

Leda Carolina Torres Maldonado, Horacio Merchant Larios
Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas
Ciencia Ergo Sum, vol. 13, núm. 2, julio-octubre, 2006, pp. 176-182,
Universidad Autónoma del Estado de México
México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10413208>



Ciencia Ergo Sum,
ISSN (Versión impresa): 1405-0269
ciencia.ergosum@yahoo.com.mx
Universidad Autónoma del Estado de México
México

¿Cómo citar?

Fascículo completo

Más información del artículo

Página de la revista

www.redalyc.org

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas

Leda Carolina Torres Maldonado* y Horacio Merchant Larios**

Recepción: 27 de octubre de 2005

Aceptación: 7 de abril de 2006

* Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Correo electrónico: leda@ibt.unam.mx

** Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Correo electrónico:

merchant@servidor.unam.mx

Agradecemos a la SEMARNAT su autorización para la colecta de huevos de *L. olivacea* en la playa La Escobilla, Oaxaca; el apoyo técnico de Alejandro Marmolejo, José Baltazar y Laura Ramírez y al Conacyt (46679) por el apoyo financiero.

Resumen. La determinación del sexo en vertebrados puede estar controlada por factores genéticos o por factores ambientales. Hasta el momento los mecanismos moleculares relacionados con la determinación sexual por temperatura (DST) no se conocen con exactitud. En los diferentes grupos de vertebrados se han estudiado algunos genes que participan en la cascada de la determinación del sexo, los cuales se encuentran conservados tanto en estructura como en función, como ejemplo tenemos a los genes *Sox9*, *Dax1* y *Dmrt1*. La tortuga marina *Lepidochelys olivacea* presenta DST; en esta especie se ha estudiado la expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y *Dmrt1* en tejido gonadal en distintas etapas del desarrollo embrionario, se observa que la temperatura tiene efecto sobre su expresión. Se sugiere que éstos podrían formar parte de la cascada de genes que regulan la diferenciación gonadal en *L. olivacea*.

Palabras clave: Determinación sexual por temperatura (DST), reptiles, *Sox9*, *Dax1*, *Dmrt1*, tortuga golfina.

Molecular Aspects in Turtle Sex Determination.

Abstract. In vertebrates sex determination is controlled by genetic factors or by environmental factors. In vertebrates the sex-determining genes such as *Sox9*, *Dax1* and *Dmrt1* are conserved in structure and function. In the sea turtle *Lepidochelys olivacea*, sex determination depends on the temperature of egg incubation (TSD). In this species the expression of *Sox9*, *Dax1* and *Dmrt1* has been analyzed in gonadal tissue at different developmental stages. The temperature of egg incubation has an effect in the expression of the genes *Sox9*, *Dax1* and *Dmrt1*; these genes are probably part of the genetic pathway of gonadal differentiation in *L. olivacea*.

Key words: Temperature sex determination (TSD), reptiles, *Sox9*, *Dax1*, *Dmrt1*, olive ridley.

1. Determinación del sexo en vertebrados

En los vertebrados la identidad de las gónadas depende de dos procesos: primero, de la determinación del sexo, que es el evento molecular que se establece en etapas tempranas del desarrollo embrionario y, segundo, de la diferenciación del sexo, en el cual una cascada de eventos genéticos y hor-

monales lleva a la gónada indiferenciada a desarrollarse como un ovario o como un testículo.

La determinación del sexo puede estar controlada por factores genéticos (Witschi, 1959 y Ohno, 1967) o por factores ambientales (Bull, 1980). En el primer caso depende de la presencia de genes específicos y se asocia comúnmente a la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos, como

en el caso de los mamíferos que presentan el par XX en la hembra y el par XY en el macho; en el caso de las aves y algunos reptiles, la hembra presenta el par ZW y el macho que presenta el par ZZ.

En el segundo caso depende de factores ambientales, como la temperatura, por ejemplo en ciertos peces, anfibios y reptiles, en general, en especies que carecen de cromosomas sexuales identificables (Vogt y Bull, 1979).

En los mamíferos la determinación del sexo depende de la presencia de un gen o genes y está relacionada con la presencia del cromosoma Y, que es el determinante masculino; la señal primaria para la distinción testicular de la gónada indiferenciada es la presencia y expresión del gen *Sry* (Sinclair *et al.*, 1990). Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma Y. Una vez que el testículo se ha diferenciado produce las hormonas que controlarán la diferenciación de los genitales masculinos internos y externos. En el caso de las hembras, la ausencia del gen *Sry* ocasiona que la gónada se desarrolle como ovario y los genitales internos y externos como femeninos.

