



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE *Sxl* (*Sex-lethal*) EN CAMARÓN
BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*
(Boone, 1931).

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a

Itzia López Cuadros

La Paz, Baja California Sur, Febrero 2014.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 21 del Mes de Febrero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Caracterización y localización de la expresión de *Sxl (Sex-lethal)* en camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)."

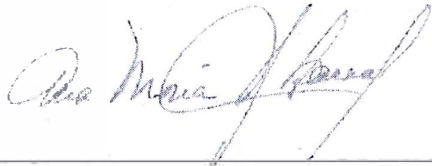
Presentada por el alumno:

Itzia López Cuadros

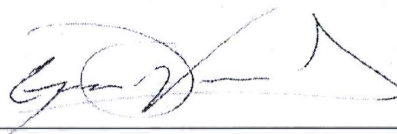
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

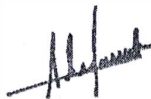
LA COMISION REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphries
DIRECTOR DE TESIS



Dra. G. Fabiola Arcos Ortega
CO-TUTOR



Dra. S. Alejandra García Gasca
CO-TUTOR



DRA. ELITA SPINIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:

Dra. Ana María Ibarra Humphries (CIBNOR, S.C.)

Co-tutoras:

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega (CIBNOR, S.C.)

Dra. Silvia Alejandra García Gasca (CIAD - Mazatlán)

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Ana María Ibarra Humphries (CIBNOR, S.C.)

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega (CIBNOR, S.C.)

Dra. Silvia Alejandra García Gasca (CIAD - Mazatlán)

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Gracia Gómez Anduro

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov (suplente)

RESUMEN

La producción del camarón blanco por acuicultura ha tenido gran importancia en los últimos años tanto a nivel mundial como nacional. Este crecimiento se debe a la intensificación del esfuerzo de cultivo así como de investigación para la mejora del mismo, sin embargo aún existen procesos de gran importancia que han sido poco explorados, por ejemplo el de la diferenciación sexual. Estudios recientes han mostrado que dicho proceso no es regulado por factores ambientales y sugieren que éste consiste en un sistema génico estable. En este sentido algunos estudios en peneidos han reportado el mapeo de marcadores moleculares asociados a un grupo de ligamiento específico de hembra. Por otro lado, se ha observado que en los diversos sistemas de determinación sexual los genes que activan la ruta de diferenciación sexual pueden ser *Sex-lethal* (*Sxl*) o *complementary sex determiner* (*csd*) entre otros; sin embargo, existe una ruta en común compuesta por los genes cascada abajo: *transformer* (*tra*) y su gen blanco *doublesex* (*dsx*). El gen *Sxl* ha sido ampliamente estudiado en la especie modelo *Drosophila melanogaster*, donde la dosis cromosómica y proteínas regulatorias actúan en conjunto para su activación. Este funciona como controlador de la feminización durante el desarrollo embrionario mediante mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales a través de expresión sexo-específica de variantes resultantes de splicing alternativo. Recientemente en librerías EST se han obtenido secuencias parciales de *Sxl* en *Penaeus monodon* y *Litopenaeus vannamei* y transcritos completos de *Tra-2* en *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, así como variantes completas de *Sxl* en *Macrobrachium nipponense*, lo que indirectamente sugiere que la determinación sexual en estas especies puede estar influenciada por la ruta génica *Sxl-tra-dsx*. Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo fue generar conocimiento básico del proceso genético de determinación y diferenciación sexual camarón blanco *L. vannamei*, mediante análisis de expresión espacio temporal del gen *Sxl* en el desarrollo embrionario y desarrollo gametogénico de ambos sexos. Así, mediante la técnica de RACE se aislaron y caracterizaron transcritos de *Sxl* a partir de embriones, gónada femenina y masculina de adultos de *L. vannamei*, los cuales presentan alta similitud nucleotídica 74% y proteica 88% con secuencias *Sxl* de otros invertebrados, particularmente con *M. nipponense* y *Daphnia pulex*. El análisis *in silico* de los transcritos obtenidos mostraron secuencias conservadas en la región 5' y patrones de splicing y variación hacia la región 3', así como diferentes sitios de poliadenilación (Poly A). La traducción conceptual de los transcritos aislados, reveló que todos estos presentan marco de lectura abierto en el mismo sitio (612) y que al igual que en *Drosophila*, dan lugar a variantes sexo-específicas: hembra-específico temprano (embriones), hembra-específico tardío (embriones y hembra), y macho-específico tardío (machos), las cuales contienen dominios de reconocimiento de ARN (RRM) característicos y conservados en variantes *Sxl* de otros artrópodos. Adicionalmente, pruebas realizadas por hibridación *in situ* en gónada masculina y femenina de sub-adultos y adultos, mostraron expresión génica en gametos de ambos sexos, así como durante el desarrollo embrionario de camarón blanco, tanto en el soma como en la línea germinal, presentando mayor nivel de expresión en la línea germinal.

Los análisis de ubicuidad mostraron expresión de *Sxl* en gónada, hepatopáncreas y glándula neuroendocrina. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la posible función de *Sxl* en la determinación y diferenciación sexual de la especie.

Palabras clave: *L. vannamei*, *Sex-lethal (Sxl)*, splicing alternativo.

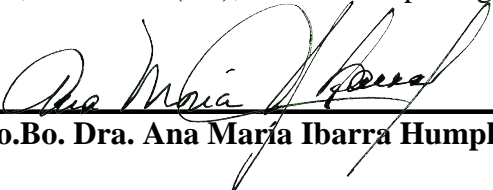


Vo.Bo. Dra. Ana María Ibarra Humphries

ABSTRACT

The aquaculture production of white shrimp has been worldwide and nationally very important in recent years. Its growth is due to the increased research effort and the development of new techniques for achieving sustainable and effective shrimp culture system, however there are still many processes that have not been wide explored, such as the sex determination/differentiation. Recent studies have shown that this process is not regulated by environmental factors and suggest that it consist on a gene-stable system. In this sense, some studies have reported penaeid mapping of molecular markers associated with a female specific linkage group. Furthermore, it has been observed that in the various sex determination systems are different genes that activate the differentiation pathway as *Sex-lethal (Sxl)* or *complementary sex determiner (csd)* or other genes, but paths of downstream genes are common and composed of *transformer (tra)* gene and its target gene *doublesex (dsx)*. *Sxl* has been widely studied in the model species *Drosophila melanogaster* where chromosomal dosage and regulatory proteins act together to activate *Sxl*. This master gene switches on the feminization during embryonic development through transcriptional and post-transcriptional mechanisms by sex-specific expression of alternative splicing variants. Recently in EST libraries partial sequences of *Sxl* were obtained in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* and complete transcripts of *Tra-2* in *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, as well as complete *Sxl* variants in *Macrobrachium nipponense*, this fact indirectly suggests that sex differentiation in these species may be influenced by *Sxl-tra-dsx* gene pathway, however it is unknown whether these variants are sex-specific. Therefore the main goal of this work was to generate basic knowledge of sexual differentiation and determination genetic process of white shrimp *L. vannamei*, by analyzing the spatiotemporal expression of *Sxl* during embryo and gametogenic development in both sexes. Thus, the RACE methodology was used to isolated and characterize *Sxl* transcripts from *L. vannamei* embryos, male, and female adult gonads, which showed high nucleotide 74% and protein 88% homology with *Sxl* from other invertebrates, particularly with *M. nipponense* and *Daphnia pulex*. *In silico* analysis showed conserved sequences in the 5' ends and variation of splicing patterns in the 3' ends, with different polyadenylation (Poly A) sites. The conceptual translation of the isolated transcripts revealed open reading frame (ORF) at the same position (612) as observed in *Drosophila*. The 3'end variation produces sex-specific variants with different stop codon signals: early female-specific (embryo), late female-specific (embryo and female), and late male-specific (male), which contain conserved RNA recognition motifs (RRM) characteristic of *Sxl* sequences. In addition, *in situ* hybridization in male and female gonad (sub-adult and adult), showed gene expression in gametes of both sexes, as well as during embryo development of white shrimp in both the soma and germ line, showing higher expression levels in the germline. The ubiquitous analysis showed *Sxl* expression in gonad, hepatopancreas, and neuroendocrine gland. The results obtained in this study suggest the potential role of *Sxl* in sex determination and differentiation of *L. vannamei*.

Key words: *L. vannamei*, *Sex-lethal (Sxl)*, alternative splicing


 Vo.Bo. Dra. Ana Maria Ibarra Humphries

Dedico este trabajo,
con todo mi corazón y esfuerzo,
a mis dos amores

Mi hijo

Rodolfo

Tu mirada, tu sonrisa, cariños y todo lo que eres,
hacen que todo esfuerzo, desvelo y cansancio valgan la pena.

Mi esposo

Armando

Por todo el apoyo, porras, ánimo y palabras de aliento
que me impulsan a superarme y salir adelante día con día.

LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada con número de registro 414013; así como la Beca Mixta de Movilidad Nacional.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), particularmente a todo el personal de la Dirección de Estudios de Posgrado por permitir el desarrollo y culminación de este trabajo, así como las facilidades y apoyo otorgado para la realización de la estancia de investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana María Ibarra H., por su confianza y haberme brindado la oportunidad de ser su estudiante y con ello permitirme aprender mucho de ella tanto a nivel profesional como personal, por todo su apoyo, ayuda, comprensión, paciencia, por qué en las buenas y en las malas, siempre ha estado al pie del cañón. Te admiro y respeto profundamente, muchas gracias por tu amistad y por ser una mujer invaluable en todos los sentidos. Con todo mi corazón gracias.

A la Dra. S. Alejandra García G., por haberme dado la oportunidad de realizar la estancia de investigación en el Laboratorio de Biología Molecular del CIAD (Unidad Mazatlán), por todo su apoyo, consejos, ayuda y contribuciones que me dieron un eje, por su confianza y amistad.

A la Dra. Fabiola Arcos O., por su apoyo con la aportación de muestras y su ayuda durante los muestreos realizados, por compartirme su conocimiento, por sus observaciones y comentarios durante el desarrollo y escrito de esta tesis.

Al Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola, especialmente agradezco a la M. en C. Susana Ávila, quien siempre estuvo al pendiente de que el material y reactivos estuvieran a tiempo para el desarrollo de este trabajo, y al M. en C. José Luis Ramírez, quien apoyó con muestreos, biometrías y cuidado de camaroncitos; así como al Dr. Pedro Cruz y Ricardo Pérez, por sus comentarios y aportaciones. A todos los

integrantes del laboratorio quienes con comentarios, consejos, llamadas de atención, pláticas, chistes, etc. alivianaron las horas pesadas de trabajo.

Al Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR: M en C. Carmen Rodríguez J. y a la Técnico Eulalia Meza, por todo su apoyo y consejos en el procesamiento histológico de las muestras.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular del CIAD (U. Mazatlán), por todo el apoyo, consejos préstamo de equipos y espacio para la realización de la estancia de investigación. Gracias por su compañerismo y amistad.

A los tíos Gustavo e Irma Cervantes Bernal e hijos, quienes me recibieron en su casa con los brazos abiertos durante mi estancia en Mazatlán, nunca olvidaré su calidez y siempre llevaré presente las anécdotas vividas durante ese tiempo, Tavo, Irma, Adi, Adri y Lupis, sus pláticas, ocurrencias e hijitos alivianaron el tiempo y el vivir lejos de mis dos amores.

A la familia Medina Espinoza, Bertha y Armando gracias por todo su apoyo en las buenas y en las malas (especialmente en las épocas de crisis), por recibirme con cariño y respeto como una hija más. Gracias a mis cuñis y sus familias que de lejos se que siempre nos mandan porras.

Eterno e infinito agradecimiento a mi familia, mis padres: Esther y Rodolfo, y a mis hermanas: Liz y Yuri. Con nada en el mundo podré agradecer todo lo que ustedes me han dado; de lejos, de cerca, desde el cielo siempre me han apoyado, gracias por ser mis ángeles en este mundo, y por que pese lo que pese, siempre estaremos juntos. Gracias por que siempre han confiado en mí y me impulsan a seguir adelante. Los admiro y amo.

Finalmente y muy importante, gracias a mi hijo Rodolfo y a mi esposo Armando quienes con amor, paciencia, esfuerzo y muchas pero muchas cosas más, han sido pieza fundamental para mi desarrollo en todos los sentidos, gracias por todo, los amo.

CONTENIDO

		Página
	Resumen	i
	Abstract	iii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimientos	v
	Contenido	vii
	Lista de Figuras	ix
	Lista de Tablas	xiii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
3.	JUSTIFICACIÓN	12
4.	OBJETIVOS...	13
5.	HIPÓTESIS	13
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1.	Material biológico.....	14
6.2.	Aislamiento y caracterización de los transcritos del gen <i>Sxl</i> en camarón blanco.....	15
6.2.1.	Obtención parcial del transcrito del gen <i>Sxl</i> en camarón blanco.....	15
6.2.2.	Obtención del transcrito completo de <i>Sxl</i> de camarón blanco por RACE.....	18
6.2.3.	Análisis bioinformático de transcritos <i>Sxl</i> obtenidos de camarón blanco.....	20
6.3.	Localización de la expresión de <i>Sxl</i> por hibridación <i>in situ</i>	22
6.4.	Análisis de ubicuidad de la Expresión de <i>Sxl</i>	25
7.	RESULTADOS	26
7.1.	Aislamiento y caracterización de los transcritos del gen <i>Sxl</i> en camarón blanco.....	26
7.1.1.	Obtención parcial del transcrito del gen <i>Sxl</i> en camarón blanco.....	26
7.1.2.	Obtención del transcrito completo del gen <i>Sxl</i> de camarón blanco por RACE.....	28

7.1.3.	Caracterización bioinformática y molecular de transcritos <i>Sxl</i> obtenidos de camarón blanco.....	29
7.2.	Localización de la expresión de <i>Sxl</i> por hibridación <i>in situ</i>	38
7.2.1.	Localización de la expresión de <i>Sxl</i> por hibridación <i>in situ</i> en embriones.....	38
7.2.2.	Localización de la expresión de <i>Sxl</i> por hibridación <i>in situ</i> en gónada femenina y masculina.....	39
7.3	Análisis de ubicuidad de la expresión de <i>Sxl</i>	46
8.	DISCUSIÓN	47
8.1	Aislamiento y caracterización de los transcritos del gen <i>Sxl</i> en camarón blanco.....	48
8.1.1	<i>Sxl</i> en otros invertebrados.....	52
8.2.	Localización de células de expresión <i>Sxl</i>	54
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
10.	LITERATURA CITADA	63
11.	ANEXOS	77

Lista de figuras

Figura	Página
1. Determinación sexual en especies de insectos modelo, con sus relaciones filogenéticas representadas ~300 millones de años de evolución. Las especies presentadas comparten una ruta en común (en gris) compuesto por el gen <i>transformer</i> (<i>tra</i>) y su gen objetivo cascada abajo <i>doublesex</i> (<i>dsx</i>).....	4
2. Esquema de splicing sexo específico temprano y tardío de <i>Sxl</i> . La proteína <i>Sxl</i> temprana se une junto al exón 3, bloqueando el sitio de splicing, esto causa la omisión del exón 3 en hembras. La proteína funcional tardía <i>Sxl</i> se retroalimenta y se produce otra proteína <i>Sxl</i> tardía a través del desarrollo femenino.....	6
3. Expresión de <i>Sex-lethal</i> en diferentes etapas del desarrollo en hembras.....	7
4. Cascada de genes que se desencadena por la actividad de <i>Sxl</i> en la diferenciación sexual en <i>D. melanogaster</i>	8
5. Posición de oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización del gen <i>Sxl</i> de <i>L. vannamei</i> por PCR y RACE.....	19
6. Posición de oligonucleótidos diseñados para análisis de hibridación in situ y de ubicuidad (ubicuidad y “exón alternativo”) a partir del aislamiento y caracterización de <i>Sxl</i> , de embriones, gónada femenina y masculina de <i>L. vannamei</i> , usando como modelo la secuencia más larga obtenida en donde se presentan los dos potenciales sitios de splicing.....	22
7. Alineamiento de las secuencias <i>Sxl</i> previamente existentes y secuencias parciales aisladas en este trabajo a partir de gónada femenina y masculina de camarón blanco.....	27

8. Alineamiento de secuencias *Sxl* de *L. vannamei* previamente existentes y aisladas en este trabajo a partir de embrión, gónada femenina y masculina con diferente patrón de splicing..... 32
9. Alineamiento de traducción conceptual de secuencias SXL de *L. vannamei* previamente existentes y aisladas en este trabajo a partir de gónada femenina y masculina..... 33
10. Esquema de variantes nucleotídicas y protéicas de *Sxl* aisladas en *L. vannamei*, con regiones no codificantes (UTRs) en dirección 5' y 3', indicando señal de inicio de la traducción, codón de paro de traducción, sitios posibles de splice y las diferentes RRM..... 34
- 11a. Traducción y alineamiento de secuencias de variantes de *Sxl* de *Daphnia pulex* (EFX75394.1 y EFX75395.1) para las cuales la posición de los intrones es conocida. En cuadro azul el exón 1, verde: exón 2, gris: exón 3, naranja: exón 4 y morado: exón 5; en rojo una secuencia codificante en *Sxl* de *L. vannamei* que en *D. pulex* corresponde a un intrón. En barras azul y naranja se muestran las diferentes RRM características de *Sxl*..... 35
- 11b. Traducción y alineamiento de secuencias de variantes de *Sxl* de *L. vannamei* previamente existentes (284aa_SRA, 267aa_SRA, 260aa_SRA y 243aa_SRA) y aisladas en este trabajo a partir de gónada femenina y masculina. En cuadro azul el exón 1, verde: exón 2, gris: exón 3, naranja: exón 4 y morado: exón 5; en rojo una secuencia codificante en *Sxl* de *L. vannamei* que en *D. pulex* corresponde a un intrón..... 36
12. Expresión de ARNm *Sxl* durante el desarrollo embrionario de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ*. A-D: embriones de 4 células (50 mpd), E y F: embriones de 32 células (mórula, 120 mpd)..... 39
13. Expresión de ARNm *Sxl* durante el desarrollo embrionario de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ* A y B: gastrulación temprana

formación del blastoporo e invaginación celular al blastocele, C y D: gastrulación tardía, primera división del mesendodermo, E y F: gastrulación tardía, sección posterior mostrando más células derivadas del mesendodermo.....	40
14. Expresión de ARNm <i>Sxl</i> durante la pre-vitelogénesis del desarrollo gonádico femenino de <i>L.vannamei</i> observado mediante hibridación <i>in situ</i> y tinción con hematoxilina-eosina.....	42
15. Expresión de ARNm <i>Sxl</i> durante el desarrollo gonádico femenino de <i>L.vannamei</i> observado mediante hibridación <i>in situ</i> y tinción con hematoxilina-eosina. A: vitelogénesis primaria (Vit I) glóbulo de aceite I; B: Vit I glóbulo de aceite II, C: Vit I sin vitelo, D: vitelogénesis secundaria gránulos de vitelo.....	43
16. Expresión de ARNm <i>Sxl</i> en vitelogénesis secundaria y pre-maduración de hembras <i>L.vannamei</i> observado mediante hibridación <i>in situ</i> y tinción con hematoxilina-eosina. A: acercamiento al núcleo de ovocito en vitelogénesis secundaria con gránulos de vitelo y B: acercamiento al límite entre ovocitos en vitelogénesis secundaria con gránulos de vitelo, C: ovocitos en pre-maduración, y D: acercamiento de límite entre ovocitos en pre-maduración.....	44
17. Expresión de ARNm <i>Sxl</i> en machos subadulto y adulto de <i>L.vannamei</i> observado mediante hibridación <i>in situ</i> y hematoxilina-eosina. A: espermátidas tempranas en gónada de macho subadulto, B: túbulos seminíferos de macho adulto, C: acercamiento a espermátidas de B.....	45
18. Amplificación en punto final con oligonucleótidos a) qPCR- <i>Sxl</i> y b) EA3- <i>Sxl</i> , en gónada, glándula neuroendocrina y hepatopáncreas de ambos sexos de <i>L. vannamei</i>	46

