al., 2002; Tezak, et al., 2020). Genes como *Dmrt1* (Factor de transcripción 1 relacionado con Doublesex y Mab3), *Mis* (también conocida como la

---

<sup>8</sup> Male-Producing Temperatures

<sup>9</sup> Female-Producing Temperatures

hormona antimulleriana, *Amh*) y *Sox9* (Factor de transcripción SRY-box 9) se ha visto que participan en la formación de testículos (Moreno-Mendoza et al., 2001; Shoemaker & Crews, 2009; Zapatero, et al., 2007). En el caso de *Dmrt1*, su expresión es mayor a MPT que a FPT en al menos tres taxones. Por ejemplo, en el caimán del Mississippi (*Alligator mississippiensis*), su expresión en el sistema urogenital es detectable a ambas temperaturas de incubación durante las primeras etapas del desarrollo, pero incrementa a partir de la etapa 24 en MPT (Smith, et al., 1999). De manera muy similar, en los complejos cresta genital/mesonefros de la tortuga de orejas rojas (*T. scripta*), su expresión es más elevada en MPT durante las etapas 15-20 (Kettlewell, et al., 2000). Para crías de la tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*), se ha encontrado una expresión del mRNA de *Dmrt1* 150 veces mayor en testículos que en ovarios. En cuanto a *Sox9*, para la misma especie, su expresión en gónadas embrionarias se ha visto que aumenta de manera gradual a MPT (Rhen, et al., 2007). Así también, en el gecko leopardo (*Eublepharis macularius*), la expresión de este gen en el sistema urogenital es detectable a principios del desarrollo (etapa 34) a ambas temperaturas, pero luego, es imperceptible a FPT a partir de la etapa 37; mientras que en MPT, sí es observable (Valleley, et al., 2001). Con respecto a *Mis*, su expresión es significativamente mayor en la tortuga de orejas rojas y el caimán del Mississippi desde comienzos del TSP en MPT a diferencia de FPT (Zapatero, et al., 2007; Western, et al., 2000).

En contraparte, entre los genes que se han considerado que tienen un rol importante en la formación de ovarios encontramos a *FoxL2* (Forkhead box L2), la aromatasa y *Rspo1* (R-spondin1). En la tortuga de orejas rojas, los niveles de expresión de *FoxL2* en las gónadas son similares a ambas temperaturas de incubación, temprano en el TSP. Sin embargo, la expresión se vuelve más alta al final de dicho periodo cuando ocurre la diferenciación ovárica (Zapatero, et al., 2007). Por su parte, en la tortuga mordedora, se ha demostrado que, su nivel de expresión es 25 veces mayor en ovarios que en testículos. Y lo mismo sucede con la expresión de la aromatasa en esta especie, siendo mayor en FPT que en MPT (Rhen, et al., 2007). Finalmente, para *Rspo1*, se ha reportado su regulación positiva a FPT durante el TSP en la tortuga de orejas rojas, siendo significativamente mayor a partir de la etapa 17, y manteniéndose a bajos niveles de expresión en MPT (Smith, et al., 2008).

#### **1.1.2.1.4. Determinación del sexo por temperatura en tortugas marinas**

En las tortugas (Orden: Testudines) o quelonios, se ha determinado la presencia de TSD en ocho familias, de las cuales Cheloniidae y Dermochelyidae incluyen a las siete especies de tortugas marinas: tortuga láud (*Dermochelys coriacea*), tortuga verde (*C. mydas*), tortuga boba (*C. caretta*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), tortuga olivácea o golfina (*Lepidochelys olivacea*), tortuga lora de Kemp (*Lepidochelys kempii*) y tortuga de espalda plana (*Natator depressus*), que al parecer exhiben el patrón *la* de TSD (Janzen & Paukstis, 1991; CONANP, 2013; Wibbels, 2003; Morales, 2013). Bajo este patrón, se ha determinado mediante diversos estudios que las FPTs cubren un rango de aproximadamente 29.75 a 32.0°C, mientras que las MPTs van de los 26.0 a los 28.75°C (Wibbels, 2003) y tienen un rango de tolerancia térmica de entre 25° y 35 °C dentro del cual el éxito de eclosión por lo general es alto (Ackerman 1997).

## **1.2. Aspectos biológicos de *Lepidochelys olivacea***

### **1.2.1. Descripción de la especie**

*L. olivacea*, también conocida como la tortuga olivácea o golfina (Eschscholtz, 1829), es considerada como la especie de tortuga marina más abundante en el mundo, y la más pequeña dentro de la familia Cheloniidae (Barrientos, et al., 2014; Lara & Rodríguez, 2014). Con respecto a sus características morfológicas, se caracteriza por tener una cabeza ligeramente triangular con dos pares de escamas prefrontales, un caparazón redondeado, de 5-9 pares de escudos laterales con una configuración asimétrica, la presencia de un poro en cada escudo inframarginal, y aletas relativamente cortas, usualmente con dos uñas en cada una (Varo-Cruz, et al., 2015; Barrios-Garrido, et al., 2014). Los adultos tienen un color oliváceo muy característico en la parte dorsal, de ahí su nombre, con tonos grisáceos y amarillentos (fig. 2a). Ventralmente, la coloración es resultado de una gama que va del color crema al gris verdoso. Las crías, por su parte, tienen una coloración grisácea que tiende al negro, tanto ventral como dorsal (fig. 2b) (Márquez, 1996). El peso promedio de las tortugas adultas ronda entre los 33 y 52 kg (Gaona & Barragán, 2016), presentan una longitud curva del caparazón (LCC) promedio de 69.91 cm, junto con una talla mínima de 57 cm y una máxima de 79 cm (Brenes, et al., 2015). La LCC media en las crías es de 43.5 mm, y su peso es de aproximadamente 16.2g (Márquez, 1996). Los machos

adultos se diferencian de las hembras por tener la cola más larga y las uñas más alargadas y curvadas (Varo-Cruz, et al., 2015).

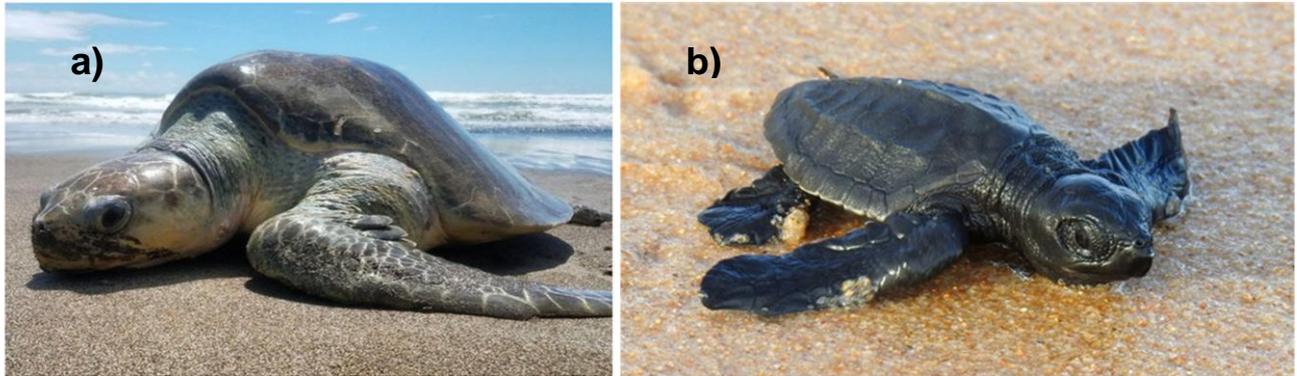


Figura 2. *L. olivacea* adulta en una playa desconocida de Costa Rica (a) [Imagen recuperada de Beange, M., 2017] y cría de *L. olivacea* en Bahía, Brasil (b) [imagen recuperada de Santiago, J., 2020].

### 1.2.2. Distribución de la especie

*L. olivacea* es una especie pantropical y epipelágica que se distribuye en el este y oeste del Océano Pacífico, así como también en el Índico y Atlántico sur (Gaona & Barragán, 2016; Barrientos, et al., 2014; Zug, et al., 1998). En el Océano Pacífico oriental (OPO), *L. olivacea* se ubica desde el noreste de México hasta las costas de Chile, aunque se han reportado avistamientos atípicos en el sur de Estados Unidos y en el Golfo de Alaska, lo cual se ha asociado con el aumento en la temperatura del agua en estas zonas (Lara & Rodríguez, 2014; Spotila, 2004; Colin, 2015; Márquez, 1996; Márquez, 1990). Al otro lado del mundo, en el Océano Índico Oriental, se les ha encontrado en las costas de la India, Sudáfrica, Pakistán, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam, Indonesia y en ciertos lugares de Australia. En lo que corresponde al Océano Atlántico Sur, su distribución se limita a las costas del oeste de África; mientras que, en la zona oeste del Océano Atlántico, precisamente en el continente americano, están presentes en Brasil, Surinam, y la Guayana Francesa (Spotila, 2004, Márquez, 1990). Lamentablemente, en algunas regiones del mundo se ha presenciado la disminución poblacional de esta especie, catalogándola a nivel internacional en la categoría Vulnerable (VU A2bd) de acuerdo con la lista roja de especies amenazadas de la IUCN (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008; Barrios-Garrido, et al., 2014).

### 1.2.3. Reproducción y comportamientos de anidación

Debido a que *L. olivacea* es una de las especies más pequeñas entre las tortugas marinas, su maduración es temprana en comparación con estas. De hecho, se dice que exhibe una de las tasas de crecimiento más rápidas, pues alcanza la madurez sexual en un rango de entre 10 a 18 años con un promedio de 13 años, y a un tamaño de 62 cm aproximadamente (Zug et al., 2006; Márquez, 1990; Colin, 2015). Cabe mencionar que estos datos pueden variar dependiendo la latitud a la que se encuentren las tortugas, la calidad del alimento, el tamaño de la población y los factores genéticos (Márquez, 1990).

El cortejo y apareamiento ocurren, por lo general, frente a las playas que suelen frecuentar para la anidación (máximo a 1 km de distancia); aunque también puede suceder a lo largo de las rutas migratorias, con los machos interceptando a las hembras (Lara & Rodríguez, 2014; Gaona & Barragán, 2016). Cuando llega el momento de la anidación, las hembras se dirigen con cierta preferencia hacia playas abiertas que tienen una ligera pendiente y que están en áreas aisladas, algunas de las cuales, pueden estar separadas del continente por lagunas costeras (Gaona & Barragán, 2016; Márquez, 1990). Estas playas pueden ser aquellas donde tuvo lugar su eclosión o bien, áreas cercanas a estas (fenómeno conocido como filantropía), aunque las tortugas adulto pueden anidar en otras que se encuentran lejos de las de su origen (Gaona & Barragán, 2016; Frazier, 1999). En cuanto al comportamiento de anidación, *L. olivacea* muestra dos tipos: 1) la anidación solitaria, que es la más común y en la que las tortugas emergen individualmente y de manera asincrónica, para depositar sus huevos en alguna playa que se encuentre dentro de su área geográfica de anidación; y 2) la anidación masiva o mejor conocida como “arribada”, un evento sincrónico, en el que se puede presenciar como cientos y hasta miles de tortugas salen del mar para desovar en una misma playa (Lara & Rodríguez, 2014; Colin, 2015; Gaona & Barragán, 2016; Behera, et al., 2010; Plotkin, 1997; Plotkin, 1995). Los sitios con las arribadas más impactantes, es decir, con la mayor densidad de tortugas en la temporada de anidación ocurren en las playas, “La Escobilla” y “El Morro Ayutla” en el estado de Oaxaca (México); las playas “Ostional” y “Nancite” (Costa Rica); y en el santuario de vida silvestre marina “Gahirmatha”, en Orissa (India)

(Lara y Rodríguez, 2014; Shanker, et al., 2004; Barrientos, et al., 2014; Behera, et al., 2010; Zug, et al., 1998).



**Figura 3. Anidación masiva de *L. olivacea* en Gahirmatha, India [imagen recuperada de Sivakumar, K.]**

El ciclo reproductivo es predominantemente anual, ya que, más del 60% de las hembras de *L. olivacea* anidan cada año (Márquez, 1990), llegando a tener entre 1 a 3 desoves (o hasta 5) por temporada de anidación (Gaona & Barragán, 2016; Castro, et al., 2011). Entre cada nidada hay un periodo de 14 días, en el caso de la anidación solitaria, y de 28 días para la anidación masiva (Lara y Rodríguez, 2014). Las tortugas hembra salen a anidar principalmente en la noche, depositando alrededor de 100 huevos en promedio (Lara & Rodríguez, 2014; Castro, et al., 2011), durante un periodo de aproximadamente 45 minutos (Gaona & Barragán, 2016). La duración de la incubación, por su parte, va de los 45 a 75 días, dependiendo la temperatura de incubación, puesto que, a mayor temperatura más corto es el periodo de incubación y viceversa (Merchant, et al., 2010). Los huevos son cilíndricos y de color blanco, además, tienen un diámetro que oscila entre los 32,1 y los 44,7 mm y un peso de entre 30 y 38 gramos (Márquez, 1990; Lara & Rodríguez, 2014).

#### **1.2.4. Período termosensible (TSP) y determinación del sexo por temperatura de *L. olivacea***

En *L. olivacea*, la determinación del sexo es por temperatura: los huevos incubados a 26°C producen 100% machos y aquellos incubados a 33°C producen 100% hembras. Una temperatura de incubación de ~35°C puede llegar a ser letal (Márquez, 1990; Colin, 2015; Valverde, et al., 2010; Wibbels, et al., 1998). Por su parte, la temperatura pivote que se ha registrado para *L. olivacea* es de 30 y 31°C, ligeramente mayor a la de otras tortugas marinas (Wibbels, 2003).

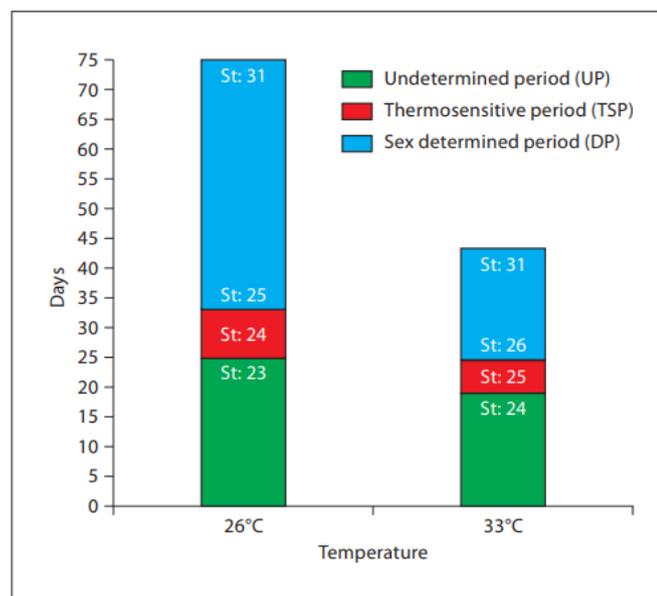
El TSP para esta especie ocurre entre las etapas 23 y 26 que corresponden a los 2/3 del desarrollo embrionario. Durante este momento clave, el sexo es lábil, es decir, las gónadas que recién comienzan la trayectoria hacia la diferenciación sexual son más sensibles a la temperatura, pudiendo responder a cambios en ella (Bowden & Paitz, 2018; Valenzuela, et al., 2003; Merchant, et al., 2010).

Merchant y colaboradores (2010) evaluaron cómo el cambio en la temperatura afecta la respuesta de los embriones en las diferentes etapas embrionarias que incluyen el TSP (fig. 4). Para ello, realizaron experimentos usando huevos de *L. olivacea*, que fueron primero incubados a una temperatura [FPT (33°C) o MPT (26°C)], para luego sufrir un cambio hacia la temperatura que promovía el sexo contrario. Los resultados los registraron acorde a la etapa de desarrollo embrionario en la que se realizó dicho cambio, encontrándose lo siguiente;

Los embriones que fueron cambiados de FPT a MPT respondieron casi al 100%, desarrollaron testículos, cuando se les cambió justo en la etapa 24; mientras, el 30% respondió al cambio en la etapa 25 y ninguno lo hizo en la etapa 26. Los embriones incubados primero a MPT y luego a FPT, respondieron formando ovarios cuando el cambio se dio en la etapa 23; sin embargo, solo el 35% respondió en la etapa 24 y ninguno en la etapa 25.

Con base en estos resultados, Merchant y colaboradores concluyeron que: 1) los embriones que son incubados a temperaturas distintas no se encuentran en la misma etapa de desarrollo embrionario a pesar de que estén en la misma edad

cronológica<sup>10</sup>, como se puede apreciar en la fig. 4; 2) los embriones de *L. olivacea* incubados a FPT se desarrollan más rápido (tan solo en 45 días) que a MPT (~75 días de incubación se necesitan) (fig. 4); 3) el sexo masculino se determina en la etapa 25, en embriones que se desarrollan lentamente a MPT, mientras que embriones incubados a FPT, y que por ende tienen un desarrollo más rápido, son definidos sexualmente como hembras en una etapa más tardía (etapa 26 del desarrollo embrionario) (revisar el período sexo-determinado en la fig. 4); y 4) para comparar niveles de expresión en gónadas de embriones en estado determinado<sup>11</sup> contra de los que están en un estado indeterminado<sup>12</sup>, se debe considerar la primera y última etapa del TSP. En el caso de los embriones de *L. olivacea* incubados a FPT, la comparación de los niveles de expresión génica tendría que realizarse entre las gónadas de embriones en la etapa 24 (estado indeterminado) y gónadas en la etapa 27 (estado determinado). Por su parte, para los embriones que están sometidos a MPT, la comparación se haría entre las gónadas en etapa 23 y 26, que corresponden a un estado indeterminado y determinado, respectivamente (Merchant, et al., 2010; Merchant, et al., 2013).



**Figura 4. Gráfico del período de incubación para *L. olivacea* de Merchant, et al., 2010. Se muestra la relación entre edad cronológica (días de incubación), etapas del desarrollo embrionario (basadas en criterios morfológicos) y las temperaturas de incubación de 26°C (MPT) y 33°C (FPT) a las que están sometidos los embriones. La etapa 31 marca el final del período de incubación, momento en el que ocurre la eclosión. En color verde, rojo y azul se indican los**

<sup>10</sup> Edad que se mide de acuerdo a los días del período de incubación.

<sup>11</sup> Embriones que responden al cambio en la temperatura.

<sup>12</sup> Embriones que no muestran respuesta al cambio de temperatura.

periodos de respuesta, indeterminado, termosensible, y sexo-determinado, de los embriones a la variación en la temperatura, respectivamente. Estos periodos son establecidos a lo largo del desarrollo embrionario, y acorde al porcentaje de individuos que respondió al cambio en la temperatura que producía el sexo opuesto, en experimentos realizados por Merchant, et al. (2010). En el periodo indeterminado, el 100% de los embriones responde al cambio en la temperatura; mientras que, en el periodo termosensible, el porcentaje de embriones que responden al cambio va decreciendo; y en el periodo determinado, ningún embrión muestra respuesta.

En el TSP de *L. olivacea*, patrones de expresión de genes como *Sox9*, *Dmrt1* y *Dax1* han sido detectados en muestras gonadales, indicando su participación en la diferenciación sexual (Torres Maldonado, et al., 2006). La expresión de *Sox9* en las gónadas ha sido encontrada entre las etapas 23 y 25, tanto a MPT como a FPT. Sin embargo, a partir de la etapa 26, los embriones sometidos a MPT continúan expresando a *Sox9*, mientras que para aquellos incubados a FPT la expresión ya no es detectable en las gónadas (Torres-Maldonado, et al., 2001; Torres Maldonado, et al., 2002). Además, se ha demostrado que la vía de determinación del sexo masculino que sostiene la expresión de *Sox9* en las gónadas a MPT ocurre en la etapa 24. Y en las gónadas incubadas a FPT se puede apreciar la desregulación de *Sox9*, así como también, la disminución de la proteína en la etapa 25, estableciéndose la vía que determina el sexo femenino (Torres-Maldonado, et al., 2001; Moreno-Mendoza, 1999; Torres Maldonado, et al., 2006). De manera similar, a FPT y MPT, no se han detectado diferencias significativas en cuanto a los perfiles de expresión de *Dax1* durante las etapas 23-26, pero a partir de la etapa 27 se puede apreciar una mayor expresión de este locus en las gónadas incubadas a FPT. Debido a que las diferencias en expresión son halladas después del TSP no se puede considerar a *Dax1* como un locus involucrado en la determinación del sexo por temperatura (Torres Maldonado, et al., 2002; Torres Maldonado, et al., 2006). *Dmrt1*, por su parte, se ha visto que probablemente puede actuar río arriba de *Sox9* y mantener su expresión en gónadas masculinas ya que, a partir de la etapa 24, los niveles de expresión de este gen son significativamente más altos en MPT que en FPT; su expresión diferencial precede a la de *Sox9* en machos (Torres Maldonado, et al., 2002; Torres Maldonado, et al., 2006).

En el periodo de respuesta indeterminada, las gónadas de los embriones son bipotenciales, y están formadas por compartimentos estromales y epiteliales (Merchant & Díaz, 2013; Urbano, 2013). A partir de la etapa 26 del desarrollo embrionario de *L. olivacea* son evidentes las primeras diferencias histológicas entre

gónadas incubadas a distintas temperaturas (26 y 33° C): en MPTs, los cordones medulares resaltan en las gónadas como una red compleja, mientras que en temperaturas que favorecen a las hembras, comienza a darse un proceso parecido a la fragmentación, además de la formación de la corteza ovárica a causa del engrosamiento del epitelio superficial. La diferenciación sexual es más apreciable ya para la etapa 27, donde los cordones medulares se convierten en cordones seminíferos a MPT, y estos mismos, en FPT, permanecen en la gónada como vestigios de lo que alguna vez fueron (Merchant, et al., 2010).

### **1.3. El cambio climático influye en la proporción de sexos de crías de tortuga marina**

El riesgo del cambio climático es más pronunciado en especies ectotérmicas como los reptiles, en donde, los ectotermos marinos se encuentran más cerca a los límites de la tolerancia térmica que los ectotermos terrestres (Sunday et al., 2012) y, en particular las especies con la TSD cuya biología y fenología están íntimamente ligadas a la temperatura (Somero, 2010). Debido a la presencia de la TSD, la proporción de sexos de la descendencia está sujeta fuertemente a la temperatura ambiental, de modo que, tan solo el cambio de 1°C en la temperatura de incubación durante el periodo termosensible puede llegar a alterar de manera significativa la proporción de sexos (Jazen, 1994).

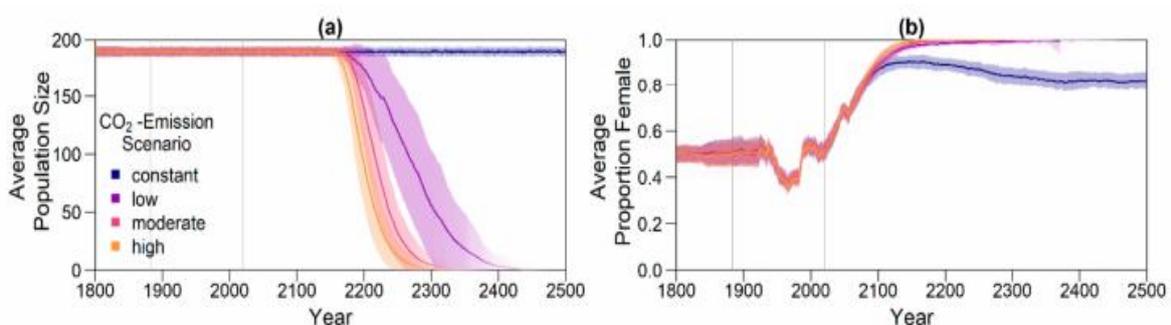
A través de una serie de simulaciones de modelos climáticos globales se ha estimado que probablemente la temperatura global incremente de 3-4°C antes de que concluya este siglo (XXI) (New, et al., 2011). Dicho incremento podría provocar proporciones de sexos altamente sesgadas hacia machos o hembras, lo que limitaría la reproducción ya que las oportunidades de encontrar pareja se reducirían ante la escasez de individuos del sexo opuesto, y en casos extremos, este suceso conllevaría a extinciones locales (Hawkes, et al., 2007; Valenzuela, et al., 2019; Blechschmidt, et al., 2020). Además, el aumento en la temperatura global podría reducir el éxito de eclosión y el *fitness* de las crías (Tapilatu & Ballamu, 2015).

En el caso de las tortugas marinas, cuyo sistema de determinación sexual es por temperatura en todas las especies (Tapilatu & Ballamu, 2015), ya se ha observado una tendencia feminizante en las proporciones de sexos, es decir, una predominancia de hembras (producidas a temperaturas cálidas) con relación a los machos, a partir

del registro de las temperaturas promedio de los nidos y de la duración promedio de incubación, en diversos lugares. Por ejemplo, en Oaxaca, México, particularmente en la playa San Juan Chacahua donde anidan poblaciones de tortugas laúd, oliváceas y verdes; así como también en sitios más retirados del mundo como las playas de Sugözü, en la costa Mediterránea de Turquía, y las islas Piai y Sayang en Papúa Occidental, Indonesia, donde llegan a anidar colonias de tortugas verdes (de la Torre-Robles, et al., 2017; Tapilatu & Ballamu, 2015; Candan & Kolankaya, 2016).

Más sorprendente aún, Laloë y colaboradores (2016) demostraron que las proporciones de sexos primarias han estado históricamente sesgadas hacia las hembras para poblaciones de tortugas marinas verdes, carey y laúd, que anidan en la isla San Eustaquio al noreste del Caribe, y reportaron un porcentaje de entre el 85,9% y el 93,5% de hembras producido desde finales del siglo XIX. Así también, predijeron que con el aumento de las temperaturas de incubación (de hasta 34,2°C para el año 2090), la proporción de hembras será mayor al 95% para las tortugas carey después del año 2045, y para las tortugas laúd después del 2028.

No obstante, anteriormente ya se había predicho un gran sesgo femenino bajo un escenario extremo del cambio climático para el año 2070, en una población de tortugas verdes que anida al norte de la Gran Barrera de Coral (nGBR), Australia, que más tarde fue robustecido por otras predicciones realizadas frente a cuatro escenarios de emisiones de CO<sub>2</sub> (fig. 5) (Fuentes, et al., 2013; Blechschmidt, et al., 2020). E inclusive, desde la década de los 80's se hizo la advertencia de un posible sesgo feminizante masivo a raíz de un estudio donde se proyectó para el 2040, un gran aumento de crías hembra en poblaciones de tortugas verdes y laúd en la playa Krofajapasi, Suriname (Mrosofsky, 1984; Mrosofsky, et al., 1984).



**Figura 5. Predicciones de Blechschmidt, et al., 2020 sobre el tamaño promedio poblacional (a) y la proporción de hembras adultas (b) de la tortuga verde, *C. mydas*, del norte de la Gran Barrera de Coral (nGBR), bajo la simulación del cambio climático en cuatro escenarios distintos relacionados a las emisiones de CO<sub>2</sub>. El modelo de cambio climático comprende el periodo**

abarcado de 1800-2500. La intensidad del color de las líneas representa la proporción de poblaciones sobrevivientes y las áreas sombreadas indican la desviación estándar entre las réplicas. Las líneas grises verticales indican el año en que se utilizaron datos meteorológicos (1883) y predicciones sobre la temperatura (2020). Note el efecto del cambio climático en el aumento de la proporción de hembras a partir del año 1900 (Fig. 5b).

A pesar de que las proporciones de sexos primarias que se han proyectado a futuro apuntan al riesgo de extinción de poblaciones de tortugas marinas, se espera que éstas puedan adaptarse conductualmente a la elevación de la temperatura del aire, ya sea mostrando cambios fenológicos y/o espaciales, es decir, retrasando o adelantando la temporada de anidación o bien, moviéndose a otras áreas más frías (Steward & Dutton, 2014; Santidrián & Spotila, 2020; Valenzuela, et al., 2019). Así también, se cree que la falta de tortugas macho podría no comprometer la supervivencia de las poblaciones dado que ellos pueden reproducirse con más de una hembra durante la temporada de anidación (poliginandria) y, además, porque las hembras tienen la capacidad de almacenar espermatozoides viables en sus oviductos durante largos períodos de tiempo; de esta forma, el esperma de un solo macho puede servir para fertilizar múltiples nidadas. Sin embargo, esto resultaría en una menor diversidad genética entre los descendientes, en comparación a lo que se espera de una paternidad múltiple (Laloë, et al., 2016; Pearse & Avise, 2001).

Otra de las razones por las que se ha restado preocupación al sesgo feminizante masivo es porque se han encontrado proporciones de sexos operativas (OSR<sup>1314</sup>, por sus siglas en inglés) equilibradas. Por ejemplo, para una población de tortugas verdes de Taiwán, se reportó una proporción de crías hembras del 74% lo que se tradujo en una OSR del 58,7%. Sin embargo, en otras poblaciones con proporciones de sexos secundarias altamente sesgadas hacia las hembras, las OSRs no se logran equilibrar (Laloë, et al., 2016; Hays, et al., 2014).

Por otro lado, se ha considerado al sesgo femenino en las proporciones de sexos más como una ventaja para el cambio climático que un efecto negativo, puesto que, al producirse una mayor proporción de hembras, puede incrementar el número de nidadas puestas en una temporada, lo que se traduciría como un aumento de la tasa natural de la población (Laloë, et al., 2016; Tapilatu, et al., 2015). Esta idea es soportada por el supuesto de que, durante la gran extinción que sucedió entre el Cretácico y Paleógeno, en Hell Creek, Montana, EE. UU., la TSD pudo haber

---

<sup>13</sup> Operational Sex Ratio.

<sup>14</sup> Proporción de machos y hembras disponibles para el apareamiento en un momento determinado.

permitido que las especies vulnerables al cambio climático sobrevivieran bajo condiciones climáticas perjudiciales, con la producción de hembras (Santidrián & Spotila, 2020).

Adicionalmente, se ha propuesto que la TSD y las tolerancias térmicas pueden seguir un modelo de coadaptación, bajo el cual las hembras comenzarán a ser producidas a temperaturas más altas a medida que aumenta la tolerancia térmica de una población (Schwanz, et al., 2010; Santidrián & Spotila, 2020). Sin embargo, aunque se puede hablar de una adaptación se debe considerar que la tasa del cambio climático es mucho mayor en la actualidad, por lo que los investigadores se plantean si la selección natural puede actuar lo suficientemente rápido como para que las tortugas marinas, así como otras especies que dependen de las condiciones ambientales para la incubación de sus huevos, logren adaptarse a tiempo a los cambios en su entorno (Santidrián & Spotila, 2020; de la Torre-Robles, et al., 2017).

## **1.4. Métodos de sexado de crías de tortuga marina**

En vista de los sesgos femeninos relacionados al cambio climático global que han sido reportados para diferentes poblaciones naturales en múltiples sitios de anidación, los programas de conservación han centrado sus esfuerzos en estudiar la dinámica poblacional actual y futura de las tortugas marinas con ayuda, en parte, del conocimiento que se tiene sobre las proporciones de sexos de las crías, esto con el fin de estimar la viabilidad de las poblaciones a corto y largo plazo (Gross, et al., 1995; Kaska, et al., 2006). No obstante, dichos esfuerzos se han visto obstaculizados por los métodos descritos para el sexado de crías de tortuga. Hoy en día son pocos los que han logrado determinar con un alto grado de precisión las proporciones primarias de sexos. Sin embargo, siguen manteniendo inconsistencias en sus metodologías o bien son métodos invasivos, que incluso pueden requerir de la eutanasia de las crías (Gross, et al., 1995; Rostal, et al., 1994; Girondot, et al., 2004).

### **1.4.1. Métodos indirectos de sexado**

Con frecuencia las proporciones de sexos para nidadas o sitios completos de anidación se estiman de manera indirecta, ya sea a través de la medición de la temperatura de los nidos durante el segundo tercio del período de incubación (Wyneken, et al., 2007; Kaska, et al., 2006); como también, por medio de la duración

de incubación (duración desde la puesta de los huevos hasta la emergencia de las crías), donde una duración promedio corta se asocia con la producción de hembras, que desde luego, si se coloca por debajo de la duración pivotal de incubación obtenida de un laboratorio, se podría hablar de un sesgo hacia las hembras (Godley, et al., 2001). Este sesgo femenino también se puede lograr detectar siempre que la temperatura de incubación promedio registrada se ubique entre la temperatura pivotal y el límite superior del TRT (Wibbels, 2003).

Los estudios que se basan en la medición de la temperatura de incubación pueden incluir una cobertura espacio-temporal limitada (Wyneken, et al., 2007), ya que a menudo no es posible monitorear la temperatura de todos los nidos, y entonces recurren a utilizar subconjuntos de huevos para las estimaciones de proporciones de sexos. Sin embargo, el problema radica en que, la muestra implicada debe ser representativa de la diversidad y abundancia de las ubicaciones de los nidos en la playa de anidación. Además, en los estudios se debe considerar la variación temporal (i.e. diferencias anuales o estacionales en cuanto a patrones de precipitación y temperatura del aire) que puede llegar a influir en la proporción de sexos durante toda la temporada de anidación o bien, las temporadas de anidación en caso de que se trate de un estudio multianual (Wibbels, 2003; Tapilatu, et al., 2015).

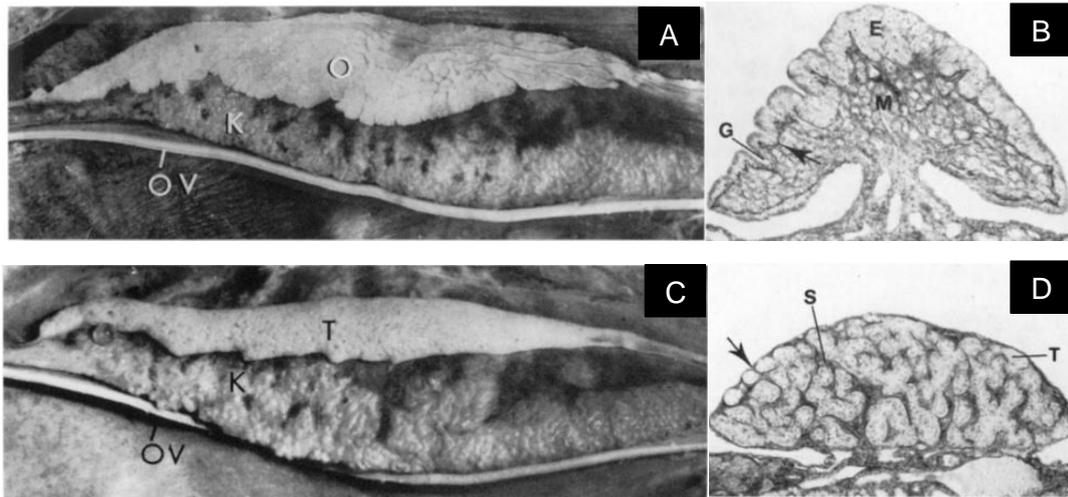
#### **1.4.2. Métodos directos de sexado**

Estudios morfométricos como los realizados en tortugas adultas no son los más adecuados, dado que las crías y también los juveniles inmaduros no son sexualmente dimórficos sino hasta la etapa adulta (Xia, et al., 2011; Wibbels, 2003; Hernández, et al., 2009; Sönmez, et al., 2019; Gross, et al., 1995). Sin embargo, algunos autores han informado que, en efecto, las crías de tortugas pueden distinguirse de machos y hembras a partir de su morfología externa, como lo demostraron Valenzuela, et al. (2014), quienes determinaron el sexo para dos especies, *Chrysemys picta* y *Podocnemis expansa*, con una precisión del 98% y 90%, respectivamente. Ellos observaron que existe un dimorfismo sexual muy sutil en las crías de tortugas, en términos de la expansión de la región anal del caparazón y de la región vertebral central. Desafortunadamente, este es uno de pocos estudios que lograron determinar el sexo de manera exitosa basándose en características como la forma y tamaño del caparazón, siendo esta última, una característica que varía en función de la condición

nutricional (Xia, et al., 2011, Kircher & Wyneken, 2017; Lubiana & Ferreira, 2009; Zhang, et al., 1995; Bjorndal, 1985; Sönmez, et al., 2019).

La histología de las gónadas, por su parte, es considerada como el método más preciso para la determinación del sexo (Wibbels, 2003; Hamann, et al., 2010). En términos generales, el proceso consiste en la extracción y fijación de las gónadas junto con los riñones, que luego son embebidos en parafina, y seccionados en serie (grosor del corte de 6-10 mm), para finalmente ser teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) o con hematoxilina y la reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS), que se presume da mejores resultados en términos de la delimitación del epitelio germinal (Yntema & Mrosovsky, 1980; Sönmez, et a., 2019; Wyneken, et al., 2007; Mrosovsky & Benabib, 1990; Xia, et al., 2011). El sexo se determina mediante un examen microscópico de las secciones de la gónada, aunque también se han realizado estudios de la morfología macroscópica de ésta, en los cuales, se puede apreciar la superficie ventral rugosa de los ovarios, y su gran tamaño respecto al de los testículos (fig. 6A y C) (Wibbels, 2003; Yntema & Mrosovsky, 1980). Por ejemplo, Mrosovsky & Benabib (1990), usaron una solución de glicerina al 5%, para volver completamente transparentes las gónadas de crías de tortuga boba (*C. caretta*) y laúd (*D. coriacea*), y así determinar su sexo, pero desafortunadamente, hubo un fallo en la detección de las características masculinas.

Los cortes histológicos ofrecen una mejor visualización de las diferencias: el ovario se caracteriza por un epitelio germinal grueso en la superficie ventral, que se encuentra delimitado de la médula por la túnica albugínea, la cual se tiñe con hematoxilina-eosina o la reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS) (fig. 6B); en cuanto a las preparaciones histológicas de los testículos, se detecta el epitelio escamoso simple y debajo de esta delgada capa, descansa la túnica albugínea (fig. 6D) (Yntema & Mrosovsky, 1980; Wyneken, et al., 2007; Wibbels, 2003). Además, se observa que los cordones primarios han formado túbulos seminíferos inmaduros con diámetros que son de dos a cuatro veces los de los cordones primarios retrógrados de la hembra (ver fig. 6D) (Yntema & Mrosovsky, 1980).