A partir del descubrimiento de *Sry*, se han descrito otros genes relacionados con la diferenciación gonadal, sobre todo en mamíferos (Swain y Lovell-Bagde, 1999; Hiort y Holterhus, 2000); en el resto de los vertebrados el análisis de los eventos moleculares relacionados con la determinación del sexo, se reduce a estudiar la expresión de los genes ya identificados en los mamíferos. A continuación describiremos tres de los genes más relevantes en la cascada de la diferenciación sexual en vertebrados: *Dmrt1*, *Dax1* y *Sox9*.

1.1. *Dmrt1*

El gen *Dmrt1* (Doublesex and Mab3 Related Transcription Factor 1) es un gen regulador del desarrollo sexual en vertebrados. *Dmrt1* codifica un factor de transcripción que posee un dominio DM, que es un motivo de unión a DNA. Este dominio ha sido identificado en los reguladores sexuales *doublesex* de *Drosophila melanogaster* (Erdman y Burtis, 1993) y *mab-3* de *Caenorhabditis elegans* (Raymond *et al.*, 1998). En el humano el gen *Dmrt1* se localiza en 9p24.3 y se requieren dos copias para el desarrollo testicular normal (Raymond *et al.*, 1999a). *Dmrt1* se expresa en el ratón en la cresta genital antes de la diferenciación sexual (Raymond *et al.*, 1999b). En el ratón se cuenta con un modelo nulo para *Dmrt1*. Los ratones machos heterocigotos (+/-) se ven normales, pero los machos homocigotos (-/-) no pueden man-

tener la diferenciación testicular a partir del día 7 postnatal. Las hembras (-/-) se desarrollan normalmente. Estos hallazgos apoyan la idea de que el gen *Dmrt1* es específico para los machos y necesario para la diferenciación testicular (Raymond *et al.*, 2000). En las aves se ha identificado al gen *Dmrt1*, en el pollo se localiza en el cromosoma Z, su expresión ha sido detectada en la cresta genital antes de la diferenciación sexual –etapas 19 a 25– hasta la etapa 31, cuando inicia la diferenciación sexual. La expresión en machos es en todas las etapas mayor que en hembras (Raymond *et al.*, 1999b; Nanda *et al.*, 2000).

En la tortuga dulceacuícola *Trachemys scripta* se ha estudiado el patrón de expresión del gen *Dmrt1* durante el periodo termosensible, el cual sugiere su posible participación en la diferenciación testicular, ya que se presenta mayor expresión en los complejos urogenitales de embriones incubados a temperatura masculinizante al compararla con la de los embriones incubados a temperatura feminizante (Kettewell *et al.*, 2000; Murdock y Wibbels, 2003).

1.2. *Dax1*

El gen *Dax1* (DSS-AHC in X chromosome) codifica para una proteína miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares (Muscatelli *et al.*, 1994; Zanaria *et al.*, 1994). Este gen se ha mapeado en una región del brazo corto del cromosoma X, la región se encuentra duplicada en algunos pacientes con reversión sexual XY. En el ratón se localiza también en el cromosoma X (Swain *et al.*, 1996); en marsupiales se ha estudiado en el wallabi *Macropus eugenii*, en cuyo caso tiene una localización autosómica en el brazo corto del cromosoma 5, cerca de otros genes homólogos a genes humanos que se ubican en el brazo corto del cromosoma X. Este hallazgo podría indicar que la región donde se encuentra *Dax1* es originalmente autosómica (Pask *et al.*, 1997).

Los estudios de expresión de *Dax1* en el ratón han detectado que este gen se expresa desde los 11.5 días post coito (dpc) en machos, y en hembras en el componente somático de la cresta urogenital. A los 12.5 dpc decrece dramáticamente en los cordones testiculares. En la gónada femenina se continúa expresando en las células de la teca, sugiriendo que *Dax1* se requiere para la diferenciación ovárica pero no para la testicular (Swain *et al.*, 1996). Se han realizado estudios en la expresión de *Dax1* y su correlación con la expresión de *Sry*, los cuales muestran que *Dax1* puede antagonizar la acción de *Sry* (Swain *et al.*, 1998).