19. Expresión de *Fc-vsα-like* RNAm durante el desarrollo embrionario de *F. chinensis*, mostrando señal positiva y uniforme en huevo fertilizado (A), embrión de 2, 4 y 32 células (B, C y D respectivamente); y mayor señal de hibridación en región germinal en gástrula temprana (F) y tardía (G)..... 55
20. Esquemas gastrulación avanzada y desarrollo de derivados del mesendodermo. A) corte medio de células del mesendodermo (ME) mostrando cromosomas condensados; B) embrión con cuatro derivados ME; C) embrión durante la segunda división del ME; D) corte mostrando cuatro células ME dorsales; E) corte mostrando otras dos células ME, el mesoteloblasto primordial; F) corte mostrando otras dos células derivadas del ME, la presunta célula germinal primordial hermana del mesoteloblasto primordial en E; y G) corte de otro embrión en estadio ligeramente más avanzado, mostrando la presunta célula germinal primordial (G) con núcleo grande característico..... 57
21. Embriones de *L.vannamei* 32 células: A) Expresión de ARNm *Sxl* de este trabajo y B) embrión de 23 células mostrando la presencia del ICB teñido con Sytox Green..... 59

Lista de Tablas

Tabla	Página
I Porcentaje de similitud del fragmento aislado a partir de gónada femenina de hembra adulta de <i>L. vannamei</i> con secuencias de GenBank (Blastx).....	11
II Secuencia de oligonucleótidos diseñados para aislamiento y caracterización del gen <i>Sxl</i> expresado en <i>L. vannamei</i>	16
III Secuencia de oligonucleótidos para aislamiento y caracterización hacia región 5´del gen <i>Sxl</i> expresado en gónada y 3´de embriones de <i>L. vannamei</i>	19
IV Secuencia de oligonucleótidos para análisis de expresión por ISH y qPCR de los transcritos del gen <i>Sxl</i> en <i>L. vannamei</i>	21
V Tamaño de fragmentos obtenidos hacia 3´y 5´ a partir de gónada femenina, masculina y durante el desarrollo embrionario de camarón blanco.....	29
VI Porcentaje de similitud mediante BLASTx de secuencias <i>Sxl</i> de <i>L. vannamei</i> con otros invertebrados.....	30

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la comunidad mundial se enfrenta a múltiples retos relacionados con la alimentación y nutrición de una población creciente con recursos naturales finitos. En este sentido, la producción acuícola mundial alcanzó un nivel máximo sin precedentes en el 2010 con un valor estimado de 119 000 millones de dólares, por lo que la acuicultura ha sido y seguirá siendo uno de los sectores de producción de alimentos de origen animal de más rápido crecimiento (FAO, 2010). Particularmente, la producción de camarón a nivel mundial supera el millón de toneladas, las estadísticas de la FAO (2010) indican que el total de la producción de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* incrementó de aproximadamente 190, 000 tn. (2000) a 2, 300, 000 tn (2007). En México el cultivo de *L. vannamei* también ha tenido un crecimiento importante en los últimos 10 años, en donde de la producción global de camarón blanco durante el 2010, el 62.63% fue aportado por la acuicultura (CONAPESCA, 2010).

Dada la importancia del cultivo del camarón blanco en la producción mundial y nacional, es de gran interés desarrollar tecnologías para mejorar el cultivo. En este sentido, actualmente existe un aumento importante en la investigación de la especie (alimentación, sistemas de cultivo, enfermedades, etc.) que ha permitido mejorar los procesos de cultivo, e incrementar la producción. Sin embargo aún existen procesos que han sido poco estudiados, entre los que se encuentran los procesos de determinación y diferenciación sexual.

L. vannamei es una especie gonocórica que presenta marcado dimorfismo sexual, ya que además de presentar estructuras sexuales externas diferentes, petasma en machos y tético en hembras, las hembras tienen mayor tasa de crecimiento en peso y talla a partir de los 10 g de peso, siendo significativo a los 17 g (Chow y Sandifer, 1991; Pérez-Rostro *et al.*, 1999). Dada esta mayor tasa de crecimiento en las hembras y la mejora productiva esperada si el cultivo se basara en ‘solo hembras’, es necesario conocer los procesos de determinación y diferenciación sexual en la especie.

Se sabe que en algunos crustáceos marinos la determinación sexual está controlada por factores ambientales como temperatura (copépodos), densidad y ayuno (cladóceros), o fotoperiodo (anfípodos) (Legrand *et al.*, 1987, Korpelainen, 1990). Sin embargo, en *L. vannamei* no es influenciada por factores ambientales (Campos-Ramos *et al.*, 2006) y aparentemente consiste en un sistema genético estable de determinación sexual.

Lo anterior, es apoyado por algunos estudios en peneidos que han reportado el mapeo de marcadores moleculares asociados al sexo a un grupo de ligamiento específico de la hembra, sugiriendo que el sexo en *Penaeus japonicus* (Li *et al.*, 2003) y *L. vannamei* (Zhang *et al.*, 2006) es determinado por un sistema de cromosomas WZ/ZZ en donde el sexo femenino es heterogamético (ZW) mientras que el sexo masculino es homogamético (ZZ) (Bull, 1983).

Estudios posteriores mediante mapas de ligamiento con base en AFLP's indicaron que *P. monodon* también presenta este sistema de determinación sexual (Staelens *et al.*, 2008), y recientemente se logró obtener un locus específico de hembra (ausente en macho), en el mismo grupo de ligamiento (LG 26) de *P. monodon* (You *et al.*, 2010), lo cual apoya la presencia del sistema ZW en esa especie.

Dado lo anterior cabe la posibilidad de que *L. vannamei* también presente un sistema de determinación sexual ZW/ZZ. Esto es de gran importancia ya que se conoce poco sobre el sistema génico de diferenciación sexual desencadenado por el sistema ZW/ZZ.

Así, el conocimiento generado de los procesos de determinación y diferenciación sexual, potencialmente permitirá la aplicación de tecnologías enfocadas al incremento productivo a través de cultivos “monosexo” .

2. ANTECEDENTES

Sistemas cromosómicos de determinación sexual

Los mecanismos de determinación sexual pueden variar ampliamente entre especies filogenética y estrechamente relacionadas. Por ejemplo de los invertebrados, los insectos corresponden al grupo taxonómico más estudiado en cuanto a sistemas de determinación y diferenciación sexual, en los que se ha observado una diversidad desconcertante de mecanismos (Gempe y Beye, 2011). Por ejemplo, en insectos los sistemas de determinación sexual descritos incluyen: (1) dosis de cromosomas X, donde dos cromosomas X determinan feminización y un cromosoma X masculinización (Erickson y Quintero, 2007); (2) presencia de cromosoma Y que determina para machos: XX son hembras y XY son machos (Dubendorfer *et al.*, 2002); (3) presencia de cromosoma W que determina feminización: ZW son hembras y ZZ machos; (4) en sistemas XY el número de cromosomas Y puede variar sustancialmente (Marin y Baker, 1998); (5) en otras especies las hembras son XX/XX y los machos son XX/Y (Sánchez, 2008); y (6) otras especies emplean determinadores de sexo sin diferencias visibles en los cromosomas (Kraemer y Shmidt, 1993).

Sistemas génicos de diferenciación sexual

Esta variedad de sistemas de determinación sexual también ha dado lugar a una gran variedad de sistemas génicos de diferenciación sexual, así por ejemplo, en *Apis mellifera* el nivel de ploidía activa a genes como *complementary sex determiner (csd)*, *feminizer (fem)* y *doublesex (dsx)*, mientras que en especies que presentan determinación sexual por la presencia o ausencia del cromosoma Y, se desconocen los genes que inician la cascada de genes involucrados en la diferenciación sexual, sin embargo se tiene registro de genes cascada abajo como son *transformer (tra)* y *dsx*. Por otro lado en sistemas de determinación sexual por dosis cromosómica X como *D. melanogaster*, el gen que activa el proceso de diferenciación sexual se conoce como *Sex-lethal (Sxl)*, el cual regula a su vez a los genes cascada abajo antes mencionados:

tra y *dsx* (Gempe y Beye, 2011) (Fig. 1). En el lepidóptero *Bombyx mori* (gusano de la seda), que presenta sistema ZW, se ha descrito *dsx* y, se ha aislado y caracterizado *Sxl* (Niimi *et al.*, 2006), sin embargo, se desconocen dos aspectos importantes: 1) si éste es el controlador de la cascada de genes y a su vez de *dsx*, y 2) se desconoce el sistema de genes del proceso de diferenciación sexual en este taxón.

En todos los casos anteriores se ha observado que la activación de los genes cascada arriba dan lugar a una variante del gen *doublesex* (*dsx*) sexo específico de hembras, mientras que cuando estos genes cascada arriba no son activados se transcribe directamente la variante del gen *dsx* sexo específico de machos (Fig. 1).

La actuación conjunta de los genes involucrados en el proceso de diferenciación sexual da lugar a la formación de un individuo macho o hembra completamente funcionales.

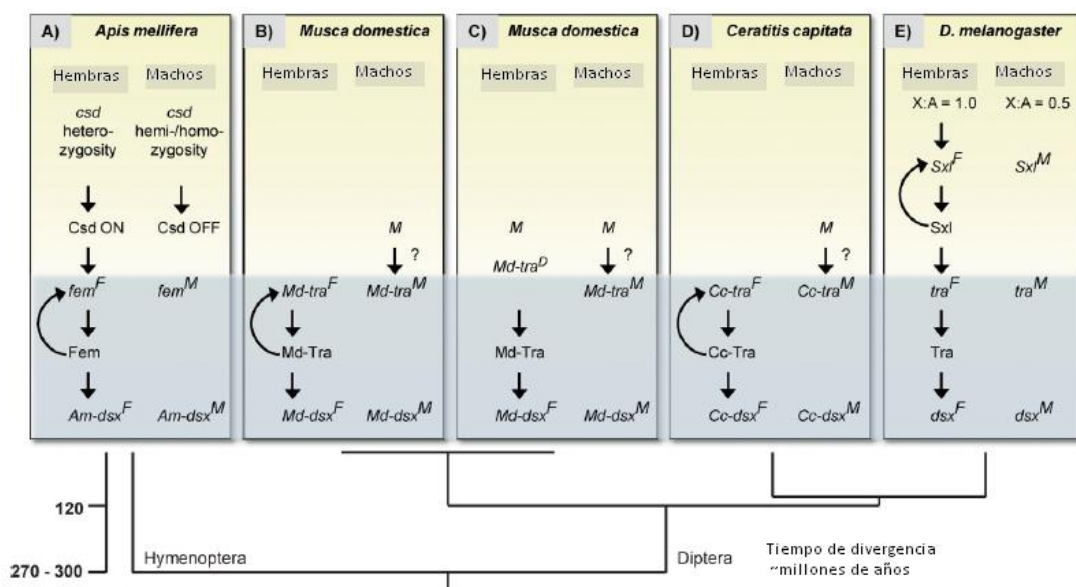


Figura 1. Determinación sexual en especies de insectos modelo, con sus relaciones filogenéticas representadas ~300 millones de años de evolución. Las especies presentadas comparten una ruta en común (en gris) compuesto por el gen *transformer* (*tra*) y su gen objetivo cascada abajo *doublesex* (*dsx*). Tomado y modificado de Gempe y Beye (2011).

Sex-lethal (Sxl) en Drosophila melanogaster.

El gen *Sex-lethal (Sxl)* ha sido extensamente estudiado en *D. melanogaster*. En esta especie, las células diploides con un cromosoma X (XY) son machos y aquellas con dos cromosomas X (XX) son hembras. Así el número de cromosomas X y proteínas regulatorias actúan en conjunto para activar el gen *Sex-lethal* (en adelante: *Sxl*), el cual funciona como controlador de la feminización durante el desarrollo embrionario (Cline 1984).

La actividad de *Sxl* es controlada por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales que adaptan su función a escenarios específicos de desarrollo, mediante expresión sexo-específica de variantes resultantes de splicing alternativo (Cline *et al.*, 2010). Es decir, en animales XX, *Sxl* está encendido y su expresión dirige todos los aspectos del desarrollo femenino. Además, la expresión de *Sxl* previene la activación del sistema de compensación de dosis específica en hembras, por lo que en animales XY, donde *Sxl* permanece apagado se activa la compensación de dosis dando lugar a la masculinización (Salz y Erickson, 2010).

En *Drosophila* el gen *Sxl* codifica diferentes productos de transcripción, que pueden ser divididos en tres grupos: tardío específico de hembras, tardío específico de machos, y temprano específico de hembras (Fig. 2). Los RNA mensajeros tardíos de macho y hembra se expresan por el promotor de “mantenimiento” (*SxlPm*), a partir de células blastodérmicas y hasta etapa adulta. Aunque ambos tienen la misma terminación 5' (exón L1), estos son resultado de splicing alternativo que producen diferentes potenciales de codificación. Así en machos todos los transcritos incluyen el tercer exón, el cual contiene un codón de paro de la traducción y por ende codifica proteínas truncadas e inactivas. En hembras, el splicing alternativo omite el exón 3 y genera mRNA que codifica proteínas funcionales (Salz y Erickson, 2010).

Por otro lado, el mRNA temprano específico de hembras se expresa transitoriamente en el blastodermo sincicial (estado del desarrollo embrionario en el que no existen membranas celulares entre los núcleos multiplicados) a partir de un segundo promotor:

promotor de “establecimiento” (*SxlPe*), el cual es específico de hembras. Estos RNA’s también difieren entre sí en la terminación 3’ y tienen en común el exón E1 en 5’ que se une directamente al exón 4 omitiendo los exones 2 y 3 (Fig. 3). Entonces el mRNA temprano codifica las mismas proteínas que los productos del específico de hembra tardío, aparte de una diferencia de 25 aminoácidos en su extremo amino o N terminal (Salz y Erickson, 2010).

La actividad de *Sxl* y sus proteínas de unión al RNA SXL específicas de hembras dirigen el desarrollo de estructura y comportamiento sexo específico mediante la modulación de la expresión en cascada de un conjunto de genes (Fig. 4). Así las proteínas SXL activan a *tra*, que regula la mayoría de los caracteres y comportamientos de dimorfismo sexual; SXL reprime la actividad de *male-specific-lethal-2 (msl-2)*, un componente clave en el complejo de compensación de dosis macho-específico (Salz y Erickson, 2010).

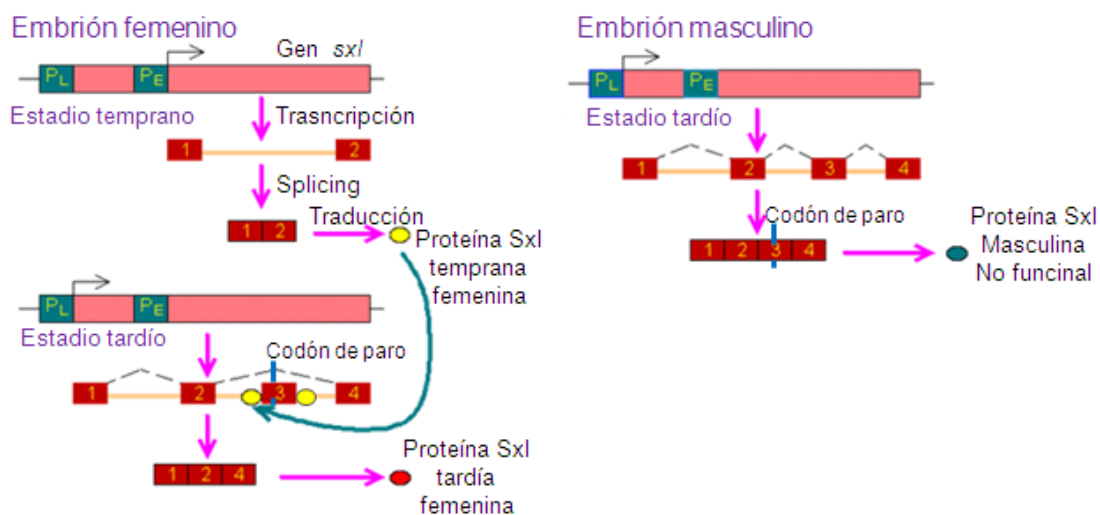


Figura 2. Esquema de splicing sexo específico temprano y tardío de *Sxl*. La proteína *Sxl* temprana se une junto al exón 3, entonces bloquea el sitio de splicing, esto causa la omisión del exón 3 en hembras. La proteína funcional tardía *Sxl* se retroalimenta y se produce otra proteína *Sxl* tardía a través del desarrollo femenino. Modificado de Lodish *et al.* (2002).

La expresión de proteínas TRA (en conjunto con Tra-2) que se unen a RNA específico de hembras, controla el splicing de los genes *doublesex* (*dsx*) y *fruitless* (*fru*) para producir factores de transcripción sexo específicos que controlan la mayoría de los aspectos de diferenciación sexual y comportamiento. A pesar de la ubicuidad de la expresión de proteínas SXL, la ejecución del programa *dsx/fru* está restringida a cierto tipo de células (ej. células somáticas) (Salz, 2011).