**Figura 6. Gónadas de crías de tortuga boba (*Caretta caretta*) incubadas a 32°C (A y B) y 28°C (C y D). [Imagen modificada de Yntema & Mrosovsky, 1980]. A. Se muestra el ovario derecho en vista ventral donde se pueden apreciar el borde lateral dentado y los surcos en la superficie ventral. El oviducto (OV) corre en paralelo al riñón (K) y el ovario (O). Objetivo 16X. B. Microfotografía del ovario izquierdo del mismo individuo de la figura 6A. El mesovario une la superficie ventral del ovario con el riñón subyacente. Se indica: 1) el grosor del epitelio germinal ventral (E), 2) la superficie con surcos y las invaginaciones del epitelio germinal (G), 3) la túnica albugínea positiva a PAS, la cual limita el epitelio germinal cortical (flecha de color negro), y 4) los pequeños y múltiples cordones sexuales primarios en la médula (M). Tinción PAS-Hematoxilina. Objetivo 100x. C. Se muestra en vista ventral el testículo derecho (T). El borde lateral dentado es menos evidente que en el ovario (fig. 7A) y no hay surcos en la superficie, pero sí pequeñas áreas diferenciadas. Objetivo 16X. D. Microfotografía del testículo izquierdo del mismo individuo de la figura 6C. Se indica: 1) la delgada túnica albugínea que está cubierta por una fina capa de epitelio (flecha de color negro) y 2) los túbulos seminíferos (T) que están embebidos en un estroma positivo a PAS (S). Tinción PAS-Hematoxilina. Objetivo 100x. Note la diferencia en tamaño del ovario y el testículo (fig. 6A y C)].**

Ahora, estos dos últimos métodos revisados (histología gonadal y método de la glicerina) no son recomendables, ya que necesariamente tienen que sacrificar a las crías (Hamann et al. 2010; Mrosovsky & Benabib, 1990). Y a pesar de que la histología gonadal puede ofrecer una gran precisión en la determinación sexual, lo ideal sería probar un método que sea mínimamente invasivo (Xia, et al., 2011; Hamann et al. 2010; Kircher & Wyneken, 2017). El examen laparoscópico puede ser una alternativa ya que se ha demostrado que tiene un grado de precisión similar (97%) al del examen histológico de la gónada (Wyneken, et al., 2007). En las imágenes laparoscópicas, se puede observar que los ovarios son flexibles y se pliegan sobre sí mismos (fig. 8B); mientras que los testículos, que son de menor tamaño, tienden a ser fusiformes y compactos (fig. 8A). Otro rasgo distintivo es visto en las hembras, quienes poseen conductos paramesonéfricos grandes y móviles con un lumen completo a diferencia de los machos (fig. 8B) (Wyneken, et al., 2007).

Aunque el examen laparoscópico es un método confiable, presenta algunas deficiencias como las que se mencionan a continuación: 1) las tortugas deben ser criadas hasta que consigan un tamaño (85-88 mm SCL) y masa (120 g) adecuados para una laparoscopia segura; 2) su crianza durante varios meses (e.g. 2,5 a 6 meses) implica altos costos; 3) puede haber problemas postoperatorios como flotabilidad anormal o sobredistensión del celoma, que son atribuidos al uso de gas comprimido y solución de lactato Ringer, respectivamente; 4) requiere entrenamiento quirúrgico; 5) realizar el procedimiento en campo es complicado; y 6) la anestesia local/general puede volver al método invasivo (Wyneken, et al., 2007; Hernandez, et al., 2009; Wibbels, 2003).



Figura 7. Examen laparoscópico a un individuo de la especie de tortuga *Cuora flavomarginata* [Imagen recuperada de Hernandez-Divers, et al., 2009].

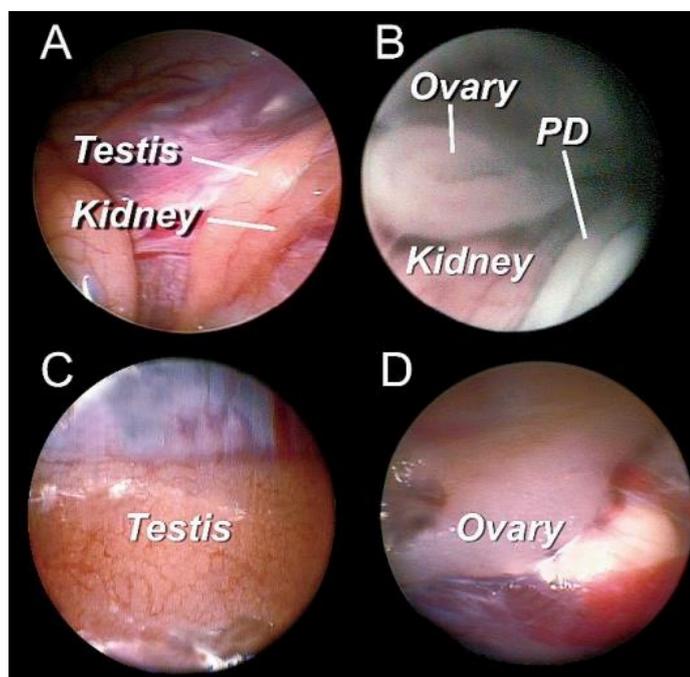


Figura 8. Imágenes de un procedimiento laparoscópico a crías de la tortuga boba (*Caretta caretta*). [Imagen recuperada de Wyneken, et al., 2007]. A. Testículo fusiforme normal adherido

a la pared celómica, que está recubriendo el riñón. B. Ovario derecho inmaduro que se encuentra plegado y que posee, lateralmente, un gran conducto paramesonérfico (PD) móvil. C. Acercamiento al testículo donde se observa la superficie con una apariencia reticulada a causa de la diferenciación activa de los túbulos seminíferos. D. Acercamiento al ovario con superficie lisa, pero compuesta de pequeñas células corticales que le dan una apariencia granular. Las gónadas tienen una longitud aproximada de 1,7 cm.

Otro método ha sido a partir de la elaboración de perfiles hormonales por radioinmunoensayo (RIA) del líquido corioalantoideo/amniótico (CAF) presente en la cáscara del huevo y de la sangre, en los cuales, se ha visto que la proporción de testosterona (T) respecto al estradiol-17 $\beta$  (E) brinda un índice confiable (96% de precisión) para la distinción entre sexos. En las crías hembra, la proporción E:T promedio es significativamente mayor que en los machos (Gross, et al., 1995; Xia, et al., 2011). Cabe mencionar que los radioinmunoanálisis en sangre pueden ser letales para las crías de tortuga pues se necesita remover un volumen importante de sangre para que se pueda detectar la presencia de hormonas que están a bajas concentraciones en el plasma (Wyneken, et al., 2007; Owens, 1999; Owens, et al., 1978; Gross, et al., 1995). En cuanto a los análisis del líquido corioalantoideo/amniótico (CAF), estos resultan ser un método no invasivo, pero que, sin embargo, no es práctico debido a que requiere un manejo *a priori* de los huevos para evitar su contaminación y, además, para obtener suficiente CAF (Tezak, et al., 2020; Gross, et al., 1995; Xia, et al., 2011).

Por otro lado, Tezak y colaboradores (2020) encontraron que la hormona anti-mülleriana (AMH) puede servir como rasgo diagnóstico para identificar a las crías de tortugas como machos (90% de confiabilidad). Sin embargo, las limitantes de este método incluyen: las variaciones respecto al tiempo en que tarda el conducto paramesonérfico (PD) en degenerarse por completo, volviendo impredecible al método, en el sentido de que, no se sabe con exactitud cuál es el tiempo post-eclosión máximo para que continúe siendo 100% preciso; y la expresión inusual de la AMH, que podría conducir a la formación de un lumen incompleto en las crías hembra, lo que a su vez llevaría a una identificación errónea del sexo.

Pese a los diferentes métodos que se han aplicado para estimar las proporciones primarias de sexos en tortugas marinas aún no se ha establecido un método no letal y confiable que pueda ser extrapolado a estudios de campo (Hamann, et al., 2010).

## 1.5. *Splicing* alternativo dependiente de la temperatura en *JARID2* y su función como represor transcripcional

*JARID2* es un miembro perteneciente a la familia *Jumonji* reconocidos por ser reguladores epigenéticos que presentan funciones relacionadas al desarrollo y que se caracterizan por tener dominios de unión a DNA ricos en AT (ARID), además de su actividad histona desmetilasa (a excepción de *Jarid2* que no la posee) (da Rocha, et al., 2014; Sanulli, et al., 2015; Deveson, et al., 2017). Al igual que *KDM6B* (o también conocido como *JMJD3*), otro integrante de esta familia, *JARID2* exhibe *splicing* alternativo dependiente de la temperatura (Deveson, et al., 2017). En un estudio previo hecho en el laboratorio, se realizaron análisis de RNA-seq en cuatro tejidos (cerebro, hígado, mesonefros y gónada) de embriones de *L. olivacea*, encontrándose que la forma canónica de *JARID2* conformada únicamente por exones, que da lugar a una proteína completa, se expresa mucho más a 33°C (temperatura que produce hembras), especialmente en las etapas 23-25 del desarrollo embrionario, mientras que a una temperatura de 26°C (temperatura que produce machos) se sobre expresa la otra isoforma (truncada) de *JARID2* que retiene un intrón, el cual contiene un codón de paro prematuro que produce una proteína truncada carente de los tres últimos exones y también de un dominio de unión a DNA con dedos de zinc (fig. 9). Los análisis de Western blot corroboraron que, en efecto, la proteína *Jarid2* está presente en altos niveles a 33°C durante las etapas embrionarias 25 y 26 que incluyen el TSP (fig. 10).

Nuevamente, basado en este trabajo, se encontró que *JARID2* puede responder rápidamente a cambios repentinos en la temperatura de incubación. Interesantemente, las variantes de *splicing* alternativo de *JARID2* mostraron una preferencia a una temperatura en particular: la isoforma truncada se adaptó enseguida (2h después) a la transición de 33° a 26°C a partir de la etapa 23 del desarrollo embrionario; por su parte, la isoforma completa lo hizo, pero a un cambio de temperatura de 26° a 33°C.

Se sabe que *JARID2* es un represor transcripcional que interactúa con ciertos RNAs largos no codificantes (lncRNA) a través de un sitio de unión a RNA denominado como RBR (residuos 332-358) (da Rocha, et al., 2014; Kaneko, et al., 2014). Estos lncRNA (eg. *Meg3*, *Xist*) funcionan como andamio para las interacciones entre la proteína *Jarid2* y el complejo represivo *Polycomb 2* (*PRC2*); por consiguiente,

contribuyendo al reclutamiento y ensamblaje de PRC2 a la cromatina. Como resultado de las interacciones RNA-proteína, Jarid2 se une al componente catalítico de PCR2, Ezh2, y estimula su actividad de histona metiltransferasa, de modo que, en los genes diana de Jarid2 se encarga de la tri-metilación de lisina 27 en la histona H3 (modificación epigenética H3K27me3), lo que induce el silenciamiento transcripcional de la cromatina (da Rocha, et al., 2014; Kaneko, et al., 2014; Deveson, et al., 2017). De esta manera se ha descubierto que Jarid2 es metilado por el mismo PCR2 en la lisina 116 ubicada en el extremo N-terminal de la proteína (Jarid2-K116). La metilación de Jarid2 reconocida por Eed (uno de los componentes de PCR2), aunque se ha visto que es prescindible para el reclutamiento de PCR2, sí tiene un efecto importante en lo que respecta a mejorar la eficiencia de la deposición de H3K27me3 por parte de PCR2. Adicionalmente, se ha visto que H3K27me3 también puede unirse a Eed y promover la activación alostérica de la actividad enzimática de PCR2, en modo de retroalimentación positiva. Por lo tanto, Jarid2 podría servir como un mecanismo alternativo en los casos en que, PCR2 se dirija a sitios de la cromatina desprovistos de H3K27me3 (Sanulli, et al., 2015).

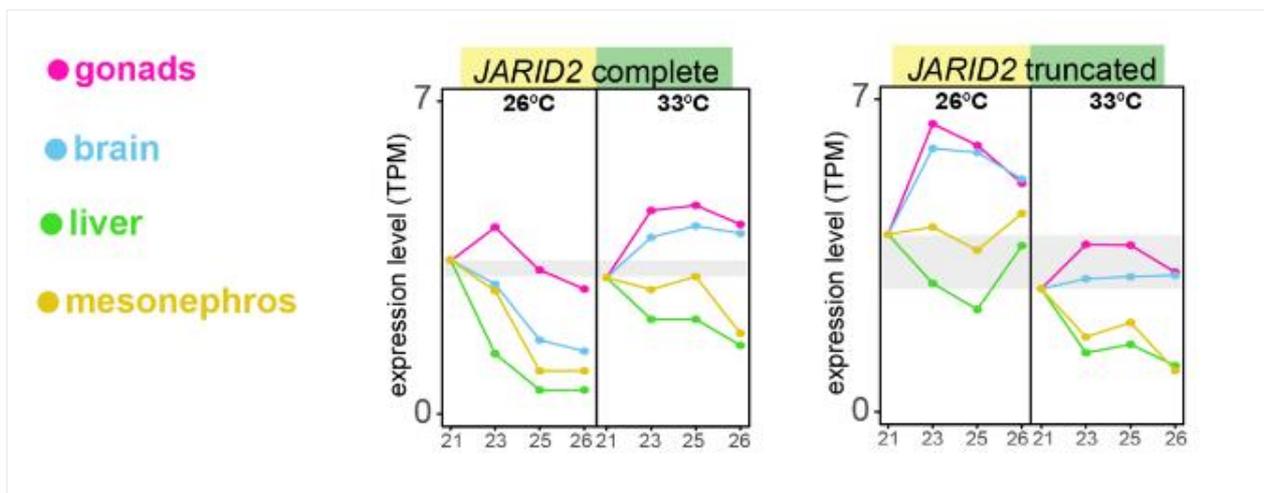


Figura 9. Niveles de expresión de las isoformas truncada y completa de *JARID2* en tejidos de embriones (cerebro, hígado, mesonefros y gónada) de *L. olivacea* bajo temperaturas de incubación de 33 y 26°C. En el eje “X” se encuentran las etapas del desarrollo embrionario que coinciden con el periodo termosensible de esta especie (etapa 23-26) y, por su parte, el eje “Y” corresponde al nivel de expresión expresado en valores TPM (transcritos por millón). Note que la isoforma completa se expresa más a una temperatura de incubación de 33°C en las etapas 23-26; mientras que, la truncada lo hace a una temperatura de incubación de 26°C.

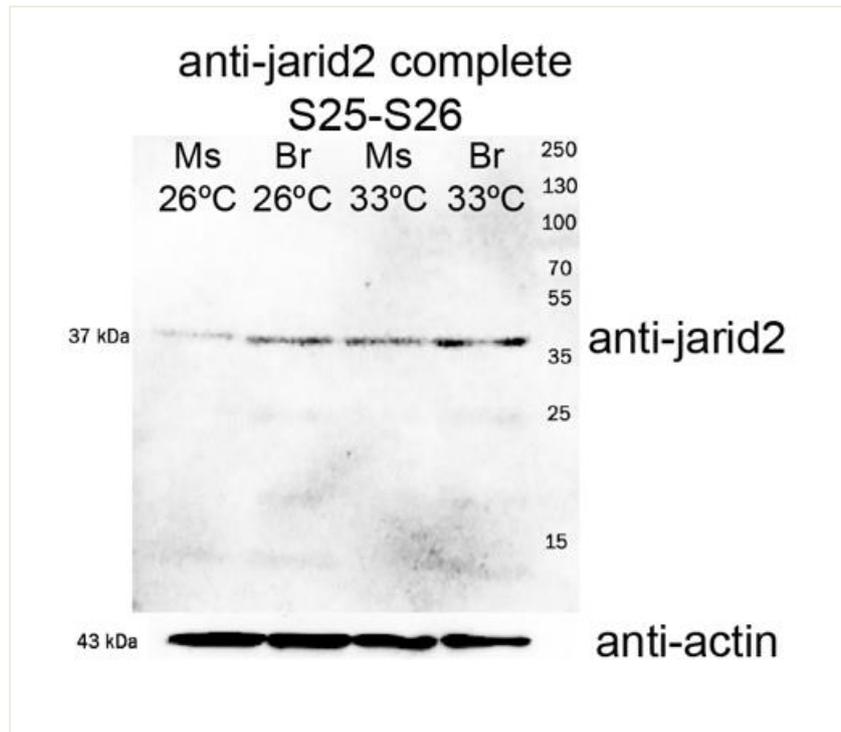


Figura 10. Análisis Western blot de un anticuerpo anti-jarid2 contra la isoforma completa de *JARID2* (37 kDa) utilizando extractos proteicos de mesonefros y cerebro de *L. olivacea* en las etapas 25 y 26 del desarrollo embrionario. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra la proteína actina (43 kDa). Se observa un mayor nivel de expresión de la proteína Jarid2 a 33°C, pero la diferencia no es muy remarcada.

## 2. Justificación



Los cambios proyectados en el sistema climático han señalado un incremento progresivo de la temperatura global, estimando un aumento mínimo de 1,5°C para finales del siglo XXI (2081-2100) (IPCC, 2014). A pesar de que el cambio no parece ser radical, se prevé que afectará a muchas especies, en particular, a aquellas con TSD (Fuentes & Porter, 2013; Donelson & Munday, 2015; Schwanz, et al., 2010; Valenzuela, et al., 2019). Entre estas especies se encuentran las tortugas marinas, que a temperaturas cálidas producen hembras y a temperaturas frías dan lugar a machos (Morreale, et al., 1982; Standora & Spotila, 1985; Santidrián & Spotila, 2020). Estos organismos han puesto en alerta a los científicos, ya que durante varias décadas se han registrado proporciones de sexos sesgadas hacia las hembras (Mrosovsky & Provancha, 1992; Godfrey, et al., 1996; Broderick, et al., 2000; Santidrián, et al., 2014; Laloë, et al., 2016). La preocupación concerniente al sesgo femenino se debe a que las bajas proporciones de crías macho observadas en las poblaciones naturales podrían agravar, en gran medida, su estado de riesgo de extinción (Schwanz, et al., 2010; Donelson & Munday, 2015; Hawkes, et al., 2007; Valenzuela, et al., 2019; Blechschmidt, et al., 2020).

Hasta el momento, investigaciones dirigidas a conocer más sobre la relación que hay entre el cambio climático y el sesgo feminizante se han visto obstaculizadas por métodos de estimación del sexo de las crías de tortuga que en su mayoría son invasivos, imprecisos, costosos y/o poco eficientes (Tezak, et al., 2020; Gross, et al., 1995; Sönmez, et al., 2019; Wibbels, 2003; Mrosovsky & Benabib, 1990; Hamann et al. 2010; Hernandez, et al., 2009; Owens, 1999; Owens, et al., 1978; Xia, et al., 2011; Kaska, et al., 2006; Valenzuela, et al., 2004; Rostal, et al., 1994; Girondot, et al., 2004). El método que proponemos consiste en usar parejas de cebadores específicos de las variantes de splicing alternativo de *JARID2*. La abundancia relativa diferencial de las isoformas (completa y truncada) permitiría determinar el sexo de las crías de *L. olivacea*. Cabe destacar que los análisis se harán con muestras de tejido de caparazón (3mm<sup>2</sup>), un método no invasivo, y usando PCRs que es una técnica relativamente económica y sencilla (Garibyan & Avashia, 2013; Valentini & Pompa, 2016). Dadas estas características ventajosas, se podría considerar el uso del

protocolo en estudios a gran escala de poblaciones naturales de tortugas marinas, para estimar de manera confiable y sin riesgos implicados, las proporciones de sexos en nidos completos.

### 3. Objetivo General



Determinar el sexo de crías de *L. olivacea* a partir de muestras de caparazón usando parejas de cebadores específicos de las isoformas (completa y truncada) del gen *JARID2*.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- 1) Diseñar cebadores específicos de las variantes de *splicing* alternativo dependiente de la temperatura del gen *JARID2* para distinguir muestras correspondientes a huevos incubados a 33°C (FPT) y a 26°C (MPT).
- 2) Trabajar con DNA genómico y RNA de caparazón para realizar los experimentos de PCR.
- 3) Poner a punto la reacción de PCR y comparar las amplificaciones obtenidas para las dos isoformas de *JARID2* en las muestras de machos y hembras.
- 4) Hacer experimentos de competencia en la PCR para determinar qué isoforma es la más abundante (mayor amplificación).

### 4. Hipótesis



Los cebadores específicos de las dos isoformas del gen *JARID2* nos permitirán distinguir machos de hembras usando RNA de caparazón de crías de *L. olivacea*. La sobreexpresión de la isoforma completa será evidente en muestras correspondientes a una temperatura de incubación de 33°C (FPT), mientras que a una temperatura de incubación de 26°C (MPT) la isoforma truncada será más abundante. Por lo tanto, la amplificación relativa de las dos isoformas establecerá el fenotipo, macho o hembra, del individuo.

## 5. Metodología



### 5.1. Material biológico

En este estudio se trabajó con huevos de *L. olivacea*, que fueron colectados por el personal del Museo de la tortuga ubicado en Mazunte, Oaxaca, México, bajo el permiso SGPA/DGVS/05249/06 otorgado por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General para Vida Silvestre, SEMARNAT. Posterior a la colecta, los huevos de tortuga marina fueron transportados en menos de 24 horas al laboratorio del Dr. Horacio Merchant que se ubica en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en la Ciudad de México, con el debido cuidado, utilizando cajas de poliestireno que contenían vermiculita húmeda estéril para su adecuada transportación. Tras ser recibidos en el laboratorio, los huevos fueron traspasados a cajas de plástico y cubiertos con una capa nueva de vermiculita estéril. Después, una proporción de los huevos se incubó a temperaturas que producen machos (MPT) (26°C), y el resto a temperaturas que producen hembras (FPT) (33°C). Una vez que eclosionaron, a las crías se les retiró un fragmento de 3 mm<sup>2</sup> de caparazón, específicamente en la región trasera, con ayuda de unas pinzas estériles de metal, para después realizar la extracción de RNA. Luego del procedimiento, las crías fueron llevadas de vuelta a Oaxaca, y liberadas en su hábitat natural.

Otro conjunto de huevos fue también incubado a MPT (26°C) y FPT (33°C), pero contrario al primer conjunto, se practicó la eutanasia entre las etapas 25 y 26 del desarrollo embrionario. A los embriones se les extrajeron tejidos de cerebro, hígado y mesonefros, utilizando pinzas y tijeras de disección previamente esterilizadas, y luego fueron colocados en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml para ser almacenados a -80°C hasta su transportación.

### 5.2. Extracción de RNA de caparazón de crías de *L. olivacea*

La extracción de RNA del tejido de caparazón previamente extraído de las crías de tortuga golfina se realizó en el laboratorio del Dr. Horacio Merchant-Larios del Instituto

de Investigaciones Biomédicas, UNAM, siguiendo las instrucciones del proveedor del reactivo TRIzol™ (Invitrogen™ 15596026).

El tejido de caparazón fue enseguida homogeneizado mecánicamente con el mortero y pistilo estériles. Tanto el tejido como el mortero y pistilo se enfriaron utilizando nitrógeno líquido. El tejido se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregó 1 ml del reactivo TRIzol™. Esto se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas. Después, se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló por vórtex durante 20 segundos, y se tapó el tubo de manera segura, dejando incubar a 3 minutos, nuevamente a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada por 15 minutos a 12,000 g a 4°C, y al término, se transfirió la fase superior acuosa e incolora que contenía el RNA a un tubo nuevo.

Dado que la muestra inicial era muy pequeña, se añadieron 0.5 µg de glucógeno libre de RNasa para que funcionara como transportador. Así también, se añadieron 500 µl de isopropanol, se invirtió el tubo 6 veces y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 g a 4°C, y se descartó el sobrenadante con una micropipeta, dejando únicamente el pellet que contenía el precipitado de RNA total. Más adelante, se resuspendió el pellet obtenido en 1 ml de etanol al 75%, y la muestra se llevó al vórtex para mezclar durante unos segundos, y luego se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó con una micropipeta, y el pellet de RNA se dejó secar al aire durante 10 minutos. El nuevo pellet fue resuspendido en 20 µl de agua libre de RNasa, pipeteando suavemente de arriba hacia abajo. Finalmente, se incubó la muestra en un bloque térmico a 60°C durante 15 minutos.

Los aislados de RNA de tejido de caparazón fueron transportados en hielo seco junto con los órganos que habían sido previamente extraídos de embriones, y enviados al laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM, ubicado en Cuernavaca, Morelos, para su manejo, bajo la asesoría del Dr. Diego Cortez. Las muestras, al ser recibidas, fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

En total, se recibieron 20 muestras de RNA correspondientes al tejido de caparazón de diez machos y diez hembras, que habían sido incubados a temperaturas de 26° y 33°C, respectivamente. Así también, se recibieron 13 muestras de tejidos de embriones incubados a ambas temperaturas (26 y 33°C); de las cuales,

dos correspondían a tejidos de cerebro, diez a hígado y otras dos a tejidos de mesonefros.

La concentración y pureza del RNA proveniente del tejido de caparazón fue medida por absorbancia en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific™). El cociente de las absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  con un valor de entre 2.0-2.2, indicó que el RNA contaba con una pureza óptima; mientras que, valores mayores a 1.7 determinaron que el RNA tenía una pureza aceptable (*Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*, 2020).

### **5.3. Extracción de DNA genómico proveniente de tejidos embrionarios de *L. olivacea***

El DNA genómico fue extraído de tejidos de cerebro, hígado y mesonefros que provenían de embriones en distintas etapas de desarrollo (ver tabla no.1) utilizando el kit comercial ZR Genomic DNA™-Tissue MiniPrep de ZYMO RESEARCH™ (D3051). Se siguieron las instrucciones del manual del fabricante del producto.

Los tejidos que se encontraban en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml fueron primero descongelados en hielo a 4°C. A cada muestra se le añadieron 95 µl de agua Milli-Q, 95 µl de Buffer de digestión (2X) y 10 µl de Proteinasa K, dejándose incubar a 55°C durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se añadieron 700 µl de Buffer de lisis genómico y se mezcló utilizando el vórtex, para luego centrifugar a 10,000 g durante 1 minuto. El sobrenadante se transfirió a una columna IIC Zymo-spin™ en un tubo colector y nuevamente se centrifugó a 10,000 g durante 1 minuto. El tubo colector fue cambiado por uno nuevo y se añadieron 200 µl de Buffer de prelavado de DNA a la columna, centrifugando, posteriormente, a 10,000 g durante 1 minuto. Paso seguido, se volvió a cambiar el tubo colector por uno nuevo y, esta vez, se añadieron 400 µl de Buffer de lavado de g-DNA a la columna para después centrifugar a 10,000 g durante 1 minuto. La columna se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml, y se añadieron 30 µl de Buffer de elución de DNA a la columna. La muestra fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente (~25°C) y después se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos para lograr eluir el DNA.

Finalmente, se cuantificó el DNA, estimando la absorbancia (A) a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific™). Y también, se determinó la pureza de éste, nuevamente por espectrofotometría, obteniendo el cociente de las

absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  (las proteínas absorben a 280 nm). Valores de entre 1.8 y 2.0, indicaron que el material genético presentaba una pureza óptima (López, et al., 2011; *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*, 2020).

El tubo de 1.5 ml que contenía el DNA fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

**Tabla no. 1. Características de los tejidos embrionarios utilizados para la extracción de DNA genómico.**

<b>Órgano de procedencia del tejido</b>	<b>Temperatura de incubación</b>	<b>Etapas embrionaria</b>	<b>Días de incubación</b>
<b>Mesonefros</b>	26°C	E25	36 d
<b>Mesonefros</b>	33°C	E26	30 d
<b>Hígado</b>	26°C	E26	47 d
<b>Hígado</b>	33°C	E26	30 d
<b>Cerebro</b>	26°C	E25	36 d
<b>Cerebro</b>	33°C	E26	30 d

#### **5.4. Verificación de la integridad del DNA genómico por electroforesis en geles de agarosa**

Una vez obtenidos los valores de la cuantificación y pureza de cada una de las muestras de DNA genómico, se procedió a verificar la integridad del material genético para los análisis subsecuentes. La verificación se realizó llevando a cabo diferentes electroforesis convencionales en geles de agarosa al 1,5% que habían sido teñidos con 2  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Se utilizaron aproximadamente 300 ng para cada una de las muestras de DNA genómico provenientes de tejido de cerebro e hígado y alrededor de 2000 ng para cada muestra de tejido de mesonefros. En cuanto a las muestras de RNA, no se verificó su integridad debido a que se contaba con muy poco material genético, el cual sería requerido en otros métodos.

A cada muestra se le añadió 1/6 del volumen total de la misma de colorante

de carga de DNA 6X (Thermo Scientific™ R0611) y, posteriormente, se cargaron en los pozos de los geles que se encontraban en una solución de TBE 1X en el equipo Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-RAD). Asimismo, también se cargó 1.5 µl del marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific™ SM0243).

La electroforesis se desempeñó a 86 V durante 30 a 60 minutos. Al término, las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV para determinar su integridad. Los resultados de los geles fueron impresos en papel fotográfico.

## **5.5. Diseño de oligonucleótidos para las isoformas (completa y truncada) de *JARID2***

El diseño de oligonucleótidos específicos de las isoformas truncada y completa del gen *JARID2*, se realizó con el programa AmplifX versión 1.7.0.8, utilizando las secuencias de cada isoforma, que fueron obtenidas en un estudio previo realizado en laboratorio. Los oligonucleótidos forward se diseñaron de manera que alinearan en el exón 15, ya que es la última región que comparten ambas isoformas; permitiendo así, que pudieran ser utilizados para amplificar cualquiera de ellas. En la secuencia de la isoforma truncada se realizó la búsqueda de los oligonucleótidos forward dentro de un rango que abarcaba las 3715-3853 pb; mientras que, para la isoforma completa, se contempló la región de 3600-3730 pb. En cuanto a los oligonucleótidos reverse, éstos se diseñaron dependiendo de la isoforma a amplificar, pues para la truncada se planeó que alinearan en el intrón 15 abarcando los nucleótidos 3853-5113; y para la isoforma completa, que alinearan dentro de la región que comprenden los nucleótidos 3743-3918, correspondiente al exón 16 (fig. 11).

Los valores de los parámetros del software que fueron considerados para el diseño de los oligonucleótidos se mencionan a continuación: una longitud mínima del oligonucleótido de 18 pb y una máxima de 25 pb, una calidad mínima del oligonucleótido del 90%, una longitud mínima del fragmento amplificado de 80 pb y una máxima de 300 pb, y una diferencia máxima de cinco unidades en la  $T_m$  (temperatura de fusión). El porcentaje de GC para cada oligonucleótido fue obtenido a partir del programa SnapGene versión 6.0.5.0 (ver la tabla no. 2).

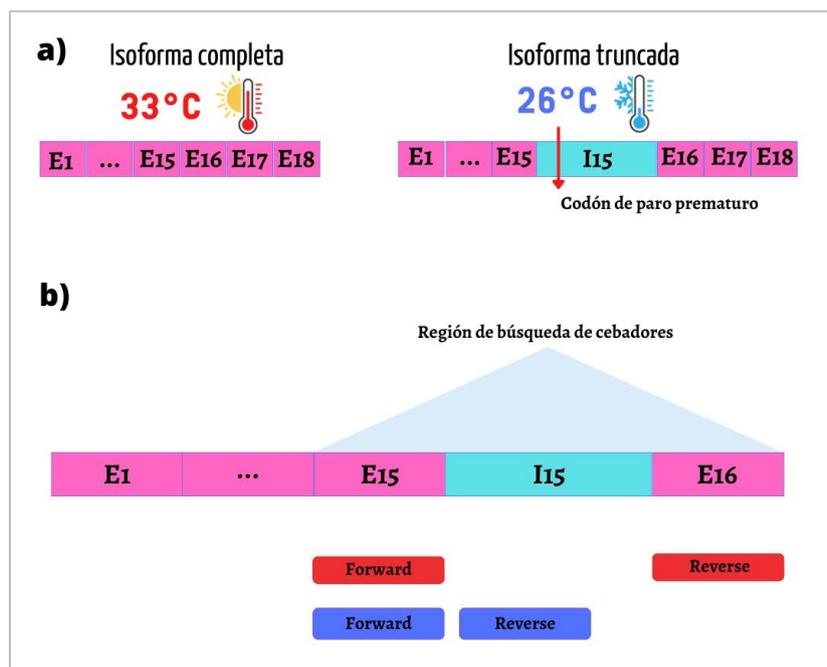
Con el programa bioinformático BLASTn (Basic Local Alignment and Search Tool), disponible en: <https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>, los oligonucleótidos se alinearon contra el genoma de la tortuga pintada (*Chrysemys picta bellii*) dado que

el genoma de *L. olivacea* no se encuentra disponible en la base de datos. Esto se hizo con el fin de seleccionar aquellos que tuvieron el menor número de hits posibles y que fueron superpuestos con *JARID2*, para luego hacer simulaciones de PCRs con las parejas de oligonucleótidos seleccionadas, y de esta forma, obtener la secuencia y el tamaño de sus amplicones. Asimismo, se obtuvieron las temperaturas de alineación para cada amplicón y se verificó que estas fueran similares.

Para corroborar que los oligonucleótidos amplificaran en la región deseada, se realizó el alineamiento de los amplicones y de las secuencias de las isoformas (truncada y completa) contra el genoma de la tortuga pintada, utilizando nuevamente el programa bioinformático BLASTn.

Con el apoyo de la alumna de doctorado, Mariela Tenorio, se diseñaron ocho oligonucleótidos; dos de ellos forward (F2 y F3) y los otros seis reverse (R133, R233, R333, R126, R226 y R326) (ver tabla no. 2). Con estos últimos oligonucleótidos, se formaron 12 parejas de cebadores en total (ver tabla no. 3).

Los oligonucleótidos diseñados se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt).



**Figura 11. *Splicing* alternativo dependiente de la temperatura en el gen *JARID2*. (a) Se muestra la estructura exón-intrón que conforma a las isoformas truncada y completa. La isoforma completa es más abundante a una temperatura de incubación de 33°C (FPT); mientras que la isoforma completa, lo es una temperatura de incubación de 26°C (MPT). Note que la isoforma completa está conformada únicamente por exones y, en cambio, la isoforma truncada retiene el intrón15, el cual contiene un codón de paro prematuro que se indica con una línea en color rojo que corta verticalmente al intrón. (b) La región de búsqueda de los cebadores se limitó a la**

estructura: exón15-intrón15-exón16. En color rojo se indican las regiones a partir de la cuales se diseñaron los cebadores específicos de la isoforma completa, y en color azul, aquellas donde fueron diseñados los cebadores específicos de la isoforma truncada.

**Tabla no. 2. Características de los oligonucleótidos diseñados.**

Nombre de la secuencia	Secuencia	T <sub>m</sub>	Longitud	Posición		Porcentaje GC
				Isoforma completa (33°C)	Isoforma truncada (26°C)	
<b>F2</b>	5'ATGAAGCGACGACGTATAGCCAA3'	60°C	23 pb	3605-3627	3715-3737	48%
<b>F3</b>	5' AAGGAAAATGGACCGACTCT3'	56°C	20 pb	3680-3699	3790-3809	45%
<b>R133</b>	5' CCATAGCGGGCTGAAGAA3'	56°C	18 pb	3781-3798		56%
<b>R233</b>	5'CGCTGCCTCAGTTCTGTGTC3'	60°C	20 pb	3734-3753		60%
<b>R333</b>	5'CAACCACTTTCGAGGCTTTT3'	56°C	20 pb	3837-3856		45%
<b>R126</b>	5'CGTGAAACAGACTCCTTGTCTGT3'	59°C	24 pb		3846-3869	46%
<b>R226</b>	5'ACACAGGGTACGTGAAACAGACTC3'	61°C	24 pb		3856-3879	50%
<b>R326</b>	5' ACAGCCAAGGAAGTTTCTTCT3'	56°C	21 pb		3979-3999	43%

**Tabla no. 3. Resultados de las longitudes de los amplicones en las simulaciones de PCR con las parejas de cebadores de *JARID2*.**

Parejas de amplificación	Secuencia objetivo	Longitud del fragmento amplificado
F2-R133	<b>Isoforma completa</b>	194 pb
F3-R133		119 pb
F2-R233		149 pb
F3-R233		74 pb
F2-R333		252 pb
F3-R333		177 pb
F2-R126	<b>Isoforma truncada</b>	155 pb
F3-R126		80 pb
F2-R226		165 pb
F3-R226		90 pb
F2-R326		285 pb
F3-R326		210 pb

## 5.6. Pruebas PCR de punto final con los oligonucleótidos diseñados en DNA genómico de tejidos embrionarios de *L. olivacea*

Con el motivo de generar una idea preliminar del comportamiento de alineación de los cebadores diseñados para amplificar las isoformas truncada y completa de *JARID2*, estos fueron puestos a prueba en DNA genómico; material genético que se sabe, es más estable que el RNA. El DNA utilizado provino de tejidos de mesonefros de embriones incubados a MPT (26°C) y FPT (33°C), y de tejido de cerebro de un embrión incubado a FPT (33°C).

Se prepararon alícuotas de los oligonucleótidos con una concentración de 5 uM/μL, así como también, alícuotas con una concentración de 100 ng/μl a partir del material de DNA genómico que fue extraído previamente de los tejidos embrionarios (mesonefros y cerebro).