La determinación del sexo en vertebrados puede estar controlada por factores genéticos o por factores ambientales.

Figura 1. Tortuga marina *Lepidochelys olivacea*

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

1.3. *Sox9*

El gen *Sox9* se describió por el estudio en pacientes con displasia campomélica, un síndrome de malformaciones esqueléticas que se asocia con reversión sexual, estas alteraciones se asocian con translocaciones o rearrreglos en el cromosoma 17 humano en 17q24.1 a 17q25.1. El análisis molecular de esta región llevó al hallazgo de un gen relacionado con el *Sry*, al cual se denominó *Sox9*, que pertenece a la familia *SOX* (SRY-like HMG-box gene) y que parece estar relacionado con la diferenciación gonadal (Foster *et al.*, 1994). En el ratón, los transcritos de *Sox9* se observan en la cresta urogenital desde los 10.5 dpc en ambos sexos. A los 11.5 dpc sólo hay expresión en machos y de los 12.5 a 13.5 dpc la expresión se localiza en las células somáticas de los cordones sexuales en los testículos, los cuales en este estadio constan de células de Sertoli y células germinales. En la etapa postnatal se expresa en las células somáticas del testículo hasta la edad adulta (Morais da Silva *et al.*, 1996). *Sox9* se expresa a los 12.5 dpc en los conductos de Müller y mesonefricos en hembras y machos. A los 13.5 dpc la expresión sólo se mantiene en los machos en las células del mesenquima que rodean los conductos de Müller, se detecta expresión a los 15.5 dpc pero a los 17.5 dpc ya no se observa porque se ha completado la regresión del conducto de Müller (Kent *et al.*, 1996).

El gen *Sox9* también se ha encontrado en aves como el pollo y se ha observado su expresión en ambos sexos en etapas tempranas (etapa 28). A partir de la etapa 32 sólo se observó su expresión en embriones ZZ, lo que demostró también que en las aves tiene un papel importante en la diferenciación testicular (Morais da Silva *et al.*, 1996). Otros estudios

realizados en pollos muestran que no hay expresión de *Sox9* en los embriones hembras (ZW) en ninguna de las etapas estudiadas (28-40), observándose esta expresión sólo en los machos (Kent *et al.*, 1996; Oreal *et al.*, 1998 y Smith *et al.*, 1999).

Se ha estudiado la presencia y expresión del gen *Sox9* en diferentes reptiles. En la tortuga *Chelydra serpentina* se encontraron siete genes relacionados con la familia *SOX*: *TSox1* al 7 y tres pseudogenes: *TSox8*, 9 y 10, pero no se ha estudiado su patrón de expresión (Spotila *et al.*, 1994a; Spotila *et al.*, 1994b). Se han realizado estudios en distintas especies de tortugas. Por ejemplo, en la tortuga dulceacuícola *T. scripta* se analizaron complejos urogenitales durante el periodo sensible a la temperatura (etapas 12 a la 20) en embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) y en embriones incubados a temperatura feminizante (31°C). El nivel de expresión en ambos grupos es similar hasta la etapa 19, aumentando la expresión en los embriones de 26°C en la etapa 20. Estos datos muestran que *Sox9* podría tener un papel en la formación de testículo en esta especie (Spotila *et al.*, 1998).

En el cocodrilo americano *A. mississippiensis* se ha reportado la expresión de *Sox9* sólo en gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (33°C), mientras que a temperaturas feminizantes (30°C o 34.5°C) *Sox9* se expresa en niveles basales en todas las etapas (Western *et al.*, 1999).