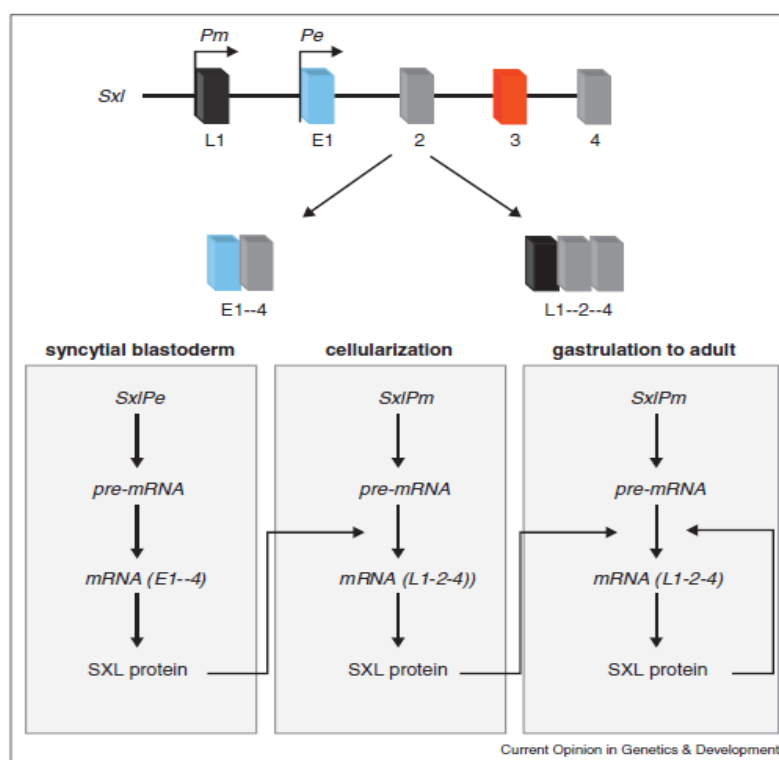


Figura 3. Expresión de *Sex-lethal* en diferentes etapas del desarrollo en hembras. Tomado de Salz (2011).

Lo descrito anteriormente describe la diferenciación sexual de células somáticas, sin embargo, la diferenciación sexual de células primordiales de la línea germinal, además de estar determinada por su constitución cromosómica, parece estar influenciada por la interacción de células germinales y somáticas (Van Doren, 2011). Sin embargo, Hashiyama *et al.* (2011), mostraron evidencia de que: 1) *Sxl* inicia el destino sexual de la línea germinal durante el desarrollo sexual temprano; 2) las células germinales tienen identidad sexual antes de ser influenciadas por señales sexo específicas de la gónada

somática durante el desarrollo embrionario, algo recientemente descubierto al determinar que *Sxl* se expresa transitoriamente en las células germinales durante su migración a las gónadas; y finalmente 3) la sub-actividad de este gen (mediante RNA de interferencia) condujo a la formación de hembras adultas agaméticas y con tumores y, por lo tanto *Sxl* tiene alguna función en gónada y en la gametogénesis.

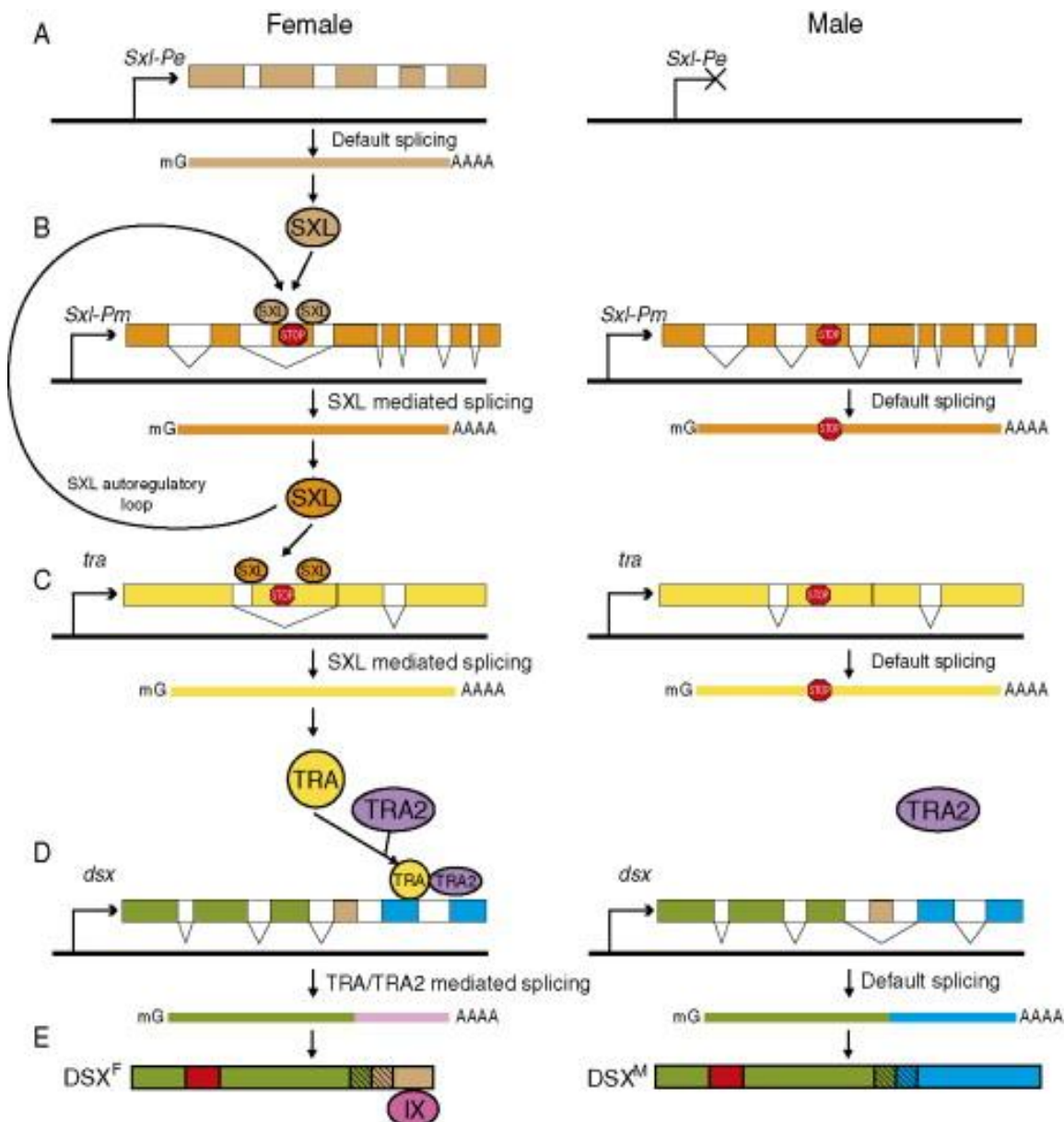


Figura 4. Cascada de genes que se desencadena por la actividad de *Sxl* en la diferenciación sexual de *D. melanogaster*. Tomado de Camara *et al.* (2008).

Genes de diferenciación sexual en decápodos.

El primer reporte de un gen involucrado en las cascadas de determinación sexual en crustáceos corresponde a secuencias parciales de *Sxl* encontradas en librerías EST obtenidas a partir de hemocitos de *P. monodon* (Tassanakajon *et al.*, 2006) y *M. japonicus* (T. Aoki, datos no publicados). Posteriormente, se publicó el aislamiento por RACE-PCR de *Tra-2* en el decápodo *P. monodon*, donde se observó que éste presenta mayor nivel de expresión en ovarios que en testículos, y la expresión es mayor en gónada que en otros tejidos como branquias, corazón, hemocitos, órganos linfáticos intestino y estómago; esto indirectamente sugiere que la determinación sexual en estas especies puede estar influenciada por la ruta génica *Sxl-tra-dsx* (Leelatanawit *et al.*, 2009)

Li *et al.* (2012a) aislaron y caracterizaron secuencias correspondientes a *Tra-2* en *F. chinensis* (*FcTra-2*); este consiste de siete exones y seis intrones, además de la presencia de tres transcritos variantes (*FcTra-2* a, b y c) resultado de splicing alternativo. *FcTra-2* incluye una región de reconocimiento de ARN (RRM) y regiones ricas en Arginina/Serina, similar a lo observado en otras especies. La isoforma *FcTra-2c* mostró mayor expresión en ovario que en otros tejidos. En estadios de desarrollo temprano, se detectó incremento repentino de niveles de expresión en estadio de mysis, mientras que en juveniles, éste mostró mayor nivel de expresión significativo en hembras que en machos. Estos resultados indican que *FcTra-2* pudiera estar involucrado en la determinación sexual femenina en *F. chinensis* (Li *et al.*, 2012a).

Recientemente se publicó el análisis del transcriptoma de *M. nipponense* a partir de pedúnculo ocular, branquia, corazón, ovario, testículo, hepatopáreas, músculo y embriones en estadios de división celular, gástrula y larvas nauplio y zoea, donde por primera vez, se identificaron genes involucrados en la determinación sexual como: DMRT1, FTZ-F1, FOXL2, FEM1, entre otros genes candidatos de potencial interés (Ma *et al.*, 2012). Particularmente en glándula androgénica genes homólogos a: *sex lethal* (*Sxl*), *transformer2* (*tra2*) y factor específico de glándula androgénica tipo-insulina (IAG) y proteínas Chromobox (Jin *et al.*, 2013).

Se cree que la función del IAG es similar a la hormona AG (glándula androgénica) de isópodos, la primera en ser descrita estructuralmente, pertenece a la superfamilia proteica de la insulina, es considerada como factor clave de la determinación sexual masculina. IAG ha sido aislado y estudiado en otros crustáceos decápodos como *L. vannamei* (Garza-Torres, 2011), *P. monodon* (Mareddy *et al.*, 2011), *M. rosenbergii* (Ventura *et al.*, 2011), *Callinectes sapidus* (Chung *et al.*, 2011) y *M. nipponense* (Ma *et al.*, 2013).

Sin embargo existe evidencia que en dos especies de peneidos: *L. vannamei* (Campos-Ramos *et al.*, 2006; Garza-Torres *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009) y *P. monodon* (Charniaux-Cotton y Payen, 1985, Nakamura *et al.*, 1992) La glándula androgénica no está involucrada en la diferenciación y determinación sexual inicial, ya que el sexo se diferencia antes de que ésta se desarrolle durante el desarrollo temprano de postlarva (PL) (Garza-Torres, 2011). En *L. vannamei* el proceso de diferenciación sexual comienza aproximadamente a partir de postlarva de 12 días (PL12), en donde ya se observa el lóbulo bilateral de la gónada y conductos sexuales en ambos sexos (oviductos o vasos deferentes); en PL32 se pueden observar los primeros indicios de diferenciación sexual externa, posteriormente en PL44 se logra observar el petasma y apéndices masculinos, y para PL48, el petasma está completamente formado en la hembra. Finalmente entre PL55 y 72, los individuos machos y hembras están completamente diferenciados (Garza-Torres *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009).

Finalmente, los resultados obtenidos a partir de la ablación de la glándula androgénica en PL20-30 y PL60 de machos *M. rosenbergii*, mostraron que la reversión sexual hacia neo-hembras obtuvo mayor éxito en individuos cuya ablación se realizó en PL20-30. Lo anterior sugiere que en *M. rosenbergii*, la diferenciación sexual tiene un “punto de no retorno” alrededor de PL60, y que la GA tiene un papel crucial dirigiendo y retroalimentando la diferenciación sexual masculina una vez que la determinación sexual ha iniciado (Ventura *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, los análisis de expresión de variantes *MnSxl1*, *MnSxl* y *Tra-2* de *M. nipponense* mostraron que ambos alcanzan su máximo nivel de expresión en fase

nauplio, disminuyen a sus niveles más bajos al final de la metamorfosis larvaria e incrementan gradualmente desde P11 hasta PL20, lo que sugiere que *Sxl* actúa en conjunto con *Tra-2* en funciones complejas e importantes durante la embriogénesis, metamorfosis, desarrollo sexual somático y diferenciación sexual (Zang *et al.*, 2013 a y b). Estas observaciones indirectamente sugieren que la diferenciación sexual en estas especies puede estar influenciada por la ruta génica *Sxl-tra-dsx* (Leelatanawit *et al.*, 2009).

Sex-lethal en *Litopenaeus vannamei*

Recientemente y como resultado de la generación de librerías de transcritos expresados en gónada de hembras de *L. vannamei* (Ibarra *et al.*, 2012, Proyecto Genómica-Reproductiva de Camarón) se encontró un fragmento de 356 pb, el cual su anotación indica que comparte una alta similitud con el gen *Sxl* de otros artrópodos, incluyendo especies con sistema de determinación sexual WZ/ZZ (*Bombyx mori* y el decápodo *M. nipponense*), con determinación sexual ambiental (*Daphnia pulex*), y la especie modelo en estudios de determinación y diferenciación sexual (*D. melanogaster*), en la cual el sexo es determinado por la dosis cromosómica del sistema XX/XY (Tabla I).

Dado lo anterior, surge la pregunta de si el gen *Sxl* encontrado en *L. vannamei* presenta distintas variantes por splicing diferencial que puedan estar asociadas con la diferenciación sexual en esta especie.

Tabla I. Porcentaje de similitud del fragmento aislado a partir de gónada femenina de hembra adulta de *L. vannamei* con secuencias de GenBank (Blastx).

No. acceso	Secuencia Homóloga	% similitud	E
NP 001166854,	<i>Bombyx mori</i> (<i>Sex-lethal</i> isoforma S)	80	5e-10
NP 001036780	<i>Bombyx mori</i> (<i>Sex-lthal</i> isoforma L)	80	7e-10
EFX75395	<i>Daphnia pulex</i> (<i>Sex-lethal</i> variante protéica 2)	38	2e-09
EFX75394	<i>Daphnia pulex</i> (<i>Sex-lethal</i> variante protéica 1)	63	4e-07
NP01162689, NP727161, NP001162688,	<i>Drosophila melanogaster</i> (<i>Sex lethal</i>)	62	5e-04

3. JUSTIFICACIÓN

Mientras que los estudios previamente realizados plantean que en *L. vannamei* la diferenciación sexual consta de un sistema génico estable que no está influenciado por factores ambientales. Actualmente en decápodos se han aislado secuencias homólogas a genes involucrados en las cascadas génicas de diferenciación sexual en otros artrópodos, sin embargo, aún no se tiene conocimiento de los procesos génicos específicos de determinación y diferenciación sexual en esta y otras especies de decápodos. Dado lo anterior la realización de este trabajo contribuirá en la generación de conocimiento básico asociado a la diferenciación sexual, estableciendo en primera instancia si existen variantes de transcritos de este gen en embriones, hembras y machos de *L. vannamei*, y en una segunda instancia conociendo la expresión espacio temporal de los transcritos encontrados para *Sxl*.

El conocimiento de las variantes de *Sxl* presentes en camarón blanco podría ser aplicado en un futuro en la investigación y conocimiento del sistema de diferenciación sexual en la especie mediante RNA de interferencia (RNAi) en hembras, evaluando la proporción de sexos fenotípicos de la progenie. Esto es importante ya que la producción de camarón blanco en cultivo podría incrementar si se conocen y se llegan a manipular los mecanismos de diferenciación sexual

4. OBJETIVOS

General

Generar conocimiento básico del proceso genético de determinación y diferenciación sexual camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante análisis de expresión espacio temporal del gen *Sex-lethal (Sxl)* en ambos sexos desde el desarrollo embrionario hasta etapa adulta.

Particulares

1. Establecer si se expresan diferentes transcritos del gen *Sxl* en embriones, gónada de hembra y gónada de macho.
2. Localizar las células donde ocurre la expresión del gen *Sxl* durante el desarrollo embrionario y en tejido gonadal durante la gametogénesis de sub-adultos y adultos de ambos sexos.
3. Conocer si el gen *Sxl* se expresa ubicua o específicamente en diferentes órganos o tejidos además de embrión y gónada.

5. HIPÓTESIS

Si el gen *Sex-lethal (Sxl)* es el controlador inicial de la determinación y diferenciación sexual en camarón blanco, entonces, éste se expresará diferencialmente en tiempo y forma en ambos sexos, es decir, se observará un transcrito temprano específico de hembras (blastodermo) y diferentes transcritos tardíos específicos de cada sexo (de blastodermo a adulto).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico:

Para lograr los objetivos planteados se llevó a cabo una colecta de muestras de camarón blanco en diferentes estadios de su ciclo de vida, desde ovocitos fecundados hasta tejido de gónada, hepatopáncreas y tallo ocular de adultos (machos y hembras). En todos los estadios se preservaron muestras para la posterior extracción de ARN así como muestras para análisis histológicos e hibridación *in situ*.

Todas las muestras obtenidas para extracción de ARN fueron preservadas en RNA-later (Ambion), manteniéndolas a 4°C por 24 horas, y almacenándolas a -20°C hasta su utilización para extracción de ARN. Las muestras para hibridación *in situ* fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 28 h, recambiando a las 24 h para su posterior procesamiento histológico. En paralelo se fijó tejido gonadal en solución Davidson (Bell y Lightner, 1988) por 24 h los cuales se utilizaron para incluir en mezcla de parafina/paraplast para identificar el estadio de madurez gonádico mediante análisis histológicos según la clasificación de Tan Fermin y Pudadera (1989) y Yano (1988).

Las muestras de embriones se obtuvieron en el laboratorio comercial Acuacultura Mahr, colectando durante el desarrollo embrionario 10 desoves, cada uno de ellos en intervalos de tiempos postfertilización reportados (Ronquillo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012b). Cada muestreo se fijó en RNA-later para la extracción de ARN y en formol 4% para determinación del estadio de desarrollo.

Las muestras de individuos subadultos y adultos se obtuvieron en Julio de 2012, realizando un muestreo de 59 hembras y 19 machos en etapa subadulta (15-20g), así como 133 hembras adultas (30-35g) en los estanques de la Granja Mar Azul, Sinaloa. Los organismos fueron sacrificados *in situ* y utilizados para la obtención de muestras de tejido de gónada, tallo ocular y hepatopáncreas. Estos muestreos se emplearon para la extracción de RNA.

También en Julio de 2012 en la Granja Mar Azul se realizó un muestreo de 15 machos y 30 hembras en etapa subadulta (15-20 g), y en Febrero de 2013 se adquirieron 10 hembras y 5 machos en etapa adulta (30-35 g) de la empresa GranMar. De estos dos muestreos se fijó el tejido gonadal del cefalotórax y del primer somita en paraformaldehído al 4% para análisis de hibridación *in situ*.

6.2 Aislamiento y caracterización de los transcritos del gen *Sxl* en camarón blanco

6.2.1. Obtención parcial del transcrito del gen *Sxl* en camarón blanco

Se obtuvo ARN total en forma independiente de: (1) gónada de cinco machos adultos obtenidos del laboratorio experimental de Reproducción de Crustáceos del CIBNOR, (2) gónada de cinco hembras sometidas a condiciones de maduración sin ablación en el laboratorio de producción comercial FITMAR en Mazatlán, Sinaloa, y (3) huevos fertilizados (desarrollo embrionario) de camarón blanco obtenidos de la empresa Acuacultura Mahr.

El ARN de las muestras obtenidas fue extraído mediante el protocolo Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science) (40% fenol, 24% guanidina de tiocinato) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor (ANEXO I), re-suspendiendo en 30 µl de agua tratada con DEPC (Invitrogen). La integridad, pureza y concentración del ARN se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediante la relación 260/280 y 260/230 obtenidas a través de un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000).

Para eliminar residuos de ADN genómico se dio tratamiento con *DNAsa I* (RQ1 DNase, Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (ANEXO II). Una vez obtenido el ARN de calidad y cantidad requerida, se utilizaron 5 µl (5 µg) de cada organismo y se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el sistema de transcripción reversa *Improm II Reverse Transcription System* siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Promega) (ANEXO III).