Posteriormente, en tubos de PCR de 0.2 ml se agregaron 5 μl de H<sub>2</sub>O milli-Q, 1 μl de DNA genómico (100 ng), 10 μl de la mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion Flash 2X (Thermo Scientific™ F548S) y 2 μl de cada oligonucleótido (forward y reverse) para tener una concentración final de 0.5 μM en los 20 μl del volumen total de la reacción.

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar alguna de las dos isoformas (completa/truncada) fueron probados tanto en muestras de hembras como de machos.

A continuación, se realizó la prueba PCR de punto final en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Scientific™), con los ciclos de amplificación establecidos para el uso de la Phusion Master Mix;

1 ciclo	10 seg	98°C	Desnaturalización inicial
40 ciclos	1 seg	98°C	Desnaturalización
	5 seg	54°C	Hibridación
	15 seg	72°C	Extensión
1 ciclo	60 seg	72°C	Extensión final

Los viales que contenían los productos de amplificación fueron guardados a -20°C.

## 5.7. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se realizó la conversión de RNA a cDNA a partir de las 20 muestras de tejido de caparazón (10 de machos y 10 de hembras), en un ambiente de trabajo libre de RNAsas, con el kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific™ K1621), siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

Las muestras de RNA fueron descongeladas a 4°C para realizar alícuotas a una concentración de 1 ng/μl con el motivo de su estandarización. Paso seguido, se añadieron en tubos de PCR de 0.2 ml, 10 μl de agua milli-Q, 1 μl de cebadores hexaméricos aleatorios y 1 μl de RNA para así obtener un volumen final de la reacción de 12 μl. Una vez añadidos los reactivos se mezcló gentilmente con la pipeta y se procedió a incubar a 65°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo se agregaron a la misma reacción 4 μl de Buffer de reacción 5X, 1 μl de inhibidor de RNasa RiboLock (20U/μL), 2 μl de la mezcla de dNTPs (10 mM), y 1μl de la enzima transcriptasa inversa RevertAid H Minus M-MuLV (200 U/μl), para así conseguir un volumen final de la reacción de 20 μl.

A continuación, se realizó la retrotranscripción en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Scientific™) o, en su defecto, en el termociclador Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf) (dependiendo su disponibilidad en el laboratorio) con los siguientes ciclos: 1 ciclo de 5 minutos a 25°C, 1 ciclo de 60 minutos a 42°C y 1 ciclo de 5 minutos a 70°C.

Al finalizar se cuantificó el cDNA, estimando la absorbancia (A) a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific™) y se determinó su pureza de acuerdo con el cociente de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ . Valores superiores a 1.6 y menores a 1.8, indicaron que el DNA contaba con una pureza aceptable (López, et al., 2011; *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*, 2020). Los viales que contenían el cDNA, se guardaron a -80°C hasta su próximo uso.

## 5.8. Pruebas PCR de punto final con los oligonucleótidos diseñados en cDNA de tejido de caparazón de crías de *L. olivacea*

Para el sexado de las muestras de caparazón a través de la amplificación de las isoformas truncada y completa del gen *JARID2*, se trató de elaborar un protocolo, en

el cual, se definirían las condiciones de las PCRs y la electroforesis, para la prueba de las diferentes parejas de cebadores diseñadas, permitiendo así, obtener bandas de amplificación definidas y específicas, con las cuales se lograra observar la abundancia diferencial de las dos isoformas en las muestras de cDNA de machos (incubados a 26°C) y de hembras (incubadas a 33°C).

En la reacción de PCR, la concentración final de los reactivos fue de 2X para la mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion Flash (Thermo Scientific™ F548S), de 0.5 µM para cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) y, en cuanto a la concentración de cDNA, ésta varió porque se trabajó con el 10% del volumen final de la reacción que fue de 25 µl. Con H2O milli-Q se aforó hasta alcanzar este volumen.

La PCR de punto final se llevó a cabo en los termocicladores GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Scientific™) y Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf), de acuerdo con su disponibilidad durante el experimento y bajo los siguientes ciclos:

1 ciclo	10 seg	98°C	Desnaturalización inicial
30/35/40 ciclos	1 seg	98°C	Desnaturalización
	5 seg	52/54/58/60/61°C	Hibridación
	15 seg	72°C	Extensión
1 ciclo	60 seg	72°C	Extensión final

El número de ciclos difirió conforme se realizaron los cambios al protocolo para llegar a resultados más definidos y claros, esto al controlar el grado de amplificación. Asimismo, la temperatura de alineación fue modificada a lo largo del experimento para hallar aquella en la que los oligonucleótidos fueran más afines o específicos a las secuencias de las isoformas.

Al término de la PCR, se cuantificó el cDNA en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific™) y los viales que lo contenían se guardaron a -20° C.

## 5.9. Ensayos de competencia entre oligonucleótidos en cDNA de tejido de caparazón de crías de *L. olivacea*

Después de probar los oligonucleótidos diseñados en cDNA de tejido de caparazón, dispusimos una vez más de estas muestras (tanto de machos como de hembras) para

poner a competir en una misma reacción parejas de cebadores cuyos amplicones tuvieran un peso molecular similar. Las parejas a competir fueron seleccionadas de modo que amplificaran para los dos tipos de isoformas (completa y truncada) (ver tabla no. 4), esperando siempre que la isoforma más abundante en la muestra consumiera más recursos de la reacción de PCR y, por consiguiente, resultará en una mayor amplificación. De esta forma, se podrían sexar las muestras de caparazón al ver la expresión diferencial de las dos isoformas en una misma muestra.

**Tabla no. 4. Parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma, seleccionadas para la primera competencia en la reacción de PCR.**

Parejas de cebadores específicas de la isoforma completa	vs	Parejas de cebadores específicas de la isoforma truncada
F3-R333		F3-R326
F3-R133		F3-R126
F3-R133		F2-R126
F3-R333		F2-R126

Posteriormente, se realizó otra competencia, probando con nuevas combinaciones de parejas de amplificación, donde la constante era una pareja específica de la isoforma truncada (más abundante a 26°C) que amplificaba un fragmento de 80 pb. Las parejas formadas ahora podían no amplificar para diferentes isoformas, tal como se muestra en la tabla no. 5.

**Tabla no. 5. Parejas de cebadores seleccionadas para la segunda competencia en la reacción de PCR.**

Pareja de amplificación 1	vs	Pareja de amplificación 2
F3-R126		F3-R133
F3-R126		F2-R126
F3-R126		F3-R333
F3-R126		F3-R326

La concentración final de los reactivos en la reacción de PCR fue de 2X para la mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion Flash (ThermoFisher Scientific F548S) y de 0.25  $\mu\text{M}$  para cada uno de los cuatro oligonucleótidos (forward A y B, reverse A y B). Para el cDNA, se agregó el 10% del volumen final de la reacción (la concentración de RNA de partida fue de 1ng/ $\mu\text{l}$ ) y se aforo con agua milli-Q hasta los 25  $\mu\text{L}$ .

La PCR de punto final fue realizada en el termociclador Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf), con los siguientes ciclos:

1 ciclo	10 seg	98°C	Desnaturalización inicial
40 ciclos	1 seg	98°C	Desnaturalización
	5 seg	54/58/60°C	Hibridación
	15 seg	72°C	Extensión
1 ciclo	60 seg	72°C	Extensión final

La temperatura de alineación fue variando para ver cómo cambiaba la especificidad de las parejas de oligonucleótidos por la secuencia de las isoformas al encontrarse compitiendo por los recursos de la reacción de PCR.

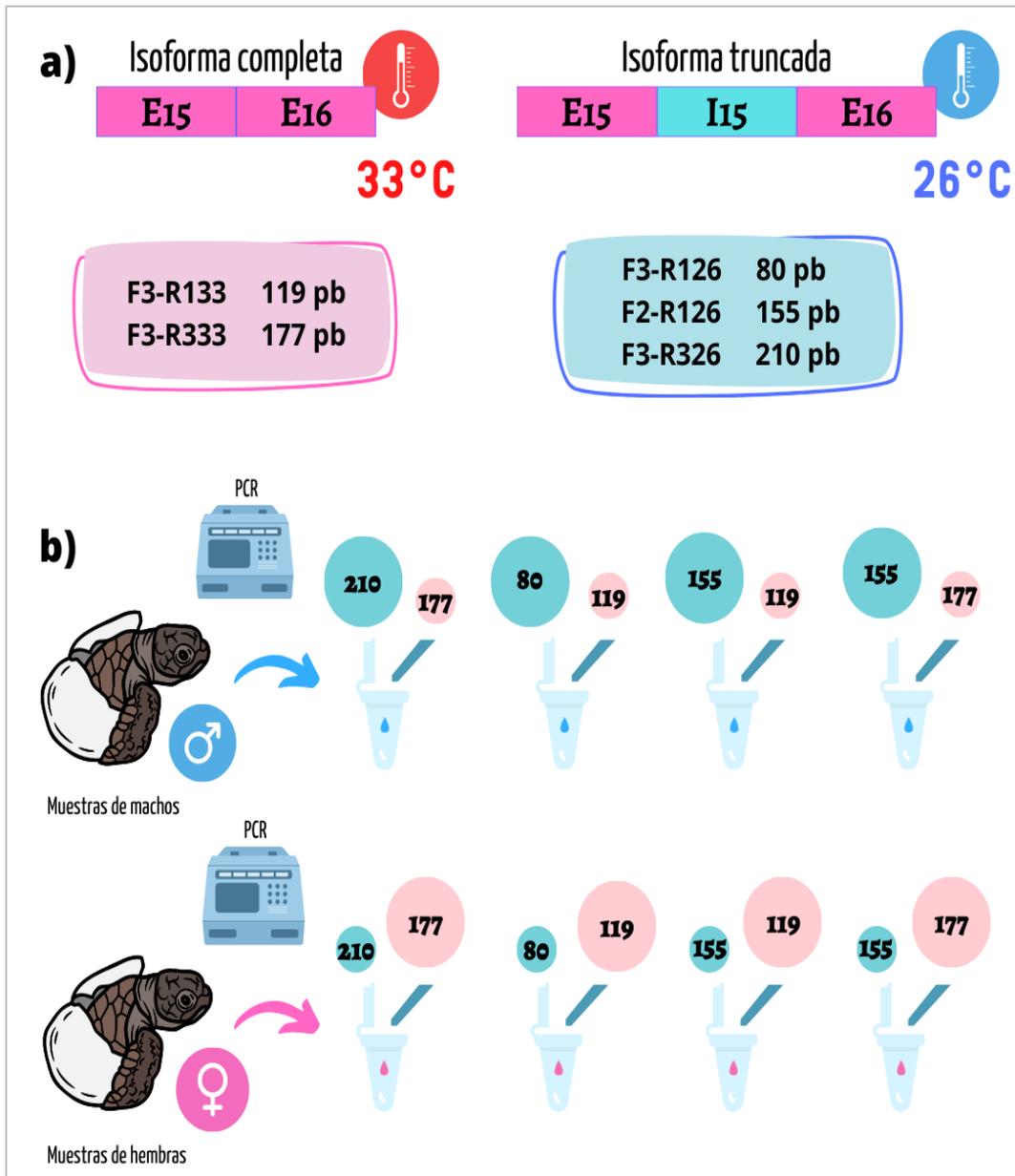


Figura 12. Representación del primer ensayo de competencia entre parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma en la reacción de PCR, realizado para muestras de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. (a) Se muestran las parejas de cebadores seleccionadas que alinean contra la secuencia de la isoforma completa (recuadro color rosa) y truncada (recuadro color azul), junto con la longitud de los fragmentos que amplifican. (b) En el primer ensayo de competencia, las combinaciones de parejas de cebadores formadas compiten por los recursos de la PCR en reacciones distintas, con el fin de observar la abundancia diferencial de ambas isoformas del gen *JARID2* en machos y hembras. Las parejas de cebadores a competir, bajo una misma reacción, fueron seleccionadas de modo que sus productos de amplificación tuvieran pesos moleculares similares. Los círculos indican los productos de amplificación correspondientes a la isoforma truncada (en color azul) y a la isoforma completa (en color rosa). Note que la proporción de los círculos rosas y azules está relacionada a la abundancia esperada de las isoformas con respecto a la muestra a tratar (macho o hembra).

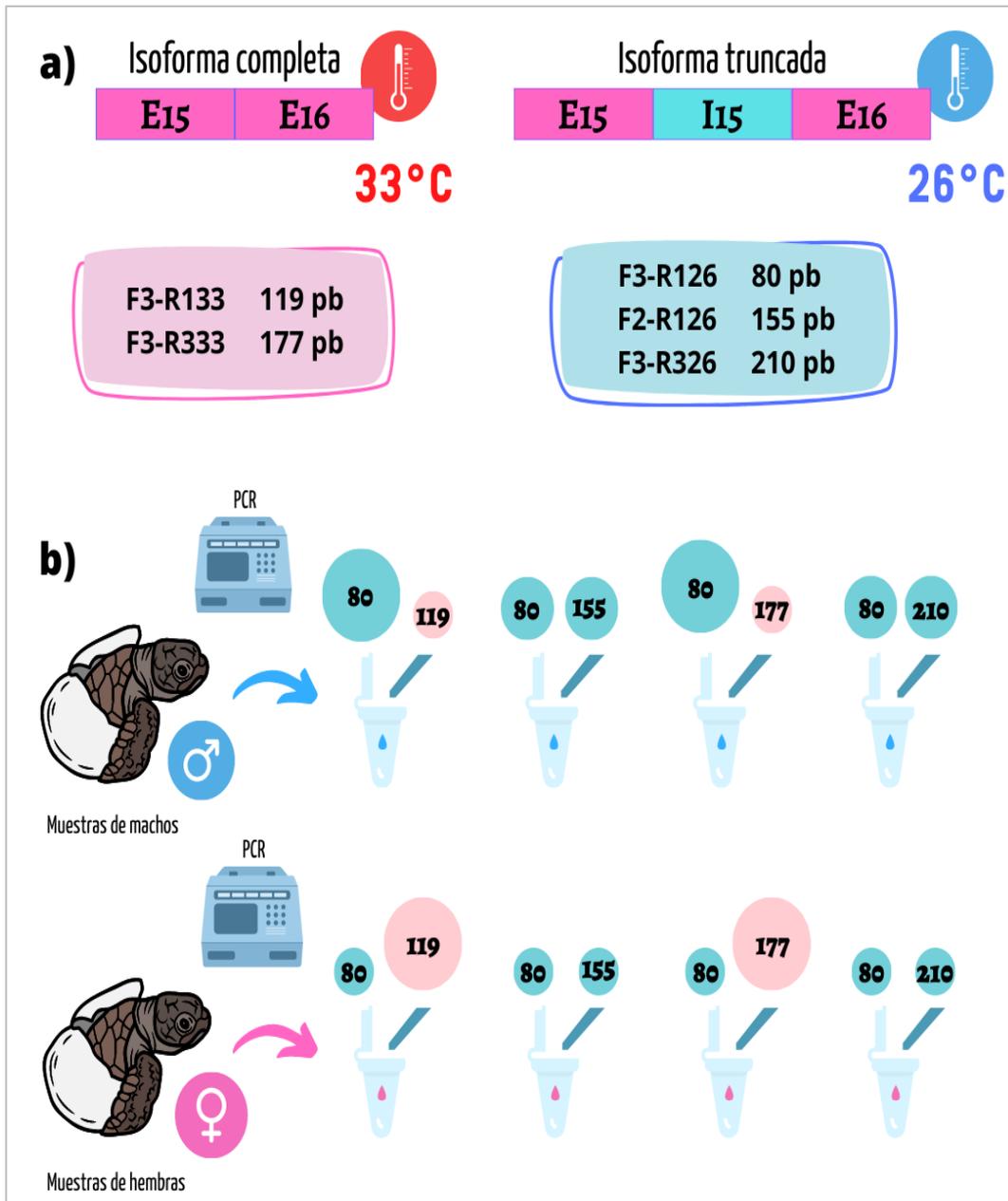


Figura 13. Representación del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores con/sin especificidad opuesta por la isoforma en la reacción de PCR, realizado para muestras de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. (a) Se muestran las parejas de cebadores seleccionadas que alinean contra alguna de las isoformas (completa/truncada) de *JARID2* junto con la longitud del fragmento que amplifican. (b) En el segundo ensayo de competencia, nuevas combinaciones de parejas de cebadores compiten por los recursos de la PCR en reacciones distintas. Se compara la abundancia relativa del fragmento de 80 pb amplificado por la pareja de cebadores F3-R126, que corresponde a la isoforma truncada, contra la de los fragmentos amplificados por las otras parejas competidoras, que corresponden a la isoforma truncada o bien, la completa. Los círculos indican los fragmentos de amplificación de la isoforma completa (en color rosa) y los de la isoforma truncada (en color azul). Observe que la proporción de los círculos está en función de la abundancia esperada de las isoformas según la muestra a tratar (macho o hembra).

## 5.10. Electroforesis en geles de agarosa

Para la verificación de los resultados de las amplificaciones se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa a diferentes concentraciones (1.5 y 2%). Los geles fueron teñidos con 2  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml). Cuando solidificaron, se sumergieron en solución de TBE al 1X en una cámara de electroforesis Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-RAD).

El total del producto de la reacción de PCR se mezcló con colorante de carga de DNA 6X (Thermo Scientific™ R0611). El colorante fue añadido en una proporción 1:6 con relación al volumen de la muestra. Una vez cargadas las muestras en el gel de agarosa, se mantuvieron a un voltaje constante de 86 V durante 1 h. Para lograr separar las bandas en el gel e identificar con mayor precisión su tamaño en algunas muestras, se modificó el voltaje y tiempo (ver resultados).

Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific™ SM0243) ya que esperábamos fragmentos amplificados de 74-285 pb aproximadamente.

Los productos de amplificación fueron visualizados en un transiluminador de luz UV. Los resultados de los geles fueron impresos en papel fotográfico.

## 6. Resultados



### 6.1. Cuantificación, pureza y valoración de la integridad del DNA genómico

El análisis espectrofotométrico del DNA genómico extraído de tres tejidos (cerebro, hígado y mesonefros) provenientes de embriones de (*L. olivacea* incubados a MPT (26°C) y FPT (33°C), mostró, a partir de lecturas a 260 nm, que las seis muestras totales tenían una concentración media de 425.6 ng/μl (ver tabla no. 6). Por su parte, el cociente de los valores obtenidos a 260nm y 280nm (A260/A80) indicó que el DNA genómico de las muestras contaba con una pureza óptima, ya que los valores fueron superiores a 1.8 (ver tabla no. 6).

El perfil de las muestras de DNA genómico de cerebro e hígado en la electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v), evidenció la adecuada integridad del mismo, al observarse bandas definidas (fig. 14). Por otro lado, el perfil de las muestras de DNA genómico de mesonefros mostró la ausencia de bandas definidas y, en su lugar, un concentrado intenso de material genético en la parte superior del gel, lo cual no indicó que hubiera degradación de las muestras, sino más bien, se relacionó a un probable exceso de la cantidad de muestra (5 μl) depositada en los pozos de los geles (fig. 15a y b).

**Tabla no. 6. Medidas de cuantificación y pureza de DNA genómico de tejidos embrionarios de *L. olivacea* incubados a distintas temperaturas.**

Órgano de procedencia	Temperatura de incubación	Concentración (ng/μl)	Cociente de Absorbancias A260/A280
Mesonefros	33°C	388.2	1.85
Mesonefros	26°C	443.0	1.84
Hígado	33°C	393.3	1.84
Hígado	26°C	453.3	1.84
Cerebro	33°C	307.6	1.85
Cerebro	26°C	568.6	1.82

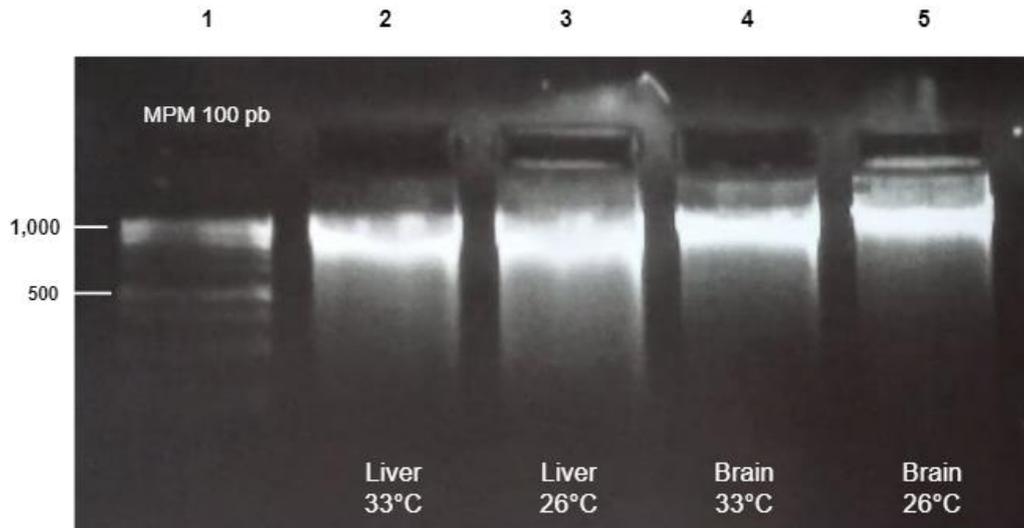


Figura 14. Verificación de la integridad del DNA genómico en gel de agarosa al 1,5%. DNA extraído de tejidos de hígado y cerebro de embriones de *L. olivacea* incubados a temperaturas de 33°C y 26°C. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2 y 3: DNA genómico de hígado. Carriles 4 y 5: DNA genómico de cerebro. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 30 min en TBE 1X.

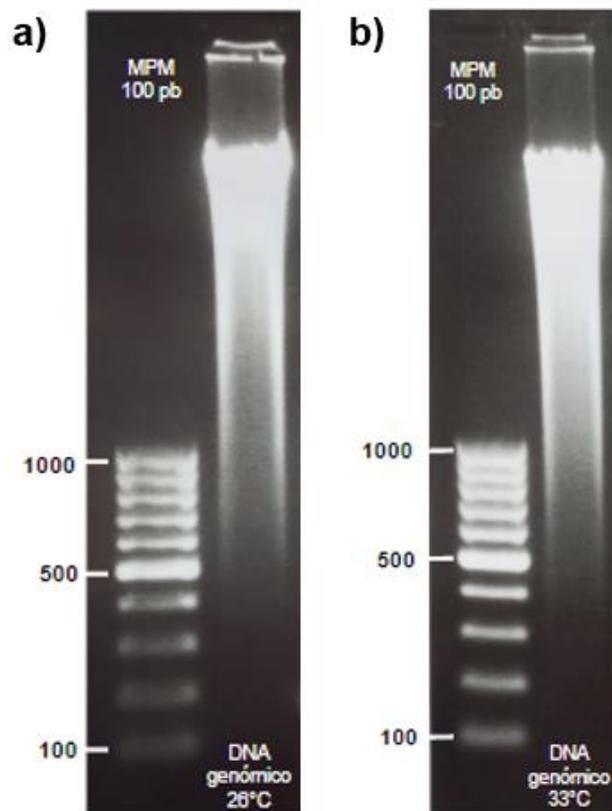


Figura 15. Verificación de la integridad del DNA genómico en gel de agarosa al 1,5%. DNA extraído de tejidos de mesonefros provenientes de embriones de *L. olivacea* incubados a 26°C (a) y 33°C (b). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X.

## **6.2. Pruebas con los oligonucleótidos diseñados de *JARID2* en DNA genómico de tejidos embrionarios de *L. olivacea***

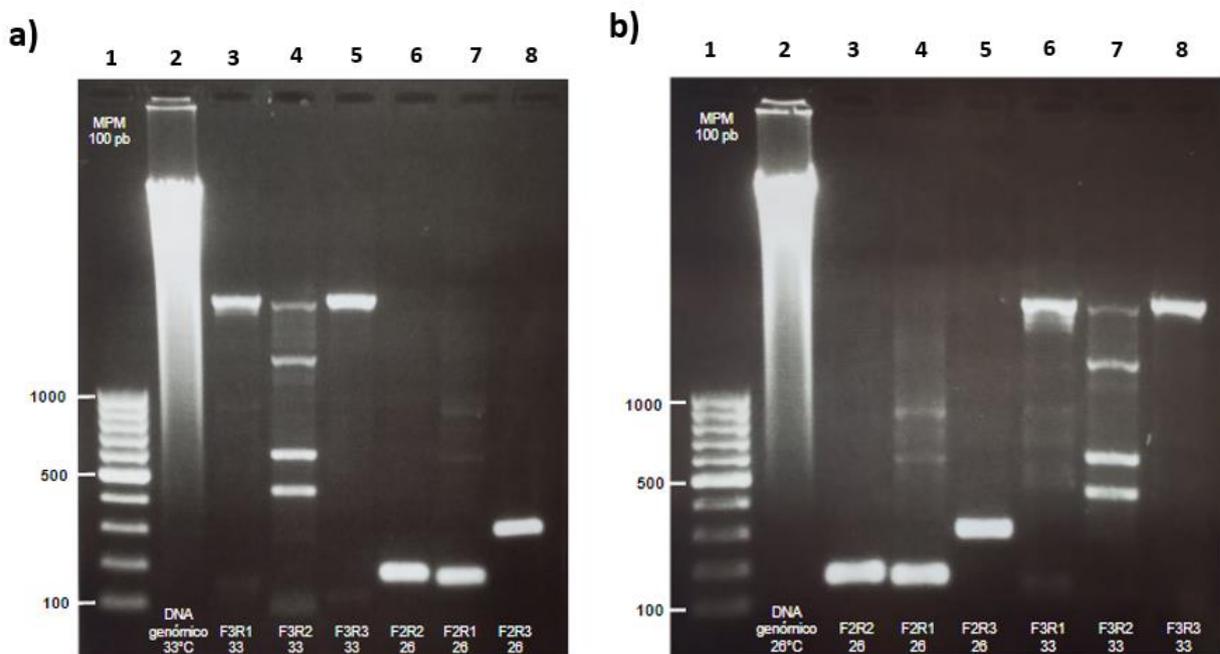
Se probaron los cebadores diseñados para amplificar las isoformas (completa y truncada) de *JARID2* en muestras de DNA genómico de tejido de mesonefros de embriones de *L. olivacea* que habían sido incubados a MPT (26°C) y FPT (33°C) (fig. 16); así como también, en DNA genómico de tejido de cerebro de un embrión incubado a FPT (fig. 17).

La primera prueba que se realizó fue en las muestras de DNA genómico de mesonefros con algunas de las parejas de cebadores dirigidas hacia ambas isoformas. Los productos de la reacción de la PCR fueron visualizados al realizar una electroforesis convencional en gel de agarosa, misma que sirvió para verificar la integridad del DNA utilizado. Como se muestra en la fig. 16, los cebadores lograron alinear con una especificidad aceptable, a excepción de la pareja F3-R233 dirigida a la isoforma truncada, para la cual se observó más de una banda en los dos geles; asumiendo, entonces, que los oligonucleótidos amplificaron diferentes regiones, no deseadas. En cuanto a las otras parejas, se observó una banda principal que coincidió con el tamaño esperado, siendo así que, los cebadores dirigidos a la isoforma truncada amplificaron regiones del DNA que resultaron ser, aparentemente, del mismo peso molecular a lo que se esperaría, si fueran probados en RNA (ver tabla no. 3 y fig. 16); y, por el contrario, aquellos dirigidos a la isoforma completa mostraron bandas de alto peso molecular (~3000 pb) en los geles, lo cual, concuerda, si se toma en cuenta que la región del intrón 15, que se encuentra entre el exón 15 y 16, los cuales forman parte de la isoforma completa, consta de más de 1260 pb. Esto, de acuerdo con los datos de las posiciones de la isoforma truncada, que retiene parte del intrón 15. Además, considere que, al tratarse de DNA genómico, los cebadores diseñados para amplificar ambas isoformas no respetan, por razones lógicas, la estructura exónica-intrónica intrínseca de éstas, al momento de la hibridación. En pocas palabras, el fragmento amplificado por los cebadores diseñados para alinear en la isoforma completa incluía el intrón.

Luego de verificar la integridad del DNA genómico de tejidos de cerebro e hígado, se realizó la segunda prueba con todas las parejas de cebadores en una muestra de tejido de cerebro de embrión incubado a una temperatura de 33°C (fig. 14

y 17). Los resultados de la electroforesis fueron bastante similares a los anteriores, ya que, nuevamente, se observó el mismo patrón: bandas de bajo peso molecular para los cebadores dirigidos a la isoforma truncada y, de alto peso molecular para aquellos dirigidos a la isoforma completa. Además, se siguió observando la inespecificidad de la pareja de cebadores F3-R233, que previamente, en DNA genómico de mesonefros, había mostrado cuatro bandas de distintos tamaños en los geles. Las parejas F2-R226 y F2-R233 también resultaron ser inespecíficas, dado que la primera amplificó para una banda más, de aproximadamente 90 pb; mientras que la segunda, amplificó para una banda no esperada de un tamaño poco mayor a las 400 pb.

Las parejas de cebadores diseñadas para amplificar ambas isoformas de *JARID2*, fueron probadas tanto en muestras de DNA genómico de machos como de hembras, considerándose una muestra de macho, si provenía de un embrión incubado a 26°C y como hembra, si había sido tomada de un embrión incubado a 33°C. No observamos diferencias en cuanto al patrón de amplificación, en todas las muestras de machos y hembras analizadas, utilizando las mismas parejas de cebadores (fig. 16), tal como se esperaba. Los resultados demostraron que los cebadores son funcionales, ya que lograron amplificar en DNA genómico, alineando, en la mayoría de los casos, en las regiones esperadas; y, confirmaron de nueva cuenta la integridad óptima del material genético de los tejidos embrionarios.



**Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos de PCR de muestras de DNA genómico de tejido de mesonefros de embriones de *L. olivacea* incubados a 33°C (a) y**

26°C (b), utilizando parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (completa y truncada) de *JARID2*. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carril 2: 5 µl del DNA genómico de tejido de mesonefros. Carriles 3-8: 5 µl de la reacción de PCR. Los carriles 3-5 corresponden a: pruebas con parejas de cebadores que amplifican la isoforma abundante a la temperatura de incubación que indica la muestra (isoforma completa más abundante a 33°C e isoforma truncada más abundante a 26°C); y carriles 6-8 a: pruebas con parejas de cebadores que amplifican la isoforma menos abundante a la temperatura de incubación que indica la muestra. Bandas esperadas de 165, 155, y 285 pb, para los carriles 6-8 de la fig. 16a y 3-5 de la fig. 16b. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X. 54°C de temperatura de alineación se indica dentro del perfil de amplificación de 30 ciclos.

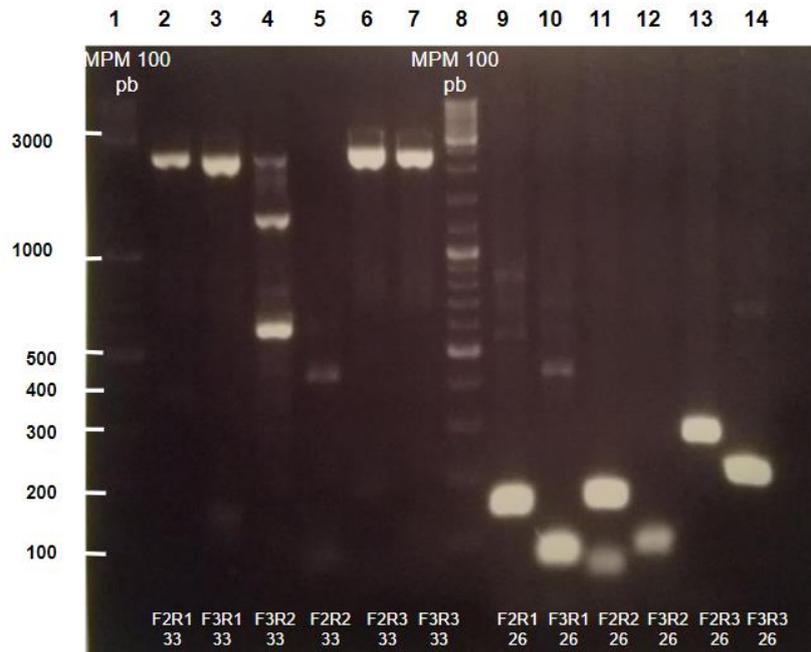


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos de PCR de la muestra de DNA genómico de tejido de cerebro de un embrión de *L. olivacea* incubado a 33°, utilizando parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (completa y truncada) de *JARID2*. Carril 1 y 8: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb Plus. Carriles 2-7 y 9-14: 5 µl de la reacción de PCR. Los carriles 2-7 corresponden a: pruebas con parejas de cebadores que amplifican la isoforma completa (abundante a temperatura de incubación de 33°C); y carriles 6-8 a: pruebas con parejas de cebadores que amplifican la isoforma truncada (abundante a temperatura de incubación de 26°C). Bandas esperadas de 155, 80, 165, 90, 285 y 210 pb, para los carriles 6-8. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X. 54°C de temperatura de alineación se indica dentro del perfil de amplificación de 30 ciclos.

### 6.3. Cuantificación y pureza del RNA

La tabla no. 7 resume los resultados obtenidos por espectrofotometría, de las muestras de tejido de caparazón de crías de *L. olivacea* que habían sido incubadas a MPT (26°C) y FPT (33°C). Los valores de concentración mostraron que se extrajo una cantidad relativamente mayor de material genético de tejido de hembras que de machos, obteniendo una media de 78.26 y 43.28 ng/µl, respectivamente. Por otra parte, el cociente de absorbancias (A260/A80) indicó que el RNA de la gran mayoría

de las muestras tenía una pureza óptima a excepción de dos muestras que no se hallaron dentro del rango esperado (2.0-2.2). La muestra no. 17 mostró un RNA de pureza aceptable, con un valor superior a 1.7; mientras que, la muestra no. 20, resultó estar contaminada, pues su valor (0.54) fue muy inferior al límite aceptable, aunque dicho valor pudiera estar asociado a que la concentración de la muestra fue sumamente baja (0.2 ng/μl).

A pesar de no contar con una pureza óptima, éstas dos muestras (17 y 20) no fueron descartadas de pruebas posteriores, pero sí se tuvo presente este rasgo (pureza del RNA), al momento de analizar los siguientes resultados.

**Tabla no. 7. Medidas de cuantificación y pureza de RNA de tejido de caparazón de crías de *L. olivacea* incubados a temperaturas de 26° y 33°C.**

Número de muestra	Temperatura de incubación	Concentración (ng/μl)	Cociente de Absorbancias A260/A280
1	33°C	217.3	2.11
2	33°C	90.4	2.13
3	33°C	14.6	2.06
4	33°C	94.7	2.09
5	33°C	79.8	2.13
6	33°C	71.5	2.11
7	33°C	91.5	2.16
8	33°C	60.4	2.14
9	33°C	41.9	2.15
10	33°C	20.5	2.14
11	26°C	28.8	2.15
12	26°C	29.1	2.10
13	26°C	29.2	2.12
14	26°C	37.2	2.22
15	26°C	34.3	2.10
16	26°C	46.0	2.23
17	26°C	10.5	1.89
18	26°C	207.6	2.12
19	26°C	9.9	2.38
20	26°C	0.2	0.54

#### 6.4. Resultados de la reverso transcripción y amplificación de las isoformas de *JARID2* en cDNA de tejido de caparazón de crías de *L. olivacea*

Para analizar la abundancia relativa de las isoformas estudiadas de *JARID2* en las 20 muestras de RNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*, se requirió sintetizar cDNA a partir de estas muestras de partida, ya que así, su manipulación sería menos propensa a la degradación, dado que es más estable que el RNA. El análisis espectrofotométrico del cDNA resultante arrojó valores de concentración de aproximadamente 2000 ng para todas las muestras de ambos sexos, con un valor máximo de 3020.4 ng (macho 7) y un mínimo de 1988.9 ng (macho 10). Los resultados del cociente de absorbancias (A260/A80) indicaron que el cDNA tuvo una pureza aceptable, puesto que los valores obtenidos de todas las muestras abarcaron un rango de entre 1.65-1.68 (ver tabla no. 8).