2. Estudios en *Lepidochelys olivacea*

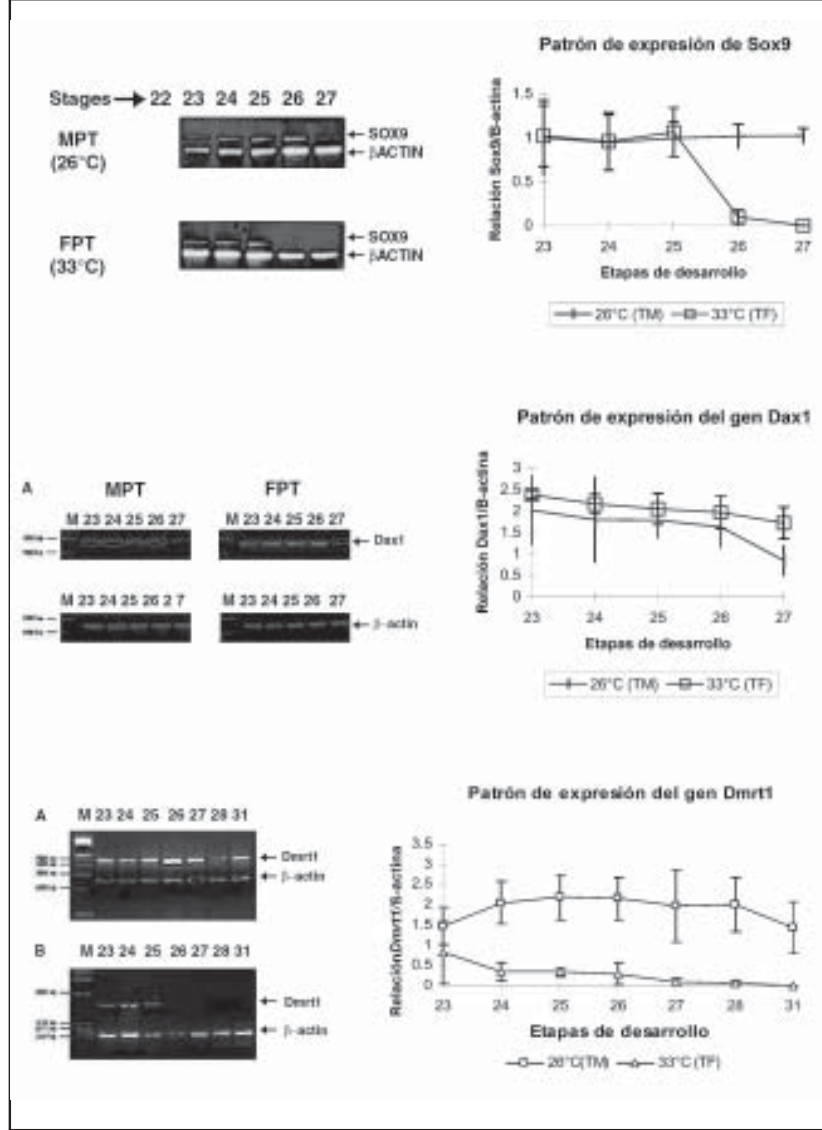
La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, conocida como tortuga golfina, anida en México en las playas del Pacífico. Sus principales sitios de anidación se encuentran en los estados de Michoacán y Oaxaca (Benabib y Cruz, 1981). La Convención Internacional para el Tráfico de Especies en Riesgo (CITES) considera a la tortuga golfina como una especie amenazada, pero no aún en peligro de extinción. La tortuga golfina no presenta cromosomas sexuales identificables y su determinación del sexo es dependiente de temperatura, los embriones que se incuban a 26-27°C (temperatura masculinizante, TM), se determinan como machos y los embriones que se incuban a 32-33°C (temperatura feminizante, TF), como hembras. Es un excelente modelo para estudiar el desarrollo gonadal porque se puede modificar la temperatura de incubación y saber de antemano cuál será el sexo del embrión. El grupo del Dr. Merchant ha trabajado en esta especie por más de diez años, han estudiado la histología de la gónada en diferentes etapas de desarrollo y establecido las temperaturas masculinizante y feminizante (Merchant-Larios *et al.*, 1989), además de definir el periodo sensible a la temperatura (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Actualmente estudian los mecanismos celulares

y moleculares que participan en la determinación del sexo en esta especie.

Los estudios realizados hasta ahora en reptiles con DST enfatizan el papel de las hormonas esteroideas en la determinación del sexo a nivel gonadal. En *L. olivacea* se han evaluado las concentraciones de esteroides de las gónadas en desarrollo, encontrando que la concentración de testosterona es más alta en embriones incubados a TF que en los incubados a TM (Salame-Mendez, 1992). En esta especie no se encuentran diferencias significativas en la concentración de estradiol en las gónadas de los embriones incubados a TF o TM; sin embargo, hubo un efecto feminizante al inyectar estradiol en embriones incubados a TM (Merchant-Larios *et al.*, 1997).