El ADNc obtenido fue empleado para evaluar la presencia de transcritos similares a *Sxl* en gónada de adultos (machos y hembras) y embriones de *L. vannamei*. Para ello se probaron oligonucleótidos diseñados utilizando el programa Primer3 (Rozen y Sakaletsky 2000; <http://fordo.wi.mit.edu/primer3>) (Tabla II) a partir del fragmento (Lvan7723) recientemente aislado en las librerías del proyecto Genómica Reproductiva de Camarón que presentó similitud al gen *Sxl* de otros invertebrados; así como utilizando transcritos anotados como SXL (Llera-Herrera, 2012, datos no publicados) a partir de un ensamble de fragmentos expresados (EST) de *L. vannamei*, y disponible en GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=6689&build=4&tool=webfeed>).

Tabla II. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para aislamiento y caracterización del gen *Sxl* expresado en *L. vannamei*.

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño esperado
Lvan7723-F1	5'- GGCGTTGTTCCCGAGGGTGG - 3'	71.5	325 pb
Lvan7723-R1	5'- TGTAGCGGTTGGCGGTTTCGG - 3'	69.8	
SXL-F1	5'- AACGGAGCTCGCGGCGAAAA - 3'	68.2	740 pb
SXL-R1	5'- CCACCCTCGGGAACAACGCC - 3'	71.5	

Lo anterior se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en punto final con las siguientes condiciones:

Para los pares de oligonucleótidos Lvan7723 (F y R) y SXL (F y R) se realizaron reacciones de 25 µl con Buffer 1x, MgCl₂ a 3 mM, para hembra y Buffer 0.7x, MgCl₂ a 1.5 mM para macho, además 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer y 0.1 U/µl de GoTaq DNA polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 4 min para desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 63°C y 1.45 min a 72°C cada uno, y finalmente 10 min a 72 °C para extensión final.

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X (100 volts; 30 min), teñidos con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) y comparando el tamaño con marcador de peso molecular

Directload Wide Range DNA Marker (50pb-10,000pb) de SIGMA. Los productos fueron visualizados y fotodocumentados en un transiluminador con luz UV (BioDoc-It Imaging System, UVP BioImaging Systems).

Los fragmentos obtenidos fueron purificados utilizando el Kit wizard SV& PCR Clean-up System (Promega) con la posterior verificación de los mismos por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. Una vez purificados y verificados los productos se re-amplificaron por 20 ciclos con las mismas condiciones y concentraciones previas, con el objetivo de aumentar la concentración de los productos y con ello maximizar la eficiencia de reacción de ligación posterior.

Una vez verificada la presencia de bandas únicas de los productos de re-amplificación, estos se ligaron empleando 2.5 µl de Buffer de ligación 2x, 0.5 µl de pGem-T Easy Vector (Promega), 0.5 µl de producto de PCR, 0.5 µl de Ligasa y 1 µl de agua para obtener un volumen final de 5 µl, ésta reacción se dejó a 4°C toda la noche.

Los productos obtenidos de ligación fueron empleados para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* JM109 (Promega) (Anexo IV), las cuales se dejaron crecer durante 18 horas en medio LB-Agar con ampicilina. Las clonas positivas se dejaron crecer por 18 horas en 3 ml de medio LB-Agar líquido con ampicilina; se extrajo el ADN plasmídico (ADNp) por método de lisis alcalina (ANEXO V) y se verificó la presencia del inserto de tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de 5 µl de producto obtenido a partir de la digestión con la enzima de restricción *Eco RI* (ANEXO VI) del ADNp de cada clona. Las clonas que mostraron tener el inserto de tamaño esperado fueron enviadas a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y editadas eliminando los fragmentos correspondientes al plásmido mediante el programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen>), para su posterior análisis de similitud por alineamientos locales por homología con secuencias *Sxl* previamente depositadas en la base de datos del GenBank, empleando los programas BLASTn (nucleótido) y

BLASTx (nucleótidos traducidos) (Altschul *et al.*, 1990), en el sitio del NCBI para este fin (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas se diseñaron nuevos oligonucleótidos para ser utilizados en la amplificación por RACE (Tabla III).

6.2.2 Obtención del transcrito completo de *Sxl* de camarón blanco por RACE

Una vez verificada la similitud de los fragmentos amplificados por punto final obtenidos con los pares de oligonucleótidos Lvan7723 y SXL a partir de ADNc de gónada (ambos sexos) y embriones de camarón blanco con secuencias *Sxl* depositadas en GenBank, se llevó a cabo el procedimiento para obtener el transcrito completo de *Sxl*. Para ello se extrajo ARN total de gónada de seis hembras adultas (una en vitelogénesis primaria, tres en vitelogénesis secundaria y dos en estadio de madurez, según la escala de Tan Fermin y Pudadera (1989), de cinco machos reproductores (estadio de madurez) y de huevos de camarón blanco fertilizados (desde la primera división celular hasta antes de la eclosión a nauplio), mediante el protocolo de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science) (ANEXO I). El ARN total fue tratado con DNAsa como se mencionó anteriormente (ANEXO II). Posteriormente se llevó a cabo la purificación del ARNm mediante la selección de transcritos poliadenilados, utilizando *Poly (A) Purist Kit* (Ambion) y siguiendo las recomendaciones del proveedor (ANEXO VII).

El ADNc 3' y 5' de gónada de ambos sexos y de embriones, fue obtenido de forma independiente a partir de 1 µg de ARNm mediante la transcripción reversa utilizando oligonucleótidos-dT y aleatorios ligados a adaptadores del kit comercial SMARTer™ RACE ADNc Amplification Kit (Clontech), siguiendo las recomendaciones del proveedor (ANEXO VIII).

Con los productos de ADNc en sentido 5' y 3' de cada sexo gonadal y de embriones, se llevaron a cabo amplificaciones por separado con los oligonucleótidos previamente probados y verificados en reacciones de 15 µl conteniendo 1x de Polimerasa Advantage,

1x de buffer Advantage 2, 0.2 mM de dNTP's, 1x de Mix de oligonucleótidos universales (UPM, por sus siglas en inglés), 0,2 µM de oligonucleótido específico del gen (GSP, por sus siglas en inglés), empleando los oligonucleótidos Lvan7723-F1, SXL-F1 y LvanSxlRACE-F3' (embriones) para el ADNc en sentido 3', y los oligonucleótidos Lvan7723-R1, RACE SXL5'H y RACE SXL5'M para el ADNc en sentido 5' (Tabla II y III). En la figura 5 se muestra la posición de los oligonucleótidos empleados para el aislamiento y caracterización de transcritos del gen *Sxl* mediante la metodología PCR en punto final y RACE.

Tabla III. Secuencia de oligonucleótidos para aislamiento y caracterización hacia región 5' del gen *Sxl* expresado en gónada y 3' de embriones de *Litopenaeus vannamei*.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C	Tamaño esperado (pb)
LvanSxlRACE-F3'	5' - GACCGAACCGCCAACCGCTACA-3'	69.2	>430
RACE SXL5'H	5' - CGTAGTAGGCAGCCTTCATTTTG - 3'	62.24	>936
RACE SXL5'M	5' - GATAAGGTTTGTTCGCGTTTCC - 3'	61.99	>361

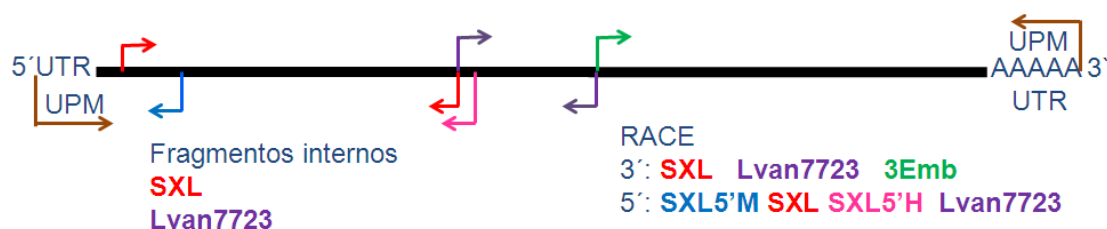


Figura 5. Posición de oligonucleótidos diseñados para el aislamiento y caracterización del gen *Sxl* de *L. vannamei* por PCR y RACE

Los productos obtenidos de la reacción de PCR por RACE fueron verificados en electroforesis horizontal de gel de agarosa al 1.5% como se menciona anteriormente. Las bandas observadas fueron separadas y cortadas para la posterior ligación y clonación siguiendo el mismo protocolo mencionado en sección 6.2.1.

De las clonas crecidas en LB líquido se extrajo el ADNp y se verificó la presencia de inserto de tamaño esperado como se menciona en la sección 6.2.1. Para los fragmentos

obtenidos de tamaño mayor a 1000 pb, la verificación se llevó a cabo mediante electroforesis de gel agarosa al 1% de productos obtenidos a partir de la amplificación por PCR de cada ADNp, utilizando los oligonucleótidos M13 en reacciones de 20 µl con Buffer 1x, 2 mM de MgCl₂, 0.26 mM de dNTPs, 0.25 µM de cada oligonucleótido (M13-F y R) y 0.05 U/µl de GoTaq DNA polimerasa (Promega) con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C por 4 min para desnaturalización inicial, 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 68°C y 1.30 min a 72°C cada uno, seguidos de una extensión final por 10 min a 72 °C. Las clonas que mostraron tener el inserto de tamaño esperado fueron enviadas a secuenciar en ambos sentidos (5´y 3´) a Macrogen Inc. (Corea del Sur).

6.2.3. Análisis bioinformático de transcritos *Sxl* obtenidos de camarón blanco

Las secuencias obtenidas se limpiaron y editaron para su posterior análisis de similitud por alineamientos locales por homología con secuencias *Sxl* previamente depositadas en la base de datos del GenBank, empleando los programas BLASTn (nucleótido) y BLSTx (nucleótidos traducidos) (Altshul *et al.*, 1990), en el sitio del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Adicionalmente, las secuencias obtenidas en este trabajo fueron utilizadas para la búsqueda de este gen en un ensamble *de novo* realizado a partir de una librería SRA depositada en el GenBank (SRX098246) para genes expresados en estadios larvarios (PL9) de *L. vannamei*, encontrando 3578 lecturas cortas que al ensamblarlas conforman cuatro contigs anotados como *Sex-lethal* (Llera-Herrera, 2012, datos no publicados).

Una vez verificada la naturaleza *Sxl* de las secuencias obtenidas, se determinó el sentido de las mismas mediante alineamientos hechos con el programa en línea MAFFFT versión 7.0. Posteriormente se realizó el ensamble de las secuencias en el programa MEGA versión 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) y MultAlin (Corpet, 1988), para obtener los transcritos específicos de cada sexo y embrionarios. Una vez obtenidos los transcritos específicos se realizó su traducción conceptual a aminoácidos en el sitio del Swiss

Institute of Bioinformatics para este fin (<http://web.expasy.org/translate/>), identificando el marco de lectura abierto y el codón de paro de traducción.

Una vez alineadas las secuencias e identificados los sitios potenciales de splicing alternativo se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla IV) para evaluar la expresión espacio temporal de los transcritos del gen *Sxl* durante los estadios de desarrollo embrionario y gonádico mediante hibridación *in situ* (ISH) y análisis de ubicuidad por punto final (PCR).

Los oligonucleótidos diseñados para ISH y ubicuidad se ubican en una región en común en todos los transcritos aislados, además se diseñó un par de oligonucleótidos para verificar la presencia de un “exón alternativo” en tejidos u órganos de ambos sexos (Fig. 6).

Tabla IV. Secuencia de oligonucleótidos para análisis de expresión por ISH y PCR de los transcritos del gen *Sxl* en *Litopenaeus vannamei*.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C	Tamaño esperado (pb)
ISH-SXL_F	5' -ATGGCCAGATTGTCCAGAAG - 3'	60.1	317
ISH-SXL_R	5' - GTAGTTCCTCGTCCCTGGT - 3'	60.4	
sxl-EA3-F	5' - ATGCTGGCCTCAGCACCAC - 3'	64.8	164
sxl-EA3-R	5' - CGCTGGCATCACCTTCCACT - 3'	65.9	
Ubicuidad-sxl-F	5' - CGTGCGTTGGATTTGTGAG - 3'	64.8	172
Ubicuidad-sxl-R	5' - TGCTGAGGCCAGCATGGTAA - 3'	65.1	

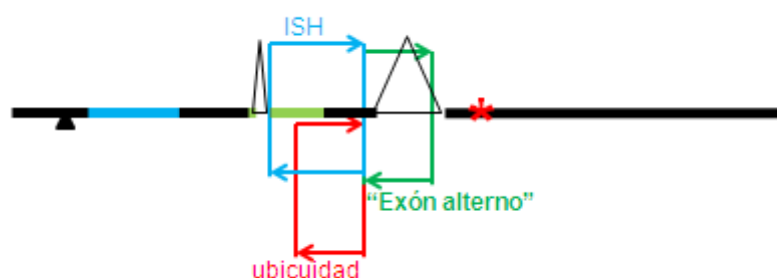


Figura 6. Posición de oligonucleótidos diseñados para análisis de hibridación *in situ* y de ubicuidad (ubicuidad y “exón alternativo”) a partir del aislamiento y caracterización del gen *Sxl*, de embriones, gónada femenina y masculina de *L. vannamei*, usando como modelo la secuencia más larga obtenida en donde se presentan los dos potenciales sitios de splicing, el triángulo negro representa el sitio de inicio de traducción, y * señal de codón de paro.

6.3. Localización de la expresión de *Sxl* por hibridación *in situ*

Con fines de establecer la localización celular específica de expresión del gen *Sxl* durante el desarrollo embrionario, postlarvario y gonádico de machos y hembras se realizó hibridación *in situ* (ISH) siguiendo el protocolo de Sifuentes-Romero *et al.* (2010).

Para el diseño y generación de las ribosondas de hibridación se empleó el ADNc aislado para la caracterización inicial del transcrito de *Sxl* en camarón blanco, el cual se obtuvo mediante la extracción de ARN de cinco machos y cinco hembras en etapa adulta y de un pool de embriones utilizando el protocolo de Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science) (ANEXO I) y tratado con DNasa para la eliminación del ADN genómico (ANEXO II). Con ese ADNc, se amplificó mediante PCR el fragmento seleccionado para el diseño de la sonda de hibridación empleando los oligonucleótidos ISH-SXL_F e ISH-SXL_R (Tabla IV, Fig. 6) diseñados a partir de una región común de las diferentes secuencias de transcritos obtenidos para el gen *Sxl*.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 20 μ l, conteniendo 1x Buffer de reacción GoTaq, 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTPs, 0.25 μ M de cada primer, 0.05U de GoTaq DNA polimerasa (Promega) y 1 μ l de ADNc previamente obtenido, con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C por 5 min para desnaturalización inicial, 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 63°C y 45 s a 72°C cada uno, seguidos de una extensión final de 10 min a 72 °C.

El producto de la amplificación se verificó mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%. Una vez obtenido el fragmento de tamaño esperado (317 pb) se llevó a cabo la ligación siguiendo las recomendaciones del proveedor, utilizando el Kit pGEM-T Easy Vector (Promega) y se almacenó a -20 °C toda la noche. Con los ligandos obtenidos se realizó la transformación en bacterias competentes *E. coli* y se incubó por 18 h, seleccionando las colonias positivas para el inserto, e incubando en medio LB/ampicilina líquido en agitación a 37 °C durante 18 h. El DNAp de las clonas positivas se obtuvo mediante el protocolo de lisis alcalina (ANEXO V) y se verificó la

presencia del inserto de tamaño esperado por amplificación de la región M13 en reacciones de 20 μ l con Buffer 1x, MgCl₂ a 2 mM, 0.26 mM de dNTPs, 0.25 μ M de cada primer y 0.05 U/ μ l de GoTaq DNA polimerasa (Promega) con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C por 4 min para desnaturalización inicial, 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 68°C y 45 s a 72°C cada uno, seguidos de una extensión final por 10 min a 72 °C; con la posterior verificación de productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Los fragmentos con el inserto de tamaño esperado (317 pb + 253pb de región M13) se enviaron a secuenciar en ambos sentidos de la cadena (5' - 3' y 3' -5') (Macrogen Inc., Corea del Sur), con los oligonucleótidos T7 y Sp6 para establecer la orientación de las mismas. Las secuencias obtenidas se limpiaron y editaron para su posterior análisis de similitud por alineamientos locales por homología con secuencias *Sxl* previamente depositadas en la base de datos del GenBank.

El ADNp de la clona elegida fue digerido con las enzimas de restricción *Apa*I y *Pst*I por separado (ANEXO X) para linearizar el plásmido y obtener los sitios de inicio de la transcripción de la polimerasa Sp6 y T7 respectivamente (contenidos en el vector) que permitieran el marcaje de las ribosondas de hibridación en sentido (5' - 3') y antisentido (3' - 5') respectivamente. Los productos de la digestión fueron verificados y separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x empleando un marcador de 125 a 23,130 pb (Lambda DNA/HindIII, Promega) y se purificaron los fragmentos correspondientes al tamaño del vector (aprox. 3000 pb) con el Kit Wizard SV Gel & PCR Clean-up System (ANEXO XI), éstas se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x. A partir de estos se generaron ribosondas por transcripción *in vitro*, las cuales fueron marcadas con digoxigenina, siguiendo la metodología descrita en Sifuentes-Romero *et al.* (2010) utilizando el sistema DIG RNA Labeling (SP6/T7, Roche Applied Science) (ANEXO XII).

Para la hibridación de las ribosondas se utilizaron cortes transversales de la gónada y del primer somita de ambos sexos y embriones de diferentes estadios de desarrollo; los cuales fueron previamente preservados en paraformaldehído al 4% y procesados

histológicamente. Se obtuvieron cortes de 4 μm usando un micrótopo rotatorio y montados en laminillas previamente tratadas con Poly-L-lisina (Sigma Aldrich) utilizando el protocolo modificado de Hu (2004) y almacenadas a 4°C hasta su uso (ANEXO IX).

Se obtuvieron cuatro laminillas de cada una de las muestras (embriones, subadultos y adultos), de las cuales una se utilizó para realizar la tinción con hematoxilina y eosina, con fines comparativos y para evaluar el estadio de desarrollo embrionario y desarrollo gonádico de subadultos y adultos (Tan–Fermin y Pudadera, 1989; Yano, 1988), los cuales se fotodocumentaron por medio de una cámara digital con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc).

La hibridación, post-hibridación y detección se llevaron a cabo mediante la técnica de Sifuentes-Romero *et al.* (2010), la cual consiste en la desparafinación e hidratación de los tejidos (cargados en portaobjetos tratados con Poly-L-lisina) con un serie de alcoholes en concentraciones decrecientes hasta llevarlos a agua tratada con DEPC y PBS 1x. Posteriormente los tejidos se permeabilizaron con proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se post-fijaron con paraformaldehído al 4% y se deshidrataron con una serie de alcoholes en concentraciones crecientes.