**Tabla no. 8. Medidas de cuantificación y pureza del cDNA resultante de la reverso transcripción de tejido de caparazón de crías de *L. olivacea* incubadas a temperaturas de 26° y 33°C.**

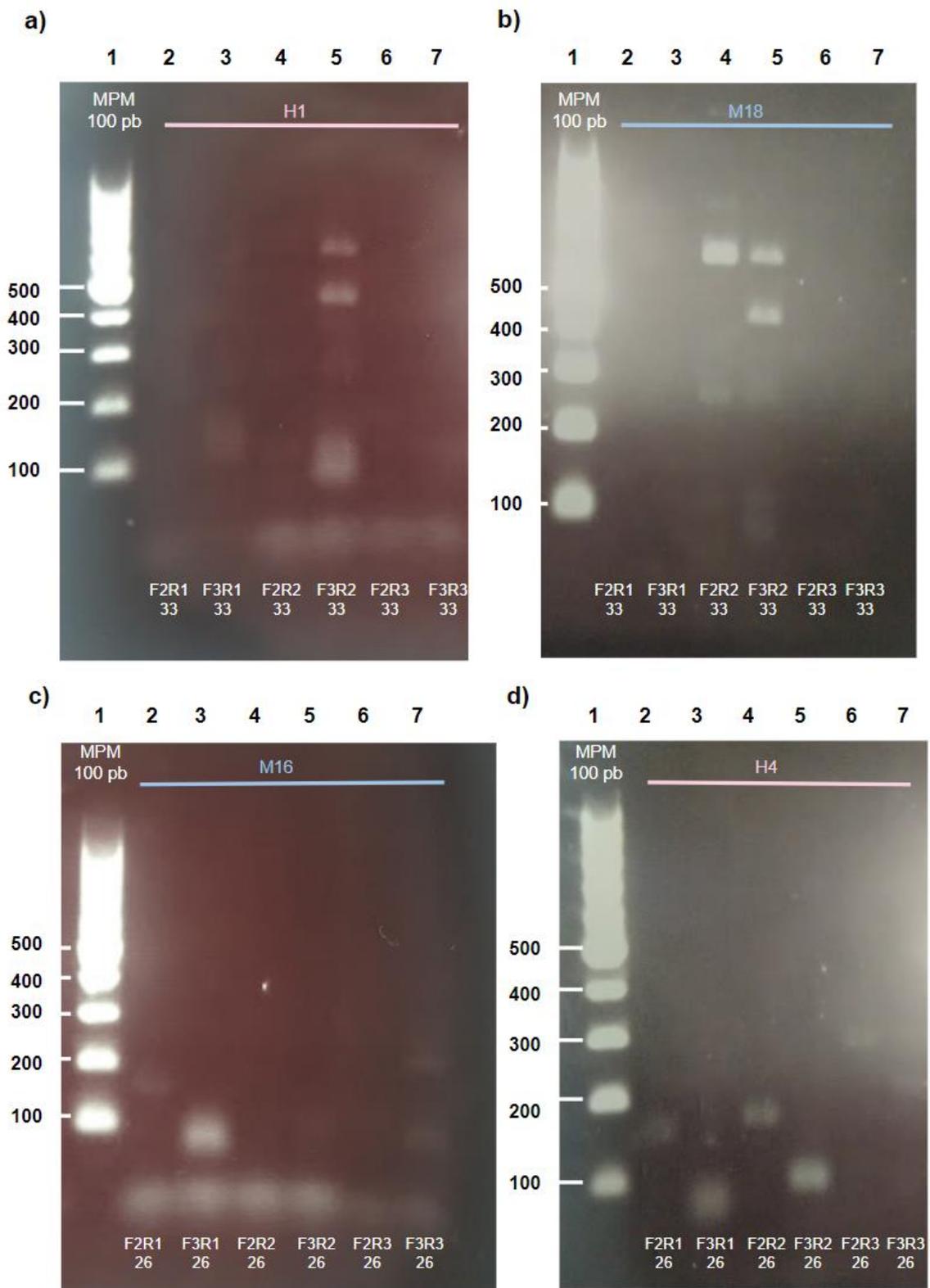
Número de muestra	Temperatura de incubación	Concentración (ng/μl)	Cociente de Absorbancias A260/A280
1	33°C	2056.5	1.67
2	33°C	2157.9	1.67
3	33°C	2102.6	1.67
4	33°C	2472.1	1.66
5	33°C	2192.7	1.68
6	33°C	2053.8	1.67
7	33°C	3020.4	1.65
8	33°C	1999.1	1.67
9	33°C	2124.1	1.68
10	33°C	1988.9	1.68
11	26°C	2165.8	1.66
12	26°C	1990.1	1.66
13	26°C	2055.3	1.67
14	26°C	2106.1	1.68
15	26°C	1900.7	1.67
16	26°C	1928.4	1.67
17	26°C	2217.0	1.66
18	26°C	2003.0	1.67
19	26°C	2054.5	1.67
20	26°C	2148.9	1.68

Posterior a la transcripción reversa, se realizaron las primeras amplificaciones por PCR de punto final, de regiones determinadas de las isoformas truncada y completa del gen *JARID2*, en cuatro muestras seleccionadas al azar de cDNA de macho (M16 y M18) y hembra (H1 y H4), con las parejas de cebadores diseñadas que, previamente, habían sido probadas en muestras de DNA genómico (figs. 16 y 17); resultados que fueron satisfactorios utilizando un perfil de amplificación de 30 ciclos y una temperatura de hibridación de 54°C, motivo por el cual, se volvieron a emplear las mismas condiciones en estas PCRs. El análisis electroforético de los productos de la reacción, en los geles de agarosa al 1,5% (p/v), reveló que las PCRs tuvieron un rendimiento deficiente, ya que las bandas se mostraron muy tenues debido a que se generó menos producto de amplificación e incluso, en algunos casos, no hubo indicio del amplicón esperado (fig. 18). Por ejemplo, los resultados de las pruebas con las parejas de cebadores diseñados para amplificar la isoforma completa, en el cDNA de un macho (M18) y una hembra (H1), mostraron que los amplicones de las parejas: F2-R133, F2-R233, F2-R333, y F3-R333, con tamaños de 194, 149, 252, y 177 pb, respectivamente, no fueron evidentes en los geles correspondientes a las muestras de ambos sexos (H1 y M18) (figs. 18a y b). En cuanto a las parejas restantes, F3-R133 logró apenas amplificar el fragmento deseado de 119 pb en la muestra de la hembra 1 (H1) (fig. 18a), mostrándose una banda tenue en el gel. Sin embargo, no sucedió lo mismo al ser probado en la muestra del macho 18 (M18), ya que la banda estuvo ausente (fig. 18b). Siguiendo una tendencia similar, la pareja F3-R233 amplificó la banda esperada de 74 pb, la cual, se mostró claramente más brillante en la muestra de la hembra 1 (H1) (fig. 18a) que del macho 18 (M18) (fig. 18b), pero al igual que F2-R233 amplificó fragmentos inespecíficos, no deseados, en mayor proporción, siendo estas bandas las más notorias en los geles (figs. 18a y b).

Por otra parte, los resultados de las pruebas con las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada, en la muestra de un macho (M16) y una hembra (H4), también revelaron productos amplificados en baja proporción (figs. 18c y d). La mayoría de las parejas amplificó la banda deseada, pero muy tenue, en la muestra del macho 16 (M16), a excepción de F2-R226 y F2-R326, para las cuales, no fueron evidentes las bandas de 165 y 285 pb, respectivamente (fig. 18c). En la muestra de

la hembra 4 (H4) todas las parejas: F2-R126, F3-R126, F2-R226, F3-R226, F2-R326 y F3-R326 amplificaron el fragmento deseado de 155, 80, 165, 90, 285 y 210 pb, respectivamente (fig. 18d). Cabe mencionar, que la banda de 80 pb amplificada por la pareja F3-R126 fue más brillante y notoria en la muestra del macho (M16) que de la hembra (H4) (figs. 18c y d).

Aunque se logró apreciar la abundancia relativa diferencial de las isoformas amplificadas por las parejas de cebadores F3-R126, F3-R133 y F3-R233 entre las muestras de machos y hembras (fig. 18), no fue lo suficientemente clara y destacable como para poder asumir que: la isoforma completa se expresa en mayor abundancia en las hembras; mientras que, en los machos, la isoforma truncada se expresa en mayor abundancia.



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos obtenidos por PCRs de 30 ciclos de amplificación, de muestras de cDNA de caparazón de crías macho (b y c) y hembra (a y d) de *L. olivacea*, utilizando cebadores que amplifican la isoforma completa (a y b) y truncada (c y d) de *JARID2*. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-7: 5  $\mu$ l de la reacción de PCR. Muestras: cDNA proveniente de las hembras 1 (H1) y 4 (H4), y de los machos

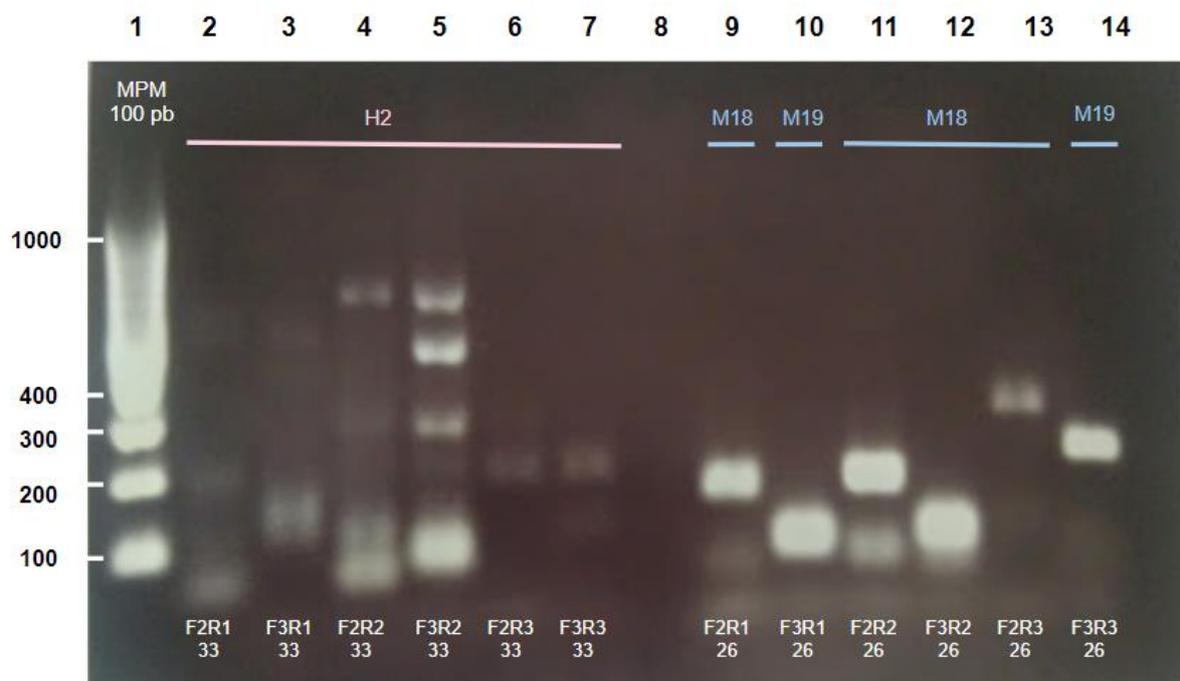
**16 (M16) y 18 (M18). Bandas esperadas desde 74 a 285 pb. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X. 54°C de temperatura de hibridación.**

Dados los resultados anteriores, se decidió aumentar el número de ciclos de las PCRs a 35, logrando así, mejorar su rendimiento y, con ello, la claridad de las bandas. Sin embargo, al hacerlo, también aumentamos la proporción de fragmentos inespecíficos, tal como se puede apreciar en las figs. 19 y 20. Para esta siguiente ronda de amplificaciones, primero, se probaron las parejas de cebadores diseñadas para amplificar las isoformas de *JARID2* en las muestras objetivo donde supuestamente se esperaba observar una mayor abundancia de los productos amplificados: parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada en muestras de machos (M18 y M19) y aquellas dirigidas a la isoforma completa en la muestra de una hembra (H2) (fig. 19). Después, se probaron en las muestras opuestas donde se esperaba obtener menos producto de los amplicones, resultando en lo siguiente: parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada en muestras de hembras (H2 y H3) y aquellas dirigidas a la isoforma completa en la muestra de un macho (M18) (fig. 20). Las muestras utilizadas fueron seleccionadas aleatoriamente.

En la fig. 19, que muestra los productos de la PCR con un perfil de amplificación de 35 ciclos, correspondiente a las pruebas en las muestras objetivo, se observa que algunas de las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa sí amplificaron los fragmentos esperados en la muestra de la hembra (H2). Las bandas de 194, 252 y 177 pb, que anteriormente no eran apreciables con una PCR de 30 ciclos de amplificación (fig. 18a), sí aparecieron en los geles, indicando que su previa ausencia se debía a la falta de producto y no a un mal diseño de los cebadores o a ciertas condiciones de la PCR. Sin embargo, como se observa, estas bandas, en particular, se muestran muy tenues en comparación a los productos amplificados por las parejas: F3-R133 y F3-R233, cuyas bandas esperadas de 119 y 74 pb, respectivamente, fueron ligeramente más brillantes, en especial la de 74 pb, atribuyéndose a que hubo un aumento de los amplicones desde la prueba con estos cebadores en la PCR de 30 ciclos, en la que fueron observables los productos (fig. 18a). Respecto a la pareja F3-R233, aunque amplificó en abundancia el fragmento esperado, la banda en el gel (de 74 pb) se mostró acompañada de otras cuatro bandas inespecíficas, tres de las cuales fueron muy notorias. Con las parejas: F2-R133, F3-R133 y F3-R333 también se obtuvieron bandas inespecíficas, pero estas se amplificaron en baja cantidad. Y, por último, la pareja de cebadores F2-R233 amplificó únicamente fragmentos

inespecíficos, entre los cuales, uno pareció tener el tamaño esperado de 149 pb, pero dado a que se aproximaba más a las 100 pb, fue descartado. Este resultado se asocia a que la pareja de cebadores pudo resultar ser inespecífica o bien, a que la temperatura de hibridación no fue la correcta.

El rendimiento de la PCR utilizando las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada en las muestras objetivo de machos (M18 y M19), resultó ser mucho más alta que la realizada con las parejas dirigidas a la otra isoforma en la muestra de la hembra (H2) (fig. 19). Las bandas esperadas se mostraron más gruesas y brillantes (a excepción de la de 285 pb), indicando que hubo más abundancia de los productos amplificados con la PCR de 35 ciclos (fig. 19) que con aquella de 30 ciclos (fig. 18c). Incluso, fueron evidentes las bandas esperadas de 165 y 285 pb, amplificadas por las parejas de cebadores: F2-R226 y F2-R326, respectivamente, al aumentar los ciclos de la PCR. No obstante, aunque hubo un mejor rendimiento, se observaron bandas inespecíficas (con menos producto) que rondaban las 100 pb, además de las esperadas, que fueron amplificadas por las parejas: F2-R126 y F2-R226 (fig. 19).



**Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos obtenidos por la PCR de 35 ciclos de amplificación, de muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*, utilizando cebadores diseñados para amplificar la isoforma completa y truncada de *JARID2*. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-7 y 9-14: 5 µl de la reacción de PCR. Los carriles 2-7 corresponden a: cDNA de hembra utilizado como molde para cebadores que amplifican la isoforma completa; y carriles 9-14 a: cDNA de macho utilizado como molde para cebadores que amplifican la isoforma truncada. Muestras: cDNA proveniente

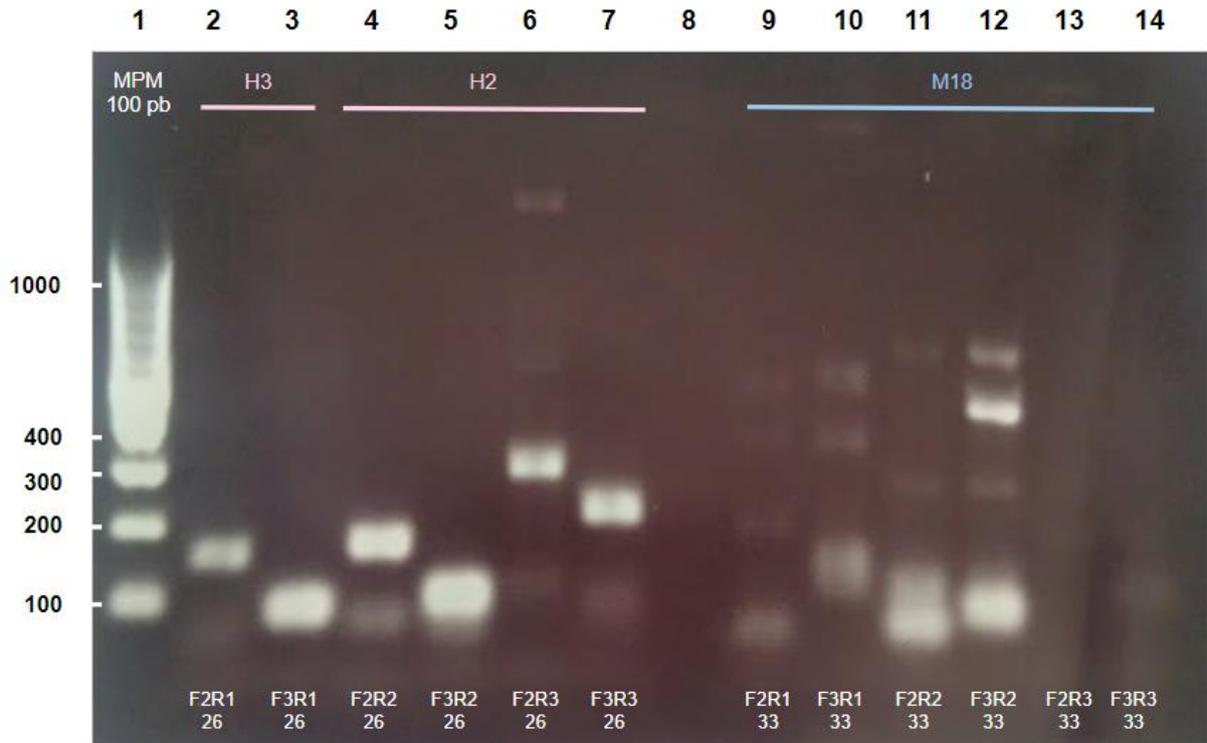
**de la hembra 2 (H2), macho 18 (M18), y macho 19 (M19). Bandas esperadas desde 74 a 285 pb. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X. 54°C de temperatura de hibridación.**

Los resultados de las pruebas con las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada en las muestras opuestas de hembras (H2 y H3) (fig. 20) fueron bastante similares a los producidos cuando se probaron en las muestras objetivo de machos (M18 y M19) (fig. 19), pues, nuevamente, la PCR tuvo un alto rendimiento con 35 ciclos de amplificación, por lo que todas las bandas esperadas se mostraron más gruesas y brillantes, pero algunas venían acompañadas de bandas inespecíficas que habían sido amplificadas en poca cantidad, por las parejas de cebadores: F2-R126, F2-R226, F2-R326 y F3-R326 (fig. 20). En el perfil de amplificación de 30 ciclos, estos fragmentos inespecíficos no fueron visibles, mostrándose un gel más limpio, pero con todas las bandas esperadas siendo poco perceptibles (fig. 18d). Al probar estas parejas en las muestras de las hembras, se aprecia que F2-R326 amplificó la banda de 285 pb con mayor cantidad de producto en la hembra (H2) que en el macho (M18), pero lo hizo con menos especificidad; mientras que, F2-R126 amplificó con mayor abundancia la banda de 155 pb en el macho (M18) que en la hembra probada (H3).

En cuanto al análisis electroforético de los productos de la PCR con 35 ciclos de amplificación, usando parejas dirigidas a la isoforma completa en la muestra opuesta de un macho (M18) (fig. 20), este mostró que la PCR también había mejorado (por muy poco) su rendimiento, ya que fueron evidentes las bandas de 194 y 119 pb, amplificadas por las parejas: F2-R133 y F3-R133, respectivamente; coincidiendo así, con los resultados de las pruebas realizadas con estas mismas parejas, en la muestra de la hembra (H2) (fig. 19). Sin embargo, tales cebadores también amplificaron bandas inespecíficas que se destacaron más en el gel de la muestra del macho (M18) (fig. 20). Además, las bandas de 252 y 177 pb, que tampoco habían sido detectadas con una PCR de 30 ciclos (fig. 18b), sí se mostraron, pero fueron sumamente tenues, por lo que no fueron tan apreciables en la muestra del macho (M18) (fig. 20), como lo hicieron en la muestra de la hembra (H2) (fig. 19). Por otro lado, la banda de 74 pb amplificada por la pareja F3-R233, también se mostró gruesa y brillante como sucedió en la muestra de la hembra (H2), y de igual manera, se encontró acompañada de otras cuatro bandas inespecíficas (figs. 19 y 20). Y, nuevamente, no se observó la banda esperada de 149 pb con la pareja F2R233, pero sí cuatro productos inespecíficos (fig. 20).

Entre las parejas de cebadores diseñadas para amplificar la isoforma completa, se consideraron, a este punto, como buenas candidatas para la tarea del sexado de las muestras a: F2-R333 y F3-R333, las cuales, demostraron que amplifican los fragmentos esperados con una abundancia ligeramente mayor en la hembra (H2) que en el macho (M18) (figs. 19 y 20). Pero, como el rendimiento de la PCR no fue muy alto utilizando estas parejas dirigidas a la isoforma completa en ambos tipos de muestras (machos y hembras), se pensó en mejorarlo, para apreciar mejor los resultados y realizar la comparación. Y, de las parejas diseñadas para amplificar la isoforma truncada, se consideró a F2-R126, cuya banda amplificada se mostró con un poco más de producto en el macho (M18) que en la hembra (H3) (figs. 19 y 20). Sin embargo, estas pequeñas diferencias en la abundancia de las isoformas entre las muestras de ambos sexos se relacionaron también a variaciones entre las muestras, o a un aumento en la concentración de la enzima utilizada, como consecuencia de un error de pipeteo; concluyendo, entonces, que necesitábamos realizar más pruebas en otras muestras.

Curiosamente, las bandas amplificadas por las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada indicaron que el rendimiento de la PCR había sido alto, ya que el producto de los amplificados fue abundante, independientemente de la muestra (macho/hembra). Pero, esta aseveración resulta contradictoria, puesto que, en la misma PCR, la abundancia de los productos de la amplificación con las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa fue baja. En resumen, los ciclos de amplificación (35X) fueron adecuados para las parejas dirigidas a la isoforma truncada, pero no para aquellas dirigidas a la isoforma completa.



**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos obtenidos por la PCR de 35 ciclos de amplificación, de muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*, utilizando cebadores diseñados para amplificar la isoforma completa y truncada de *JARID2*. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-7 y 9-14: 5  $\mu$ l de la reacción de PCR. Los carriles 2-7 corresponden a: cDNA de hembras utilizado como molde para cebadores que amplifican la isoforma truncada; y carriles 9-14 a: cDNA de macho utilizado como molde para cebadores que amplifican la isoforma completa. Muestras: cDNA proveniente de la hembra 2 (H2), hembra 3 (H3), y macho 18 (M18). Bandas esperadas desde 74 a 285 pb La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X. 54°C de temperatura de hibridación se indica dentro del perfil de amplificación de 35 ciclos.

Con el propósito de mejorar el rendimiento de las PCRs, se aumentaron los ciclos de amplificación a 40, sabiendo, de antemano, que esto disminuiría la especificidad; razón por la cual, se decidió generar un pequeño gradiente de temperaturas de hibridación: 52°, 54° y 58°C. Observando el comportamiento de la PCR con cada una de estas temperaturas, permitiría entonces, seleccionar aquella con la que se obtuviera una PCR más específica. La decisión de no probar la reacción bajo temperaturas de hibridación más altas se basó en los resultados anteriores, obtenidos con una PCR (35X) de 54°C de temperatura de hibridación, en los que fue posible observar que la gran mayoría de los cebadores (a excepción de F2-R233) dirigidos a los dos tipos de isoformas de *JARID2*, tanto en muestras de machos como de hembras, amplificaron las bandas deseadas (figs. 19 y 20). Dado esto, se consideró que no era necesario probar con más de 58°C, pese a que la  $T_m$

(temperatura de fusión) indicada para los cebadores diseñados abarcaba un rango de entre 56° a 61°C (ver tabla no. 2).

La PCR fue realizada bajo las especificaciones antes mencionadas, únicamente con las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada, como modo de prueba, en muestras de ambos sexos (M11 y H5). No se consideraron a las parejas de cebadores que incluían al cebador reverse R226 en las pruebas de amplificación, debido a un ajuste en el diseño experimental. Y, para las pruebas posteriores con cebadores dirigidos a la isoforma completa, tampoco se contemplaron a las parejas que incluían al cebador reverse R233, ya que, en combinación con cualquiera de los dos cebadores forward (F2/F3) amplificaba bandas inespecíficas que se mostraban muy notorias en los geles, sumando el hecho de que, la pareja F2-R233 no amplificó la banda deseada de 149 pb en ninguna de las PCRs de 30 (figs. 18a y b) y 35 ciclos (figs. 19 y 20).

La fig. 21 muestra los resultados de la electroforesis con los productos de la PCR modificada de 40 ciclos de amplificación. Se observa que, en todas las temperaturas de hibridación, las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada amplificaron las bandas esperadas tanto en la muestra del macho (M11) como en la de la hembra (H5). De hecho, revelaron un patrón de amplificación bastante similar, donde se amplificaron casi las mismas bandas inespecíficas, sin notarse cambios destacables entre una temperatura de hibridación y otra. Las parejas de cebadores que amplificaron justo los mismos productos en las muestras de ambos sexos y en todas las temperaturas de hibridación fueron F3-R126 y F3-R326; por lo que, la variación observada se debió a la amplificación de F2-R326 y F2-R126.

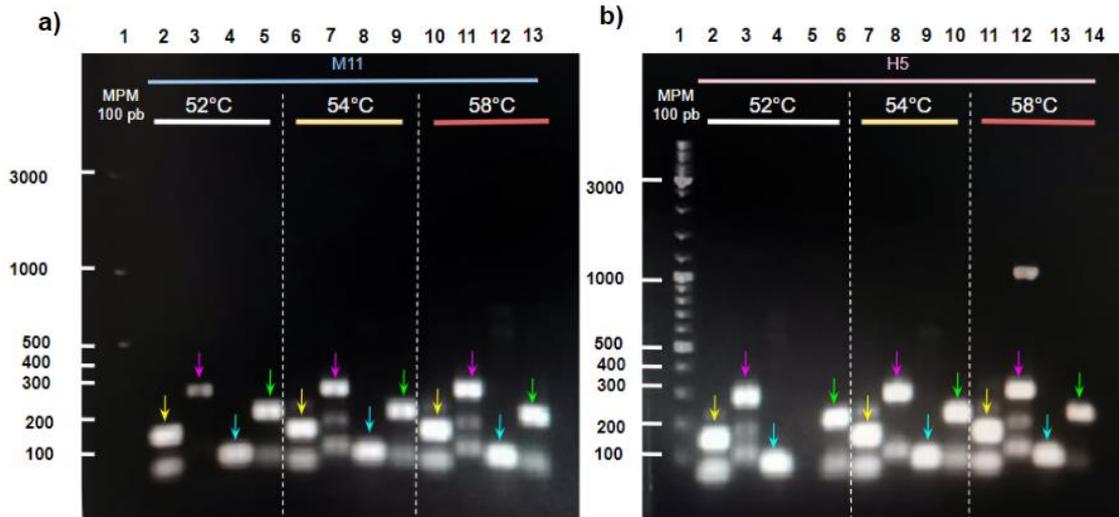
En la muestra del macho (M11) (fig. 21a), la temperatura de hibridación de 52°C resultó ser la más adecuada, ya que a esta temperatura la pareja de cebadores F2-R326 fue más específica, amplificando únicamente la banda de 285 pb. Esta misma banda se mostró acompañada de otras bandas inespecíficas a 54° y 58°C de hibridación. Así también, a 52°C se eliminó una banda inespecífica de poco más de 200 pb que había sido amplificada por la pareja F2-R126 con las otras temperaturas de hibridación. Sin embargo, las pruebas con los cebadores en la muestra de la hembra (H5) (fig. 21b), mostraron lo contrario, pues las bandas inespecíficas que no amplificaron con las parejas F2-R326 y F2-R126 en la muestra del macho a 52°C, si aparecieron en el gel a esta temperatura de hibridación. Solamente a 54°C de hibridación, se eliminó una de las bandas inespecíficas (>150 pb) amplificadas por la

pareja F2-R326, siendo esta la temperatura ideal para la muestra de la hembra. Por su parte, a 58°C de hibridación, esta misma pareja amplificó una banda inespecífica de más, que rondaba las 1000 pb, indicando que fue menos específica a esta temperatura, lo cual fue algo inesperado, si se considera que, por lo general, las temperaturas de hibridación más altas producen PCRs más específicas (Espinosa, 2007).

Respecto a la abundancia relativa de la isoforma truncada, entre la muestra del macho y la hembra, solo se notó una diferencia con la pareja F2-R326 a 52°C de hibridación: la banda amplificada de 285 pb tuvo menos producto en la muestra del macho (M11) que en la de la hembra (H5), un resultado que fue contrario a lo esperado. Aunque, esta pareja de cebadores fue más específica en el macho, puesto que, no amplificó fragmentos inespecíficos; mientras que, en la hembra si lo hizo. Previamente, en la PCR de 35 ciclos con temperatura de hibridación de 54°C, ya se había mostrado este mismo patrón, pero utilizando muestras de macho y hembra distintas (M18 y H2) (figs. 19 y 20).

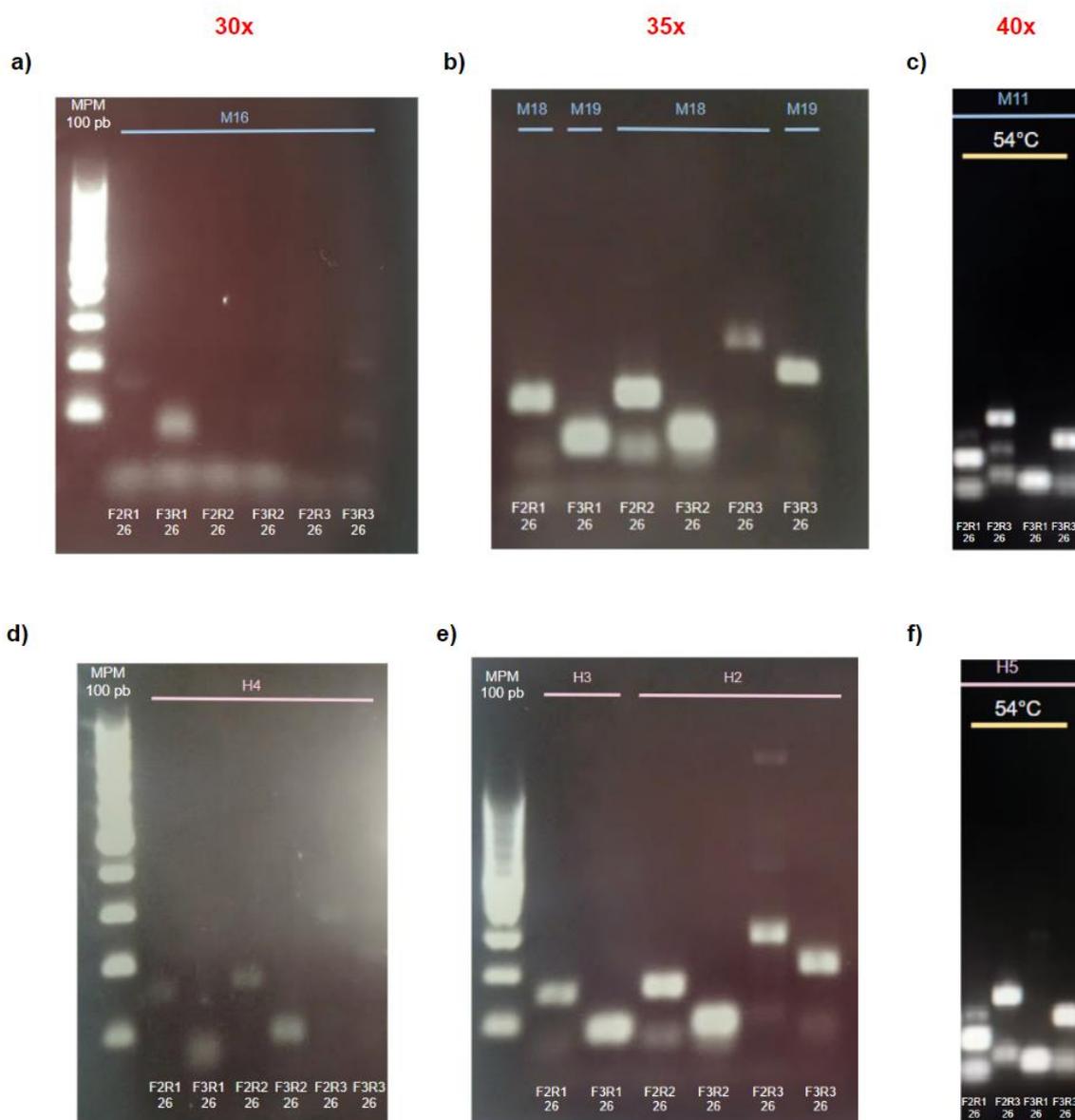
Por otro lado, la pareja F2-R126 que, anteriormente, en la PCR de 35 ciclos, había amplificado la banda esperada de 155 pb con más cantidad de producto en el macho que en la hembra, no mostró los mismos resultados a 40 ciclos de amplificación. Esta vez, las bandas se observaron exactamente iguales, sin haber diferencias visibles en la abundancia del amplificado, bajo ninguna temperatura de hibridación, entre las muestras del macho y la hembra (fig. 21).

F2		F3	
R126	R326	R126	R326
155 bp	285 bp	80 bp	210 bp



**Figura 21.** Gradiente de temperaturas de hibridación de las PCRs, de muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 1,5% contienen los productos obtenidos a partir de un perfil de 40 ciclos de amplificación, utilizando algunas de las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada de *JARID2*; las cuales, se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 5  $\mu$ l de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. (a) cDNA de macho como molde para los cebadores. Carriles: 1) marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb Plus; 2-5) ensayos a 52°C de hibridación; 6-9) ensayos a 54°C de hibridación; y, 10-13) ensayos a 58°C de hibridación. (b) cDNA de hembra como molde para los cebadores. Carriles: 1) marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb Plus; 2-6) ensayos a 52°C de hibridación (carril 5 vacío); 7-10) ensayos a 54°C de hibridación; y, carriles 11-14) ensayos a 58°C de hibridación. Las bandas esperadas se indican con las flechas, cuyo color refiere a la pareja de cebadores probada. Muestras: cDNA proveniente del macho 11 (M11) y la hembra 5 (H5). La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h en TBE 1X.

Al realizar una comparación de los resultados obtenidos a 54°C de temperatura de hibridación con los diferentes ciclos de amplificación empleados (30X, 35X y 40X) (fig. 22), se logra observar que hubo un aumento de los productos inespecíficos usando las parejas de cebadores: F2-R126, F2-R326 y F3-R326, conforme se fue incrementando el rendimiento de la PCR, tal como se había predicho. Algunas de estas bandas, no deseadas, ya habían aparecido anteriormente en los geles correspondientes a una PCR de 30 y 35 ciclos, pero con menor cantidad de producto, aunque, cabe mencionar que, fragmentos inespecíficos por arriba de las 300 pb fueron eliminados para la pareja F2R326 en la muestra de la hembra, al probar con 40 ciclos (fig. 22e y f). Por otro lado, comparando el rendimiento de la PCR de 35 con la de 40 ciclos, se nota que aumentó muy poco: las bandas siguieron manteniéndose gruesas, pero ligeramente más brillantes (figs. 22b, c, e y f).



**Figura 22. Comparación de los productos obtenidos por PCRs de 30 (a y d) 35 (b y e) y 40 ciclos de amplificación (c y f), en geles de agarosa al 1,5%, utilizando parejas de cebadores que amplifican la isoforma truncada de *JARID2*. Las muestras corresponden a cDNA de caparazón de crías macho (a, b, y c) y hembra (d, e, y f) de *L. olivacea*. Muestras: cDNA proveniente de los machos 11 (M11), 16 (M16), 18 (M18) y 19 (M19) y, de las hembras 2 (H2), 4 (H4) y 5 (H5).**

En vista de que las bandas amplificadas a 40 ciclos se mostraron muy gruesas, se buscó definir las para capturar mejor su tamaño en el gel. Para ello, se incrementó la concentración de agarosa en el gel, al 2% (p/v), que es el porcentaje que se recomienda para una mayor resolución de bandas cuyo tamaño varía de 100-2500 pb; rango dentro del cual, se encuentran los tamaños de las bandas esperadas (Pérez & Gómez, 2018). Además, se elaboraron geles con pozos más grandes, por lo que, se aumentó el volumen del producto de la PCR a cargar (10  $\mu$ l). Las modificaciones

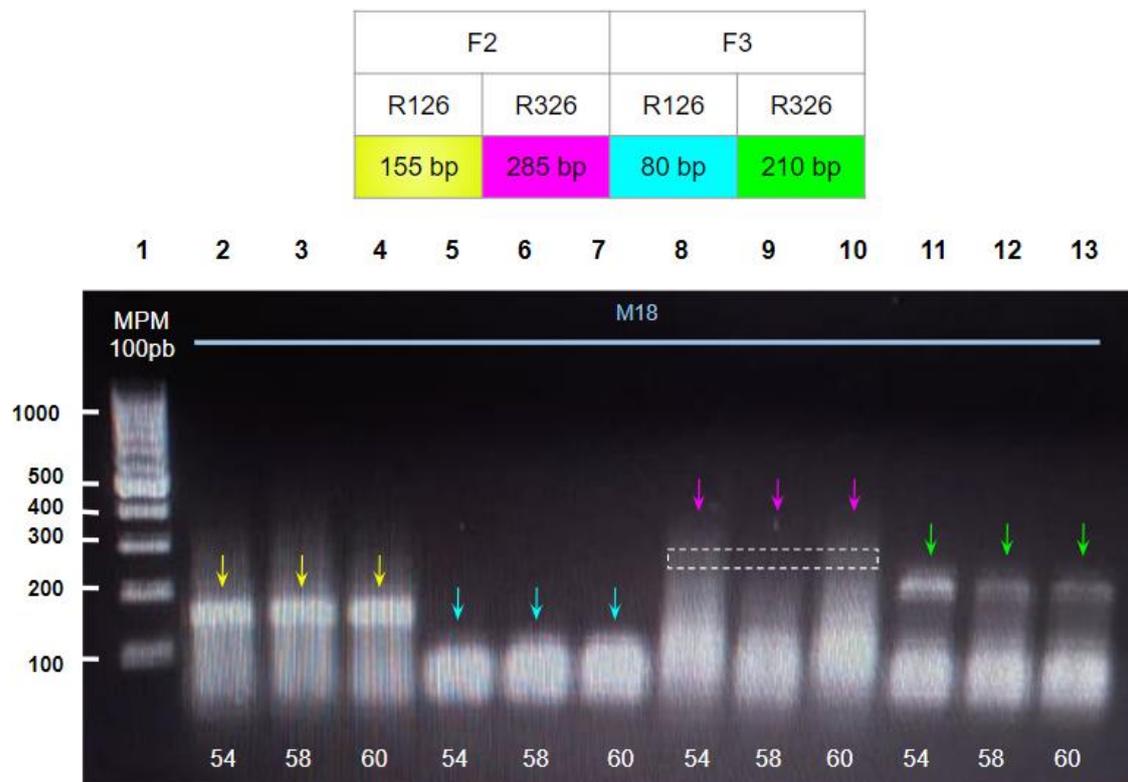
al protocolo se realizaron, probando únicamente las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada en la muestra de un macho (M18). La PCR se realizó con un gradiente de temperaturas de hibridación diferente: 54°, 58° y 60°C. Se eliminó la temperatura de 52°C y, en su lugar, se agregaron 60°C al gradiente, con el motivo de probar un rango de temperaturas de hibridación más cercano a la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión) indicada para los cebadores diseñados. Los resultados se muestran en la fig. 23, donde se puede apreciar que, en efecto, las bandas de 155 y 210 pb tuvieron una mayor definición incrementando la concentración de agarosa y la dimensión de los pozos en los geles. Sin embargo, la banda de 80 pb se mostró muy gruesa, no aumentó su definición y, la de 285 pb no se detectó con ninguna de las temperaturas de hibridación empleadas.