En la tortuga golfina se estudió su desarrollo gonadal por microscopía electrónica de alta resolución, y se observaron nervios no mielinizados en la gónada indiferenciada (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Un trabajo posterior mostró que las gónadas aisladas se desarrollan en cultivo de acuerdo a la temperatura en que el organismo donador fue incubado inicialmente, las gónadas aisladas no responden al cambio de temperatura mientras que el embrión completo sí responde (Merchant-Larios y Villalpando, 1990). Con estos antecedentes se postuló la hipótesis de que el sistema nervioso central en los embriones de *L. olivacea* es el termosensor que genera señales para la diferenciación gonadal. Para verificarla se evaluaron por radio inmuno análisis (RIA) las concentraciones y biotransformación de hormonas esteroideas en gónadas y cerebro en los tres periodos críticos del desarrollo gonadal, encontrándose diferencias significativas en la producción de estradiol en el cerebro, el cual depende de la temperatura de incubación, que es más alta en los embriones incubados a TF (Salame-Méndez *et al.*, 1998). Posteriormente, se realizó un estudio de cultivo de gónadas aisladas en etapas previas a la determinación del sexo, observando que sí responden al cambio de temperatura (Moreno-Mendoza *et al.*, 2001), por lo que aún no queda clara la par-

Figura 2. RT-PCR semi-cuantitativo. Patrón de expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y *Dmrt1* en gónadas de embriones incubados a 26°C (TM) y de embriones incubados a 33°C (TF). En el eje de las X se muestran las etapas de desarrollo de los embriones analizados. El eje de las Y se muestra el promedio y la desviación estándar de la relación Gen/ β -actina. (Torres-Maldonado *et al.*, 2002)



ticipación del sistema nervioso central en la determinación del sexo en *L. olivacea*.

En la tortuga golfina se han identificado algunos de los genes que participan en la determinación y diferenciación del sexo en vertebrados, investigando también su expresión en tejido gonadal en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Para identificar los genes *Sox9*, *Dax1* y *Dmrt1* en *L. olivacea* se diseñaron oligonucleótidos degenerados con base en las secuencias conocidas en otros vertebrados. Una vez identificados se analizó la expresión a nivel de

El patrón de expresión de los genes *Sox9*, *Dax1* y *Dmrt1* en el tejido gonadal de *Lepidochelys olivacea* sugiere su participación en la diferenciación sexual de esta especie.

RNA mensajero por la técnica de RT-PCR, se estudiaron gónadas de embriones en distintas etapas del desarrollo embrionario de dos grupos: los embriones incubados a TM y los incubados a TF (Torres-Maldonado *et al.*, 2001).

Se detectaron los transcritos de *Sox9* en las gónadas de la tortuga golfina a ambas temperaturas de incubación en las etapas 23 a 25. En la etapa 25-26 se detecta en 25% de las gónadas a TF y en todas las gónadas a TM. A partir de la etapa 26 sólo se detecta en las gónadas de los embriones incubados a TM, mientras que ya no se detecta en los incubados a TF (Torres-Maldonado *et al.*, 2001), estas observaciones coinciden con un estudio previo en el cual se analizó por inmunohistoquímica la presencia de la proteína Sox9 en gónadas de *L. olivacea*, incubadas a TM o a TF (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999). Se observó la presencia de la proteína en ambas temperaturas en los núcleos de células somáticas en la médula de la gónada hasta la etapa 24. En la etapa 25 empezó a disminuir en las gónadas de embriones incubados a TF, ya que se encontraron sólo algunos núcleos marcados, mientras que se siguió observando en las de los embriones de TM. A partir de la etapa 26 ya no se detectó en las gónadas de TF, y sí en las de TM. Todas estas observaciones nos indican que en *L. olivacea* la regulación de la expresión del gen *Sox9* es a nivel transcripcional y que existe una regulación negativa en la etapa 25 en los embriones incubados a TF.

Al analizar la presencia del RNA mensajero de *Dax1* por RT-PCR se observó que se expresa en gónadas de embriones incubados a TF en niveles semejantes en todas las etapas estudiadas (23 a 27), sin mostrar una diferencia significativa con los niveles en embriones incubados a TM hasta la etapa 26 en donde empieza a bajar el nivel de expresión a TM (Torres-Maldonado *et al.*, 2002). Este resultado es similar a lo que se observó en el cocodrilo americano, que presenta transcritos de *Dax1* en embriones a TF y a TM, con la diferencia que en el cocodrilo no se analizó el nivel de expresión (Western *et al.*, 2000).