La hibridación se realizó en dos réplicas de cada muestra utilizando 3 μl de la sonda sentido en una réplica y 3 μl de sonda antisentido en la otra réplica, cada una mezclada en 67 μl de solución de hibridación, las laminillas se incubaron toda la noche a 42°C (ANEXO XIII).

Posteriormente se realizaron los lavados post-hibridación, se incubaron con solución de bloqueo a temperatura ambiente y se realizó la detección con el anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina seguido de revelado con el sustrato NBT/BCIP. Las laminillas se lavaron con agua estéril y se realizó la contra-tinción de los tejidos con café de Bismarck al 0.5%. Finalmente las muestras se deshidrataron y se cubrieron con resina para su posterior análisis al microscopio y foto-documentación digital con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc) (ANEXO XIV).

6.4. Análisis de ubicuidad de la expresión de *Sxl*

Para evaluar si los transcritos de *Sxl* se expresan ubicua o específicamente se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en punto final con los dos pares de oligonucleótidos (Ubicuidad-*sxl* y *sxl*-EA3), los cuales flanquean una región común en todos los transcritos aislados y una región correspondiente a un potencial exón alternativo (Tabla IV, Fig.6). Para ello se obtuvo el ADNc a partir de hepatopáncreas, gónada y glándula neuroendocrina (pedúnculo) de cinco machos adultos y cinco hembras adultas.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 20 μ l, conteniendo 1x de Buffer de reacción GoTaq, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada primer (F y R), 0.05U de GoTaq DNA polimerasa (Promega) y 1 μ l (250 ng) de ADNc previamente obtenido, con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C por 5 min para desnaturalización inicial, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 66.5°C para Ubicuidad-*sxl* ó 68 °C para *sxl*-EA3 y 30 s a 72°C cada uno, seguidos de una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed como se mencionó anteriormente. Se seleccionó el producto de amplificación de los tres tejidos en ambos sexo (uno de cada uno) para realizar la ligación, transformación y clonación para secuenciar y verificar la similitud a secuencias *Sxl* depositadas en GenBank como se mencionó anteriormente.

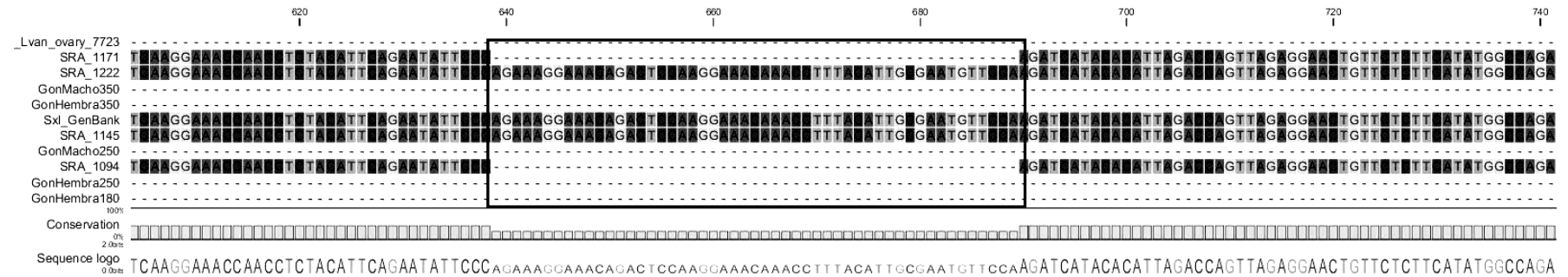
7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y caracterización de los transcritos del gen *Sxl* en camarón blanco

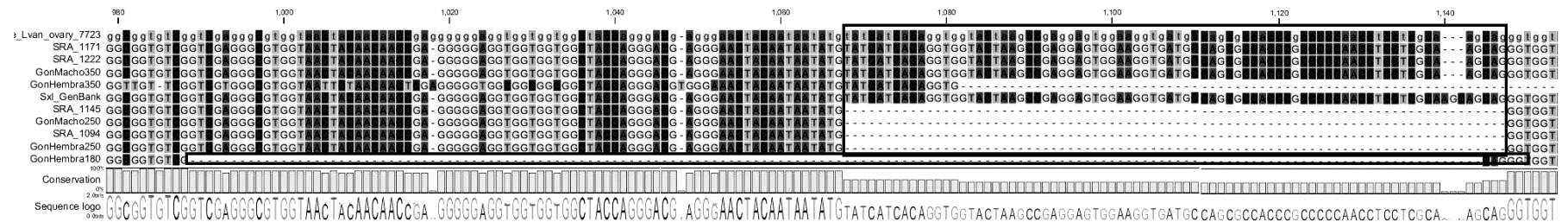
7.1.1 Obtención parcial del transcrito del gen *Sxl* en camarón blanco.

La amplificación con los oligonucleótidos Lvan7723 (F y R), diseñados para la amplificación parcial del gen *Sxl* a partir de gónada de camarón blanco adulto fue exitosa, obteniendo secuencias de diferentes tamaños en común entre sexos, dentro de cada sexo y en embriones. Mediante la separación de fragmentos por electroforesis en gel de agarosa se observaron tres fragmentos en gónada femenina (331, 247 y 173pb), mientras que en gónada masculina y embriones se observaron solamente dos fragmentos del mismo tamaño que los observados en gónada femenina (331 y 247 pb). Las secuencias parciales obtenidas con los oligonucleótidos Lvan7723 (F y R) coinciden con la presencia de splicing alternativo hacia la región 3' de los contigs SRA, observando lo siguiente: 1) las secuencias de 331 pb no presentan el splicing, 2) las secuencias de 247 pb presentan un splicing de 76 pb que comprende los nucleótidos 1059-1135, y adicionalmente 3) la secuencia de 173 pb contiene splicing de mayor longitud (154pb), iniciando en el sitio 981 hasta el 1135. La amplificación con los oligonucleótidos *Sxl* (F y R) produjo un fragmento interno de 740 pb en gónada masculina y femenina en el cual se observó splice de la posición 642 al 692 (50 pb) que coincide con dos de las secuencias SRA (no mostrado en alineamientos).

El análisis en BLASTx mostró que las secuencias de 331 pb (embrión, gónada masculina y femenina) son similares entre sí y presentan similitud del 63% con la proteína SXL de *D. melanogaster* (No. Acceso GenBank: P19339.1). Además, las secuencias de 247 pb (embrión, gónada masculina y femenina) mostraron similitud entre ellas y del 62 % con la proteína SXL de *D. melanogaster* (P19339.1) y presenta un dominio de factor de splicing de *Sxl* que describe el modelo de factores de splicing observado en dípteros. La secuencia de 173 pb obtenida sólo a partir de gónada femenina mostró similitud del 70% con el dominio de reconocimiento de ARN conservado en la proteína SXL de *D. melanogaster* (3SXL A).



A



B

Figura 7. Alineamiento de las secuencias *Sxl* previamente existentes y secuencias parciales aisladas en este trabajo a partir de gónada femenina y masculina de camarón blanco: Lvan_ovary_7723 (aislado en las librerías de cDNA de gónada de camarón), Sxl_GenBank (ensamblado de ESTs de *L.vannamei* existentes), SRA_1171, SRA_1222, SRA_1145 y SRA_1094 (contigs obtenidos de las secuencias SRA ensambladas a partir de postlarva de nueve días, PL9), y GonHembra350, GonHembra250, GonHembra180, GonMacho350 y GonMacho250 (aislados en este trabajo). Los recuadros señalan los sitios de splicing de las secuencias.

7.1.2. *Obtención de los transcritos completos del gen Sxl de camarón blanco por RACE.*

Una vez verificada la naturaleza *Sxl* de las secuencias amplificadas por PCR en punto final con los oligonucleótidos Lvan7723 (F1 y R1) y SXL (F1 y R1) se llevó a cabo la técnica de Amplificación rápida de fragmentos terminales de ADN complementario (RACE) a partir de gónada masculina y femenina así como embriones de camarón blanco. Para ello se emplearon los oligonucleótidos Lvan 7723-F1, SXL-F1 (Tabla II) y LvanSxlRACE-F3' para la región 3'; y para la región 5' se emplearon los oligonucleótidos RACE SXL5'H y RACE SXL5'M (Tabla III).

Ésta técnica generó fragmentos de diferentes tamaños en ambas direcciones de la cadena, así en dirección 5' obtuvieron fragmentos de 680 y 184 (gónada ambos sexos); de 1000 pb (gónada masculina), y de 680 pb (embriones); y hacia la región 3' se obtuvieron dos fragmentos de 1500 y 750 pb (gónada femenina); de 2000 y 1500 pb (gónada masculina); y de 1500, 750, 500 y 400 pb (embriones). (Tabla V).

Tabla V. Tamaño de fragmentos obtenidos hacia 3' y 5' a partir de gónada femenina, masculina y durante el desarrollo embrionario de camarón blanco.

Dirección 3'				Dirección 5'		
Lvan7723-F		SXL-F	LvanSxl RACE-F3'	Lvan7723-R	RACESXL 5'H	RACE SXL5'M
H	M	M,H y E	E	M	M, H, E	M, H
750	200	1500	750 500	1000	680	184
	0		400			

Nota: H=Hembra, M= macho, E= embriones.

Se verificó la naturaleza *Sxl* de los transcritos completos obtenidos a partir de gónada femenina, masculina y embriones de este trabajo mediante alineamientos locales de homología en el programa BLASTx, en el que se obtuvo una alta similitud (83 y 95%) con secuencias *Sxl* de *Macrobrachium nipponense* y de 62-64% de *Harpegnathos saltator*, *Daphnia pulex* y *Bombyx mori*.

Tabla VI. Porcentaje de similitud mediante BLASTx de secuencias *Sxl* de *L.vannamei* con otros invertebrados.

Secuencia	% similitud	E	No. Acceso
<i>Macrobrachium nipponense Sxl1</i>	83 (442/442)	1e-150	AGI44577.1
<i>Macrobrachium nipponense Sxl2</i>	95 (380/380)	2e-127	AGI44578.1
<i>Harpegnathos saltator sxl</i>	64 (265/265)	5e-83	EFN79874.1
<i>Daphnia pulex Sxl 2</i>	63 (257/257)	1e-78	EFX75395.1
<i>Daphnia pulex Sxl 1</i>	62 (255/255)	2e-78	EFX75394.1
<i>Bombyx mori Sxl 2</i>	62 (252/342)	1e-76	ABA71352.1
<i>Bombyx mori Sxl S</i>	62 (251/341)	2e-75	NP001166854.1
<i>Bombyx mori Sxl L</i>	62 (251/341)	2e-75	NP001036780.1

7.1.3 Caracterización bioinformática y molecular de transcritos Sxl obtenidos de camarón blanco:

El alineamiento y ensamblaje de las secuencias obtenidas a partir de camarón blanco en el aislamiento parcial del transcrito (apartado 6.1.1), y en dirección 5' y 3' obtenidas por RACE, dio lugar a cinco secuencias nucleotídicas diferentes en hembra (1292, 1253, 989, 911 y 837 pb), tres secuencias nucleotídicas diferentes de gónada masculina (1934, 1334 y 916) y tres secuencias nucleotídicas diferentes en embriones (1068, 1020 919), las cuales difieren entre sí por el patrón de splicing en ambos sitios (642-692: 50 pb y 981/1059-1135: 154 ó 76 pb).

Los ensamblajes obtenidos se pueden dividir en cinco grupos de transcritos diferentes según el patrón de splice: 1) transcritos con splice en ambos sitios: 50 y 154 pb (Hembra837 y Macho1934), 2) transcritos con splice en ambos sitios, siendo el segundo splice de menor tamaño que en el grupo anterior: 50 y 76 pb (Hembra 1292, 1253 y 911, Macho916, Emb919 y SRA1094); 3) transcritos con el primer splice solamente: 50 pb (Hembra989, Macho1334, Emb1020 y SRA1171); 4) transcritos con el segundo splice: 79 pb (Emb1068 y SRA1145); y 5) transcrito sin splice (SRA1222). Estos patrones de splicing coinciden con lo obtenido en las secuencias parciales de *Sxl* en camarón blanco descritas anteriormente, secuencias SRA, fragmento de 334pb aislado en librerías de cDNA de gónada femenina de camarón adulta y *Sxl* GenBank ensamblado de ESTs existentes (Fig.8).

El análisis del marco de lectura abierto +1 (ORF por sus siglas en inglés) mostró la presencia de codón de inicio de la traducción ATG en la posición 163 de todas las secuencias ensambladas. Estas contienen codón de paro de la traducción dando lugar a cinco diferentes secuencias de aminoácidos (335, 319, 244, 215 y 118 aa) (Fig.9).

Estas secuencias son el resultado de ausencia de splicing de 50pb en el sitio 642-692 en Emb1068 dando lugar a una secuencia de 335 aa.; la presencia splicing de diferente tamaño en Hembra1253 (319aa), Macho1334 (244aa) y Macho1934 (215aa); de la inserción-delección de una adenina en posición 612 en secuencias de hembra y embrión que cambia el marco de lectura introduciendo un codón de paro prematuro en Hembra1292, 989, 911 y 837, Emb1020 y 919 dando lugar a una secuencia de 118aa (Fig. 10). Las secuencias nucleotídicas y la traducción conceptual por variante se encuentran en el ANEXO XV.

Las diferencias observadas en la región carboxilo terminal de las cinco variantes de aminoácidos obtenidas generan secuencias truncas o que tienen incompleta la región de reconocimiento de ARN (o RRM por sus siglas en inglés) conservada en la proteína SXL de *D. melanogaster* (Fig.9 y 10) dando lugar a variantes proteicas Sxl sexo-específicas:

- 1) una variante de 118 aa aislada en hembra y embriones, la cual potencialmente se deriva de la delección de una adenina que modifica el marco de lectura del transcrito, produciendo una proteína que presenta un dominio de unión al ARN (RRM-1) común en todas las variantes.

- 2) la segunda variante aislada de gónada femenina que presenta dos sitios potenciales de splicing dando lugar a tres dominios RRM (1-3) dos de ellos presentes en las variantes masculinas (RRM 1 y 2).

- 3) la primera variante masculina carece del segundo potencial sitio de splicing ubicado en el sitio 1059 (76 pb) introduciendo por lo tanto un codón de paro prematuro dando lugar a variante con dos dominios RRM (1 y 2).

- 4) la segunda variante masculina que presenta dos potenciales sitios de splicing, el segundo sitio de mayor tamaño (154 pb en el sitio 981) que la variante anterior,

dando lugar a un codón de paro prematuro y modificando la porción terminal de la RRM 3.

5) finalmente, una variante exclusiva de embriones, que carece del primer potencial sitio de splicing (presente en las demás variantes), esto conduce al cambio en el marco de lectura truncando al segundo RRM y da lugar a un RRM diferente a los anteriores (RRM-4), por otro lado mantiene el segundo sitio potencial de splicing dando lugar a la RRM-3 observado en la variante femenina.

De lo anterior, es importante resaltar que las diferencias observadas en las variantes masculinas dan a lugar a la modificación del marco de lectura introduciendo un codón de paro prematuro que producen secuencias de aminoácidos de menor tamaño y eliminan al tercer RRM observado en las variantes femeninas y de embrión.

Adicionalmente, al comparar las secuencias proteicas de *Sex-lethal* SRA con las únicas dos variantes descritas para *Sxl* de *Daphnia pulex*, es que el ‘splicing alternativo’ de la región 642-692 en *L. vannamei* no ha sido reportada como un exón alternamente transcrito en *D. pulex*. En esta última especie se han descrito cinco exones (Fig. 9a), inferidos a partir de su genoma ya secuenciado (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/dispGeneModel?db=Dappu1&id=299722>). Interesantemente, al alinear las secuencias nucleotídicas reportadas en GenBank para *D. pulex* (Fig. 11a) se puede observar que la inclusión o exclusión de una región intrónica parcial localizada justo después del cuarto exón (Fig. 11b) resulta en un cambio del marco de lectura de tipo *frame-shift* resultando en un codón de paro prematuro en el transcrito más corto. Esto es altamente similar a lo observado en las secuencias proteicas cortas de *sex-lethal* traducidas a partir de las secuencias SRA.

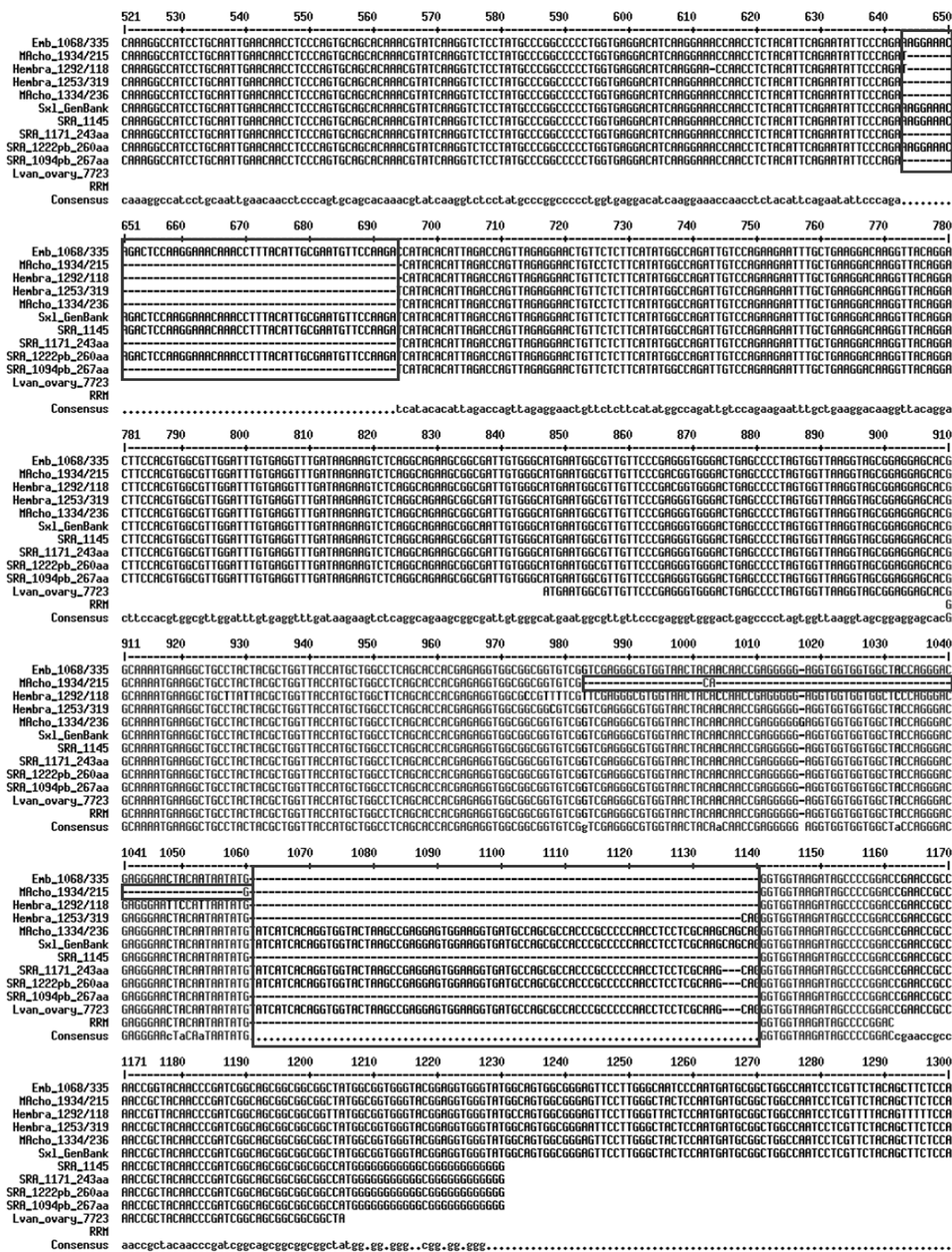


Figura 8. Alineamiento de secuencias *Sxl* de *L. vannamei* previamente existentes y aisladas en este trabajo a partir de embrión, gónada femenina y masculina con diferente patrón de splicing en los sitios 642 al 692 (50pb) y 981 ó 1059 al 1135 (154 ó 76 pb): Lvan_ovary_7723 (aislado en las librerías de cDNA de gónada de camarón), Sxl_GenBank (ensamblado de ESTs existentes), SRA_1171, SRA_1222, SRA_1145 y SRA_1094 (contigs obtenidos de las secuencias SRA ensambladas a partir de postlarva de nueve días, PL9), Hembra 1292 y1253, Macho 1934 y 1334 y Emb 1068 (aislados en este trabajo) secuencia de la Región de unión al ARN (RRM). Los recuadros señalan los sitios de splicing de las secuencias.