El gradiente de temperaturas de hibridación mostró que no hubo cambios detectables en la amplificación con las parejas de cebadores utilizadas, a excepción de F3-R326, la cual, resultó ser un poco más específica con una temperatura de 54°C de hibridación, pues el amplificado de 210 pb se observó ligeramente más brillante, aunque, también vino acompañado del mismo fragmento inespecífico (<100 pb) que se amplificó con las otras temperaturas de hibridación, poniendo en duda la especificidad de esta pareja a 54°C (fig. 23).

Comparando los productos de amplificación obtenidos a 54° y 58°C de hibridación, visualizados en geles al 1,5% y al 2% de agarosa, se observa que en el gel más concentrado (2%), la pareja F2-R126 amplificó la banda deseada de 155 pb en las diferentes temperaturas de hibridación, pero no los fragmentos inespecíficos que sí la acompañaron en el gel menos concentrado (1,5% de agarosa). La pareja F2-R326 tampoco amplificó las bandas inespecíficas que se mostraban junto con la banda de 285 pb, y no logró amplificar esta banda esperada. Solo se observó una banda gruesa, inespecífica, menor a 100 pb, que no había aparecido en el gel anterior (menos concentrado). La banda de 80 pb amplificada por F3-R126 se mantuvo igual en ambos geles (1,5 y 2% de agarosa) y con todas las temperaturas de hibridación. Donde se observó una gran diferencia fue con la pareja F3-R326, ya que en el gel al 1,5% de agarosa, amplificó la banda de 210 pb con una abundancia similar en todas las temperaturas de hibridación; mientras que, en el gel al 2% de agarosa, esta pareja, al parecer, fue más específica a 54°C, resultando en una banda con mayor producto de amplificación (figs. 21a y 23). Por otra parte, se puede notar, claramente, que en el gel al 2% de agarosa, las parejas F2-R126 y F2-R326 amplificaron los productos

junto con un “smear” que se podría asociar a una posible contaminación o degradación de la muestra (M18) (fig. 23).

Las diferencias observadas entre los resultados del gel al 1,5% de agarosa y los obtenidos en un gel con una concentración del 2%, podrían atribuirse, también, al hecho de que las PCRs se realizaron en termocicladores diferentes, pudiendo haber cambios respecto a la rapidez y precisión con las que alcanzaron las temperaturas programadas, repercutiendo, entonces, en los resultados de amplificación.



**Figura 23.** Gradiente de temperaturas de hibridación de la PCR de 40 ciclos de amplificación, de la muestra 18 correspondiente al cDNA de caparazón de una cría macho de *L. olivacea* (M18). Los gels de agarosa al 2% contienen los productos de la amplificación, utilizando algunas de las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada de *JARID2*; las cuales, se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10  $\mu$ l de la reacción de PCR fueron corridos en los gels. Las temperaturas de hibridación se indican en la parte inferior del gel. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2, 5, 8 y 11: ensayos a 54°C de temperatura de hibridación. Carriles 3, 6, 9 y 12: ensayos a 58°C de temperatura de hibridación. Carriles 4, 7, 10 y 13: ensayos a 60°C de temperatura de hibridación. Las bandas esperadas se indican con las flechas, cuyo color refiere a la pareja de cebadores probada. El recuadro contorneado con líneas discontinuas muestra la ausencia de las bandas esperadas de 285 pb para todas las temperaturas de hibridación. La electroforesis se desempeñó a 86 V por 30 min en TBE 1X.

Para definir aún más las bandas, en especial, la de 80 pb amplificada por la pareja de cebadores F3-R126, se disminuyó el volumen de los productos de la reacción de PCR a 1  $\mu$ L. Además, se redujo el voltaje de la electroforesis a 54 V y se

extendió el tiempo de la corrida a 1h con 30 min, para lograr separar bien las bandas en el gel, permitiendo así, identificar con mayor precisión su tamaño con ayuda del marcador de peso molecular. En esta nueva ronda de PCRs, se probaron las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada en la muestra objetivo de un macho (M18) y, también, se probaron las parejas dirigidas a la isoforma completa en la muestra objetivo de una hembra (H2). El gradiente de temperaturas de hibridación se mantuvo igual (54°, 58° y 60°C).

En los resultados con las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada, correspondientes a la muestra del macho (M18) (fig. 24a), se observa que las bandas fueron más tenues, pero no ganaron definición, por lo que no se logró el efecto deseado. De hecho, la banda de 155 pb amplificada por la pareja F2-R126 se mostró más gruesa que antes de modificar el protocolo y, además, volvió a aparecer junto con la misma banda inespecífica menor a 80 pb, que ya se había mostrado en otros resultados. En cuanto a las demás, la banda esperada de 80 pb amplificada por la pareja F3-R126, no mejoró su definición, pero disminuyó su brillo, mostrándose más tenue, por lo que fue un poco más fácil identificar su tamaño. La banda de 210 pb amplificada por F3-R326 se mostró casi imperceptible a la vista, siendo acompañada, de nuevo, por la misma banda inespecífica (<100 pb). Y, sobre la pareja F2-R326 no amplificó la banda esperada de 285 pb, ni la banda inespecífica antes mostrada de un tamaño menor a las 100 pb. Solo apareció un “*smear*” para todas las temperaturas de hibridación bajo las cuales fue probada esta pareja. Así también, el “*smear*” se observó para los productos amplificados de la pareja F2-R126, pero solo a una temperatura de hibridación de 54°C.

Nuevamente, no hubo diferencias en lo que se refiere a especificidad y abundancia de los fragmentos amplificados entre las diferentes temperaturas de hibridación para la mayoría de las parejas de cebadores. La única que mostró diferencias en la amplificación fue F3-R326, pues amplificó la banda de 210 pb ligeramente más brillante a una temperatura de hibridación de 54°C, revelando que quizá fue más específica a esta temperatura como ocurrió en los resultados anteriores.

Por su parte, las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa que fueron probadas en la muestra de la hembra (H2), amplificaron, de igual manera, bandas muy tenues y, extrañamente, la mayoría no amplificó el fragmento deseado, a excepción de la pareja F3-R133, cuya banda de 119 pb se observó con la misma

cantidad de producto, relativamente gruesa, y sin bandas inespecíficas acompañándola, en todas las temperaturas de hibridación empleadas (fig. 24b). Si bien, esta fue la única banda que concordó con el tamaño esperado, hubo otra, amplificada por la pareja F2-R333, que pareció tener el tamaño de 252 pb, pero como no se ajustó a este, fue considerada como una banda inespecífica. Además, para esta misma pareja se observó un '*smear*' que acompañó a sus amplificadas de cada una de las temperaturas de hibridación como sucedió con otras parejas dirigidas a la isoforma truncada.

En general, como se puede apreciar en ambos resultados, con parejas dirigidas a la isoforma completa y truncada, las bandas no mejoraron en su definición al disminuir el volumen de la reacción de PCR cargado en los pozos de los geles ni tampoco al continuar empleando una concentración del 2% de agarosa; modificación al protocolo que anteriormente sí había brindado mejores resultados para las parejas F2-R126 y F3-R326. Así también, se observa que la distancia entre las bandas en vez de aumentar se produjo una disminución, por lo que se dedujo que la combinación de voltaje y tiempo de corrida para la electroforesis fue inadecuada. Por otra parte, se confirma que posiblemente, algunos cebadores se contaminaron, lo que provocó el efecto del '*smear*' observado en ambos geles y el hecho de que la pareja F2-R326 no haya amplificado ninguna banda; y, también, se sospecha que este fue el motivo por el cual, las bandas inespecíficas menores a 100 pb, amplificadas por la pareja F2-R126 no fueron visibles, sesgando así los resultados previos.

Aunque estos resultados parecen mostrar que las parejas: F2-R133, F2-R333 y F3-R333 no fueron específicas bajo ninguna de las temperaturas de hibridación, no se puede confirmar esto, al menos no para una temperatura de hibridación de 54°C, dado que, en los resultados previos de las PCRs de 35 ciclos, estas parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa lograron amplificar todas las bandas esperadas en la muestra de la misma hembra (H2) y, también en la de un macho (M18) (fig. 19). De igual forma, tampoco se aprueban los resultados que indican la inespecificidad de la pareja F2-R326 dirigida a la isoforma truncada bajo las temperaturas de hibridación empleadas, ya que, esta pareja sí había logrado amplificar la banda esperada de 285 pb en la misma muestra (M18), así como en otras más (H2, H4, H5 y M11), en este mismo gradiente de temperaturas e incluso a 52°C de hibridación y a distintos ciclos de amplificación (30X, 35X y 40X).

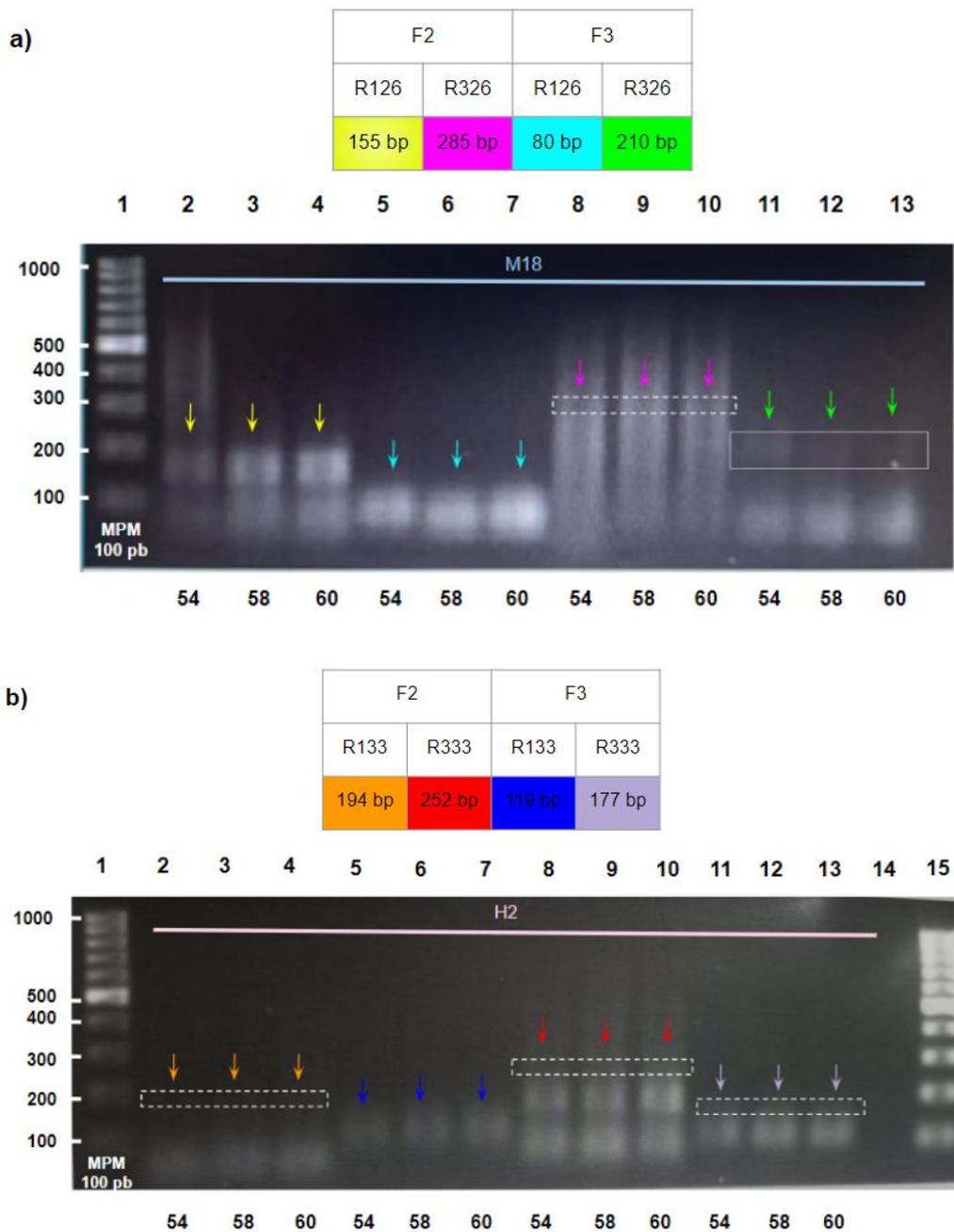


Figura 24. Gradiente de temperaturas de hibridación de las PCRs, de muestras de cDNA de caparazón de crías de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos obtenidos a partir de un perfil de 40 ciclos de amplificación, utilizando parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada de *JARID2*, en el molde de cDNA de una hembra (a), y parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa de este gen, en el molde de cDNA de un macho (b). Las parejas de cebadores utilizadas se indican en los cuadros de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 1 µl de la reacción de PCR fue corrido en los geles. Las temperaturas de hibridación se indican en la parte inferior de los geles. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2, 5, 8 y 11: ensayos a 54°C de temperatura de hibridación. Carriles 3, 6, 9 y 12: ensayos a 58°C de temperatura de hibridación. Carriles 4, 7, 10 y 13: ensayos a 60°C de temperatura de hibridación. Las bandas esperadas se indican con las flechas, cuyo color refiere a la pareja de cebadores probada. El recuadro contorneado en color gris muestra el desvanecimiento de las bandas de 210 pb a temperaturas de hibridación más altas; mientras, los recuadros contorneados con líneas discontinuas muestran la ausencia de las bandas esperadas de 285, 194, 252 y 177 pb para todas las temperaturas de hibridación.

Muestras: cDNA proveniente del macho 18 (M18) y la hembra 2 (H2). La electroforesis se desempeñó a 54 V por 1 h y 30 min en TBE 1X.

## **6.5. Primer ensayo de competencia entre parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma de *JARID2* en cDNA de caparazón**

Los productos de las parejas de cebadores diseñadas para amplificar regiones de la isoforma completa o truncada del gen *JARID2*, revelaron que no hubo un patrón de amplificación que permitiera distinguir machos de hembras, pues la mayoría amplificó las bandas esperadas en ambos sexos con una intensidad similar, indicando que las dos isoformas se expresan en el tejido de caparazón de las crías de *L. olivacea*, independientemente del sexo, y lo hacen en niveles de expresión similares (figs. 18-21). En un último intento por mostrar que hay una abundancia relativa diferencial de estas isoformas, donde la isoforma truncada es más abundante en los machos; mientras que, en las hembras lo es la isoforma completa, se pusieron a competir, en una misma reacción, parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma; para que así, la isoforma más abundante en una determinada muestra consumiera más recursos de la reacción de PCR y, consecuentemente, se viera reflejado en una mayor amplificación. Las combinaciones de parejas se realizaron de modo que el tamaño de los amplificados fuera cercano, para evitar que fragmentos más pequeños consumieran la mayor parte de los recursos.

Se eligieron cinco parejas de cebadores para el primer ensayo de competencia de acuerdo con criterios como especificidad, definición de las bandas amplificadas y señales de abundancia relativa diferencial de las isoformas entre machos y hembras. Con base en los últimos resultados de los productos de las PCRs de 40 ciclos de amplificación que fueron visualizados en geles al 2% de agarosa, se eligieron a las parejas F2-R126 y F3-R326 por haber amplificado bandas definidas de los fragmentos esperados (fig. 23); así también, se eligió a la pareja F3-R133 por haber sido la única pareja de cebadores dirigida a la isoforma completa en amplificar el fragmento esperado en la muestra de una hembra (H2), y por haber mostrado una alta especificidad con cualquiera de las temperaturas de hibridación probadas (54°, 58° y 60° C) (fig. 24b). Por otro lado, y tomando en cuenta los resultados de los productos de las PCRs de 35 ciclos de amplificación, la pareja F3-R333 fue seleccionada porque sus productos, visualizados en geles al 1,5% de agarosa, mostraron una mayor

abundancia de la isoforma completa en la muestra de una hembra (H2) en comparación a la de un macho (M18) (figs. 19 y 20). De manera similar, la pareja F2-R126 fue seleccionada por segunda vez porque sus productos, también visualizados en geles de agarosa al 1,5%, mostraron una mayor abundancia de la isoforma truncada en la muestra de un macho (M18) que en la de una hembra (H3) (figs. 19 y 20). Por último, la pareja F3-R126 fue elegida por mostrar una alta especificidad en todas las condiciones probadas (figs. 18-24).

Las combinaciones de las parejas de cebadores (ver tabla no. 4) se probaron en las muestras de un macho (M20) y una hembra (H2), las cuales, fueron seleccionadas aleatoriamente. La reacción de PCR se desempeñó con 40 ciclos de amplificación para la obtención de un buen rendimiento, y con una temperatura de hibridación de 54°C, para la cual, según los resultados previos, la mayoría de los cebadores amplificó con una especificidad aceptable. Para la electroforesis, se ocuparon 3 µL de los productos de la reacción de PCR, como medida inicial de prueba y, fueron corridos a 86 V, ya que la separación de las bandas resultó ser mejor que a 54 V (figs. 23 y 24).

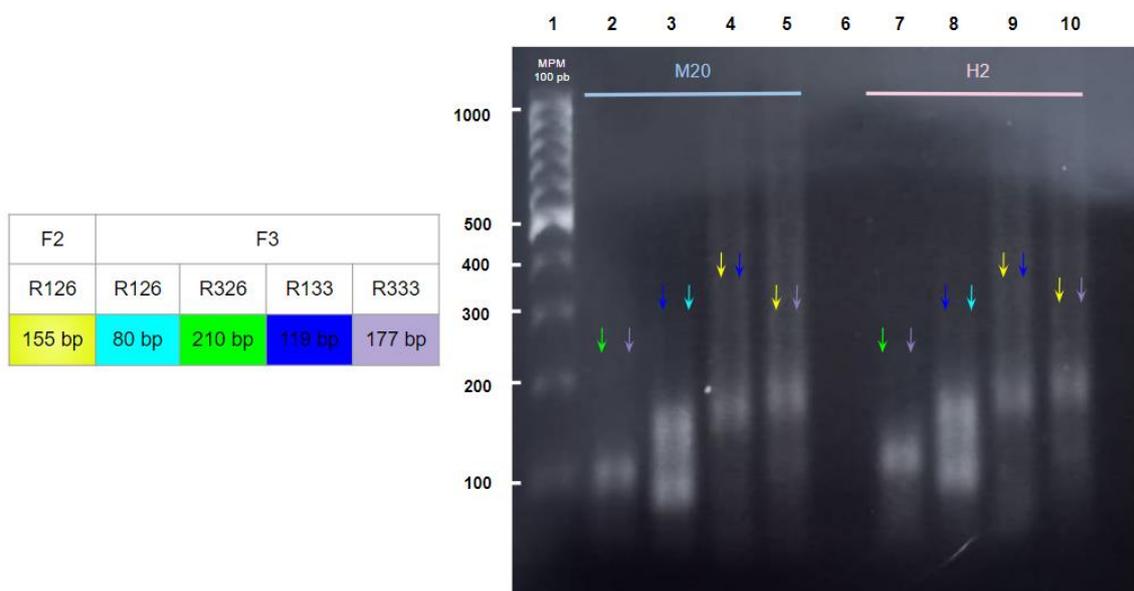
El análisis electroforético en un gel de agarosa al 2% (p/v) de los productos de la PCR, generados con la primera competencia entre las parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma, mostró que el volumen de la reacción que fue cargado en los pozos del gel no fue el adecuado, ya que las bandas se mostraron muy tenues, haciendo complicada su visualización. Por otra parte, las bandas lograron separarse muy bien, lo que se atribuye al tiempo prolongado (1h y 30 min) de la electroforesis y al voltaje empleado.

En cuanto a los resultados, para la primera combinación F3-R333/F3-R326, las parejas de cebadores no amplificaron ninguna de las bandas esperadas de 177 y 210 pb, respectivamente, en ninguna de las dos muestras (M20 y H2), pero los fragmentos inespecíficos observados dieron indicios de su posible amplificación, ya que, por un lado, en la muestra del macho (M20), se observa un fragmento de entre 80-100 pb que corresponde a la banda inespecífica que amplificaba junto con la de 210 pb en los resultados anteriores (figs. 18-24); mientras que, en la hembra (H2), se amplificó una banda por arriba de las 100 pb, la cual, figura a la banda inespecífica que se amplificaba con la de 177 pb (figs. 19, 20 y 24b). Estos resultados mostraron que, en combinación, los cebadores fueron inespecíficos a 54°C de temperatura de hibridación, lo que sugirió la modificación de esta condición en la PCR, para así, poder

observar las bandas deseadas, y confirmar la sospecha sobre si hay mayor abundancia de la isoforma truncada en la muestra del macho (M20) y de la isoforma completa en la de la hembra (H2).

Para la segunda combinación F3-R133/F3-R126, las parejas de cebadores amplificaron las bandas deseadas de 119 y 80 pb, respectivamente, en ambas muestras (M20 y H2), pero se observó que la cantidad de producto de los amplicones fue similar, indicando, por tanto, que no hubo diferencias en la abundancia de las isoformas truncada y completa para estas muestras. Y, por el contrario, las otras combinaciones de parejas de cebadores mostraron, aparentemente, que si hay diferencias en la abundancia; las parejas de la combinación F2-R126/F3-R133, únicamente, amplificaron la banda esperada de 155 pb en las dos muestras, lo que llevó a pensar que había mayor abundancia de la isoforma truncada, sin embargo, las últimas parejas F2-R126/F3-R333, contradijeron esto, debido a que solo amplificaron la banda de 177 pb en las dos muestras, indicando una mayor abundancia de la otra isoforma (completa). Esta variación en los resultados se podría deber a que la temperatura de hibridación fue adecuada para una de las parejas, pero no para su pareja competidora, en la reacción de PCR.

Los productos amplificados por todas las combinaciones de parejas de cebadores también dejaron ver un “smear” en el gel, siendo más pronunciado para las últimas combinaciones: F2-R126/F3-R133 y F2-R126/F3-R333.



**Figura 25. Primer ensayo de competencia entre parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma de *JARID2*, realizado para muestras de cDNA de caparazón de crías de *L. olivacea*. El gel de agarosa al 2% contiene los productos de la reacción de PCR realizada con 40**

ciclos de amplificación y 54°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 3 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carril 1: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma probadas en cDNA de un macho. Carril 6: vacío. Carriles 7-10: combinaciones de parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma probadas en cDNA de una hembra. El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente del macho 20 (M20) y la hembra 2 (H2). La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h y 30 min en TBE 1X.

## **6.6. Segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas de *JARID2* en cDNA de caparazón**

Los resultados del primer ensayo de competencia entre parejas de cebadores con especificidad opuesta por la isoforma, realizado en muestras de ambos sexos, arrojaron que la temperatura de hibridación (54°C) de la PCR no fue la adecuada, ya que los amplificados fueron inespecíficos usando algunas parejas en combinación y, con otras, solo se amplificó la banda deseada de una de las parejas puestas a competir (fig. 25). Dado lo anterior, se realizó un segundo ensayo de competencia, en el cual, se decidió probar con temperaturas de hibridación más altas de la reacción de PCR (58° y 60°C) y con nuevas combinaciones de las parejas de cebadores (ver tabla no. 5); todas ellas incluyeron a la pareja F3-R126 porque en el primer ensayo de competencia se acopló bien con su pareja competidora F3-R133 a una temperatura de hibridación de 54°C, pues ambas amplificaron las bandas esperadas en las dos muestras (H2 y M20). Por lo tanto, se eligió a F3-R126 para ser la pareja que sería combinada con las otras, también utilizadas en el primer ensayo, ya que su amplificado de 80 pb serviría como una banda de referencia contra la cual se podrían comparar los amplificados de las otras parejas de la competencia.

Nuevamente, se manejó un perfil de amplificación de 40 ciclos para las PCRs, y se utilizaron las mismas muestras (M20 y H2) correspondientes a un macho y una hembra, para probar las combinaciones de las parejas de cebadores que no precisamente cumplían con el requisito de tener especificidad opuesta por la isoforma como en el primer ensayo de competencia. Además, se incrementó el volumen de la reacción de PCR (5 µL) para ser cargado en los pozos, con el fin de obtener bandas más brillantes, aunque afectara su definición. El voltaje y el tiempo de la electroforesis se mantuvieron igual (86 V durante 1 h y 30 min).

Los geles de agarosa al 2%, donde fueron corridos los productos de las PCRs correspondientes al segundo ensayo de competencia, mostraron que, a 58°C de hibridación (fig. 26a), la combinación F3-R126/F3-R133 amplificó las dos bandas esperadas de 80 y 119 pb, respectivamente, en la muestra del macho (M20), y lo hizo con bastante producto. Sin embargo, en la hembra (H2), solo se amplificó una banda inespecífica que parece ser de 100 pb, y la cual, no había aparecido en los geles previamente analizados. A 60°C de hibridación (fig. 26b), esta combinación de parejas amplificó la misma banda inespecífica de aproximadamente 100 pb en las muestras de ambos sexos (M20 y H2), observándose más tenue en la hembra que en el macho.

Para la segunda combinación F3-R126/F2-R126, a 58°C de hibridación (fig. 26a), las parejas amplificaron las dos bandas esperadas de 80 y 155 pb, respectivamente, en las dos muestras, pero con diferencias apreciables; pues en el macho (M20), la banda de 155 pb se notó ligeramente más brillante y, al contrario, la de 80 pb fue mucho más tenue que en la hembra. De manera similar, a 60°C de hibridación (fig. 26b), las parejas amplificaron las dos bandas esperadas, pero con más cantidad de producto en el macho (M20), por lo que se mostraron más brillantes que en la hembra (H2). De hecho, la banda de 155 pb fue casi imperceptible en esta última. También, se puede observar que, al parecer, se amplificó un fragmento inespecífico de 100 pb en ambas muestras, siendo más notorio en el macho (M20).

Por otro lado, la tercera combinación F3-R126/F3-R333, a 58°C de hibridación (fig. 26a), amplificó una sola banda inespecífica en ambas muestras (M20 y H2). En la hembra contó con un tamaño de 100 pb y, en el macho (M20), la banda amplificada superó por muy poco esta medida, figurando a aquella que aparecía junto con la de 177 pb en resultados anteriores (figs. 19, 20 y 24b). Cabe mencionar que, para esta misma muestra (M20), parecen haber amplificado las bandas esperadas de 177 y 80 pb, sin embargo, como se mostraron muy difusas debido al “*smear*” que las acompañaba, no se contemplaron en los resultados. En cuanto al gel correspondiente a los productos de la tercera combinación, a 60°C de hibridación (fig. 26b), apareció una banda inespecífica de 100 pb en ambas muestras (M20 y H2).

La última combinación F3-R126/F3-R326, a 58°C de hibridación (fig. 26a), amplificó un solo fragmento de 100 pb en las dos muestras (M20 y H2), tal como sucedió con otras combinaciones de parejas de cebadores. Y, a 60°C de hibridación (fig. 26b), este mismo fragmento inespecífico apareció únicamente en el macho (M20). Para la muestra de la hembra (H2), no se amplificó ninguna banda.

Los productos amplificados por la primera combinación de parejas de cebadores F3-R126/F3-R133 en la PCR con 58°C de hibridación (fig. 26a), indicaron que las dos isoformas de *JARID2* fueron expresadas, con una abundancia similar, en el tejido de caparazón del macho 20. Sin embargo, estos resultados no fueron replicados por una PCR con 60°C de hibridación (fig. 26b). Por otra parte, la segunda combinación F3-R126/F2-R126 probada en una PCR con 58°C de hibridación (fig. 26a), mostró que la isoforma truncada de *JARID2* se expresó en las muestras de caparazón de ambos sexos (M20 y H2). Pero, al analizar, de forma separada, las bandas amplificadas por cada una de las parejas competidoras, se observó que, mientras la banda de 155 pb apuntó a una mayor abundancia de esta isoforma en el macho (M20); la banda de 80 pb demostró lo contrario, pues indicó que había una mayor abundancia en la hembra (H2). La prueba de esta combinación de parejas en la PCR con 60°C de hibridación (fig. 26b), reveló también que la isoforma truncada se expresó en ambas muestras (M20 y H2), pero con mayor abundancia en el macho (M20), siendo demostrado por las dos bandas de interés (155 y 80 pb). Respecto a las dos últimas combinaciones de parejas de cebadores, no fue posible sacar conclusiones sobre la abundancia de las isoformas en las muestras utilizadas porque solo amplificaron fragmentos inespecíficos, como ya se mencionó anteriormente.

Cabe mencionar que, al igual que en el primer ensayo de competencia, varios de los productos amplificados por las combinaciones de parejas de cebadores, vinieron acompañados de un barrido o “*smear*”, lo que se asocia con una degradación de las muestras utilizadas o bien, una muy posible contaminación de los reactivos e incluso de los propios cebadores.

F2	F3			
R126	R126	R326	R133	R333
155 bp	80 bp	210 bp	119 bp	177 bp

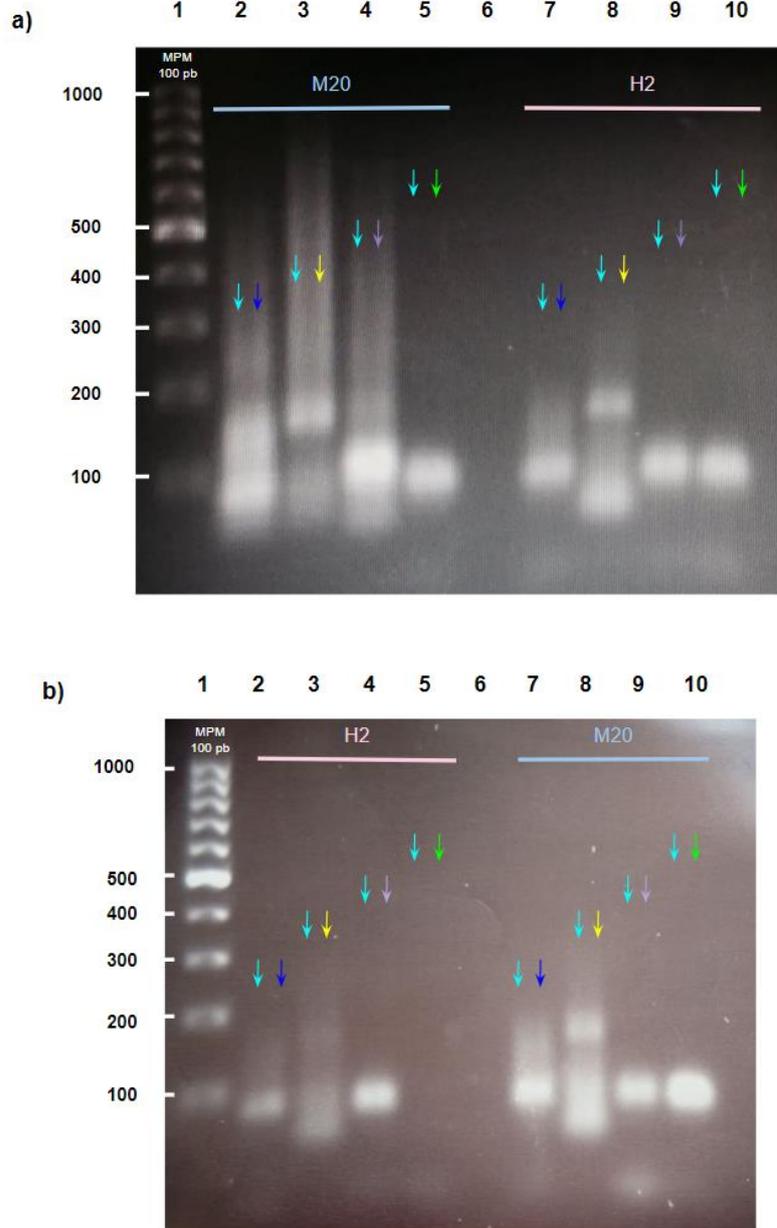


Figura 26. Segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando muestras de cDNA de caparazón de crías de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada a 58° (a) y 60°C (b) de temperatura de hibridación y con 40 ciclos de amplificación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 5 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. (a) PCR con 58°C de hibridación. Carriles: 1) marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb; 2-5) combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de un macho; 6) vacío; y 7-10) combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de una hembra. (b) PCR con

**60°C de hibridación. Carriles: 1) marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb; 2-5) combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de una hembra; 6) vacío; y 7-10) combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de un macho. El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente del macho 20 (M20) y la hembra 2 (H2). La electroforesis se desempeñó a 86 V por 1 h y 30 min en TBE 1X.**

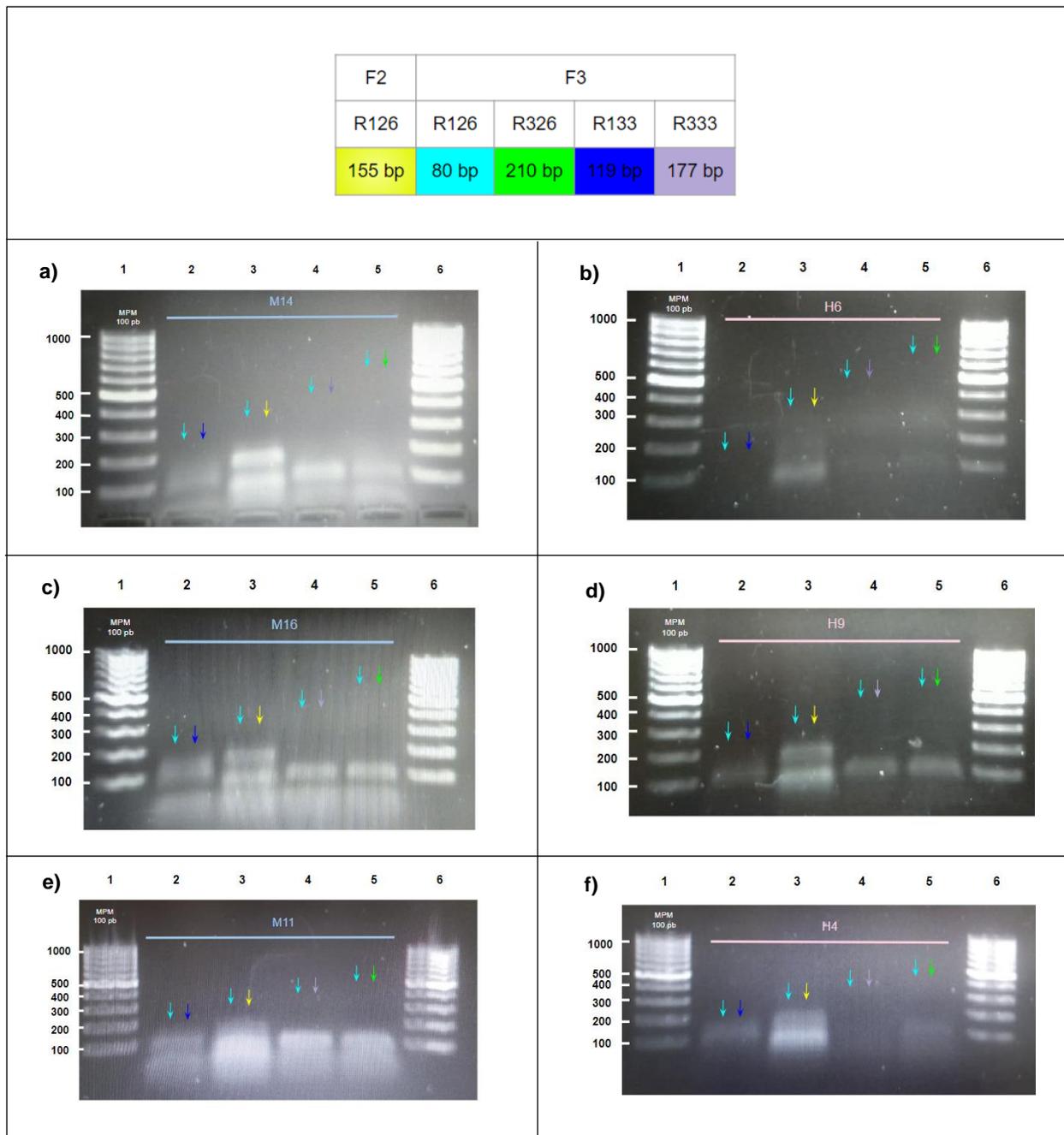
Otras muestras de cDNA de machos (M11, M14 y M16) y hembras (H4, H6, y H9) fueron utilizadas en el segundo ensayo de competencia, para ver si el patrón observado con la combinación F3-R126/F2-R126, a 60°C de hibridación, se repetía (fig. 27). Las PCRs fueron realizadas a esta temperatura de hibridación y con 40 ciclos de amplificación, como se había manejado anteriormente. Los geles se elaboraron con la misma concentración de agarosa (2%), pero con pozos más grandes, por lo que, se incrementó el volumen de la reacción de PCR a cargar en los mismos (10 µL). El voltaje y la duración de la electroforesis fueron de 124 V y 20 min, respectivamente, para agilizar el proceso.