El gen *Dmrt1* se expresa en gónadas de embriones incubados a TF en niveles semejantes a los de TM en la etapa 23. Los niveles de expresión se hacen significativamente más altos a TM a partir de la etapa 24 y son casi tres veces más altos que a TF. Observamos también que a TF el nivel de expresión decrece en la etapa 27 y desaparece en las crías (Torres-Maldonado *et al.*, 2002).

Los hallazgos moleculares sugieren que en *Lepidochelys olivacea* el sexo masculino es el que se determina de forma pasiva, porque no hay una diferencia en la expresión de los genes estudiados próxima al periodo de la de-

terminación sexual.

En la tortuga golfina la determinación testicular ocurre en la etapa 24, cuando *Sox9* se expresa de manera similar a ambas temperaturas, así el alto nivel de expresión de *Dmrt1* a TM, comparado con el nivel a TF durante el periodo sensible a la temperatura, apoya la idea de que *Dmrt1* puede actuar sobre *Sox9* manteniendo su expresión en las gónadas masculinas. Además, el hallazgo de una correlación entre la determinación femenina con la regulación negativa de *Sox9* y los bajos niveles de *Dmrt1* sugiere que estos dos genes están activamente regulados a TF para mantener el compromiso ovárico y la determinación sexual femenina. En el mismo sentido, la temperatura de incubación influye en la expresión del gen *Dax1*, que presenta una evidente disminución de su expresión en embriones incubados a TM en la etapa 26 y se mantiene en los embriones incubados a TF. Esto sugiere que el gen *Dax1* podría formar parte de la cascada de genes que regulan la diferenciación ovárica en *L. olivacea*.

Aun así falta correlacionar nuestros hallazgos con experimentos en campo, donde no hay una temperatura controlada y los machos y las hembras eclosionan de un mismo nido, y remarcar la importancia de la regulación por temperatura de estos genes, lo cual es de vital importancia en los programas de conservación de tortugas marinas en los que se incuban los huevos a temperaturas no conocidas.

Bibliografía

- Benabib, M. y L. E. Cruz (1981). "Las tortugas marinas en México", *Naturaleza*. 3: 157-166.
- Bull, J. J. (1980). "Sex Determination in Reptiles", *The Quarterly Review of Biology*. 55: 3-21.
- Erdman, S. E. y K. C. Burtis (1993). "The *Drosophila* Doublesex Proteins Share a Novel Zinc Finger Related DNA Binding Domain", *EMBO Journal*. 12: 527-535.
- Foster, J. W.; M. A. Dominguez-Steglich; S. Guioli; C. Kwok; P. A. Weller; M. Stevanovic; J. Weisenbach; S. Mansour; I. D. Young y P. N. Goodfellow