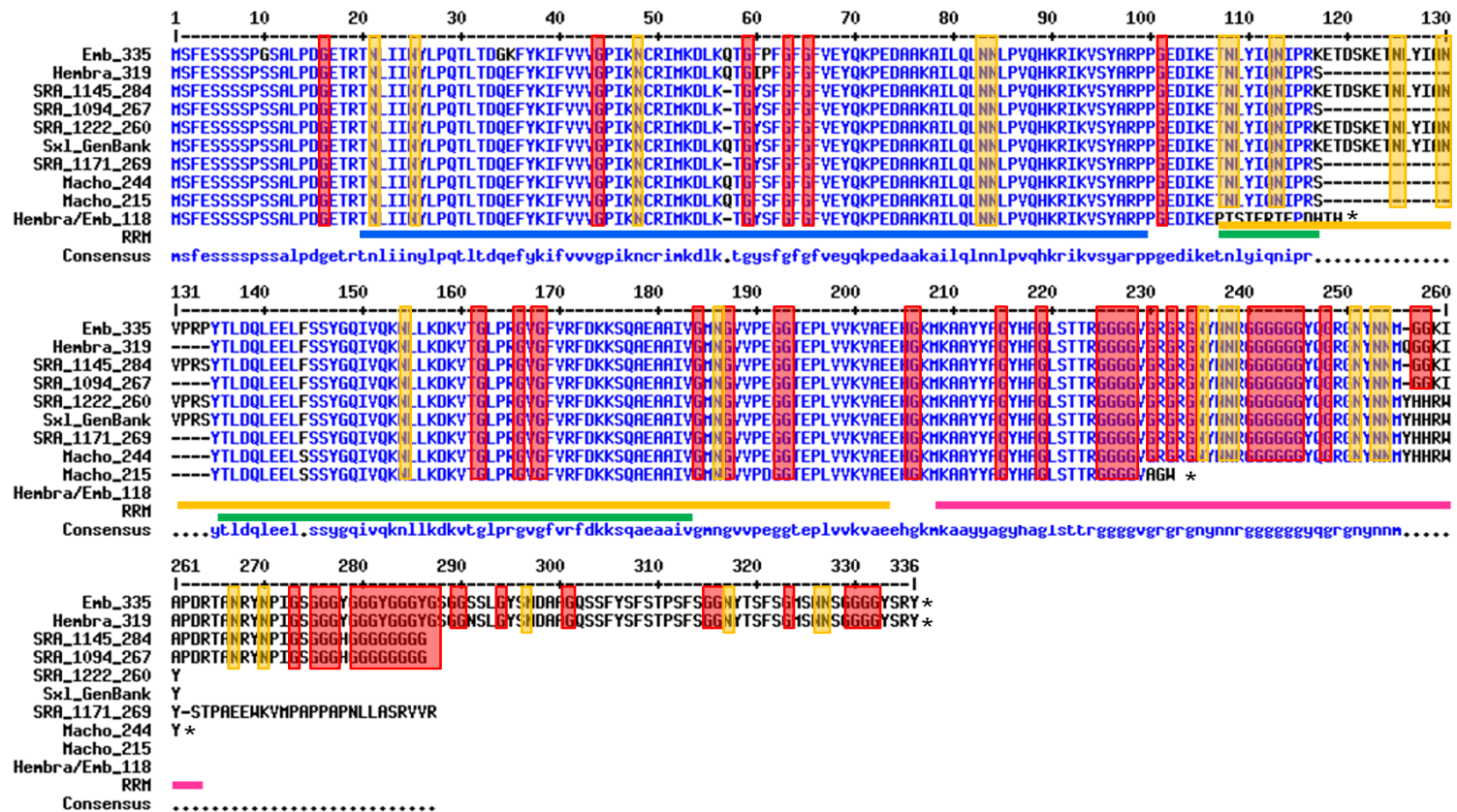


Figura 9. Alineamiento de traducción conceptual de secuencias SXL de *L. vanna* previamente existentes y aisladas en este trabajo a partir de gónada femenina y masculina: Sx1_GenBank (ensamblado de ESTs existentes), SRA_1171, SRA_1222, SRA_1145 y SRA_1094 (contigs obtenidos de las secuencias SRA ensambladas a partir de postlarva de nueve días, PL9), Hembra 1292 y 1253, Macho 1934 y 1334 y Emb 1068 (aislados en este trabajo). Los signos * indican la presencia de un codón de paro. Las cajas de color naranja resaltan Asparaginas (N) y las rojas Glicinas (G). En barras de color: azul, verde, amarillo y rosa, se representan las diferentes regiones de unión al RNA (RRM).

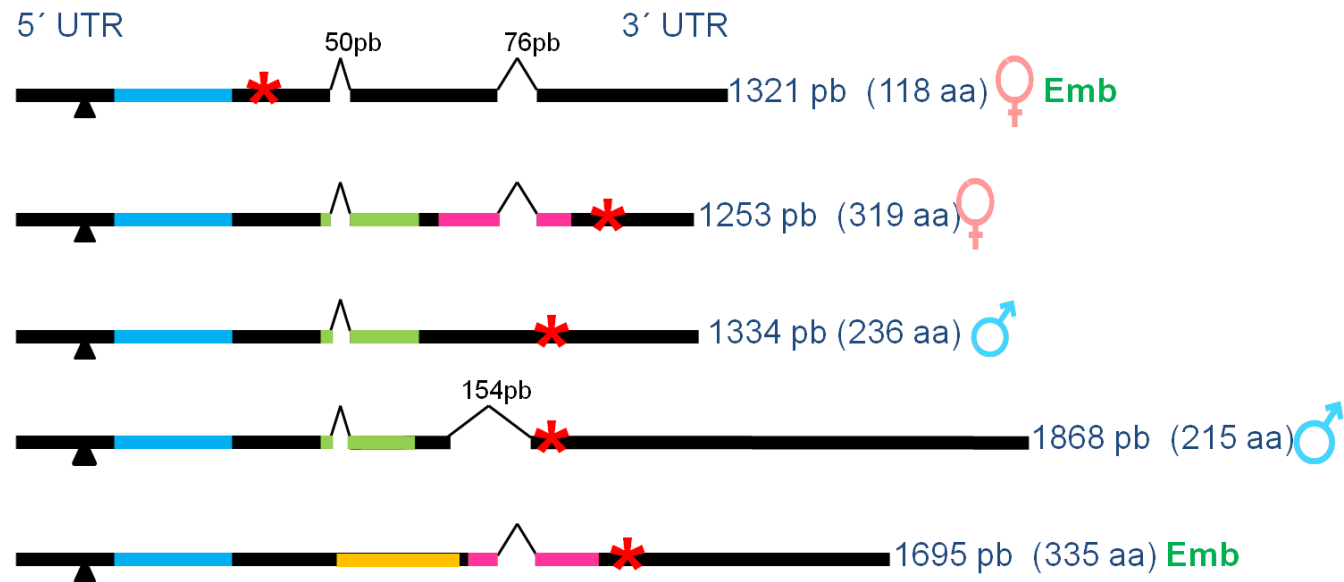


Figura 10. Esquema de variantes nucleotídicas y proteicas de *Sxl* aisladas en *L. vannamei*, con regiones no codificantes (UTR's) en dirección 5' y 3', el triángulo negro representa la señal de inicio de la traducción, * indica codón de paro de traducción, las líneas hacia arriba indican sitios posibles de splice: 50 pb, 76 pb y 154 pb; las barras de colores representan las diferentes RRM: azul-RRM1, verde-RRM2, rosa-RRM3 y naranja-RRM4.

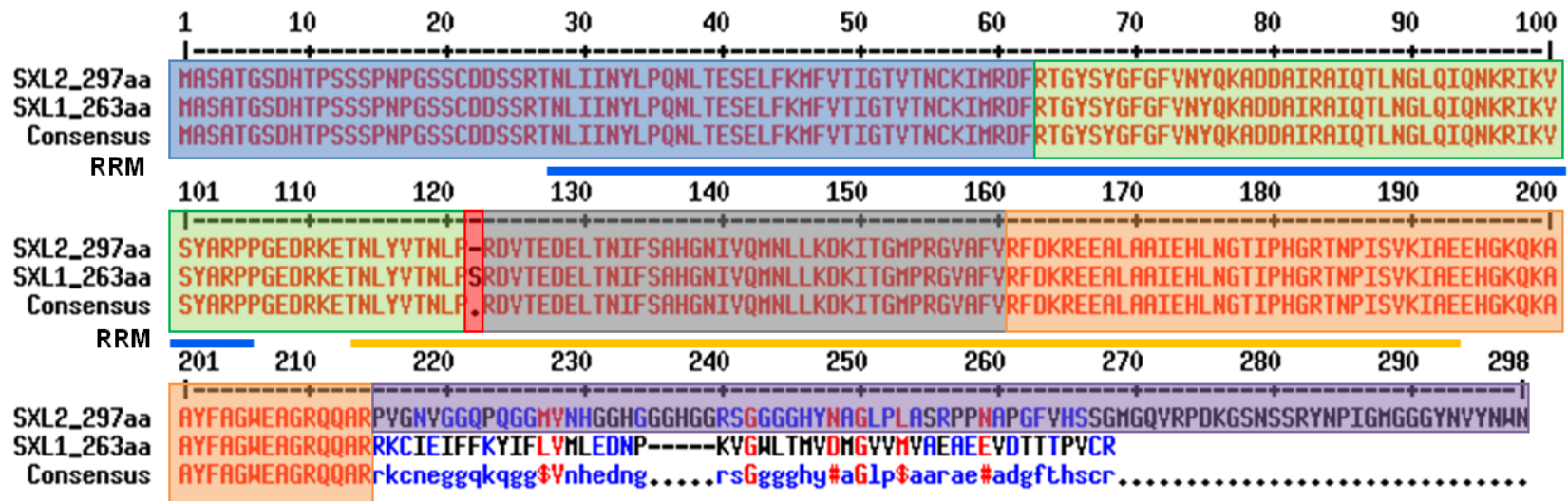


Figura 11a. Traducción y alineamiento de secuencias de variantes de *Sxl* de *Daphnia pulex* (EFX75394.1 y EFX75395.1) para las cuales la posición de los intrones es conocida. En cuadro azul el exón 1, verde: exón 2, gris: exón 3, naranja: exón 4 y morado: exón 5; en rojo una secuencia codificante en *Sxl* de *L. vannamei* que en *D. pulex* corresponde a un intrón. En barras azul y naranja se muestran las diferentes RRM características de *Sxl*.

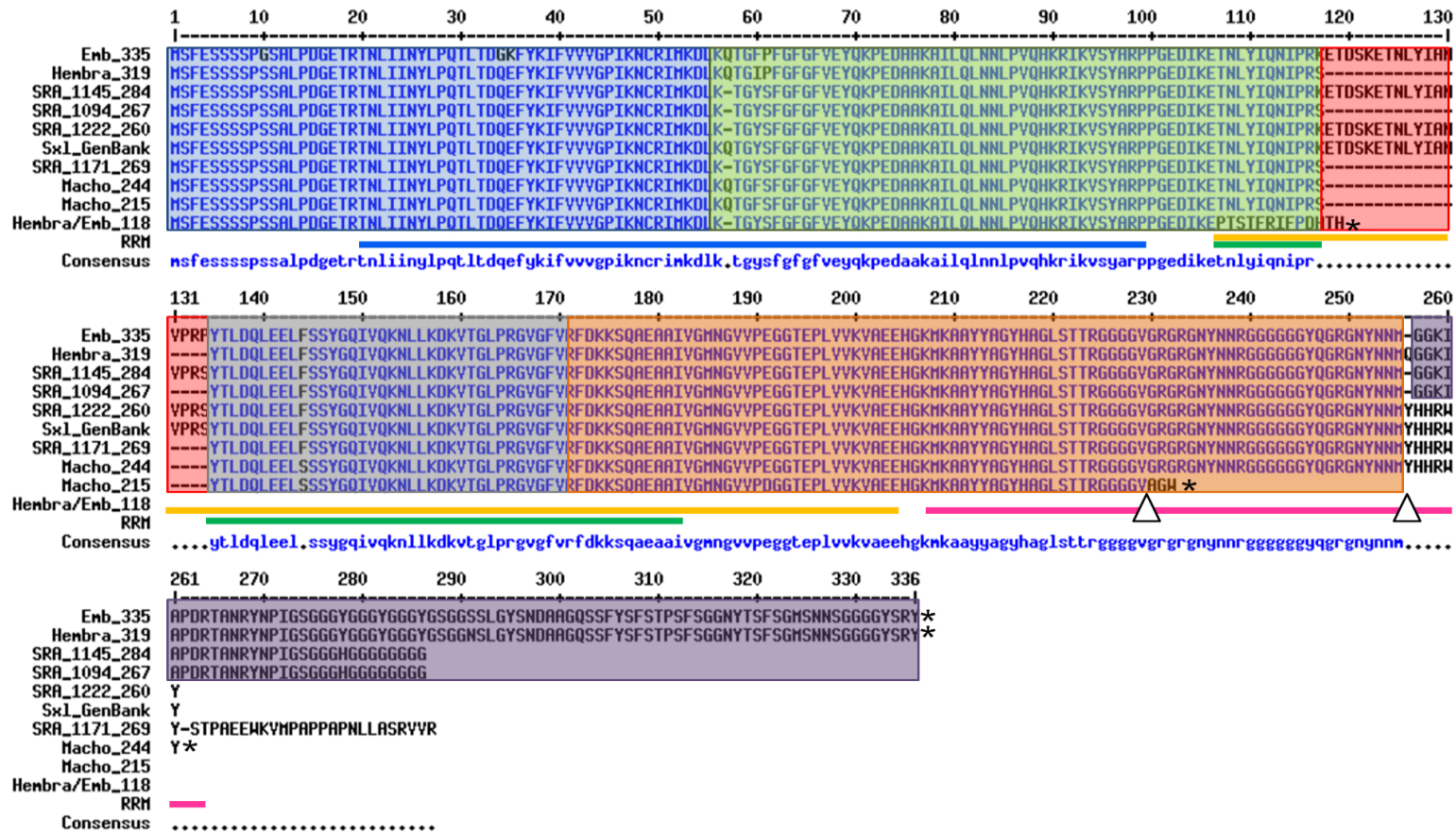


Figura 11b. Traducción y alineamiento de secuencias de variantes de Sxl de *L. vanna* previamente existentes (284aa_SRA, 267aa_SRA, 260aa_SRA y 243aa_SRA) y aisladas en este trabajo a partir de gónada femenina y masculina. En cuadro azul el exón 1, verde: exón 2, gris: exón 3, naranja: exón 4 y morado: exón 5; en rojo una secuencia codificante en *Sxl* de *L. vanna* que en *D. pulex* corresponde a un intrón, el triángulo blanco señala la posición del potencial splicing en la región 3´.

7.2 Localización de la expresión de *Sxl* por hibridación *in situ*

Los oligonucleotidos diseñados para generar la sonda para hibridación *in situ* amplificaron un fragmento de 317 pares de bases presente en gónada masculina y femenina, así como durante el desarrollo embrionario.

La hibridación *in situ* utilizando la sonda “antisentido” de *Sxl* en cortes transversales de embriones, así como de gónada femenina y masculina (subadultos y adultos), permitió localizar la expresión de este gen en embriones a partir del estadio de embrión en segunda división celular (4 células) hasta gástrula, y estadios de desarrollo gametogénico tempranos hasta la madurez en sub adultos y adultos.

7.2.1 Localización de la expresión de *Sxl* por hibridación *in situ* en embriones

La señal de hibridación de transcritos (ARNm) de *Sxl* (sonda antisentido) fue positiva en embriones de 4 células (segunda división celular 50 mpd), la cual se observa dispersa dentro del citoplasma de cada una de las células (Fig.12 A y C). En embriones de 32 células (mórula 140 mpd) la señal de hibridación con sonda antisentido fue más uniforme y ésta se puede observar en mayor concentración en la región correspondiente al núcleo celular el cual se encuentra orientado hacia la periferia del embrión, y en menor concentración y en forma de gránulos dentro del citoplasma de las células (Fig.12 E).

Durante la gastrulación temprana se forma el blastoporo (225 mpd) mediante la invaginación de células que darán lugar al mesendodermo, las células que rodean al blastoporo permanecen en interfase mientras las que están afuera adyacente al ectodermo continúan en mitosis. En esta fase se observa señal dispersa en todo el embrión sin embargo esta se observa con mayor intensidad en la región de invaginación celular la cual dará lugar al mesendodermo (Fig.13A).

Una vez ingresadas las células del mesendodermo, éstas se dividen (mitosis), en esta fase, la señal de hibridación se observa en todas las células siendo más intensa en los núcleos orientados a la periferia que en el citoplasma, además se observan las dos

células de mayor tamaño en el centro del embrión (Fig.13C), en la gastrulación tardía la señal es de mayor intensidad en las células que han ingresado al blastocele las cuales potencialmente darán lugar al mesodermo y particularmente en una de las dos células de mayor tamaño dentro del blastocele la cual corresponde al mesoteloblasto primordial y pudiera ser la precursora de la línea germinal (13E).

Los resultados obtenidos en la hibridación *in situ* con la sonda sentido de *Sxl* en embriones muestran ligera señal en algunas de las células embrionarias, sin embargo esta es significativamente de menor concentración o intensidad en comparación con la señal de hibridación de ARNm de *Sxl* (sonda antisentido) (Figs. 12-13. B, D y F).