Los análisis electroforéticos mostraron que todas las combinaciones de parejas de cebadores amplificaron la banda de 80 pb, únicamente, en las muestras de machos (M11, M14 y M16), por lo que, se asumió que la isoforma truncada se expresó en abundancia en el tejido de caparazón de estas crías del sexo masculino, marcando así, una diferencia con respecto a las hembras (H4, H6, y H9). Sin embargo, las bandas de 80 pb se mostraron muy difusas o sin mucha definición en los geles, debido a que el tiempo transcurrido de la electroforesis no fue suficiente para el voltaje empleado, y por lo cual, las bandas no se lograron separar bien (fig. 27a, c y e).

El patrón esperado por la combinación de interés, F3-R126/F2-R126, no se mostró en ninguno de los machos analizados, ya que, las dos bandas de 155 y 80 pb no amplificaron en abundancia. Pero, en la muestra del macho 14, se observó que el amplificado de 155 pb sí fue abundante, y aunque, el de 80 pb no lo fue, este resultado arrojó una vez más, que probablemente la isoforma truncada fue predominante en esta muestra (fig. 27a). En cuanto a los otros machos (M11 y M16), el amplicón de 155 pb no destacó, se mostró muy tenue o se mezcló con otras bandas como sucedió con el macho 11 (fig. 27c y e). Similarmente, en las hembras (H4, H6, y H9), esta banda amplificó con muy poco producto y, en la hembra 4, se mezcló con una banda inespecífica (fig. 27b, d y f).

Las otras combinaciones de parejas de cebadores amplificaron bandas inespecíficas de aproximadamente 100 pb en los machos, además de las esperadas de 80 pb. Y en las hembras, ocurrió lo mismo, pero solo amplificaron los fragmentos

inespecíficos de, al parecer, el mismo tamaño, mostrándose mucho más tenues que en los machos. Inclusive, fueron poco perceptibles o no se mostraron en el caso de las hembras 4 y 6 (fig. 27b y f). Estos resultados dejan en claro que la temperatura de hibridación no fue la adecuada para la mayoría de las parejas competidoras, a excepción de F3-R126 y F2-R126, las cuales, en combinación, resultaron acoplarse bien a 60°C de hibridación, únicamente en los machos analizados (M11, M14 y M16).



**Figura 27.** Panel de geles capturados a los 20 min de la electroforesis, que retrata los resultados del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando diferentes muestras de cDNA de

caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada con 40 ciclos de amplificación y a 60°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de macho (a, c, y e) y de hembra (b, d, y f). El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente de los machos 14 (M14), 16 (M16) y 11 (M11) y, de las hembras 6 (H6), 9 (H9) y 4 (H4). La electroforesis se desempeñó a 124 V por 20 min en TBE 1X.

Para obtener mejores resultados con bandas bien separadas y mejor definidas, se probaron por tercera vez, las combinaciones de parejas de cebadores del segundo ensayo de competencia solamente en la muestra del macho 16 (M16) y la hembra 9 (H9), modificando el tiempo de la electroforesis de 20 a 30 min para la corrida de los productos de la PCR en geles de agarosa al 2% (fig. 28). Se tomaron capturas de los geles a los 15 (fig. 28a y c) y 30 min (fig. 28b y d) transcurridos de la electroforesis, en las cuales, se observó la pérdida del patrón antes visto en los machos, puesto que, a los 15 min, las bandas esperadas de 80 pb parecieron haber amplificado con todas las combinaciones de parejas de cebadores en las muestras de ambos sexos (M16 y H9), pero, además, alcanzados los 30 min estas bandas se posicionaron más abajo en el gel y se difuminaron, desapareciendo casi por completo. Esto pudo ser debido a que el campo eléctrico fue muy fuerte y que, en combinación con un tiempo más prolongado de la electroforesis, hizo que estos pequeños fragmentos no fueran retenidos en los geles. Sin embargo, también surgió la sospecha de que probablemente podrían ser dímeros de cebador, ya que, en las capturas de los geles de ambas muestras (M16 y H9), a los 30 min, aparecen bandas que aparentan tener un tamaño de 80 pb y, las cuales, podrían haber sido confundidas, en resultados previos, con bandas inespecíficas de aproximadamente 100 pb (figs. 26 y 27). Otra de las bandas que aparenta tener este tamaño, es un fragmento amplificado por la segunda combinación F3-R126/F2-R126, que se puede observar a los 30 min en las dos muestras analizadas (M16 y H9), pero que, también podría corresponder al fragmento inespecífico que se amplificaba junto con la banda de 155 pb en geles anteriores (figs. 19, 20, 21 y 24a). De los resultados también capturados a los 30 min, se puede apreciar que, en las dos muestras (M16 y H9), una de las bandas amplificadas por la primera combinación F3-R126/F3-R133 podría ser del tamaño esperado (119 pb), pero, al encontrarse por debajo de la posición en la que, por lo general, se hallaba, se tomó como un fragmento inespecífico. Y, finalmente, la única

banda esperada, de la que no se puso en duda su tamaño, fue aquella de 155 pb, amplificada por la pareja competidora F2-R126 en las muestras de ambos sexos (M16 y H9), y que fue detectada a los 15 y 30 min.

Como no se hallaron diferencias respecto a la cantidad de producto de los amplicones de 155 pb y los posibles de 80 y 119 pb en las muestras del macho (M16) y la hembra (H9), se concluyó que, posiblemente las dos isoformas de *JARID2* se expresen en niveles similares en estas dos muestras.

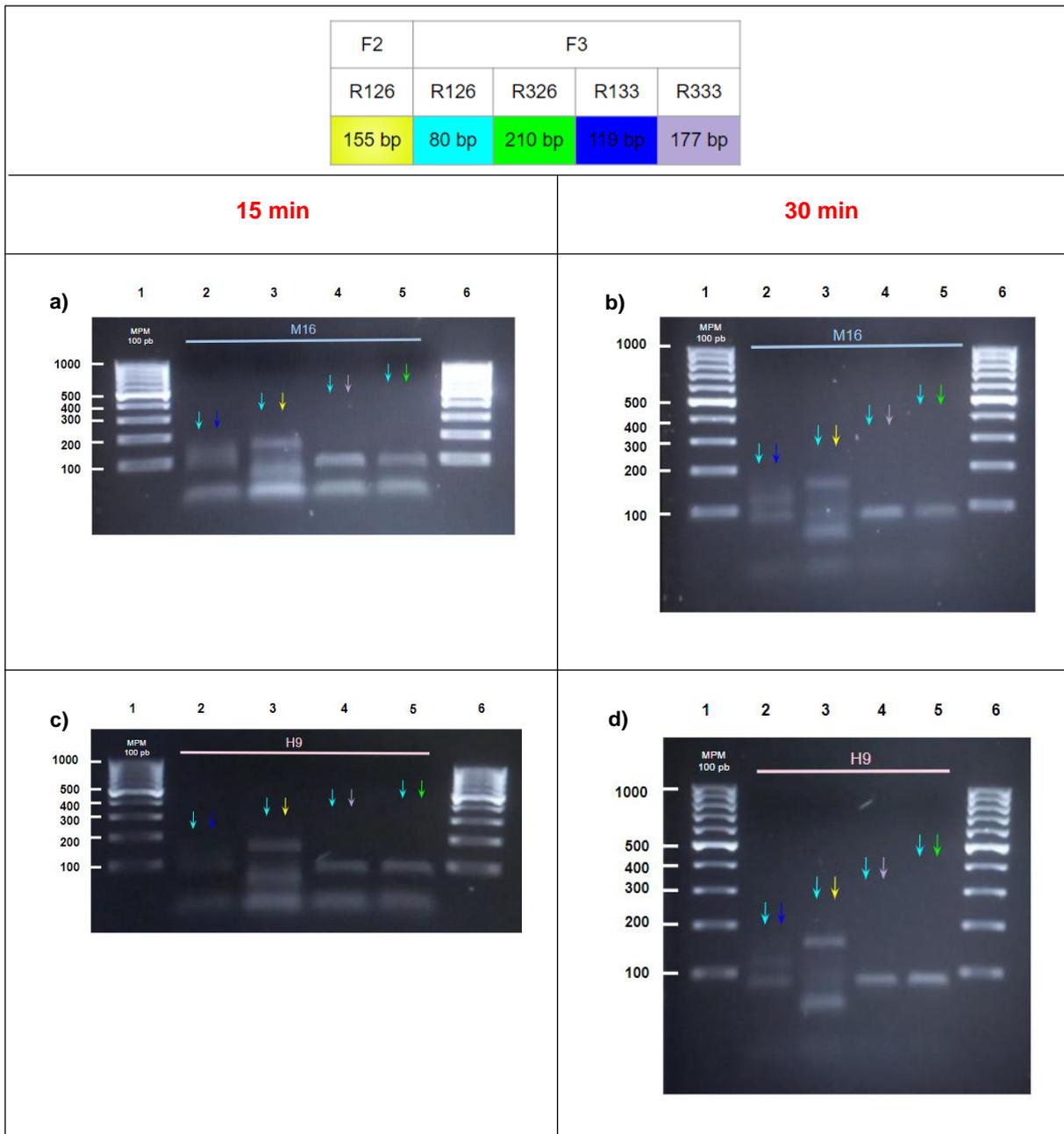


Figura 28. Panel comparativo de geles capturados a los 15 (a y c) y 30 min (b y d) de la electroforesis, sobre los resultados del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles

de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada con 40 ciclos de amplificación y a 60°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de macho (a y b) y de hembra (c y d). El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente del macho 16 (M16) y la hembra 9 (H9). La electroforesis se desempeñó a 124 V por 30 min en TBE 1X.

En otras muestras de machos (M13, M14 y M18) y hembras (H1, H3, y H6), los productos de las combinaciones de parejas de cebadores del segundo ensayo de competencia, que fueron corridos, de igual manera, durante 30 minutos en geles de agarosa al 2%, arrojaron resultados variados. Comenzando con las bandas esperadas de 80 pb amplificadas por la gran mayoría de combinaciones en las muestras de ambos sexos; estas volvieron a confundir los resultados, ya que su posición fue cuestionada nuevamente debido a que en algunas muestras (H1 y H6) parecían estar muy cercanas a la marca de 100 pb del marcador de peso molecular (fig. 29b y d), tal como aparecían en los primeros resultados, mientras que en otras (M18, M14 y de nuevo H6), se les podía asociar con aquellas que se hallaban un poco más por debajo de dicha marca (fig. 29a, b y c), o bien, parecían haberse difuminado casi al final del gel como si hubieran aparecido durante los primeros 15 min de la electroforesis (fig. 29a y b), o incluso, no aparecieron como da el caso de la hembra 3 y posiblemente el macho 13 (fig. 29e y f). En cuanto a las bandas esperadas por las otras parejas competidoras, la de 155 pb amplificó en todas las muestras analizadas, pero con una intensidad variable entre y dentro de las muestras de ambos sexos. De igual manera, la banda de 210 pb que solo fue amplificada en cuatro de las seis muestras varió en la cantidad de producto amplificado, notándose bastante brillante en el macho 13 y la hembra 3, y muy tenue en el resto de las analizadas (fig. 29c, d, e y f). Respecto a las bandas esperadas de 119 y 177 pb, solo se observaron en la hembra 1, pero se mostraron muy tenues (fig. 29d). Cabe la posibilidad de que las bandas esperadas de 119, 177 y 210 pb no hayan amplificado en algunas de las muestras debido a que la temperatura de hibridación (60°C) de la PCR, fue muy alta, lo que repercutió, quizá, en la unión de los cebadores con las bases complementarias del fragmento a amplificar, o también podría deberse a que los recursos de la reacción fueron “consumidos” por los fragmentos más pequeños como los vistos de 80-100 pb en los geles (fig. 29).

La presencia de la banda de 155 pb amplificada por la pareja competidora F2-R126 en todas las muestras, indicó que la isoforma truncada de *JARID2* se expresó

en el tejido de caparazón de los machos (M13, M14 y M18) y hembras analizadas (H1, H3, y H6) con diferencias en la abundancia que, sin embargo, no permitieron distinguirlos entre sí (fig. 29). La banda de 210 pb amplificada por otra de las parejas competidoras, F3-R326, también remarcó la expresión de esta isoforma, con baja abundancia en el macho 18 y la hembra 1 (fig. 29c, e y f), pero con mayor abundancia en la hembra 3 y el macho 13 (fig. 29d). Por otro lado, la amplificación, en la hembra 1, de las bandas de 119 y 177 pb por las parejas F3-R133 y F3-R333, respectivamente, mostró que la isoforma completa fue expresada, únicamente, con baja abundancia en el tejido de caparazón de este individuo (fig. 29d). Y, acerca de las posibles bandas de 80 pb amplificadas por la pareja competidora F3-R126, estas no fueron consideradas, por lo que, no se formularon conclusiones sobre los resultados de la competencia por los recursos de la reacción de PCR, pues la comparación de los amplificados de las parejas competidoras contra la banda de 80 pb no fue posible.

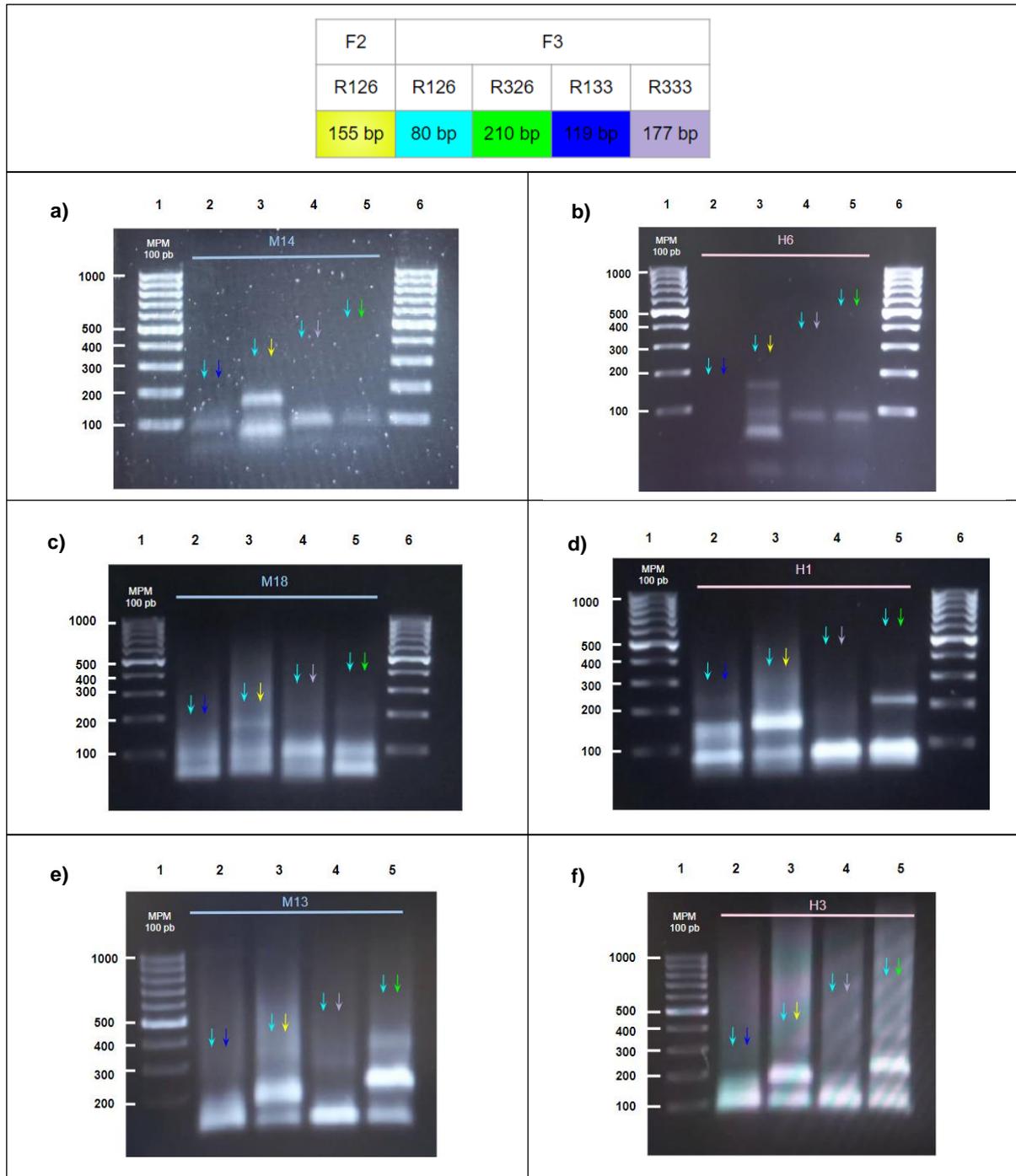
Finalmente, se realizó la prueba de estas combinaciones de parejas de cebadores en el resto de las muestras de machos (M11, M12, M15, M17, M19 y M20) y hembras (H2, H4, H5, H7, H8 y H10), modificando únicamente la duración de la electroforesis de 30 a 45 min (figs. 30, 31 y 32). Una vez más, los análisis electroforéticos mostraron resultados confusos acerca de las bandas de 80 pb, puesto que todas las combinaciones amplificaron, tanto en machos como en hembras, dos fragmentos que aparentaron tener este tamaño: uno de ellos hallado justo por debajo de la marca de 100 pb del marcador de peso molecular como sucedió en las muestras de las hembras 1 y 6 (fig. 29b y d), y que, sin embargo, en ciertas muestras pareció ser de 100 pb, confundándose con un fragmento inespecífico (figs. 30a y c, 31a y b); y el otro, encontrado más por debajo de dicha marca como también ocurrió en el macho 18 (fig. 29c), pero que en algunas muestras no fue amplificado por la combinación F3-R126/F3-R333 (figs. 30a, 31b y d; 32a). De cualquier forma, estas bandas amplificaron con diferente cantidad de producto entre y dentro de las muestras de ambos sexos, por lo que, no se consiguió observar un patrón que permitiera distinguir machos de hembras. Respecto a las otras bandas esperadas, la de 155 pb amplificó en cinco hembras (H2, H4, H5, H7 y H8) y en tres de los machos (M11, M17 y M20), con muy poco producto, siendo apenas perceptibles a la vista, aunque, en el macho 20, sí se destacó (figs. 30a y b; 31b, c y d; 32b, c y d). De manera similar y, curiosamente, la banda de 119 pb amplificó en casi las mismas muestras, cuatro

hembras (H2, H4, H5 y H7) y dos machos (M17 y M20), mostrándose sumamente tenue, a excepción del macho 20, donde se observó ligeramente más brillante (figs. 31b, c y d; 32b, c y d). Por otra parte, la banda de 210 pb pareció amplificarse en las hembras 8 y 4 (H8 y H4), pero dado que los amplificadores no se distinguieron bien, no se confirmaron estos resultados (figs. 30b y 31b). De igual forma, sucedió con la banda de 177 pb, únicamente observada en la hembra 4 (H4), la cual, tampoco se alcanzó a apreciar bien en el gel (fig. 31b). Extrañamente, fragmentos inespecíficos por arriba de las 100 pb también fueron amplificadas por la mayoría de las combinaciones en todas las muestras analizadas.

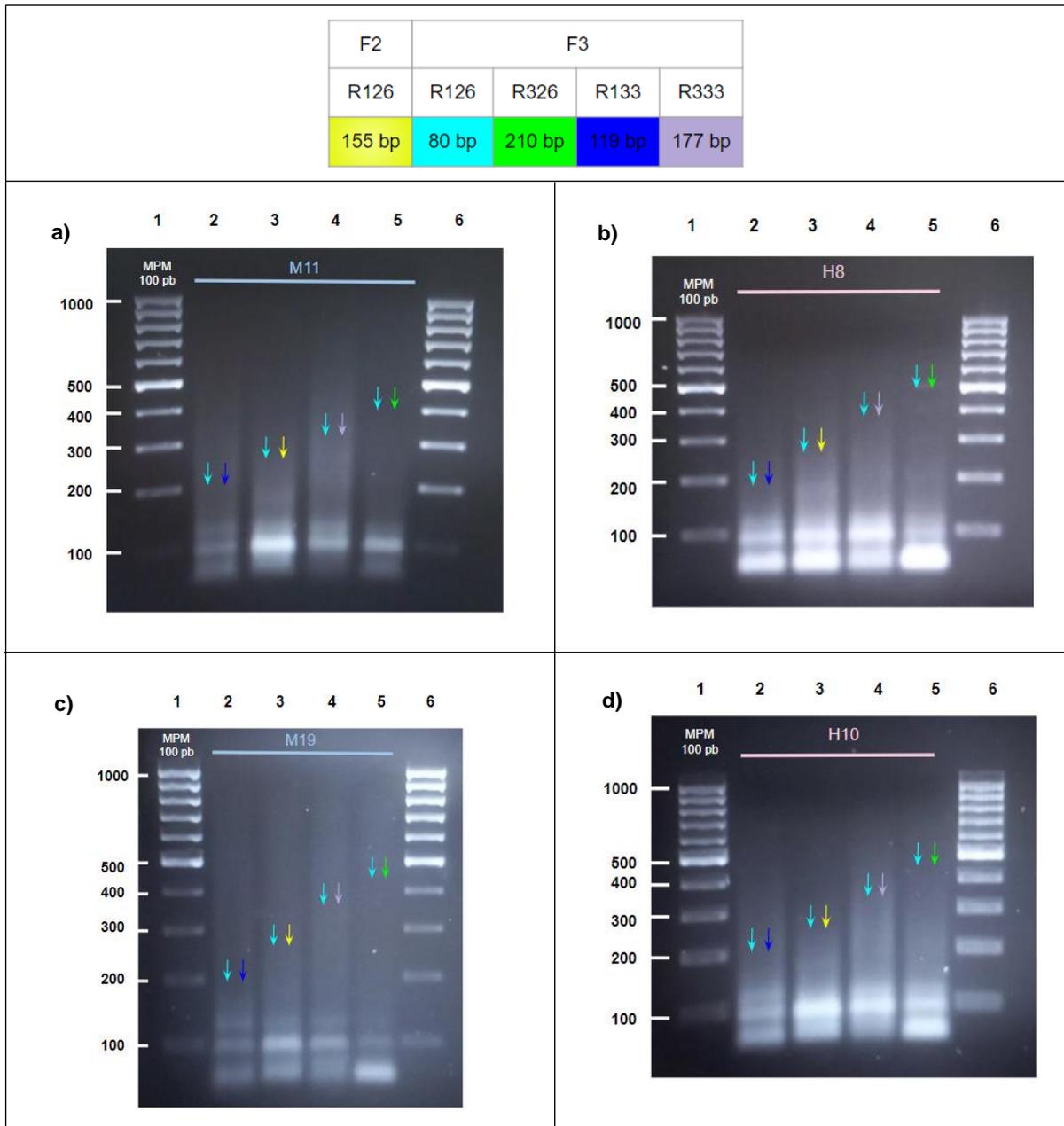
Estos resultados tomados en conjunto (incluyendo las posibles bandas de 80 pb) revelaron que, al parecer, la isoforma trunca de *JARID2* fue expresada en el tejido de caparazón de todos los machos (M11, M12, M15, M17, M19 y M20) y hembras (H2, H4, H5, H7, H8 y H10) analizados, confirmándose su expresión en tan solo cinco hembras (H2, H4, H5, H7 y H8) y tres machos (M11, M17 y M20). La abundancia de esta isoforma varió, sin mostrarse un patrón para la identificación del sexo de las muestras. Por otro lado, la isoforma completa fue expresada en cuatro hembras (H2, H4, H5 y H7) y dos machos (M17 y M20), con una abundancia similar (baja), que nuevamente, no arrojó ningún patrón.

Sobre los resultados de la competencia por los recursos de la reacción de la PCR, no se obtuvieron datos en términos de la abundancia de las isoformas en estas muestras debido a la confusión acerca de la posición de las bandas de 80 pb, las cuales, además, parecieron haberse amplificado con más cantidad de producto, lo que dejó ver que, posiblemente, los recursos fueron “consumidos” por estos fragmentos pequeños, pues al observar las pocas bandas amplificadas de mayor tamaño, éstas apenas arrojaron señales de su amplificación.

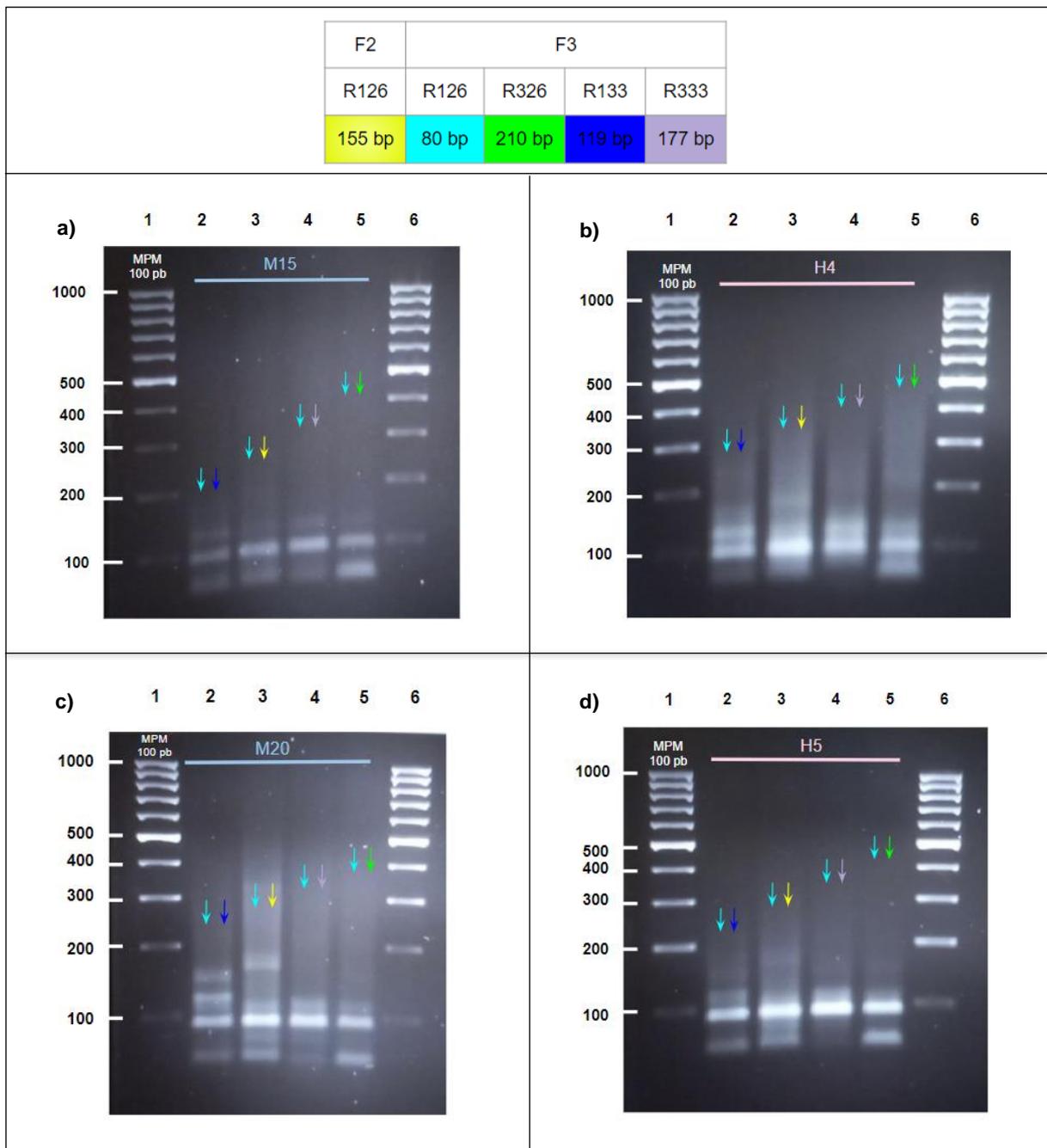
Cabe resaltar que, para estas últimas muestras de machos (M11, M12, M13, M15, M17, M18, M19 y M20) y hembras (H1, H2, H3, H4, H5, H7, H8 y H10) analizadas, todas las amplificaciones de las combinaciones de parejas de cebadores aparecieron junto con un barrido o “*smear*”, lo cual fue un indicativo de que el material genético utilizado pudo haberse degradado por el tiempo que llevaba almacenado o por el descongelamiento recurrente de las muestras. Así también, se asoció con una posible contaminación de los reactivos. Como consecuencia, esto podría haber alterado los resultados de la amplificación.



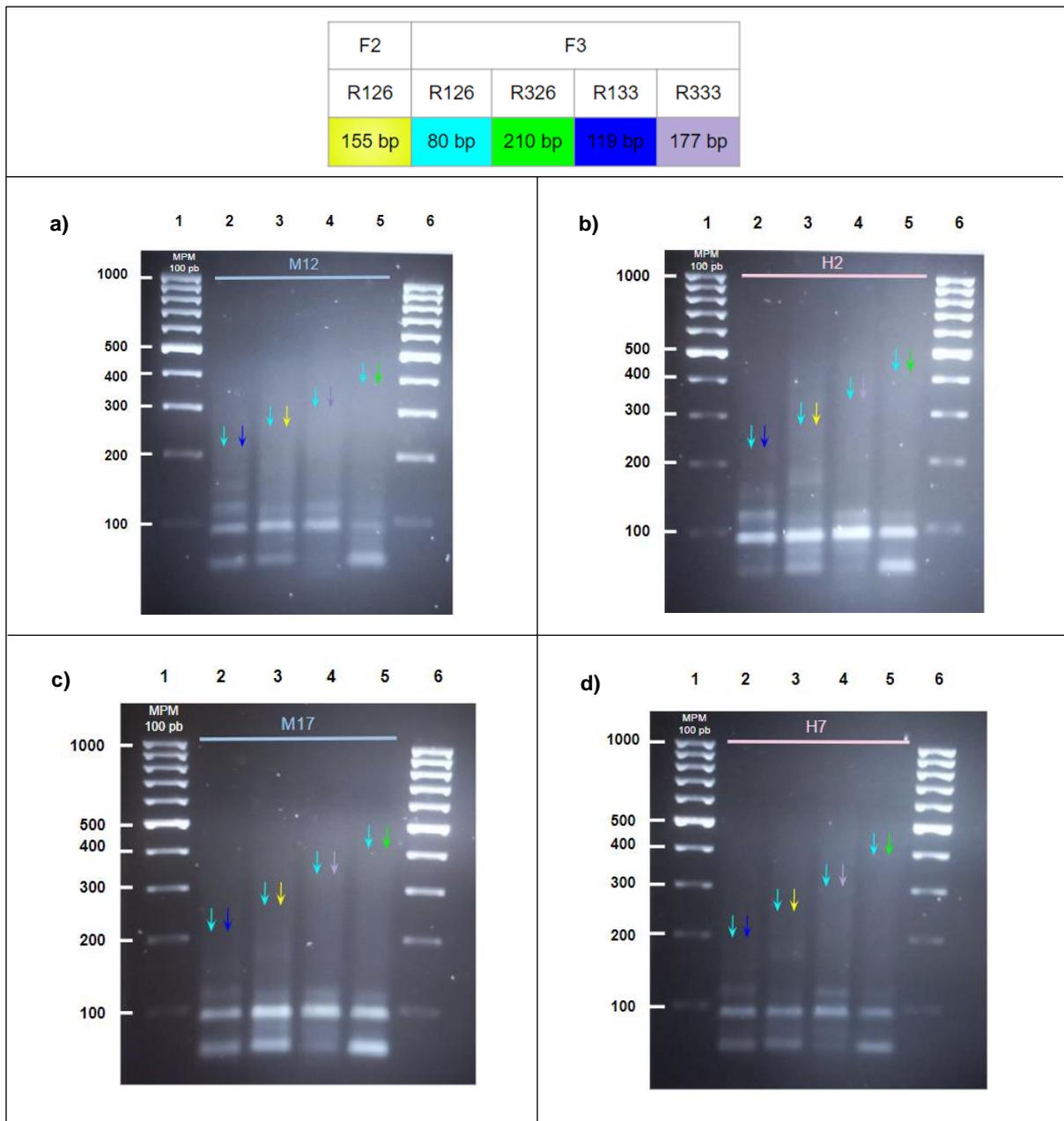
**Figura 29.** Panel de geles capturados a los 30 min de la electroforesis, que retrata los resultados del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada con 40 ciclos de amplificación y a 60°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de macho (a, c y e) y de hembra (b, d y f). Carril 6 ausente en la hembra 3 (H3) y el macho 13 (M13). El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente de los machos 13 (M13), 14 (M14) y 18 (M18) y, de las hembras 1 (H1), 3 (H3) y 6 (H6). La electroforesis se desempeñó a 124 V por 30 min en TBE 1X.



**Figura 30.** Primer panel de geles capturados a los 45 min de la electroforesis, que retrata los resultados del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada con 40 ciclos de amplificación y a 60°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de macho (a y c) y de hembra (b y d). El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente de los machos 11 (M11) y 19 (M19) y, de las hembras 8 (H8) y 10 (H10). La electroforesis se desempeñó a 124 V por 45 min en TBE 1X.



**Figura 31. Segundo panel de geles capturados a los 45 min de la electroforesis, que retrata los resultados del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada con 40 ciclos de amplificación y a 60°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de macho (a y c) y de hembra (b y d). El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente de los machos 15 (M15) y 20 (M20) y, de las hembras 4 (H4) y 5 (H5). La electroforesis se desempeñó a 124 V por 45 min en TBE 1X.**



**Figura 32.** Tercer panel de geles capturados a los 45 min de la electroforesis, que retrata los resultados del segundo ensayo de competencia entre parejas de cebadores diseñados para amplificar las isoformas (truncada y completa) del gen *JARID2*, utilizando muestras de cDNA de caparazón de crías macho y hembra de *L. olivacea*. Los geles de agarosa al 2% contienen los productos de la reacción de PCR realizada con 40 ciclos de amplificación y a 60°C de temperatura de hibridación. Las parejas de cebadores utilizadas se indican en el cuadro de texto junto con los tamaños de los fragmentos que amplifican. 10 µl de la reacción de PCR fueron corridos en los geles. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular, GeneRuler 100 pb. Carriles 2-5: combinaciones de parejas de cebadores probadas en cDNA de macho (a y c) de hembra (b y d). El color de las flechas indica las bandas esperadas según las parejas de cebadores probadas en combinación. Muestras: cDNA proveniente de los machos 12 (M12) y 17 (M17) y, de las hembras 2 (H2) y 7 (H7). La electroforesis se desempeñó a 124 V por 45 min en TBE 1X.

## 7. Discusión



*JARID2* es un gen que exhibe *splicing* alternativo dependiente de la temperatura (Deveson, et al., 2017). Anteriormente, en un estudio llevado a cabo en el laboratorio actual, se encontró que el nivel de expresión de las variantes de este gen, en su forma completa y truncada, difería de acuerdo con la temperatura de incubación a la que estaban sometidos embriones de *L. olivacea*. El análisis de RNA-seq realizado con muestras provenientes de distintos tejidos: cerebro, hígado, mesonefros y gónadas, reveló una mayor expresión de la isoforma completa en muestras de embriones que habían sido incubados a 33°C (FPT), y de la isoforma truncada en aquellas correspondientes a embriones incubados a 26°C (MPT). Tomando este trabajo como único antecedente, la presente tesis se enfocó en desarrollar un protocolo no invasivo para sexar muestras de RNA de caparazón provenientes de crías de *L. olivacea*, utilizando cebadores específicos de las isoformas de *JARID2* en pruebas PCR de punto final. La técnica empleada fue la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en su versión estándar, por lo que el análisis de los niveles de expresión fue meramente cualitativo, dado que no se hizo ninguna adaptación a la PCR para una medición semi-cuantitativa o cuantitativa. Posteriormente, se realizaron ensayos de competencia entre parejas de cebadores con o sin especificidad opuesta por la isoforma, a través de PCRs dúplex como una forma alternativa de evaluar la abundancia relativa de estas isoformas.

A partir de los resultados generados con las primeras pruebas PCRs individuales, con configuración de 30 y 35 ciclos de amplificación, se seleccionaron parejas candidatas para el sexado de las muestras de caparazón, ya que sus amplicones revelaron una abundancia diferencial de alguna de las dos isoformas entre los sexos (fig. 18, 29 y 20). De las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa contemplamos a F3-R126 y F2-R126 que amplifican fragmentos de 80 y 155 pb, respectivamente; mientras que, de las parejas dirigidas a la otra isoforma, la completa, se tomó en cuenta a F3-R233, F3-R333 y F2-R333 que amplifican fragmentos de 74, 177 y 252 pb, respectivamente. Sin embargo, con ninguna de estas parejas se pudo replicar los resultados positivos obtenidos, utilizando otras muestras. Creemos que, en parte, fue debido a las modificaciones que se fueron realizando al protocolo, principalmente para optimizar la reacción de PCR.