- (1994). "Campomelic Dysplasia and Autosomal Sex Reversal Caused by Mutations in a *Sry*-related Gene", *Nature* 372: 525-530.
- Hiort, O. y P. M. Holterhus (2000). "The Molecular Basis of Male Sexual Differentiation", *European Journal of Endocrinology* 142:101-110.
- Kent, J.; S. C. Wheatley; J.E. Andrews; A. H. Sinclair y P. Koopman (1996). "A Male-Specific Role for *SOX9* in Vertebrate Sex Determination", *Development* 122: 2813-2822.
- Kettlewell, J. R.; Ch. S. Raymond y D. Zarkower (2000). "Temperature-dependent Expression of Turtle *Dmrt1* Prior to Sexual Determination", *Genesis* 26: 174-178.
- Merchant-Larios, H.
 _____; I. Villalpando Fierro y B. Centeno-Urruiza (1989). "Gonadal Morphogenesis under Controlled Temperature in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*", *Herpetological Monographs* 3: 43-61.
- _____ e I. Villalpando (1990). "Effect of Temperature on Gonadal Sex Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*: An Organ Culture Study", *Journal of Experimental Zoology* 254: 327-331.
- _____; S. Ruiz-Ramirez; N. Moreno-Mendoza y A. Marmolejo-Valencia (1997). "Correlation Among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*", *General and Comparative Endocrinology* 107: 373-385.
- Moras da Silva, S.; A. Hacker; V. Harley; P. Goodfellow; A. Swain y R. Lovell-Badge (1996). "*Sox9* Expression During Gonadal Development Implies a Conserved Role for the Gene in Testis Differentiation in Mammals and Birds", *Nature Genetics* 14: 62-68.
- Moreno-Mendoza, N.; V. R. Harley y H. Merchant-Larios (1999). "Differential Expression of *SOX9* in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*, at Male or Female Promoting Temperatures", *Journal of Experimental Zoology* 284: 705-710.
- Moreno-Mendoza, N.; V. R. Harley y H. Merchant-Larios (2001). "Temperature Regulates *SOX9* Expression in Cultured Gonads of *Lepidochelys olivacea*, a Species with Temperature Sex Determination", *Developmental Biology* 229: 319-326.
- Murdock, C y T. Wibbels (2003). "Expression of *Dmrt1* in a Turtle with Temperature-dependent Sex Determination", *Cytogenetic and Genome Research* 101: 302-308.
- Muscattelli, F.; T. M. Strom; A. P. Walker y E. Zanaria (1994). "Mutations in the DAX-1 Gene Give Rise to Both X-linked Adrenal Hypoplasia Congenital and Hypogonadotropic Hypogonadism", *Nature* 372: 672-676.
- Nanda, I.; E. Zend-Ajusch; Z. Shan; F. Grutzner; M. Scharl; D. W. Burt; M. Koehler; V. M. Fowler; G. Goodwin; W. J. Schneider; S. Mizuno; G. Dechant; T. Haaf y S. Ohno (1967). "Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes and Genomes", en Ohno, S. *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*. Springer-Verlag Berlin.
- Nanda I.; E. Zend-Ajusch; Z. Shan; F. Grutzner; M. Scharl; D. W. Burt; M. Koehler; V. M. Fowler; G. Goodwin; W. J. Schneider; S. Mizuno; G. Dechant; T. Haaf y M. Schmid (2000). "Conserved Synteny Between the Chicken Z Sex Chromosome and Human Chromosome 9 Includes the Male Regulatory Gene DMRT1: a Comparative (re)view on Avian Sex Determination", *Cytogenetic and Cell Genetics* 89: 67-78.
- Ohno S. (1967). "Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes and Genomes", en Ohno S. *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*. Springer-Verlag, Berlín, pp 5-73.
- Oreal, E.; C. Pieau; M. G. Mattel; N. Josso; J. Y. Picard; D. Carré-Eusebe y S. Magre (1998). "Early Expression of AMH in Chicken Embryonic Gonads Precedes Testicular *SOX9* Expression", *Developmental Dynamics* 212: 522-532.
- Pask, A.; R. Toder; S. A. Wilcox; G. Camerino y J. A. Marshall-Graves (1997). "The Candidate Sex-reversing DAX1 Gene is Autosomal in Marsupials: Implications for the Evolution of Sex Determination in Mammals". *Genomics* 41: 422-426.
- Raymond, Ch. S.
 _____; C. E. Shamu; M. M. Shen; K. J. Seifert; B. Hirsch; J. Hodgkin y D. Zarkower (1998). "Evidence for Evolutionary Conservation of Sex-determining Genes", *Nature* 391: 691-695.
- _____; D. E. Parker; J. R. Kettlewell; L. G. Brown; D. C. Page; K. Kusz; J. Jaruzelska; Y. Reinberg; W. L. Flejter; V. J. Bardwell; B. Hirsch y D. Zarkower (1999a) "A Region of Human Chromosome 9p Required for Testis Development Contains Two Genes Related to Known Sexual Regulators", *Human Molecular Genetics* Vol. 8, núm. 6: 989-996.
- _____; J. R. Kettlewell; B. Hirsch; V. J. Bardwell y D. Zarkower (1999b) "Expression of *Dmrt1* in the Gonadal Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development", *Developmental Biology* 215: 208-220.
- _____; M. W. Murphy; M. G. O'Sullivan; V. J. Bardwell y D. Zarkower (2000). "*Dmrt1*, a Gene Related to Worm and Fly Sexual Regulators, is Required for Mammalian Testis Differentiation", *Genes and Development* 14: 2587-2595.
- Salame Méndez, A. (1992). *La temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroideas sexuales y su relación con el establecimiento gonadal de la tortuga marina Lepidochelys olivacea (Eschscholtz, 1829)*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Salame-Méndez, A.; S. Ruiz; J. Herrera; N. Moreno-Mendoza y H. Merchant-Larios (1998). "The Diencephalon but not the Gonad Responds to Female-promoting Temperature with Elevated Estradiol Levels in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*", *Journal of Experimental Zoology* 280: 304-313.
- Sinclair, A. H.; P. Berta; M. S. Palmer; J. R.