7.2.2 Localización de la expresión de Sxl por hibridación in situ en gónada femenina y masculina.

La localización de la expresión de transcritos de *Sxl* se llevó a cabo en cortes transversales de gónada femenina y masculina en subadultos hasta la etapa de pre madurez o madurez en adultos.

En gónada femenina se lograron observar ocho estadios del desarrollo gonádico según la clasificación de (Yano 1988), mientras que en macho sólo se tienen dos estadios: inmaduro y maduro. La señal de hibridación de transcritos (ARNm) de *Sxl* (sonda antisentido) fue positiva durante el desarrollo gametogénico de ambos sexos.

Gónada femenina

En hembras subadultas en previtelogénesis (sinapsis, cromatina y perinúcleos tempranos) la señal positiva de hibridación con la sonda antisentido *Sxl* se observó en el núcleo y peri-nucleolos de los ovocitos y en el tejido conjuntivo de la gónada (Fig.14A-C antisentido).

En los tres estadios de vitelogénesis primaria: glóbulo de aceite I, glóbulo de aceite II y sin vitelo, se puede apreciar claramente señal de hibridación de ARNm *Sxl* (sonda antisentido) siendo de mayor intensidad en el núcleo y nucléolos y de menor intensidad en el citoplasma de los ovocitos (Fig.15A-C antisentido).

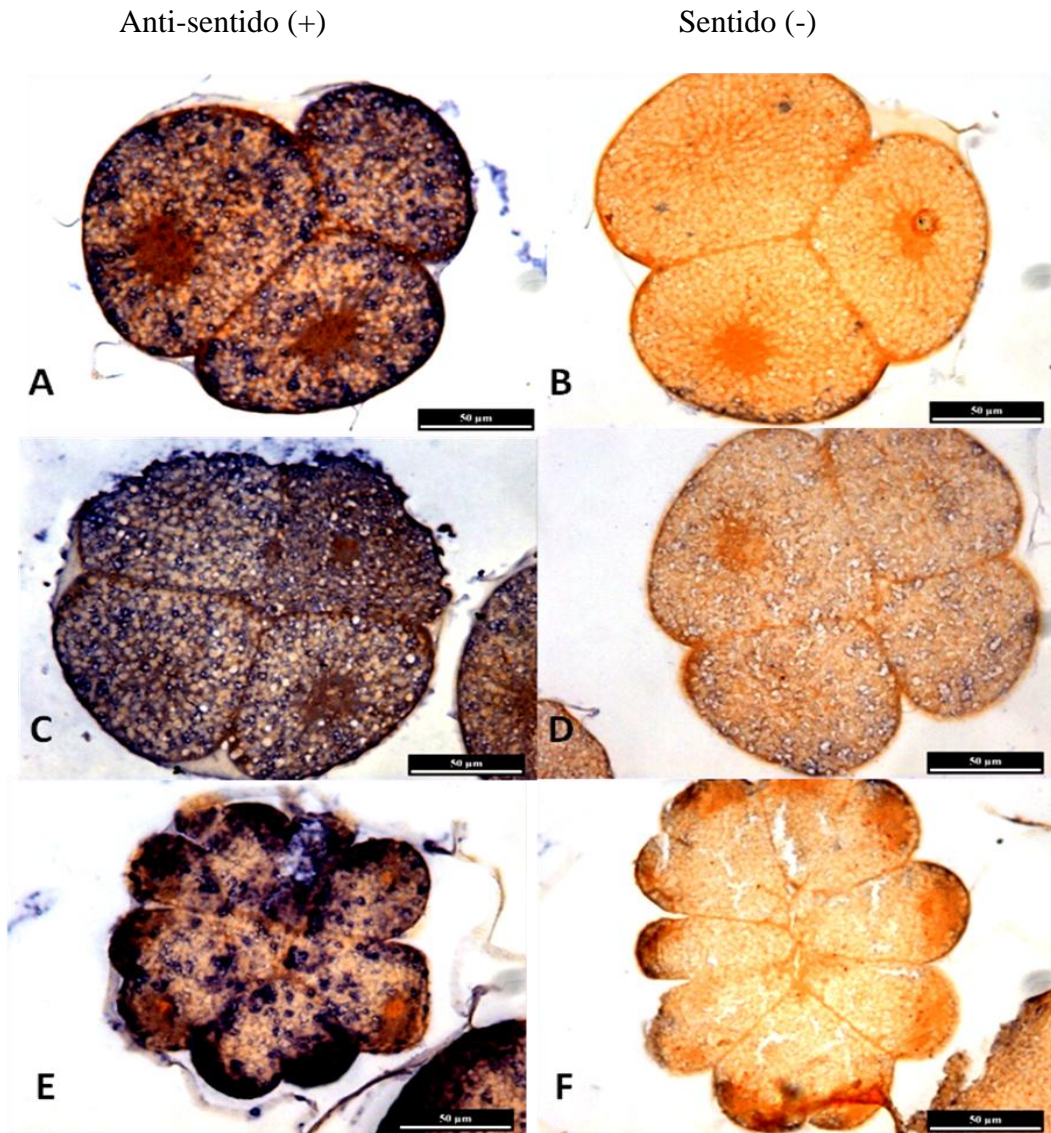


Figura 12. Expresión de ARNm *Sxl* durante el desarrollo embrionario de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ*. La señal positiva con sonda antisentido se observa en morado o azul oscuro, con la prueba sentido las células se ven color naranja. A-D: embriones de 4 células(50 mpd), E y F: embriones de 32 células (mórula, 120 mpd).

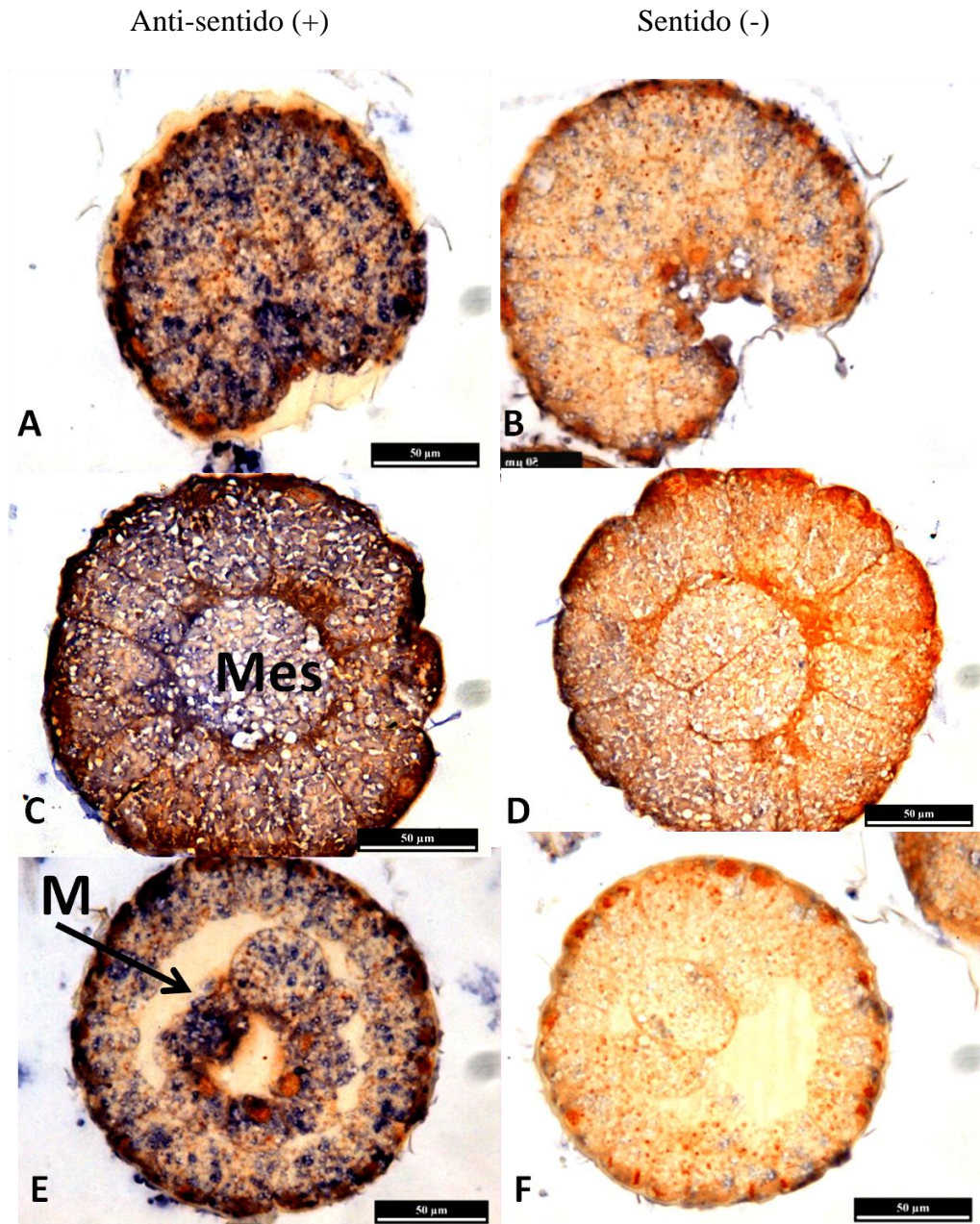


Figura 13. Expresión de ARNm *Sxl* durante el desarrollo embrionario de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ*. La señal positiva con sonda antisentido se observa en morado o azul oscuro, con la prueba sentido las células se ven color naranja. A y B: gastrulación temprana formación del blastoporo e invaginación celular al blastocele (225mpd), C y D: gastrulación tardía, primera división del mesendodermo (270mpd), E y F: gastrulación tardía, sección posterior mostrando mas células derivadas del mesendodermo. Mes= célula del mesendodermo, M= célula del mesoteloblasto.

En gónada de hembras adultas se observó hibridación del ARNm *Sxl* (sonda antisentido) en los estadios de vitelogénesis secundaria con gránulos de vitelo y en pre-maduración. En los ovocitos en vitelogénesis secundaria la señal se intensificó en el núcleo y nucléolos, y aumentó la cantidad de gránulos de hibridación en el citoplasma (Fig.15D y 16A) en comparación con los ovocitos en vitelogénesis primaria (Fig.15A, B y C), además se observó hibridación en células foliculares (Fig.16B).

En los ovocitos en pre-maduración, la señal de hibridación con la sonda antisentido *Sxl* disminuyó en el núcleo, persiste en los peri núcleos y aumentó en el citoplasma (Fig.16C) y células foliculares; y también se observó señal positiva en las criptas corticales (Fig.16D).

La hibridación con la sonda sentido *Sxl* mostró señal negativa en todos los estadios de desarrollo gonádico femenino observados (Fig.14-16 sentido).

Gónada masculina

En gónada de machos subadultos se observaron espermátocitos secundarios (7.5-11 μm) y espermátidas tempranas con núcleos esféricos y vesícula proacrosomal. En estos cortes la señal positiva de transcritos *Sxl* (sonda antisentido) se detectó en el núcleo y citoplasma de las espermátidas tempranas (Fig.17A).

Posteriormente en gónada masculina madura se observa señal positiva intensa en las espermatogonias ubicadas en la periferia de los túbulos seminíferos y en las espermátidas avanzadas (Fig.17B), las cuales presentan núcleo, cápsula acrosomal y espina, y se localizan dentro de los túbulos seminíferos, observando señal de hibridación principalmente dentro y alrededor del núcleo (citoplasma). (Fig 17 C), sin embargo también se observan espermátidas con menor señal o sin señal de hibridación en el núcleo.

Por otro lado, la señal de hibridación con la sonda sentido de *Sxl* fue negativa en gónada de machos subadultos (Fig.17.A sentido) y adultos (Fig.17.B y C sentido).

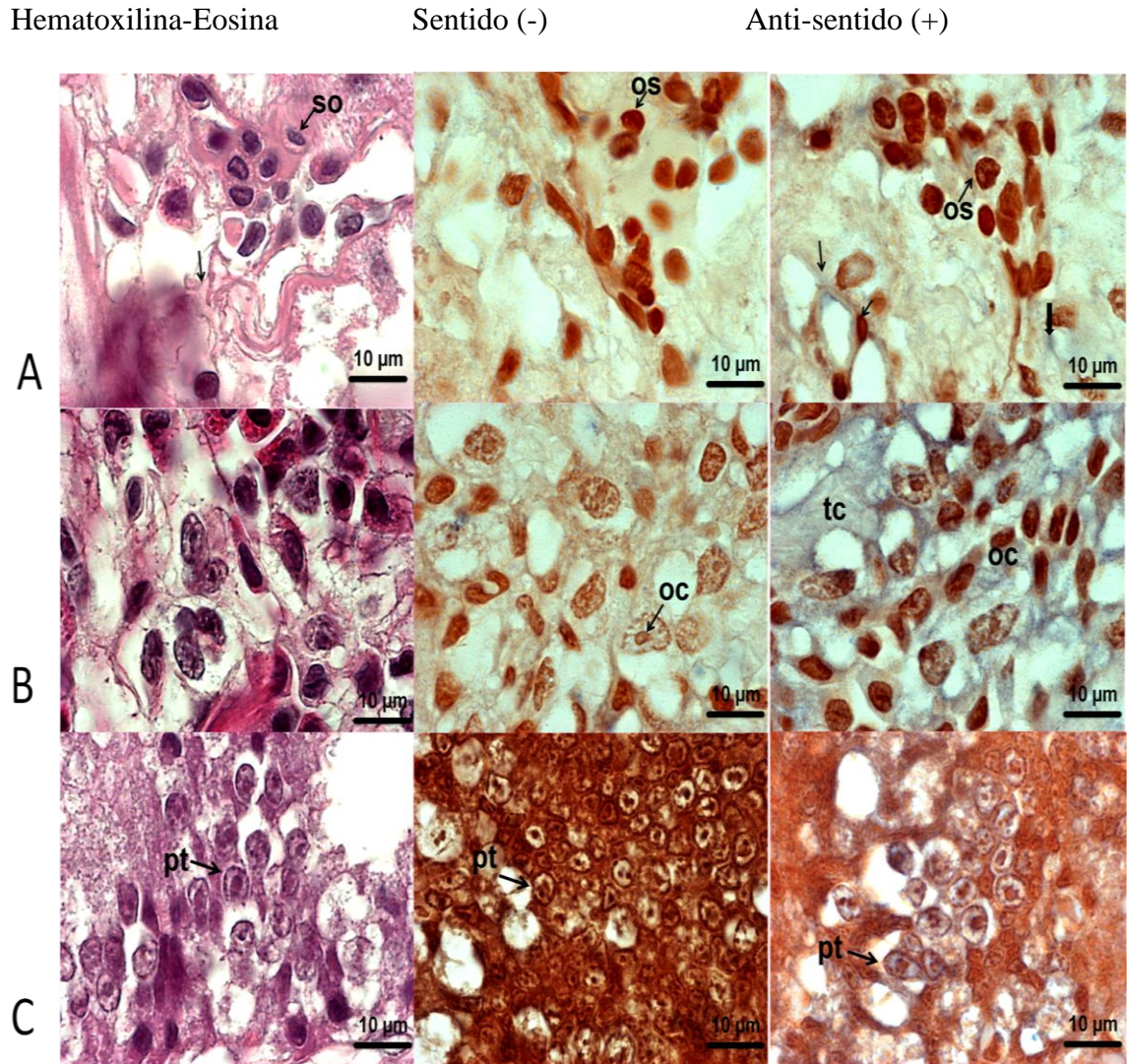


Figura 14. Expresión de ARNm *Sxl* durante la pre-vitelogénesis del desarrollo gonádico femenino de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ* y tinción con hematoxilina-eosina. La señal positiva con sonda antisentido se observa en morado o azul oscuro. A: sinapsis, B: cromatina, C: perinúcleos tempranos. os= ovocito en sinapsis. tc= tejido conjuntivo, oc= ovocito en cromatina y pt= perinúcleos tempranos.

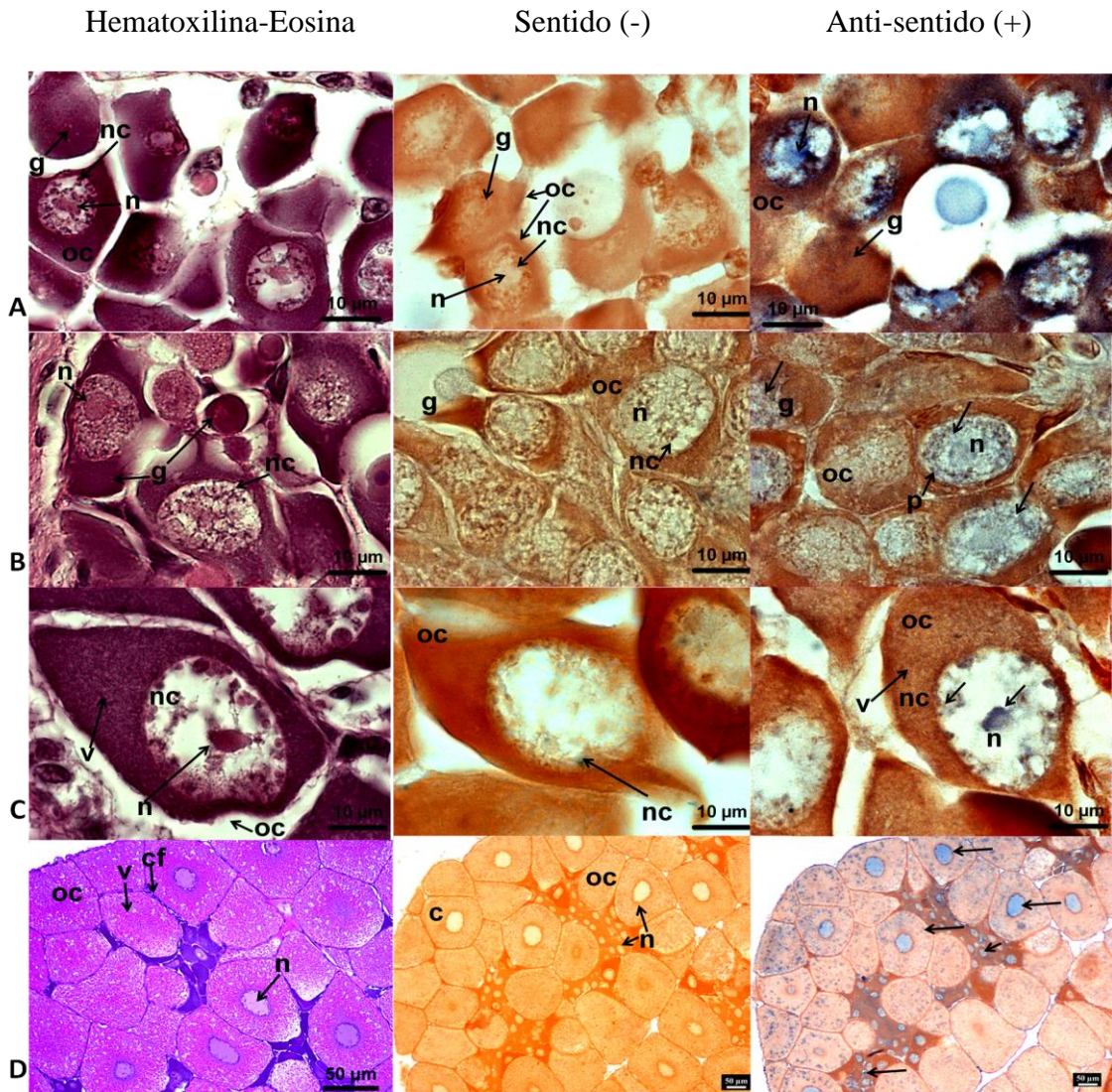


Figura 15. Expresión de ARNm *Sxl* durante el desarrollo gonádico femenino de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ* y tinción con hematoxilina-eosina. La señal positiva con sonda antisentido se observa en morado o azul oscuro. A: vitelogénesis primaria (Vit I) glóbulo de aceite I; B: Vit I glóbulo de aceite II, C: Vit I sin vitelo, D: vitelogénesis secundaria gránulos de vitelo. n=núcleo, n= nucléolo, oc= oocito, g= glóbulo de aceite; las flechas negras señalan región de hibridación intensa.