La primera modificación consistió en incrementar el número de ciclos para mejorar el rendimiento de las PCRs ya que, en general, no se obtuvo suficiente producto de los fragmentos deseados con la mayoría de las parejas de cebadores en las muestras de ambos sexos (fig. 18). Particularmente, las PCRs donde fueron probadas las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma completa presentaron un rendimiento más bajo que aquellas en las que se probaron las otras parejas, cuyo objetivo fue la isoforma truncada (figs. 19 y 20). Esto nos indica que las primeras tuvieron un valor Ct (valor umbral del ciclo) más bajo que las segundas, es decir, requerían de un mayor número de ciclos para que los productos fueran detectables. En nuestro afán de conseguir un mayor rendimiento, tras observar los amplicones obtenidos con 35 ciclos de amplificación, se decidió aumentar los ciclos hasta 40, probando únicamente las parejas dirigidas a la isoforma truncada (fig. 21). Sin embargo, este fue un error, ya que, en vez de favorecer los resultados, los obstaculizó al incrementar las posibilidades de aparición de bandas inespecíficas y de disminuir aquellas de encontrar diferencias notables respecto a la abundancia de esta isoforma entre los sexos. De hecho, no era necesario configurar las PCRs con más de 35 ciclos para las parejas dirigidas a la isoforma truncada, pues viendo los resultados previos, era evidente que se necesitaban reducir, dado que el producto de los amplicones ya era exuberante para los fines requeridos; los resultados con la pareja F2-R126 fueron una muestra de ello, pues los amplicones de 155 pb mostraron una sutil diferencia que solo podía ser confirmada si se disminuía el número de ciclos (figs. 19 y 20). Más bien, la prueba debió realizarse con las parejas dirigidas a la isoforma completa, ya que, con 35 ciclos de amplificación, la mayoría amplificó con muy poco producto. Por lo tanto, en este caso, sí era necesario mejorar el rendimiento, en especial, para las parejas F2-R333 y F3-R333, cuyos amplicones de 252 y 177 pb, respectivamente, mostraron una ligera señal de que había más abundancia de la isoforma completa en la muestra de la hembra (H2) que del macho (M18) (figs. 19 y 20). Quizá, potencializando la señal, podríamos haber visto la diferencia en abundancia con mayor claridad. La única pareja que se cree que no requería mejorar el rendimiento de las PCRs fue F3-R233 (74 pb), pues desde un principio, la configuración con 30 ciclos de amplificación permitió mostrar la abundancia diferencial que había de dicha isoforma entre el macho 18 y la hembra 1, con una señal lo suficientemente adecuada como para realizar la comparación entre sexos, sin embargo, se debió hacer la prueba en las demás muestras para corroborarlo (fig. 18a y b). Asimismo, para una de las

parejas dirigidas a la isoforma truncada, F3-R126 (80 pb), 30 ciclos de amplificación fueron suficientes para detectar la señal existente sobre la abundancia diferencial que había de la isoforma truncada entre la hembra 4 y el macho 16; siendo mayor para el sexo masculino, pero como se ha dicho, faltaba hacer más pruebas con otras muestras (fig. 18c y d). En concreto, para las parejas dirigidas a la isoforma completa a excepción de F3-R233 (74 pb), se tendrían que haber ajustado los ciclos de las PCRs a no más de 40 para una mayor amplificación. Y, para las parejas dirigidas a la isoforma truncada a excepción de F3-R126 (80 pb), la opción más conveniente era probar con un rango de ciclos de amplificación de entre 30 y 35, para evitar un exceso de producto, y no enmascarar la diferencia en la abundancia de la isoforma en cuestión entre los sexos. En todo caso, lo ideal es que las PCRs no se lleven a más de 35 ciclos, ya que, conforme avanza la reacción se puede alcanzar la fase '*plateau*' o meseta, la cual se origina a partir de la acumulación de producto ocasionada ya sea por la pérdida en la actividad de la polimerasa de DNA o bien a la disminución en la concentración de los reactivos. Cuando hay un exceso del templado que supera la concentración de los cebadores, se produce la hibridación entre cadenas de producto complementarias lo que puede conducir a la formación de productos espurios al no haber sitios disponibles de unión para los cebadores en los templados verdaderos, ocasionando que productos inespecíficos que se formaron con anterioridad proporcionen un templado alternativo (McPherson & Møller, 2007). Las parejas F3-R126 y F3-R326 al parecer fueron las únicas cuyas PCRs alcanzaron una meseta a los 35 ciclos para las muestras de ambos sexos, pues ya no hubo un incremento en la intensidad de la señal a los 40 ciclos. No obstante, no se observó la formación de nuevos fragmentos espurios (figs. 19, 20 y 21).

En protocolos RT-PCR semi-cuantitativos o cuantitativos para la medición de los niveles de expresión genética se recomienda maximizar la eficiencia de amplificación durante la fase exponencial de la PCR y detener la reacción antes de llegar a la fase tardía o '*plateau*' (McPherson & Møller, 2007; Marone, et al., 2001). En este caso, aunque se logró obtener una buena eficiencia de amplificación a los 35 ciclos para las parejas dirigidas a la isoforma truncada a excepción de F2-R326, y únicamente para la pareja F3-R233, de aquellas dirigidas a la isoforma completa (figs. 19 y 20); hubiera sido más conveniente reducir la eficiencia de las PCRs inclusive si esto significaba producir menos del producto necesario para una cuantificación convencional de los niveles de mRNA en las muestras. La razón para hacerlo era

debido a que nuestro método no contemplaba un análisis posterior a la electroforesis en gel de agarosa como lo es el *Southern blot* ni tampoco un procesamiento de las imágenes de los geles a través de un software para cuantificar la intensidad de las bandas. Por lo tanto, al ser la estimación de los niveles de expresión de las isoformas de *JARID2* meramente cualitativa y a la vez subjetiva, se requería de una intensidad de la señal más débil para poder apreciar las diferencias en abundancia. Alternativamente, se pudieron haber realizado diluciones en serie de los productos de PCR para los mRNAs que tuvieron una alta abundancia como lo fueron aquellos correspondientes a la isoforma truncada (McPherson & Møller, 2007).

Extrañamente, y contrario a lo esperado, la pareja F2-R326 (285 pb) reveló que la isoforma truncada es más abundante en hembras que en machos, en los resultados de las PCRs con las siguientes configuraciones: 35 ciclos con 54°C de alineación y 40 ciclos con 52°C de alineación (figs. 19, 20 y 21). Aunque se utilizaron muestras distintas de machos (M11, M18) y hembras (H5, H2) que lo corroboraron, las pruebas con el resto de las parejas no apuntaron al mismo resultado, lo cual, resultó ser bastante intrigante.

Conforme se incrementó el rendimiento de las PCRs, se observó que la especificidad de los cebadores decayó, tal como lo predijo la bibliografía (Lorenz, 2012; McPherson & Møller, 2007). Por lo tanto, fue necesario generar un gradiente de temperaturas de hibridación para seleccionar aquella con la cual se obtuviera el menor ruido posible provocado principalmente por productos no específicos que rondaban las 100 pb. A raíz de este primer gradiente, generado solamente para las parejas de cebadores dirigidas a la isoforma truncada, se pudo probar que éstas amplifican las bandas esperadas bajo un estrecho rango de temperaturas (52°, 54°, 58°C) en ambos sexos (fig. 21). No obstante, se encontró que las parejas F2-R326 y F2-R126, que fueron las únicas cuyos amplicones mostraron variación entre las temperaturas probadas, resultaron ser más específicas a 52° y 54°C, dependiendo la muestra. Gracias a la variación percibida con éstas parejas de cebadores y a la no percibida con el resto, se demostró que no necesariamente temperaturas de hibridación muy altas producen PCRs más específicas (Espinosa, 2007; McPherson & Møller, 2007; Innis, et al., 1990), pues contrario a lo esperado, temperaturas de hibridación más bajas brindaron resultados similares o más satisfactorios que aquellas cercanas a los 60°C. Incluso, cabe agregar que, en la muestra de la hembra (H5), 58°C fue la temperatura de hibridación menos específica para la pareja F2-R326

(fig. 21b). Estos resultados muestran que, aun cuando no se empleó 55°C como punto de partida (lo que se recomienda en la práctica común), 54°C sí fue una temperatura de hibridación adecuada para iniciar con las pruebas (McPherson & Møller, 2007). Sin embargo, para hallar la temperatura de hibridación óptima, revelan que habría sido más idóneo probar con un gradiente que incluyera temperaturas menores a las temperaturas de fusión (56° a 60°C) de los cebadores. De hecho, usualmente lo que se hace es probar con una temperatura de hibridación ( $T_a$ ) que sea 5°C menor a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) más baja del par de cebadores a utilizar (Innis, et al., 1990; Lorenz, 2012). Considerando lo anterior, se cayó en el error de recorrer los gradientes subsecuentes hacia temperaturas más altas de las PCRs donde fueron, posteriormente, probadas estas parejas en muestras objetivo de machos (figs. 23 y 24a).

Por otro lado, para las parejas dirigidas a la isoforma completa a excepción de F2-R233 y F3-R233, se cree que 54°C fue también la temperatura de hibridación adecuada para comenzar las pruebas, pues todas las bandas esperadas amplificaron en las muestras de ambos sexos (H2 y M18) cuando se realizaron las PCRs con un perfil de amplificación de 35 ciclos (figs. 19 y 20). Sin embargo, no fue la mejor dado que también se amplificaron varias bandas inespecíficas. Para este caso, se tuvo que haber generado un gradiente que incluyera temperaturas inferiores a las de fusión de las parejas y ver si también aquellas por debajo de los 54°C resultaban ser más específicas. Respecto a las parejas que integraron al cebador reverse R233, también se debió haber probado con otras temperaturas de hibridación antes de retirar estas combinaciones, pues fue claro desde un inicio, con las pruebas en DNA genómico de tejido de mesonefros y cerebro, que estas parejas presentaban una muy baja o nula especificidad a 54°C (figs. 16 y 17). Por lo tanto, era de esperarse que en las pruebas con muestras de cDNA de caparazón volviéramos a observar su inespecificidad; la pareja F3-R233, aunque sí amplificó la banda de 74 pb, también produjo tres bandas inespecíficas que salieron a relucir asaz en el gel; mientras que, F2-R233 nunca amplificó la banda esperada de 149 pb.

Continuando con el análisis del segundo (fig. 23) y tercer gradiente (fig. 24), generados para las parejas dirigidas a la isoforma truncada y, para ambos tipos de parejas en el caso del tercero, se encontró que los amplicones de éstas no mostraron diferencias consistentes entre las temperaturas de hibridación empleadas (54°, 58° y 60°C) al ser probadas únicamente en muestras objetivo. Respecto a la pareja F2-

R126, se cree que el efecto '*smear*' o barrido que acompañó a los amplicones de 155 pb (fig. 23), sesgó los resultados al ocultar bandas inespecíficas menores a 80 pb, sugiriendo que dicha pareja era, supuestamente, altamente específica bajo todas las temperaturas probadas; idea que enseguida fue descartada una vez que se generó el último gradiente para las parejas dirigidas a la isoforma truncada (fig. 24a). Este efecto se asoció a una fuente de contaminación, muy probablemente proveniente de los cebadores, lo cual pudo haberse corroborado con el uso de un control negativo (sin templado de cDNA) y, en paralelo, con un control positivo, el cual podría haber ayudado a deducir si se trataba de un problema de sobreciclado más que de contaminación (Maddocks & Jenkins, 2017; Jennings, 2016; Plant, et al., 2012). Para las parejas F2-R326 y F2-R333 también se observó el mismo efecto '*smear*', lo que insinuó de nueva cuenta una posible contaminación que pudo ser la causa de que las parejas no hayan amplificado los fragmentos de 285 y 252 pb, respectivamente, en los últimos gradientes (figs. 23 y 24). Por consiguiente, se debió haber verificado el estado de los cebadores. Y, no conformes aún, también era necesario haber realizado más pruebas hasta conseguir PCRs altamente específicas, especialmente, para las parejas dirigidas a la isoforma completa. Con ello, además, se podría haber confirmado si había una relación entre el hecho de que las parejas F2-R133, F2-R333 y F3-R333 no amplificaron los fragmentos deseados de 194, 252 y 177 pb, respectivamente, y el uso de un termociclador distinto para estos últimos gradientes (fig. 24b). La razón de tal sospecha fue debido a que en los resultados de PCRs anteriores con una configuración de 35 ciclos y 54°C de temperatura de hibridación, todas estas parejas amplificaron sus respectivas bandas esperadas (figs. 19 y 20). Aunque otras causas podrían explicar lo ocurrido, la realidad es que sí es posible encontrar diferencias entre termocicladores como lo pueden ser en velocidad (tasa de rampa) y precisión para hacer el cambio de las temperaturas programadas, lo cual repercute en la especificidad de las PCRs (McPherson & Møller, 2007). Verbigracia, en lo que corresponde a los termocicladores que se utilizaron durante todo el procedimiento experimental, el primero (GeneAmp 9700, Thermo Scientific), de acuerdo con Kim y colaboradores (2008), se agrupa dentro de los modelos que presentan tasas de rampa altas, es decir, aquellos que ejecutan los cambios de temperatura a una velocidad relativamente rápida, pero que, sin embargo, tienden a mostrar, en breve, fluctuaciones en la temperatura previo a que se estabilice. En la fase de hibridación, la temperatura tiene que descender de acuerdo con la naturalidad

del proceso de la PCR, pero en este tipo de instrumentos, la temperatura puede bajar ligeramente más allá de la establecida (suboscilación) por un cierto período de tiempo, afectando la especificidad de la PCR. La supuesta suboscilación que pudo mostrar el primer modelo al comienzo de dicha fase, podría haber favorecido los resultados, ya que temperaturas de hibridación más bajas eran requeridas. No obstante, también podría haber seguido un perfil de temperatura normal como ya se ha visto en otros termocicladores del mismo modelo (Kim, et al., 2008). Por otro lado, el segundo termociclador usado (Mastercycler Nexus Gradient, Eppendorf) muestra tasas de rampa menores según lo publicado por el fabricante. Los registros de las tasas de rampa máximas de enfriamiento y calentamiento son similares a las del termociclador Mastercycler Gradient, un modelo más antiguo del mismo fabricante, que se agrupa con los termocicladores de respuesta lenta, los cuales tienden a mostrar perfiles de temperatura curvos dado que tardan en alcanzar la temperatura establecida para dar lugar a un nuevo paso de la PCR. Como resultado, las temperaturas de hibridación pueden ser más altas que las programadas y, además, la duración de este segundo paso (alineamiento) puede acortarse (Kim, et al., 2008). Si este hubiera sido el caso para el segundo termociclador empleado, entonces podría explicar los resultados deficientes apreciados para el último gradiente de las parejas dirigidas a la isoforma completa. Asimismo, también se le podría atribuir porqué la pareja F3-R326 amplificó la banda de 210 pb con mayor intensidad a 54°C (fig. 23 y 24a), dejando entrever que quizá fue más específica a esta temperatura, cuando anteriormente había mostrado una intensidad similar a 58°C (fig. 21a); y, también, porqué no fueron visibles bandas inespecíficas mayores a 200 pb para la pareja F2-R126 (figs. 21a, 23 y 24a). Lo anterior sugiere que, para fines del experimento, hubiera sido más conveniente haber utilizado un solo termociclador para todas las pruebas, con el fin de evitar el efecto agregado sobre el desempeño de los termocicladores a los resultados.

Otras modificaciones al protocolo fueron puestas en práctica cuando se generó el segundo (fig. 23) y tercer gradiente (fig. 24), con el motivo de mejorar la definición de las bandas, ya que éstas se habían mostrado bastante gruesas luego de probar con 40 ciclos de amplificación para las PCRs (fig. 21). Básicamente, se hicieron cambios en la elaboración de los geles de agarosa y en la electroforesis. La primera consistió en incrementar la concentración de agarosa al 2% (p/v), pues de acuerdo con Koontz (2013), este es el porcentaje que se debe manejar para una mayor resolución de bandas cuyo tamaño varía de 50-2000 pb, sin embargo, otros autores

como Pérez & Gómez (2018) refieren a un porcentaje del 2,5% para una mejor resolución de bandas que estén dentro de dicho rango. En cualquier caso, el incremento en la concentración de agarosa no aportó una mejoría en este aspecto, posiblemente debido a la inadecuada combinación de tiempo y voltaje, la cual también afecta la resolución de las bandas (Voytas, 2001; Arslan, et al., 2021; Lee & Bahaman, 2012). En el segundo gradiente, aunque incrementó la nitidez de las bandas de 155 y 210 pb amplificadas por las parejas F2-R126 y F3-R326, respectivamente, la reducción del tiempo de la corrida electroforética a la mitad (30 min) en conjunto con un voltaje aplicado de 86 V, no permitió que se completara la separación de las muestras de cDNA y, por lo tanto, no tuvo lugar un incremento importante en la resolución (fig. 23). Similarmente, en el tercer gradiente que se generó para ambos tipos de parejas de cebadores, se apreció más la pérdida de la resolución puesto que todas las bandas se mostraron bastante gruesas, incluidas las de 155 y 210 pb (fig. 24). Este ensanchamiento de las bandas se puede asociar a la electroforesis conducida a un bajo voltaje (54 V) por un tiempo prolongado (1 h y 30 min), pues tales condiciones favorecen la difusión y dispersión de pequeños fragmentos de DNA ( $\leq 1$  kb) a través de la matriz de gel de agarosa, lo que da como resultado bandas gruesas y difusas como las observadas en este gradiente (Voytas, 2001; Arslan, et al., 2021; Lee & Bahaman, 2012). La combinación idónea de acuerdo con los resultados observados fueron de 86 V por 1 h (figs. 18, 19, 20 y 21); valores que se acercan a lo sugerido por Espinosa (2007) para la amplificación por PCR de fragmentos pequeños (100 pb a 1 kb). Ahora bien, otro de los factores que pudo haber influido en la pérdida de la resolución fue el aumento en el tamaño de los pozos del gel de agarosa, lo cual está definido por las dimensiones del peine utilizado durante el moldeo y gelificación del gel. Con principal énfasis, el incremento en el grosor de los dientes del peine se ha visto que disminuye la resolución y nitidez de las bandas, por lo tanto, el uso de peines más delgados es lo recomendado, pero debe considerarse que un exceso de producto de la PCR entorpecerá su efecto como sucedió aquí (fig. 21) (Arslan, et al., 2021; Lee & Bahaman, 2012). En cuanto al incremento en la anchura de los dientes del peine, solo se ha observado que disminuye la intensidad de las bandas, sin afectar la resolución (Arslan, et al., 2021). En los resultados del tercer gradiente, las bandas se mostraron bastante tenues en comparación a gradientes anteriores, pero esto no es asociado a la anchura del peine sino a la disminución, hasta 1/10 parte, del volumen de la reacción de PCR a cargar en los pozos (fig. 24). Para una buena

resolución y nitidez de las bandas se pudo contemplar lo siguiente: tinción post-electroforética con bromuro de etidio, moldeo de geles delgados, y el uso de agarosa químicamente modificada; la cual promete un mejor tamizado de fragmentos pequeños de DNA que la agarosa estándar, sin compararse al poder de resolución de los geles de poliacrilamida (Arslan, et al., 2021; Lee & Bahaman, 2012; Green & Sambrook, 2019; Bjornsti & Megonigal, 2003; Guilliat, 2003).

A pesar de que, en algunos resultados utilizando muestras de cDNA de caparazón, las parejas F3-R126 y F2-R126 dieron indicios de una mayor expresión de la isoforma truncada de *JARID2* en crías macho, y otras tres: F3-R233, F3-R333 y F2-R333, indicaron una mayor expresión de la isoforma completa en crías hembra, catalogándolas como parejas que potencialmente podrían ser utilizadas para sexar crías de tortuga marina; el resto de las parejas demostró que hay una abundancia similar de cada isoforma en las muestras de ambos sexos con cierta tendencia de una mayor expresión de la isoforma truncada. Incluso, las parejas seleccionadas también apuntaron a lo mismo cuando fueron probadas en otras muestras o bien, en PCRs que tuvieron otras condiciones (figs. 18, 19, 20 y 21). Esto indica que aún faltan más pruebas para poder aprobar la hipótesis inicial.

En un último intento por mostrar la abundancia relativa diferencial que existe de las isoformas de *JARID2* entre crías macho y hembra, se realizaron RT-PCRs dúplex donde se integraron dos parejas de cebadores a competir por los recursos de la reacción de PCR, esto con el motivo de intensificar la señal del transcrito más abundante. En general, dos ensayos de competencia fueron puestos a prueba, el primero incluyó parejas candidatas a competir que tenían estricta especificidad opuesta por la isoforma (fig. 25); mientras que, para el segundo, las parejas a competir podían tener especificidad por la misma isoforma o no (figs. 26-32). En cada uno fue evidente observar cómo la naturaleza de la reacción de las PCRs dúplex puede alterar los resultados de amplificación de modo que una o ambas parejas de cebadores no amplifiquen a la temperatura de hibridación con la cuál si logran hacerlo en PCRs monoplex donde son probadas por separado. Markoulatos y colaboradores (2002) también observaron este cambio en la especificidad de los cebadores al ser añadidos en reacciones múltiple, y mostraron que solo bajando la temperatura de hibridación (4-6°C) loci específicos podían ser co-amplificados.

En el primer ensayo de competencia, cuatro combinaciones de parejas de cebadores fueron probadas tanto para una muestra de cría hembra (H2) como de

macho (M20) (fig. 25). Los resultados de la electroforesis mostraron que la combinación F3-R333/F3-R326 no amplificó ninguna de las bandas esperadas, ni siquiera la de 210 pb que sí había sido amplificada en todas las PCRs donde fue probada F3-R326 individualmente. En cuanto al resto de las combinaciones, observamos que las parejas F2-R126, F3-R333, y F3-R133 se comportaron distinto dependiendo de cuál fuera su pareja competidora en la reacción, ya que, en ocasiones amplificaban el fragmento deseado y en otras no lo hacían. Se cree que las uni-amplificaciones de las PCRs dúplex, se debieron, por ejemplo, a un fenómeno conocido como selección de PCR, que relaciona las amplificaciones desiguales con una accesibilidad preferencial a cierta secuencia objetivo debido a sus propiedades o a las de secuencias que la flaquean (Markoulatos, et al., 2002). Otros motivos que consideremos que ejercieron mayor influencia fueron, probablemente, diferencias en la estabilidad termodinámica de las estructuras cebador-secuencia objetivo o bien, diferencias en las temperaturas de fusión de los cebadores, las cuales dependen del tamaño de la secuencia del cebador y su composición nucleotídica; pues secuencias largas y con alto porcentaje de GC tienden a tener una  $T_m$  más alta (Nolan, et al., 2006). Como consecuencia, esto pudo resultar en que una de las parejas presentara una hibridación óptima o cuasi óptima a su secuencia objetivo en comparación a su pareja contrincante, lo que le permitió llevar la ventaja sobre la otra y poder acaparar los recursos de la reacción.

La temperatura de hibridación de la PCR pudo ser el factor clave más importante en estas pruebas de competencia, pudiendo ser más adecuada para una de las parejas competidoras o para ninguna, dependiendo cómo haya sido la combinación de cebadores, lo que generó resultados diversos. En el caso de la combinación F3-R133/F3-R126, parece que las parejas se acoplaron bastante bien a 54°C de temperatura de hibridación, porque ambas co-amplificaron las bandas deseadas de 119 y 80 pb, respectivamente. Por lo tanto, consideramos que fue la única que brindó un punto de comparación sobre el cual se pudo deducir si había habido una competencia por los recursos de la reacción a causa de la abundancia diferencial de las isoformas. Para las muestras analizadas (M20 y H2) observamos que no la hubo, porque los fragmentos amplificaron con una cantidad de producto similar, demostrando que las dos isoformas fueron expresadas en niveles similares en ambos sexos. Del resto de las parejas que amplificaron solo una de las bandas esperadas, sus resultados fueron poco confiables debido a que probablemente, sí

hubo una competencia por los recursos, pero no precisamente porque hubiera una mayor expresión de alguna de las isoformas, sino porque sus temperaturas de hibridación óptimas o cuasi óptimas variaron, y posiblemente solo una de ellas coincidió con la temperatura programada (54°C), lo que resultó en la monopolización de los recursos por parte de ésta pareja.

En los Ensayos RT-PCR multiplex se busca optimizar las condiciones de las PCRs para lograr eficiencias de amplificación similares para los mRNA objetivo de cada par de cebadores. Para ello, es primordial que las temperaturas de hibridación óptimas de las parejas de cebadores a ser añadidas a un solo tubo de reacción coincidan o por lo menos sean casi idénticas. Por otro lado, también se suele recurrir a modificar las condiciones de ciclaje o las concentraciones de los componentes de la reacción (Markoulatos, et al., 2002; Hajizadeh, et al. 2012; Xu & Ming, 2022; Espitia, et al., 2010; Marone, 2001). En nuestro caso, los suministros de la PCR que incluyen: la mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion Flash y los cebadores, no podían ser alterados ya que se necesitaba promover la competencia entre pares de cebadores, de manera que hubiera una amplificación preferencial por el transcrito más abundante; condición que frecuentemente se trata de eliminar en este tipo de ensayos. Sin embargo, dado que las PCRs multiplex tienden a comprometer la sensibilidad y especificidad al integrar más de un par de cebadores, era necesario optimizar, al menos, la temperatura de hibridación, en vista de que las concentraciones de los componentes de la reacción debían permanecer intactas (Markoulatos, et al., 2002; Xu & Ming, 2022; Hajizadeh, et al. 2012). Como se discutió anteriormente, la mayoría de las combinaciones no logró acoplarse a 54°C de temperatura de hibridación (fig. 25), por lo que se tuvo que haber optimizado este parámetro para que así las parejas co-amplificaran los dos fragmentos deseados y se pudieran hacer las comparaciones. Para facilitar esta tarea, era fundamental que todas las parejas de cebadores candidatas para las competencias reunieran el requisito de la alta especificidad a su secuencia objetivo, lo cual, no se respetó desde el inicio, a excepción de las parejas F3-R126 y F3-R133. Tampoco hubo una pertinente revisión del estado de los cebadores previo a las competencias, lo que quedó evidenciado a través del efecto '*smear*' que acompañó a los amplicones de las combinaciones que incluyeron a la pareja F2-R126. Cabe decir, que este efecto ya se había mostrado en los resultados de PCRs monoplex donde fue probada dicha pareja (figs. 23 y 24a). Por último, las bandas difusas en el de agarosa de esta primera

competencia denotaron que el volumen de la reacción a cargar en los pozos (3  $\mu$ l) no fue el adecuado, pues solo disminuyó su intensidad en vez de lograr su definición. Modificaciones al ciclaje de la PCR o a las dimensiones del peine para el moldeado del gel, podrían haber generado buenos resultados en lo que concierne a nitidez.

Respecto a la segunda competencia, en la cual, se volvió a probar la combinación F3-R126/F3-R133 además de otras tres completamente diferentes que incluyeron a parejas candidatas que no tenían estrictamente una especificidad opuesta por la isoforma, se observó que las combinaciones F3-R126/F3-R133 y F3-R126/F2-R126 fueron las únicas que lograron acoplarse en al menos una de las temperaturas de hibridación probadas, en la muestra del macho 20 y la hembra 2 (fig. 26). Por un lado, la combinación F3-R126/F3-R133 se acopló a 58°C de temperatura de hibridación, únicamente en el macho 2 (fig. 26a), revelando y confirmando que había una abundancia similar de ambas isoformas de *JARID2* en esta muestra, tal como lo hizo ésta misma combinación en la primera competencia realizada bajo 54°C (fig. 25). Sin embargo, la combinación F3-R126/F2-R126, aunque consiguió acoplarse tanto a 58° (fig. 26a) como a 60°C (fig. 26b), en el macho y la hembra, los resultados obtenidos con ambas temperaturas, además de ser diferentes, contradijeron lo visto con F3-R126/F3-R133. A 58°C, los amplicones de la combinación F3-R126/F2-R126 discreparon en cuanto a la abundancia de la isoforma truncada, pues mientras el amplicón de 155 pb indicó una mayor abundancia de esta isoforma en el macho (M20); el de 80 pb lo hizo para la hembra (H2). Más contradictorio aún, fue observar que, a 60°C, estos amplicones mostraron que la isoforma truncada fue expresada a sobre manera en el macho (M20) y no en la hembra (H2), tal como se esperaba de acuerdo con la hipótesis inicial. Este resultado, aunque fue prometedor, ya no se replicó cuando se analizaron otras muestras de machos (M11, M14 y M16) y de hembras (H4, H6, y H9) bajo 60°C de temperatura de hibridación (fig. 27). No obstante, la hipótesis fue sostenida, momentáneamente, con la aparente y exclusiva amplificación de las supuestas bandas de 80 pb en los machos (fig. 27a, c y e). Pero, fue rechazada nuevamente debido a lo siguiente: 1) los resultados no fueron confiables porque la electroforesis no llegó a concretarse pues, aunque se utilizó un voltaje muy alto (124 V) para acelerar el proceso, el tiempo no fue suficiente (20 min); 2) cuando se realizó por segunda vez la electroforesis al mismo voltaje, pero por más tiempo, probando solamente en un macho (M16) y una hembra (H9), las capturas a los 15 minutos transcurridos revelaron la presencia de los supuestos amplicones de

80 pb en ambos sexos (fig. 28a y c); y 3) Con las capturas a los 30 min transcurridos de ésta misma electroforesis (fig. 28b y d), fue posible percatarse que las bandas percibidas, previamente, como de 80 pb, en muestras de machos (M11, M14 y M16) (fig. 27a, c y e), en realidad podrían haber sido dímeros de cebador, ya que estos se caracterizan por formar de manera muy eficiente fragmentos de bajo peso molecular, y más bien, las bandas inespecíficas de aproximadamente 100 pb podrían haber sido las esperadas de 80 pb (McPherson & Møller, 2007; Plant, et al., 2012). Aunque conseguimos resultados más confiables con una combinación de 124 V por 30 min para la electroforesis, lo cierto es que hubiera sido más adecuado haberla realizado con un voltaje menor y una duración ad hoc a este, para descartar la posibilidad de que amplicones de muy bajo peso molecular fueran atraídos fuertemente por la fuerza del campo eléctrico provocando que no fueran retenidos en el gel (Dash, et al., 2020; Green & Sambrook, 2019). Una opción podría haber sido la combinación de 86 V por 1 h, ya que, en las electroforesis donde se empleó, los resultados fueron satisfactorios.

Por otra parte, si se había observado a comienzos de esta prueba de competencia, que la mayoría de las combinaciones no respondían a temperaturas altas de hibridación, en especial a 60°C (fig.26), se debió de haber probado con temperaturas de 54°C o inferiores a ésta para ver si así lograban acoplarse y, también, si se generaban PCRs más específicas, que no amplificaran las engorrosas bandas de aproximadamente 100 pb, que además de generar ruido en los resultados, hacían confundir las bandas de 80 pb. Estos resultados concuerdan con lo visto en las pruebas de PCRs monoplex, donde algunas de las parejas que fueron probadas en reacciones individuales, resultaron tener una baja especificidad con temperaturas de 58° y 60°C (figs. 21, 23 y 24a). En cuanto a la combinación F3-R126/F2-R126 que fue, supuestamente, la única que logró acoplarse a 60°C, en la muestra de la hembra 9 y el macho 16 (correspondientes al segundo conjunto de muestras analizadas), solamente se pudo confiar en los amplicones de 155 pb, los cuales, por sí solos revelaron una abundancia similar de la isoforma truncada (figs. 27c y d; 28). De igual manera, esta combinación amplificó, con cierta certeza, la banda de 155 pb en el macho 14 (fig. 27a), pero se mostró con más producto que en las muestras ya mencionadas, por lo cual, se infiere que la isoforma truncada es expresada de manera variable.

Es a partir de este punto en la línea temporal de los resultados de la segunda competencia, que las bandas de 80 pb pierden confiabilidad debido a su posición dudosa en el gel y, por lo tanto, dejan de hacerse inferencias respecto a la competencia por los recursos de la reacción entre las parejas puestas a prueba. Únicamente, se consideran las bandas amplificadas por las parejas que no incluyen a F3-R126, es decir, las contrincantes. Pues, cuando se continuó realizando las pruebas de competencia con el resto de las muestras, se observó que, además del amplicón de 155 pb, también, los otros de 119, 177 y 210 pb, que eran resultado de las combinaciones: F3-R126/F3-R133, F3-R126/F3-R333, y F3-R126/F3-R326, respectivamente, ya aparecían en los geles correspondientes a algunas de las muestras analizadas (figs. 29-32), lo que hizo pensar que no precisamente 60°C fue una temperatura de hibridación inespecífica o subóptima para éstas parejas contrincantes como lo fue en las primeras muestras. Sin embargo, se sigue creyendo que fue una temperatura bastante alta, y que fue el motivo por el que, quizá, no llegaron a amplificar estos fragmentos en todas las muestras, pues se sabe que, temperaturas de hibridación altas, aunque pueden generar PCRs altamente específicas, también pueden desestabilizar la unión de los cebadores a las bases complementarias del fragmento a amplificar (Plant, et al., 2012).

Las parejas F2-R126 y F3-R326 que fueron probadas a 60°C, en muestras de machos: M13, M14 y M18, y de hembras: H1, H3, y H6, por sí solas, revelaron que la isoforma truncada se expresa a niveles distintos en ambos sexos, sin haber un patrón que los distinga (fig. 29). Por otra parte, las parejas F3-R133 y F3-R333, que únicamente amplificaron las bandas de 119 y 177 pb, respectivamente, en la hembra 1, mostraron que la isoforma completa fue expresada con baja abundancia en esta muestra (fig. 29d). Continuando con el resto de las muestras de machos: M11, M12, M15, M17, M19 y M20, y de hembras: H2, H4, H5, H7, H8 y H10, la pareja F2-R126, que no amplificó el fragmento de 155 pb en todas las muestras como se venía observando, dejó ver sólo en ocho de las doce analizadas, que la isoforma truncada es expresada con baja abundancia tanto en machos (figs. 30a; 31c; 32c) como en hembras (figs. 30b; 31b y d; 32b y d). Sin embargo, si se consideran los posibles amplicones de 80 pb, se podrá observar que el producto de estos revela que la isoforma truncada es expresada de manera variable en ambos sexos, discrepando entonces de los resultados de la pareja F2-R126 (figs. 30, 31 y 32). En cuanto a la isoforma completa, la pareja F3-R133 mostró en cuatro de las hembras (H2, H4, H5,

y H7) (figs. 31b y d; 32b y d) y en tres de los machos (M12, M17 y M20) (figs. 31c; 32a y c) que fue expresada en baja abundancia. Los resultados arrojados con las últimas muestras de ambos sexos (figs. 30, 31 y 32), se ponen en duda, ya que, las posibles bandas de 80 pb, o bien, los fragmentos inespecíficos que rondaron las 100 pb pudieron 'consumir' los recursos de la reacción, lo que llevó a que los fragmentos esperados, de un peso molecular más alto, no amplificaran o fueran apenas percibidos. Esto último no es de sorprender, ya que, fragmentos más pequeños tienden a amplificarse de manera más eficiente (McPherson & Møller, 2007). Además, resultó extraño que, en todas las muestras, a excepción del macho 14 (fig. 29a) y la hembra 6 (fig. 29b), apareciera un 'smear' junto con los amplicones de cada una de las combinaciones (figs. 29, 30, 31 y 32). Si bien, ya se había observado este efecto en resultados previos, sólo apareció en algunas combinaciones y en ciertas muestras (figs. 23-26), asociándose a una posible contaminación de las alícuotas de los cebadores o de reactivos como la polimerasa, por lo que, más adelante fueron reemplazados. Por consiguiente, se cree que, a este punto de la competencia, las muestras se comenzaron a degradar debido, posiblemente, al tiempo de almacenamiento o al recurrente descongelamiento de estas.

Tomados en conjunto, los resultados de las PCRs monoplex y dúplex parecen apuntar a que tanto la isoforma truncada como la completa son expresadas de manera variable en el tejido de caparazón de crías de tortuga macho y hembra, con oportunidad a que la expresión se dé a niveles similares en ambos sexos; sin embargo, es de resaltar que la isoforma completa podría estar expresándose en menor grado que la truncada.

La retención intrónica preferencial en los transcritos de *JARID2* y *KDM6B/JMJD3* (otro compañero de la familia *Jumonji*) a temperaturas de incubación frías ya ha sido reportado anteriormente en dos especies de reptiles que exhiben TSD: la tortuga de orejas rojas y el caimán americano; lo que ha dado pie a que estos eventos de IR se han propuestos como un vínculo entre la temperatura ambiental y las primeras redes genéticas (reversibles) que están involucradas en la TSD (Deveson, et al., 2017). Sin embargo, ésta remarcada distinción en el modo en que son empalmados los transcritos entre una temperatura de incubación y otra solo ha sido observada durante el TSP, más allá del desarrollo embrionario no ha sido analizado el *splicing* alternativo en organismos con TSD.

Particularmente, para *JARID2*, Deveson y colaboradores (2017) demostraron que la tasa de IR del antepenúltimo intrón en la gónada embrionaria es más alta a MPT en el caso de la tortuga de orejas rojas y a FPT en el caimán americano. La IR diferencial coincide con el TSP de cada organismo y parece seguir una tendencia en decadencia conforme éste se acerca a su fin: en el caimán, a FPT, la tasa IR es mayor a comienzos del TSP, pero va mermando conforme avanza, manteniéndose, sin embargo, por encima de aquella exhibida a MPT. El panorama no pinta muy distinto para la tortuga, pues la tasa de IR, aunque es variable a MPT, muestra un valor pequeño a finales del TSP (etapa 21) que, similar al caimán, rebasa aquel exhibido a FPT.

Más adelante, un análisis de RNA-seq de cuatro tejidos embrionarios de *L. olivacea* (otra especie con TSD) que fue desarrollado en el laboratorio actual (fig. 9), reveló también la retención del antepenúltimo intrón (I15) y la expresión diferencial de las isoformas truncada y completa de *JARID2* entre temperaturas de incubación cálidas y frías; siendo la expresión de la isoforma truncada más alta a 26°C y de la completa a 33°C. Similar al estudio anterior, en el tejido gonadal, se observó una tendencia en picada en la expresión de las dos isoformas en cada una de las temperaturas de incubación, con un pico máximo en la etapa 23 que representa el inicio del TSP y un mínimo en la etapa 26 que es aquella donde concluye dicho período para esta especie. En el resto de órganos (cerebro, hígado y mesonefros), la expresión pareció comportarse del mismo modo, pero a diferencia de las gónadas, fue más variable, pudiendo alcanzar su punto máximo antes de la etapa 23 o bien, en la 26 como sucedió con la isoforma truncada en hígado y mesonefros. Por lo anterior, nos cuestionamos si la fuerte expresión de la isoforma truncada observada a MPT podría llegar a igualarse con aquella a FPT en algún punto del desarrollo embrionario, posterior al TSP, y/o si pudiese presentarse esta situación para el caso inverso de la isoforma completa.