- Hawkins; B. L. Griffiths; M. J. Smith; J. W. Foster; A. M. Frischauf; R. Lovell-Badge y P. N. Goodfellow (1990). "A Gene from the Human Sex-determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-binding Motif", *Nature* 346: 240-244.
- Smith, CA., M. J. Smith y A. H. Sinclair (1999). "Gene Expression During Gonadogenesis in the Chicken Embryo", *Gene* 234: 395-402.
- Spotila, J. R.; L. D. Spotila y N. F. Kaufer (1994a). "Molecular Mechanisms of TSD in Reptiles: A Search for the Magic Bullet", *Journal of Experimental Zoology*; 270: 117-127.
- Spotila, L. D.; N. F. Kaufer; E. Theriot; K. M. Ryan; D. N. Penick y J. R. Spotila (1994b). "Sequence Analysis of *ZFY* and *Sox* Genes in the Turtle *Chelydra serpentina*", *Molecular and Phylogenetic Evolution*. Vol. 3, Núm. 1: 1-9.
- _____; Spotila J. R. y S. Hall (1998). "Sequence and Expression of *WT1* and *Sox9* in the Red-eared Slider Turtle *Trachemys scripta*", *Journal of Experimental Zoology*; 281: 417-427.
- Swain, A.
_____; E. Zanaria; A. Hacker; R. Lovell-Badge y G. Camerino (1996). "Mouse *Dax1* Expression is Consistent with a Role in Sex Determination as Well as in Adrenal and Hypothalamus Function", *Nature Genetics*. 12: 404-409.
- _____; V. Narvaez; P. Burgoyne; G. Camerino y R. Lovell-Badge (1998). "*Dax1* Antagonizes *Sry* Action in Mammalian Sex Determination", *Nature*. 391: 761-767.
- _____; y R. Lovell-Badge (1999). "Mammalian Sex Determination: A Molecular Drama", *Genes and Development*. Vol. 13, núm. 7: 755-767.
- Torres-Maldonado, L.; N. Moreno-Mendoza; A. Landa y H. Merchant-Larios (2001). "Timing of *Sox9* Downregulation and Female Sex Determination in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*", *Journal of Experimental Zoology*; 290: 498-503.
- Torres-Maldonado, L. C.; A. Landa-Piedra; N. Moreno-Mendoza; A. Marmolejo-Valencia; A. Meza-Martínez y H. Merchant-Larios H. (2002). "Expression Profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* During Temperature Sex Determination in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*", *General and Comparative Endocrinology*. 129:20-26.
- Vogt, R.C. y J. J. Bull (1979). "Temperature-dependent Sex Determination in Turtles", *Science* 206: 1186-1188.
- Western, P.S.; J. L. Harry; J. A. Marshal-Graves y A. H. Sinclair AH. (1999). "Temperature-dependent Sex Determination: Upregulation of *SOX9* Expression after Commitment to Male Development", *Developmental Dynamics*. 214: 171-177.
- Western, P.S.; J. L. Harry; J. A. Marshal-Graves y A. H. Sinclair (2000). "Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator: Expression of *SFI*, *WT1* and *DAX1* During Gonadogenesis", *Gene* 241: 223-232.
- Witschi, E. (1959). "Age of Sex Determining Mechanisms in Vertebrates", *Science* 130: 372-375.
- Zanaria, E.; F. Muscatelli; B. Bardoni; T. M. Strom; S. Guioi; W. Guo; E. Lalli; C. Moser; A. P. Walker; E. R. B. McCabe; T. Meitlinger; A. P. Monaco; P. Sassone-Corsi y G. Camerino (1994). "An Unusual Member of the Nuclear Hormone Receptor Superfamily Responsible for the X-linked Adrenal Hypoplasia Congenital", *Nature*. 372: 635-641.