En este sentido nuestros resultados con muestras de caparazón de *L. olivacea* sugieren que, una vez que ocurre la eclosión, momento en el que la gónada ya se encuentra en un estado morfológicamente diferenciado, deja de ser evidente la predominancia de transcritos que sufren retención intrónica, es decir, aquellos correspondientes a la isoforma truncada, en los neonatos macho que se desarrollaron a temperaturas frías (26°C) con relación a las hembras que se desarrollaron a temperaturas cálidas (33°); e inversamente, la predominancia de transcritos de la

isoforma completa ya no es percibida en las hembras, lo que hace imposible, por consiguiente, detectar un patrón para la identificación del sexo de las crías. Creemos que los niveles de expresión de cualquiera de las variantes de *JARID2* tratan de alcanzar el equilibrio entre ambas temperaturas pasada la etapa 26, pues en vista del posible papel que estaría jugando este gen en la vía TSD, ya no sería necesaria la expresión diferencial tras el cierre de la ventana del TSP y el consecuente establecimiento del sexo del embrión. En su lugar, otros genes no menos importantes (e.g., *Dax1*, *Sox9*, *FoxL2*), cobrarían relevancia río abajo, ya que están implicados sobre todo en la diferenciación gonadal, por lo que estaríamos presenciando su expresión diferencial (Torres-Maldonado, et al., 2001; Torres Maldonado, et al., 2002; Torres Maldonado, et al., 2006; Merchant-Larios, et al, 2021). Los resultados obtenidos con los ensayos de PCRs monoplex (figs. 18-24), apoyan principalmente la formulación de esta nueva hipótesis, ya que rara vez encontramos una diferencia en la expresión entre machos y hembras utilizando diferentes parejas de cebadores para los dos tipos de isoformas; los geles de la electroforesis casi siempre develaron un panorama homogéneo. Sin embargo, los resultados de los ensayos de competencia producto de las PCRs dúplex (figs. 25-32) refutarían tal hipótesis, ya que nos muestran una expresión variopinta de estas isoformas entre los sexos. No obstante, dada su ambigüedad, ya discutida anteriormente, esta logra prevalecer.

Aun cuando encontramos que las isoformas de *JARID2* se expresaron a niveles similares o variables, también hallamos evidencia que apunta a que existe una respuesta remanente a la temperatura en ciertos individuos, es decir, todavía puede ser apreciable la retención intrónica diferencial entre un sexo y otro. Sin embargo, para confirmar lo anterior faltaría realizar otras pruebas con técnicas más confiables y precisas. Por otro lado, también notamos un nivel de expresión elevado de la isoforma truncada en comparación con la isoforma completa en muestras de ambos sexos, lo que podría indicar, a primera instancia, una participación de la variante alternativa de *JARID2* en otros procesos no relacionados con la TSD. Aunque, cabe aclarar que, hasta el momento, no se sabe si *JARID2* está realmente involucrado en la vía TSD, además de que se desconoce cualquier función que pudiera llegar a tener su variante alternativa dependiente de la temperatura (Deveson, et al., 2017; Merchant-Larios, et al, 2021).

Es necesario reanalizar el perfil de expresión de *JARID2* y sus variantes (truncada y completa) en crías de tortuga marina, ya sea, por ejemplo, a través de

una RT-PCR dúplex que integre un control interno endógeno (i.e. un gen *house-keeping*), el cual será co-amplificado con la secuencia de interés en un mismo tubo de reacción, en razón de buscar un enfoque semicuantitativo, más el uso de un software para el análisis de los niveles de expresión; o mejor aún, mediante ensayos qPCR que brinden un análisis mayormente cuantitativo, volviendo al método más preciso (Marone, et al., 20021). Esto con el fin de comprobar si la frecuencia de los eventos de IR, así como de empalme total de los exones de *JARID2* se vuelve indiferente al sexo tras ocurrir la diferenciación de la gónada o incluso desde antes, en el momento en que se determina el sexo.

Cabe destacar que el análisis de expresión diferencial donde se observó que las isoformas truncada y completa de *JARID2* tuvieron una mayor expresión en machos y hembras, respectivamente, fue tomado a partir de muestras de embriones incubados a 26 y 33°C, en diferentes etapas del desarrollo. Esta expresión diferencial es muy probable que tome fuerza y relevancia únicamente en el desarrollo embrionario, pero pierda señal en el momento post-eclosión, que es la fase que corresponde a nuestras muestras analizadas, lo cual explicaría aquella señal similar apreciada en crías machos y hembras.

Ahora bien, aunque no logramos desarrollar un método de identificación de sexo de crías de tortuga a partir de muestras de caparazón, sí promovemos el uso de dicho tejido como fuente de material genético para futuros estudios moleculares en neonatos, ya que se ha visto que puede proveer de un alto rendimiento de DNA, además, de sugerirse que puede preservar aún más su integridad en comparación a otros tejidos blandos como piel y músculo debido a su naturaleza ósea de lenta descomposición (González-Garza, et al., 2016). En cuanto a RNA, no dudamos de su buena preservación en este tejido, pero se sabe que es más propenso a la degradación que el DNA. De hecho, una limitante de nuestro análisis se debió precisamente a una posible degradación de nuestras muestras de RNA. Y, sobre su concentración, desconocemos si es más alta en caparazón que en otros tejidos, pero al menos, los valores de cuantificación de este estudio revelaron que su rendimiento es relativamente menor al de DNA genómico (tablas no. 6 y 7). No obstante, logramos conseguir una buena calidad dentro de un rango óptimo (2.0-2.2) en 18 de las 20 muestras (tabla no. 7)

Finalmente, el muestreo de caparazón sobre otros tejidos tiene la ventaja de ser mínimamente invasivo, lo cual es de suma importancia en términos bioéticos, ya

que permitiría llevar a cabo estudios a gran escala en especies que están amenazadas o en peligro crítico. En adición, este tipo de muestreo es fácil de realizar y económico por lo que lo vuelve aún mejor (González-Garza, et al., 2016). Esperamos que en los estudios sucesivos enfocados especialmente a la estimación del sexo de las crías de tortuga con TSD puedan incorporarlo a su metodología.

## 8. Conclusiones



- Nuestra metodología basada en el uso de cebadores específicos de las isoformas de *JARID2* no detectó un patrón en la expresión de éstas, por lo que no se logró identificar el sexo de las crías de *L. olivacea* a partir de muestras de caparazón.
- No hay evidencia suficiente que pruebe la abundancia diferencial esperada para las isoformas de *JARID2* (completa y truncada) entre neonatos macho y hembra que se desarrollaron a diferentes temperaturas de incubación: predominancia de la isoforma completa a 33°C (FPT) y de la truncada a 26°C (MPT).
- La expresión de las dos isoformas de *JARID2* podría llegar a equilibrarse entre FPT y MPT tras la determinación del sexo o a finales del desarrollo embrionario.
- Una vez diferenciadas las gónadas es probable que los niveles de expresión de las variantes completa o truncada, en tejido de caparazón, se muestren similares en ambos sexos, aunque también podría observarse cierto grado de variabilidad.
- La gran abundancia de la variante alternativa sobre la completa en los neonatos sugiere su participación en otros procesos no relacionados a la TSD.
- Es necesario reanalizar la abundancia de las isoformas de *JARID2* en crías de tortuga marina a través de una PCR cuantitativa o algún otro método que permita obtener resultados más precisos. En caso de realizarse PCRs dúplex o múltiple, se debe tener en cuenta que, entre más pares de cebadores se añadan a la reacción, más complicado será optimizar las condiciones de la misma. En este sentido, los ensayos de competencia no se recomiendan, ya que limita el control de tales condiciones además de disminuir la especificidad, lo que lo convierte en un método desconfiable.
- El uso de tejido de caparazón como fuente de material genético es muy prometedor, en especial, para estudios dirigidos a la determinación del sexo de crías de tortuga marina, ya que tiene como principal ventaja, que su muestreo es mínimamente invasivo.

## 9. Referencias



- Abbott, J. K., Nordén, A. K., & Hansson, B. (2017). Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 284, 20162806.
- Abreu-Grobois, A. & Plotkin, P. (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group). 2008. *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T11534A3292503.
- Ackerman, R. A. (1997). The nest environment and the embryonic development of sea turtles. In *The Biology of Sea Turtles* (eds. Lutz, P. L., Musick, J. A.), pp. 83–106. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Alfonsi, C. Y., & Pérez J. E. (1994). Control de la determinación sexual en organismos cultivados. *Saber*, 6, 11-20.
- Arslan, M., Tezcan, E., Camci, H., & Avci, M. K. (2021). Effect of DNA concentration on band intensity and resolution in agarose gel Electrophoresis. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14(3), 326–333.
- Bachtrog, D., Mank J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto S. P., Ashman, T.-L., Hahn, M. W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross L., Valenzuela, N. & Vamosi, J. C. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLOS Biology*, 12(7):e1001899.
- Badawi, M., Moumen, B., Giraud, I., Grève, P., & Cordaux, R. (2018). Investigating the molecular genetic basis of cytoplasmic sex determination caused by Wolbachia endosymbionts in terrestrial isopods. *Genes*, 9(6), 290.
- Barrientos, K. G., Ramírez, C., & Páez, V. (2014). Nesting ecology of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) (Cheloniidae) at El Valle beach, northern Pacific, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 19(3), 437-445.
- Barrios-Garrido H., Wildermann N., Guada H. J., Buitrago J. & Balladares B. *Lepidochelys olivacea* [en línea]. WikiEVA, Especies Venezolanas Amenazadas;12/06/2014 [consultado el 13/02/2015 a las 04:58 UTM]. Disponible en: [http://wikieva.org.ve/index.php?title=Lepidochelys\\_olivacea&oldid=60533](http://wikieva.org.ve/index.php?title=Lepidochelys_olivacea&oldid=60533)
- Behera, S., Tripathy, B., Choudhury, B. C., & Sivakumar, K. (2010). Behaviour of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) prior to arribada at Gahirmatha, Orissa, India. *Herpetology Notes*, 3, 273-274.
- Berec, L., Schembri, P. J., & Boukal, D. S. (2005). Sex determination in *Bonellia viridis* (Echiura: Bonelliidae): population dynamics and evolution. *Oikos*, 108(3), 473-484.
- Bergero, R., & Charlesworth, D. (2009). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 94–102.
- Beukeboom, L. W. (1995). Sex determination in hymenoptera: A need for genetic and molecular studies. *BioEssays*, 17(9), 813–817.
- Beukeboom, L. W., Kamping, A., & van de Zande, L. (2007). Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(3), 371–378.
- Bjorndal, K. (1985). Nutritional Ecology of Sea Turtles. *Copeia*, 1985(3), 736-751.
- Bjornsti, M.-A., & Megonigal, M. D. (2003). Resolution of DNA molecules by one-dimensional agarose-gel electrophoresis. In *DNA Topoisomerase Protocols* (pp. 9–18). New Jersey: Humana Press.
- Blechs Schmidt, J., Wittmann, M. J., & Blüml, C. (2020). Climate Change and Green Sea Turtle Sex Ratio—Preventing Possible Extinction. *Genes*, 11, 588-616.
- Bowden, R. M., Paitz, R. T., 2018. Temperature fluctuations and maternal estrogens as critical factors for understanding temperature-dependent sex determination in nature. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329, 177–184.
- Brenes, O., Bonilla, L., Bonilla, A., & Vega, A. (2015). Características de la Anidación de *Lepidochelys olivacea* (Testudinata: Cheloniidae) entre el 2010 y 2012 en Playa Tortuga Ojochal de Osa, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 63, 339-349.

- Broderick, A. C., Godley, B. J., Reece, S., Downie, J. R. (2000). Incubation periods and sex ratios of green turtles: highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 202, 273–281.
- Bull, J. J. (1985). Sex determining mechanisms: An evolutionary perspective. *Experientia*, 41(10), 1285–1296.
- Bull, J. J., & Vogt, R. C. (1979). Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 206(4423), 1186–1188.
- Candan, O., & Kolankaya, D. (2016). Sex ratio of green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings at Sugözü, Turkey: higher accuracy with pivotal incubation duration. *Chelonian Conservation and Biology*, 15(1), 102–108.
- Carter, A. W., Sadd, B. M., Tuberville, T. D., Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2018). Short heatwaves during fluctuating incubation regimes produce females under temperature-dependent sex determination with implications for sex ratios in nature. *Scientific reports*, 8(3), 1–13.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95, 118–128.
- Charnier, M. (1966). Action de la temperature sur la sex ratio chez l'embryon d'Agama agama. *Soc. Bull. Oeust. Afr*, 160, 620–622.
- Colin, A. (2015). *Anidación y conservación de la tortuga golfina (Lepidochelys olivacea) en dos playas de la costa occidental de Baja California Sur, México: 1995-2013* (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Cordaux, R., Bouchon, D., & Grève, P. (2011). The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics*, 27(8), 332–341.
- da Rocha, S. T., Boeva, V., Escamilla-Del-Arenal, M., Ancelin, K., Granier, C., Matias, N. R., Sanulli, S., Chow, J., Schulz, E., Picard, C., Kaneko, S., Helin, K., Reinberg, D., Stewart, A. F., Wutz, A., Margueron, R. & Heard, E. (2014). Jarid2 is implicated in the initial xist-induced targeting of PRC2 to the inactive X chromosome. *Molecular Cell*, 53(2), 301–316.
- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020). Quantification of DNA by using agarose gel electrophoresis technique. In *Springer Protocols Handbooks* (pp. 119–125). New York, NY: Springer US.
- de la Torre-Robles, L., Buenrostro-Silva, A., & García-Grajales, J. (2017). Incubation temperatures and sexual proportion of marine turtle nests in the San Juan Chacahua beach, Oaxaca, Mexico. *AGROProductividad*, 10(5), 39–45.
- Deveson, I. W., Holleley, C. E., Blackburn, J., Marshall Graves, J. A., Mattick, J. S., Waters, P. D., & Georges, A. (2017). Differential intron retention in Jumonji chromatin modifier genes is implicated in reptile temperature-dependent sex determination. *Science Advances*, 3(6): e1700731.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3–4), 191–364.
- Donelson, J. M., & Munday, P. L. (2015). Transgenerational plasticity mitigates the impact of global warming to offspring sex ratios. *Global Change Biology*, 21(8), 2954–2962.
- Ellegren, H. (2011). Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 157–166.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. E. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre (Eds), *Ecología Molecular* (517–552). INE, CONABIO y UNAM.
- Espitia, C. M., Zhao, W., Saldarriaga, O., Osorio, Y., Harrison, L. M., Cappello, M., Travi, B. L., Melby, P. C. (2010). Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunology*, 11(1), 31.
- Ferretti, A. B. S. M., Milani, D., Palacios, O. M., Ruiz, F. J. & Cabral, D. C. (2020). High dynamism for neo-sex chromosomes: satellite DNAs reveal complex evolution in a grasshopper. *Heredity*, 125, 124–137.

- Frazier, G. (1999). Generalidades de la historia de vida de las tortugas marinas. Memorias de la reunión "Conservación de tortugas marinas en la región del Gran Caribe- Un diálogo para el manejo regional efectivo" IUCN- Marine Turtle Specialist Group. Santo Domingo, República Dominicana. 16-18 de noviembre, 1999.
- Fuentes, M. M. P. B., & Porter, W. P. (2013). Using a microclimate model to evaluate impacts of climate change on sea turtles. *Ecological Modelling*, 251, 150–157.
- Gamble, T. y Zarkower, D. (2012). Determinación del sexo. *Biología actual*, 22(8), R257–R262.
- Gaona, O., & Barragán, A. R. (2016). Las tortugas marinas en México: logros y perspectivas para su conservación. (1ra ed.). México: Soluciones Ambientales ITZENI.
- Garibyan, I. & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133: e6.
- Georges, A., Ezaz, T., Quinn, A. E., & Sarre, S. D. (2010). Are reptiles predisposed to temperature-dependent sex determination? *Sexual Development*, 4(1-2), 7–15.
- Girondot, M., Delmas, V., Rivalan, P., Courchamp, F., Prévot-Julliard, A. C., & Godfrey, M. H. (2004). Implications of temperature-dependent sex determination for population dynamics. Temperature-dependent Sex Determination in Vertebrates (eds N. Valenzuela & V. Lance), pp. 148–155. Smithsonian Books, Washington, DC.
- Godfrey, M. H., & Mrosovsky, N. (2006). Pivotal temperature for green sea turtles, *Chelonia mydas*, nesting in Suriname. *The Herpetological Journal*, 16(1), 55-61.
- Godfrey, M. H., Mrosovsky, N., & Barreto, R. (1996). Estimating past and present sex ratios of sea turtles in Suriname. *Canadian Journal of Zoology*, 74(2), 267–277.
- Godley, B. J., Broderick, A. C., Mrosovsky, N. (2001). Estimating hatchling sex ratios of loggerhead turtles in Cyprus from incubation durations. *Marine Ecology Progress Series*, 210, 195–201
- González-Garza, B. I., Sánchez-Teyer, L. F., & Zapata-Pérez, O. (2016). Sea turtle hatchling carapace as a source of high quantity and quality DNA. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(1), 217–222.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), db. top100388.
- Gross, T. S., Crain, D. A., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. & Carthy, R. R. (1995). Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/amniotic fluid. *General and Comparative Endocrinology*. 99(2), 204–210.
- Guillatt, A. M. (2003). Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In *PCR Mutation Detection Protocols* (pp. 001–011). New Jersey: Humana Press.
- Guler, Y., Short, S., Kile, P., & Ford, A. T. (2012). Integrating field and laboratory evidence for environmental sex determination in the amphipod, *Echinogammarus marinus*. *Marine Biology*, 159, 2885–2890.
- Hajizadeh, M., Navarro, B., Bashir, N. S., Torchetti, E. M., & Di Serio, F. (2012). Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. *Journal of Virological Methods*, 179(1), 62–69.
- Hamann, M., Godfrey, M. H., Seminoff, J. A., Arthur, K., Barata, P. C. R., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Broderick, A. C., Campbell, L. M., Carreras, C., et al. (2010) Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endang Species Res*, 11, 245–269.
- Hawkes, L. A., Broderick, A. C., Godfrey, M. H., & Godley, B. J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13(5), 923–932.
- Hays, G. C., Mazaris, A. D., & Schofield, G. (2014). Different male vs. female breeding periodicity helps mitigate offspring sex ratio skews in sea turtles. *Frontiers in Marine Science*, 1, 43.
- Hernández, V. & Merchant, H. (2008). Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos. *Ciencia Ergo Sum*, 15(3), 287-296.

- Hernandez-Divers, S. J., Stahl, S. J., & Farrell, R. (2009). An endoscopic method for identifying sex of hatchling Chinese box turtles and comparison of general versus local anesthesia for coelioscopy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(6), 800–804.
- Howell, E. C., Armstrong, S. J. & Filatov, D. A. (2009). Evolution of Neo-Sex Chromosomes in *Silene diclinis*. *Genetics*, 182(4), 1109–1115
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. London: Academic Press.
- IPCC, 2014: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 157 págs.
- Janzen, F. J. (1994). Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7487-7490.
- Janzen, F. J., & Paukstis, G. L. (1991). Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology*, 66(2), 149-179.
- Jennings, W. B. (2016). *Phylogenomic Data Acquisition: Principles and Practice*. Reino Unido: CRC Press.
- Kallimanis, A. S. (2010). Temperature dependent sex determination and climate change. *Oikos*, 119(1), 197–200.
- Kaneko, S., Bonasio, R., Saldaña-Meyer, R., Yoshida, T., Son, J., Nishino, K., Umezawa, A., & Reinberg, D. (2014). Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin. *Molecular Cell*, 53(2), 290-300.
- Kaska, Y., Ilgaz, Ç., Özdemir, A., Başkale, E., Türkozan, O., Baran İ., & Stachowitsch M. (2006). Sex ratio estimations of loggerhead sea turtle hatchlings by histological examination and nest temperatures at Fethiye beach, Turkey. *Naturwissenschaften*, 93, 338–343.
- Kettlewell, J. R., Raymond, C. S., & Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26(3), 174–178.
- Kim, Y. H., Yang, I., Bae, Y.-S., & Park, S.-R. (2008). Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. *BioTechniques*, 44(4), 495–505.
- Kircher, L. & Wyneken J. (2017). Sex estimation by geometric morphometric analysis of Loggerhead (*Caretta caretta*) Sea Turtle Hatchlings. *Marine Turtle Newsletter*, 154, 12-15.
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y. & Nakamura, M. (2012). Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sexual Development*, 7, 115–125.
- Kohno, S., Bernhard M. C., Katsu, Y., Zhu, J., Bryan, T. A., Doheny, B. M., Iguchi, T., Guillette, L. J., Jr. (2015). Estrogen Receptor 1 (ESR1; ER $\alpha$ ), not ESR2 (ER $\beta$ ), Modulates Estrogen-Induced Sex Reversal in the American Alligator, a Species with Temperature-Dependent Sex Determination. *Endocrinology*, 156(5), 1887–1899.
- Koontz, Laura. (2013). Agarose gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 529, 35–45.
- Lacadena, J. R. (1996). Citogenética. Madrid, España: Editorial Complutense.
- Laloë, J.-O., Esteban, N., Berkel, J., & Hays, G. C. (2016). Sand temperatures for nesting sea turtles in the Caribbean: Implications for hatchling sex ratios in the face of climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 92–99.
- Lang, J. W., & Andrews, H. V. (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 28–44.
- Lara, M. M., & Rodríguez, C. (2014). Conociendo a la Tortuga Golfina, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). *Bioma*, (24), 9-17.
- Lee, S. V. & Bahaman, A. R. (2012). Discriminatory power of agarose gel electrophoresis in DNA fragments analysis. In Magdeldin S. (Ed.), *Gel Electrophoresis – Principles and Basics* (pp. 41-56). Rijeka, Croatia: InTech.
- Leutert, R. (1975). Sex-determination in Bonellia. *Intersexuality in the animal kingdom*, 84-90.

- Li, X. Y., & Gui, J. F. (2018). Diverse and variable sex determination mechanisms in vertebrates. *Science China Life Sciences*, 61, 1503–1514.
- López Mora, P. A., López Gutiérrez, A. M., & Marulanda Ángel, M. L. (2011). Estandarización de la extracción de ADN genómico en *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. y *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Okén. *Temas Agrarios*, 16(2), 28-41.
- Lubiana, A. & Ferreira Júnior, P. D. (2009). Pivotal temperature and sexual dimorphism of *Podocnemis expansa* hatchlings (Testudines: Podocnemididae) from Bananal Island, Brazil. *Zoologia*, 26(3), 527–533.
- Maddocks, S., & Jenkins, R. (2017). Designing and ordering your polymerase chain reaction primers. In S. Maddocks & R. Jenkins (Eds.), *Understanding PCR* (pp. 11–30). San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier.
- Madhav, M., Parry, R., Morgan, J. A. T., James, P. & Asgari, S. (2020). Wolbachia Endosymbiont of the Horn Fly (*Haematobia irritans irritans*): a Supergroup A Strain with Multiple Horizontally Acquired Cytoplasmic Incompatibility Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6): e02589–19.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51.
- Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., & Scambia, G. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological procedures online*, 3, 19-25.
- Márquez, R. 1990. Sea turtles of the world. FAO. Species Catalogue. Vol. 11.
- Márquez, R. 1996. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica. México. 200 p.
- Matta, N. E., Ramírez, N., Zúñiga, B. C. & Vera, V. (2008). Sex Determination In Birds By Molecular Tools. *Acta biol. Colomb*, 13(3), 27-40.
- McPherson, M. J., & Møller, S. G. (2007). *PCR*. Reino Unido: Taylor & Francis.
- Merchant, H., Ruiz, S., Moreno, N., & Marmolejo, A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 107, 373–385.
- Merchant-Larios, H., & Díaz-Hernández, V. (2013). Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles. *Sexual Development*, 7(1-3), 95–103.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., & Cortez, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms underlying temperature-dependent sex determination in turtles. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 15(1–3), 38–46.
- Miura, I. (2007). An Evolutionary Witness: the Frog *Rana rugosa* Underwent Change of Heterogametic Sex from XY Male to ZW Female. *Sexual Development*, 1(6), 323–331.
- Morales, B. A. (2013). Relación entre la duración del período de incubación y la proporción de sexos de las tortugas marinas *Lepidochelys olivacea* en la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico (RNUMM) [Tesis de Licenciatura]. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Moreno-Mendoza, N. Vincent R. Harley & H. Merchant-Larios (2001). Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Developmental Biology*, 229(2), 319-32
- 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.
- Morreale, S., Ruiz, G., Spotila, & Standora, E. (1982). Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. *Science*, 216(4551), 1245–1247.
- Mrosovsky, N. & Benabib, M. (1990). An Assessment of two methods of sexing hatchling sea turtles. *Copeia*, 1990(2), 589-591.
- Mrosovsky, N. (1984). Editorial. Marine Turtle Newsletter 28: 1-2.

- Mrosovsky, N. (1988). Pivotal temperatures for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from northern and southern nesting beaches. *Canadian Journal of Zoology*, 66, 661-669.
- Mrosovsky, N., & Provancha, J. (1992). Sex ratio of hatchling loggerhead sea turtles: data and estimates from a 5-year study. *Canadian Journal of Zoology*, 70(3), 530-538.
- Mrosovsky, N., Dutton, P. H., & Whitmore, C. P. (1984). Sex ratios of two species of sea turtle nesting in Suriname. *Canadian Journal of Zoology*, 62(11), 2227-2239.
- Muralidhar, P., & Veller, C. (2018). Sexual antagonism and the instability of environmental sex determination. *Nature Ecology & Evolution*, 2(2), 343-351.
- Musick, J. A., & Limpus, C. J. (1997) Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In *The biology of sea turtles* (eds. Lutz, P. L., Musick, J. A.), pp. 137-163. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Natri, H. M., Shikano, T., & Merilä, J. (2013). Progressive Recombination Suppression and Differentiation in Recently Evolved Neo-Sex Chromosomes. *Mol. Biol. Evol.*, 30(5), 1131-1144.
- New, M., Liverman, D., Schroder, H., & Anderson, K. (2011). Four degrees and beyond: the potential for a global temperature increase of four degrees and its implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, 369, 6-19.
- Nguyena, P., Sýkorová, M., Šíchová, J., Kuta, V., Dalíková, M., Čapková Frydrychová R., Nevenc, L. G., Saharad, K. & Marec, F. (2013). Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *PNAS*, 110(17), 6931-6936.
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Owens, D. W. (1999). Reproductive cycles and endocrinology. Pp. 119-123. In *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A., & Donnelly, M. (Eds.). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.
- Owens, D. W., Hendrickson, J. R., Lance, V., & Callard, I. P. (1978). A technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using a radioimmunoassay. *Herpetologica*, 34(3), 270-273.
- Pala, I., Naurin, S., Stervander, M., Hasselquist, D., Bensch S. & Hansson B. (2012). Evidence of a neo-sex chromosome in birds. *Heredity*, 108, 264-272.
- Pearse, D. E., & Avise, J. C. (2001). Turtle Mating Systems: Behavior, Sperm Storage, and Genetic Paternity. *Journal of Heredity*, 92(2), 206-211.
- Pérez, A., & Gómez, L. M. (2018). Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa. En L. M. Gómez & G. F. Gómez (Eds.), *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* (163-169). Sello Editorial Tecnológico de Antioquia.
- Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays*, 18(1), 19-26.
- Pierce, B. A. (2010). *Genética: Un Enfoque Conceptual*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Plant, N., Schantz, M. v., Dale, J. W. (2012). *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*. Reino Unido: Wiley.
- Plotkin, P. T., Byles, R. A., Rostal, D. C., & Owens, D. W. (1995). Independent versus socially facilitated oceanic migrations of the olive ridley, *Lepidochelys olivacea*. *Marine Biology*, 122, 137-143.
- Plotkin, P. T., Rostal, D. C., Byles, R. A., & Owens, D. W. (1997). Reproductive and Developmental Synchrony in Female *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology*, 31(1), 17-22.
- Ponnikas, S., Sigeman, H., Abbott, J. K., & Hansson, B. (2018). Why Do Sex Chromosomes Stop Recombining? *Trends in Genetics*, 34(7), 492-503.
- Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*. (2020, 2 de octubre). Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). Sitio web: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Rhen, T., Metzger, K., Schroeder, A., & Woodward, R. (2007). Expression of putative sex-determining genes during the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Sexual Development*, 1(4), 255-270.

- Rostal, D. C., Grumbles, J. S., Lance, V. A., & Spotila, J. R. (1994). Non-lethal sexing techniques for hatchling and immature desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *Herpetological Monographs*, 8, 83-7.
- Sánchez, L. (1997). Determinación sexual y compensación de dosis génica en *Drosophila*, *Caenorhabditis* y mamíferos: aspectos comparativos.
- Santidrián Tomillo, P., Oro, D., Paladino, F. V., Piedra, R., Sieg, A. E., Spotila, J. R. (2014). High beach temperatures increased female-biased primary sex ratios but reduced output of female hatchlings in the leatherback turtle. *Biological Conservation*, 176, 71-79.
- Santidrián, P. & Spotila, J. R. (2020). Temperature-dependent sex determination in sea turtles in the context of climate change: uncovering the adaptive significance, *BioEssays*, 42, 1–6.
- Santidrián, P., Genovart, M., Paladino, F. V., Spotila, J. R., & Oro, D. (2015). Climate change overruns resilience conferred by temperature-dependent sex determination in sea turtles and threatens their survival. *Global Change Biology*, 21(8), 2980–2988.
- Sanulli, S., Justin, N., Teissandier, A., Ancelin, K., Portoso, M., Caron, M., Michaud, A., Lombard, B., da Rocha, S. T., Offer, J., Loew, D., Servant, N., Wassef, M., Burlina, F., Gamblin, S. J., Heard, E., & Margueron, R. (2015). Jarid2 methylation via the PRC2 complex regulates H3K27me3 deposition during cell differentiation. *Molecular Cell*, 57(5), 769-783.
- Schantz, M. v., Plant, N., & Dale, J. W. (2012). *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*. Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Schwanz, L. E., Spencer, R.-J., Bowden, R. M., & Janzen, F. J. (2010). Climate and predation dominate juvenile and adult recruitment in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Ecology*, 91(10), 3016–3026.
- Shanker, K., Pandav, B., & Choudhury, B. C. (2004). An assessment of the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting population in Orissa, India. *Biological Conservation*, 115, 149–160.
- Shoemaker, C. M., & Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(3), 293–303.
- Shoemaker, C., M., Queen, J., & Crews, D. (2007). Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Molecular Endocrinology*, 21(11), 2750–2763.
- Smith, C. A., McClive, P. J., Western, P. S., Reed, K. J. & Sinclair, A. H. (1999). Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 402, 601–602.
- Smith, C. A., McClive, P. J., Western, P. S., Reed, K. J., Sinclair, A. H. (2009). Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 402, 601–602.
- Smith, C. A., Shoemaker, C. M., Roeszler, K. N., et al. (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Developmental Biology*, 8(72).
- Solari, A. J. (1993). *Sex chromosomes and sex determination in vertebrates*. CRC press.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912-920.
- Sönmez, B, Bağda, E, Candan, O, Yılmaz, H. E. (2019). Sex determination in green turtle hatchlings: geometric morphometry and molecular sex markers. *Natural and Engineering Sciences*, 4 (1), 42-54.
- Spotila, J. R. (2004). *Sea turtles: A complete guide to their biology, behavior, and conservation*. Maryland, USA: The Johns Hopkins University Press and Oakwood Arts.
- Standora, E. A., & Spotila, J. R. (1985). Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles. *Copeia*, 1985(3), 711-722.
- Stewart, K. R., & Peter, H. Dutton. (2014). Breeding Sex Ratios in Adult Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) May Compensate for Female-Biased Hatchling Sex Ratios. *PLoS ONE*, 9(2): e88138.

- Straková, B., Rovatsos, M., Kubička, L. & Kratochvíl L. (2020). Evolution of Sex Determination in Amniotes: Did Stress and Sequential Hermaphroditism Produce Environmental Determination? *BioEssays*, 42(10): e2000050.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change*, 2(9), 686-690.
- Tapilatu, R. F., & Ballamu, F. (2015). Nest temperatures of the Piai and Sayang Islands green turtle (*Chelonia mydas*) rookeries, Raja Ampat Papua, Indonesia: Implications for hatchling sex ratios. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 16(1), 102-107.
- Tezak, B., Sifuentes-Romero, I., Milton, S., & Wyneken, J. (2020). Identifying sex of neonate turtles with temperature-dependent sex determination via small blood samples. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8.
- Torres-Maldonado, L. C. & Merchant-Larios, H. (2006). Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas. *Ciencia Ergo Sum*, 13(2), 176-182.
- Torres-Maldonado, L. C., Landa, A., Moreno, N., Marmolejo, A., Meza, A. & Merchant, H. (2002). Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 129(1), 20–26.
- 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(5), 498–503.
- Urbano, S. P. (2013). *Patrón de metilación en el “enhancer” TESCO vinculado a la determinación sexual de la tortuga marina Lepidochelys olivacea* [Tesis de licenciatura]. UNAM.
- Valentini, P., & Pompa, P. P. (2016). A Universal Polymerase Chain Reaction Developer. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(6), 2157–2160.
- Valenzuela, N., & Ceballos, C. P. (2012). Evolución y mecanismos de determinación sexual en tortugas. V. *Biología y conservación de las tortugas continentales de Colombia. Serie editorial recursos hidrobiológicos y pesqueros Continentales de Colombia*, 115-123.
- Valenzuela, N., & Lance, V. (Eds.). (2004). *Temperature-dependent sex determination in vertebrates* (pp. 1-194). Washington, DC: Smithsonian Books.
- Valenzuela, N., Adams D. C. & Janzen F. J. (2003). Pattern Does Not Equal Process: Exactly When Is Sex Environmentally Determined? *The American Naturalist*, 161(4), 676-683.
- Valenzuela, N., Adams, D. C., Bowden, R. M., & Gauger, A. C. (2004). Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: A powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia*, 2004(4), 735–742.
- Valenzuela, N., Literman, R., Neuwald, J.L., Mizoguchi, B., Iverson, J. B., Riley, J. L. & Litzgus, J. D. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 9, 4254.
- Valleley, E. M. A., Cartwright, E. J., Croft, N. J., Markham, A. F., & Coletta, P. L. (2001). Characterisation and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology*, 291(1), 85–91.
- Valverde, R. A., Wingard, S., Gómez, F., Tordoir, M. T., Orrego, C. M. (2010). Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos at a mass nesting rookery. *Herpetological Conservation and Biology*, 13(2), 488–496.
- van Doorn, S. G. & Kirkpatrick, M. (2010). Transitions Between Male and Female Heterogamety Caused by Sex-Antagonistic Selection. *Genetics*, 186(2), 629–645.
- Varo-Cruz, N., Monzón-Argüello, C., Carrillo, M., Calabuig, P., Liriz-Loza, A. (2015). Tortuga olivácea – *Lepidochelys olivacea*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>

- Vaught, R. C., Voigt, S., Dobler, R., Clancy, D. J., Reinhardt, K., & Dowling, D. K. (2020). Interactions between cytoplasmic and nuclear genomes confer sex-specific effects on lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, *33*, 694–713.
- Voytas, D. (2001). Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology*, *51*(1), 2.5A.1-2.5A.9.
- Warner, D. A., & Shine, R. (2008). The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature*, *451*(7178), 566-568.
- Western, P. S., Harry, J. L., Marshall Graves, J. A., & Sinclair, A. H. (2000). Temperature-dependent sex determination in the american alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Developmental Dynamics*, *216*, 411–419.
- Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination in sea turtles. In *The Biology of Sea Turtles*, vol. 2 (eds. Lutz, P. L., Musick, J. A., Wyneken, J.), pp. 103-134. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Wibbels, T., Rostal, D., & Byles, R. (1998). High pivotal temperature in the sex determination of the olive ridley sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from playa Nancite, Costa Rica. *Copeia*, *1998*(4), 1086-1088.
- Wyneken, J., Epperly, S. P., Crowder, L. B., Vaughan, J., & Blair Esper, K. (2007). Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics. *Herpetologica*, *63*(1), 19–30.
- Xia, Z.-R., Li, P.-P., Gu, H.-X., Fong, J. J., & Zhao, E.-M. (2011). Evaluating noninvasive methods of sex identification in green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings. *Chelonian Conservation and Biology*, *10* (1), 117–123.
- Xu, L., & Ming, J. (2022). Development of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of *Lily symptomless virus*, *Lily mottle virus*, *Cucumber mosaic virus*, and *Plantago asiatica mosaic virus* in Lilies. *Virology Journal*, *19*(1), 219.
- Yamauchi, A., Telschow, A. & Kobayashi, Y. (2010). Evolution of cytoplasmic sex ratio distorters: Effect of paternal transmission. *Journal of Theoretical Biology*, *266*(1), 79-87.
- Yntema, C. L. & Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*, *36*(1), 33-36.
- Yntema, C. L., & Mrosovsky, N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology*, *60*(5), 1012-1016.
- Yoshida, K. & Kitano, J. (2012). The Contribution of Female Meioticdrive to the Evolution of Neo-Sexchromosomes. *Evolution*, *66*(10), 3198–3208.
- Zhang, X.R., Li, F.M., & Wang, L.W. (1995). Determination sex of green turtle hatchlings. *Chinese Journal of Zoology* *30*, 48–49.
- Zug, G. R., Chaloupka, M., & Balazs, G. H. (2006). Age and growth in olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) from the North-central Pacific: a skeletochronological analysis. *Marine ecology*, *27*(3), 263-270.
- Zug, G. R., Ernst, C. H., & Wilson, R. V. (1998). *Lepidochelys olivacea*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, *653*, 1–13.