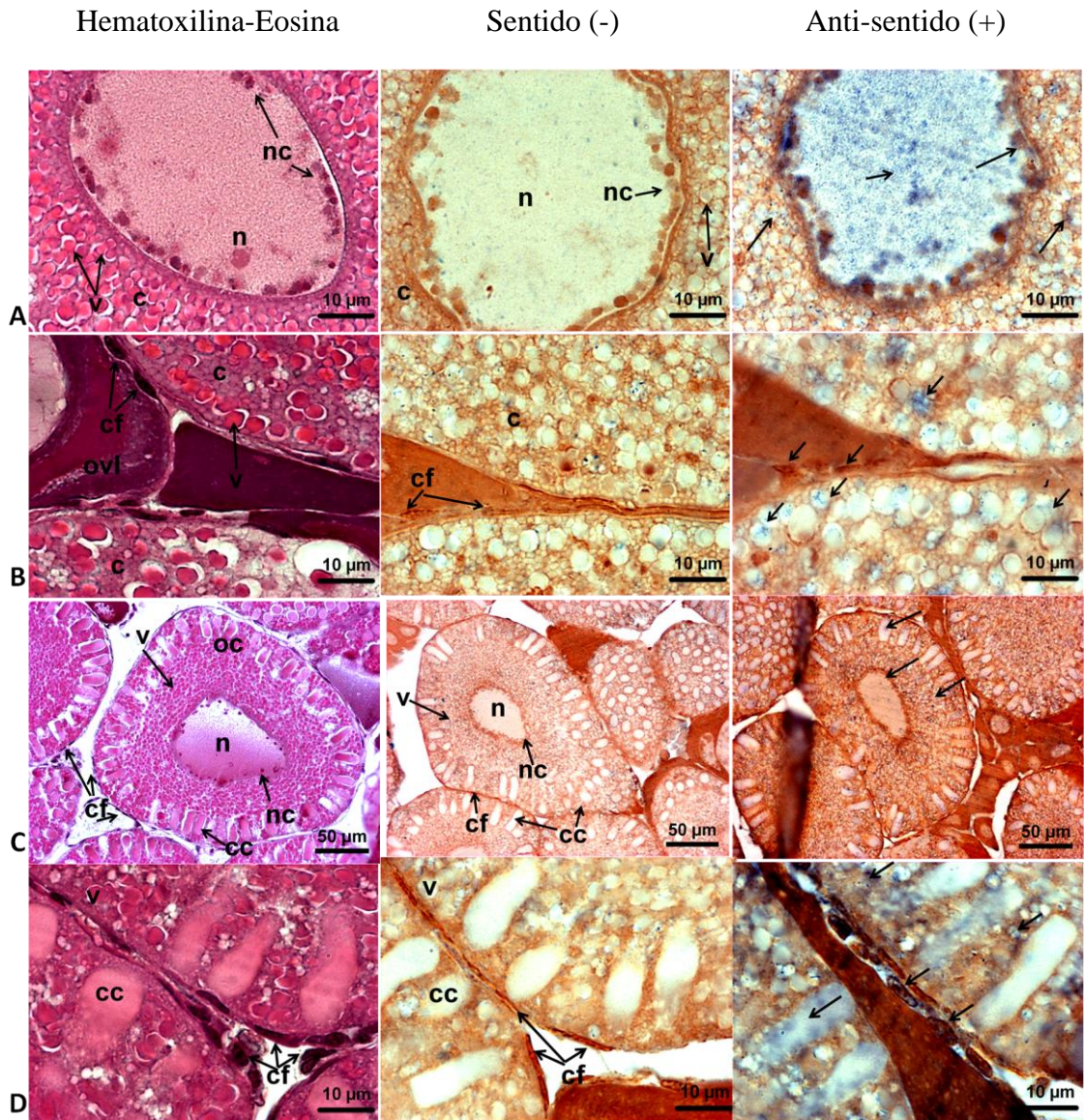


Figura 16. Expresión de ARNm *Sxl* en vitelogenéesis secundaria y pre-maduración de hembras *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ* y tinción con hematoxilina-eosina. La señal positiva con sonda antisentido se observa en morado o azul oscuro. A: acercamiento al núcleo de ovocito en vitelogenéesis secundaria con gránulos de vitelo y B: acercamiento al límite entre ovocitos en vitelogenéesis secundaria con gránulos de vitelo, C: ovocitos en pre-maduración, y D: acercamiento de límite entre ovocitos en pre-maduración. n= núcleo, nc= nucléolos, v= gránulos de vitelo, c= citoplasma, ovi= ovocito en vitelogenéesis I, cf= células foliculares, las flechas señalan las regiones de hibridación.

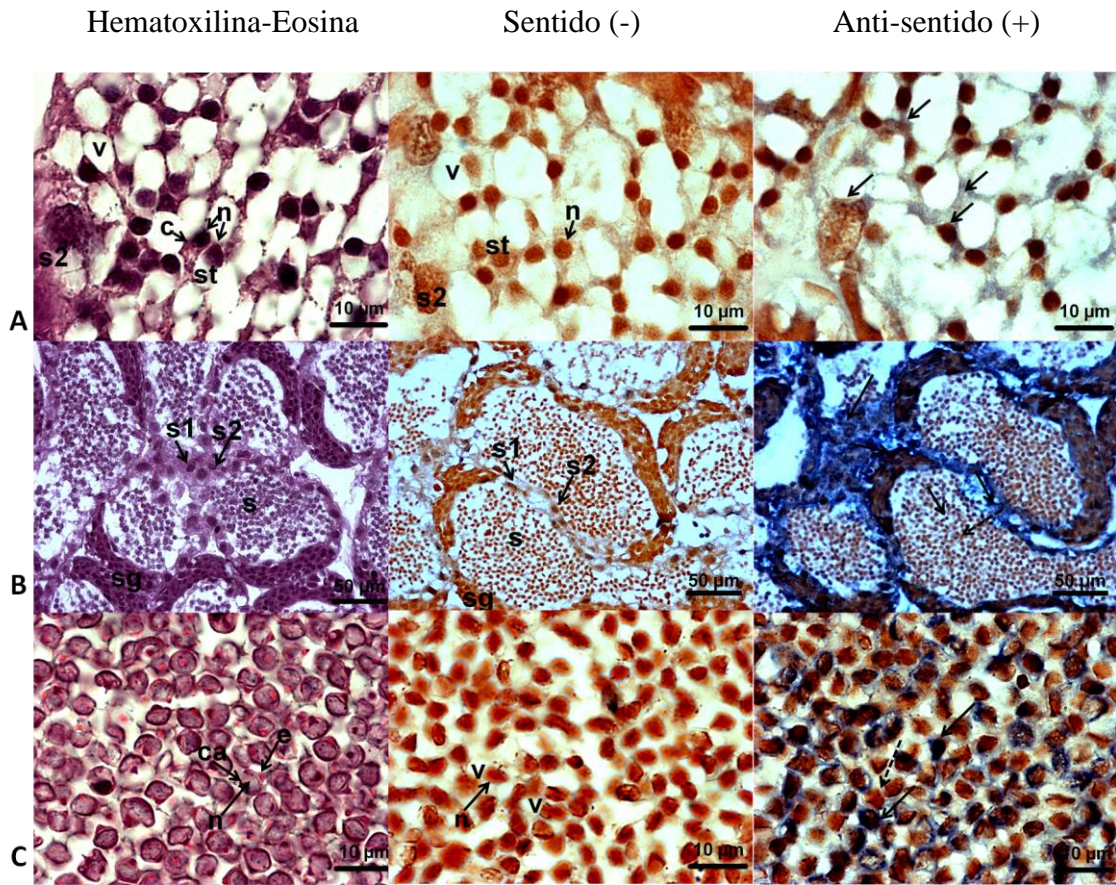


Figura 17. Expresión de ARNm *Sxl* en machos subadulto y adulto de *L.vannamei* observado mediante hibridación *in situ* y hematoxilina-eosina. La señal positiva con sonda antisentido se observa en morado o azul oscuro. A: espermátidas tempranas en gónada de macho subadulto, B: túbulos seminíferos de macho adulto, C: acercamiento a espermátidas de B. n= núcleo, c= citoplasma, sg= espermátogonio, s1= espermátocito primario, s2= espermátocito secundario, st= espermátida temprana, s= espermátida, v= vesícula proacrosomal, v= vesícula acrosomal, ca= cápsula acrosomal, y e= espina. La flecha punteada señala una espermátida sin señal de hibridación con sonda antisentido.

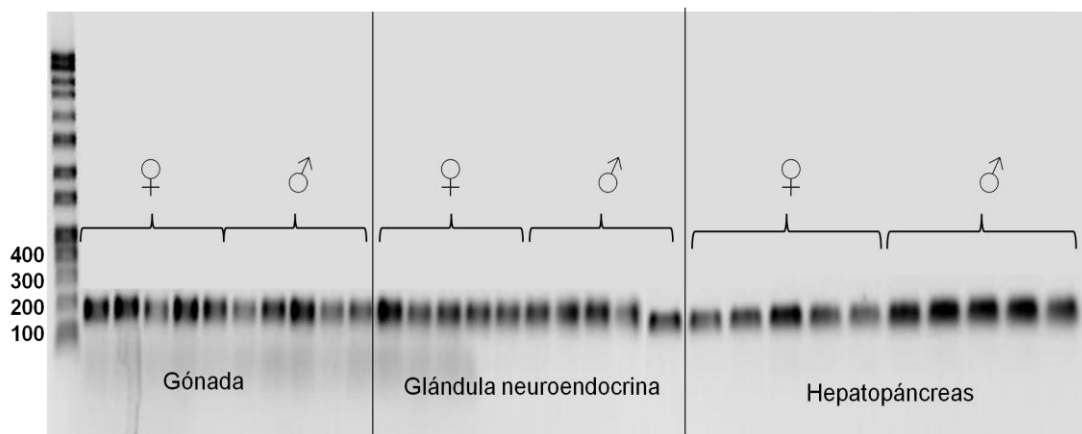
7.3. Análisis de ubicuidad de la Expresión de *Sxl*

El análisis de ubicuidad de expresión de *Sxl* en *L. vannamei* se realizó mediante la amplificación por punto final con dos pares de oligonucleótidos (qPCR-*Sxl* y EA3-*Sxl*) diseñados a partir de las secuencias obtenidas en este trabajo.

El primer par de oligonucleótidos delimita una región común en todas las secuencias obtenidas, mientras que el segundo par (EA3-*Sxl*) delimita una región que incluye al segundo splicing presente en las secuencias de ambos sexos y de embrión con la finalidad de ratificar la presencia del mismo.

Los productos obtenidos de la amplificación con ambos oligonucleótidos fueron de 180pb cada uno, y fue positiva en los tres tejidos: hepatopáncreas, gónada y glándula neuroendocrina, en ambos sexos (Fig.18).

a)



b)

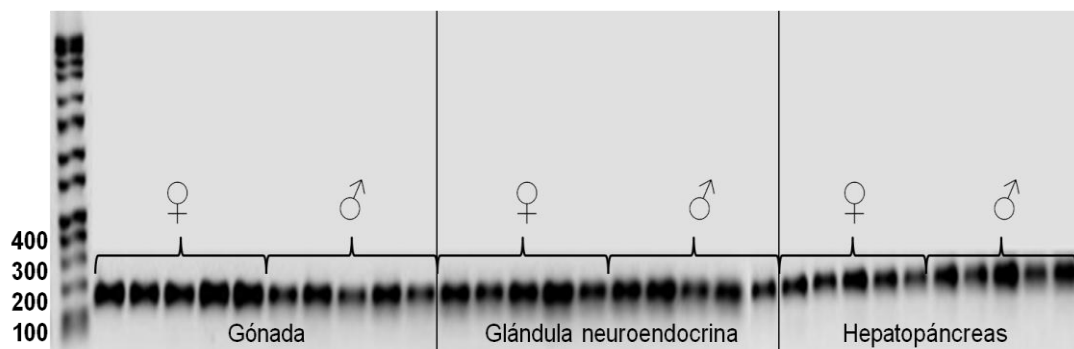


Figura 18. Amplificación en punto final con oligonucleótidos a) qPCR-*Sxl* y b) EA3-*Sxl*, en gónada, glándula neuroendocrina y hepatopáncreas de ambos sexos de *L.vannamei*.

8. DISCUSIÓN

La producción de *L. vannamei* por acuicultura ha tenido un gran empuje a nivel mundial en los últimos diez años (FAO, 2010). Esto ha sido (al menos en parte) gracias a las investigaciones que han permitido el desarrollo de tecnologías que contribuyen al mejoramiento de la rentabilidad de los cultivos. En este sentido, las investigaciones que involucran mecanismos de determinación y diferenciación sexual, son de alto interés por su potencial aplicación en el mejoramiento del cultivo. Lo anterior es debido a que *L. vannamei* presenta marcado dimorfismo sexual, en donde las hembras presentan mayor tasa de crecimiento en comparación con los machos. Así, el aislamiento y caracterización de genes expresados, específica y diferencialmente en machos y hembras de peneidos, particularmente camarón blanco, es el primer paso para la comprensión de los procesos de determinación y diferenciación sexual en especies de importancia económica, lo anterior permitirá la aplicación de tecnologías enfocadas al incremento productivo a través de cultivos “monosexo”.

En este sentido, estudios recientes han sugerido que el sistema cromosómico de determinación sexual en peneidos corresponde al ZW/ZZ, donde las hembras son heterogaméticas (ZW) y los machos son homogaméticos (ZZ), sin embargo aún no se cuenta con evidencias concluyentes al respecto. Por otro lado, en diferentes crustáceos, se ha observado la presencia de genes que se encuentran involucrados en las cascadas génicas de diferenciación sexual ya descritas en insectos, por ejemplo: *Sxl* en *D. pulex* (Colbourne *et al.* 2011), *Sxl* y *Tra 2* en *Macrobrachium nipponense* (Zhang *et al.*, 2013) y *Tra2* en *Fenneropenaeus chinensis* (Li *et al.*, 2012a). Recientemente se obtuvieron secuencias parciales de transcritos *Sxl* en gónada femenina (Ibarra *et al.* 2012) y estadios de desarrollo temprano (postlarva 9) en *L. vannamei* (Llera-Herrera, 2012, datos no publicados).

Sin embargo, aún no se sabe si las variantes anotadas como *Sxl*, aisladas en los crustáceos dulceacuícolas *Daphnia pulex* y *Macrobrachium nipponense*, y marino *L. vannamei* son sexo-específicas o si tienen alguna función en el proceso de determinación y diferenciación sexual de estos crustáceos.

Lo anterior llevó a plantear el objetivo principal de este estudio el cual fue conocer si existen diferentes transcritos sexo-específicos del gen *Sxl* en el desarrollo embrionario y en tejido gonádico de hembras y machos de *L. vannamei*, así como localizar el sitio de expresión de los mismos y evaluar su ubicuidad o especificidad en diferentes tejidos involucrados en la maduración gonádica y gametogénesis del camarón blanco.

Así, este es el primer trabajo que reporta el aislamiento, caracterización y análisis de expresión de *Sxl* en un crustáceo decápodo marino, en el que los resultados principales son los siguientes: 1) Se encontraron cinco variantes *Sxl*, de las cuales una es específica de embrión, una es común en embrión y hembra, otra es específica de hembra y dos específicas de macho; estas presentan marco de lectura abierto en el mismo sitio y diferentes sitios de codón de paro; 2) la traducción conceptual de las secuencias nucleotídicas da lugar a variantes proteicas sexo-específicas de diferentes tamaños con diferentes regiones de reconocimiento de ARN (RRM); 3) los RRM presentes en las secuencias traducidas pertenecen a la familia RRM-*Sxl* conservada en insectos; y 4) la hibridación *in situ* de los transcritos *Sxl*, indicó que su expresión es ubicua en gónada femenina, masculina, desarrollo embrionario y otros tejidos, teniendo mayor señal de hibridación en células germinales.

8.1. Aislamiento y caracterización de los transcritos del gen Sxl en camarón blanco

El gen *Sxl* y su función ha sido ampliamente estudiado en el organismo modelo por excelencia en la mayoría de los estudios genéticos: *D. melanogaster*, observando que los diferentes transcritos *Sxl* activados y derivados de dosis cromosómica y splicing diferencial entre machos y hembras, dirigen la activación de genes cascada abajo que conducen a la diferenciación sexual somática y germinal del individuo desde estadios de desarrollo tempranos (Cline, 1984; Cline *et al.*, 2010; Salz y Erickson, 2010). *Sxl* se transcribe en ambos sexos y los transcritos generados en adultos son de diferentes tamaños (Bell *et al.*, 1988; Maine *et al.*, 1985; Salz *et al.*, 1989).

Así, en *D. melanogaster* el gen *Sxl* codifica 21 productos de transcripción diferentes que se dividen en tres grupos: hembra-específico temprano, hembra-específico tardío y macho-específico tardío (Samuels *et al.*, 1991; Salz y Erickson, 2010).

Sorprendentemente, en los transcritos *Sxl* de *L.vannamei*, se observó un transcrito presente únicamente en desarrollo embrionario y un conjunto de cuatro transcritos diferentes presentes tanto en el desarrollo embrionario como en gónada de adultos. En *Drosophila* los transcritos que se expresan transitoriamente en el embrión corresponden a los hembra-específicos tempranos y se expresan a partir del promotor de establecimiento *SxlPe*, mientras que los tardíos se expresan desde mediados de la embriogénesis hasta la etapa adulta a partir del promotor de mantenimiento *SxlPm* (Salz y Erickson, 2010) .

Tanto los transcritos tempranos como tardíos de *L. vannamei* tienen en común la región 5' pero difieren hacia la región 3' mediante splicing alternativo interno, incluyendo potenciales exones terminales adicionales o alternativos y/o el uso de diferentes sitios de poli-adenilación que contienen secuencias AATAAA como ha sido observado en *Drosophila* (Samuels, 1991; Salz y Erickson, 2010).

El transcrito embrionario o hembra-específico temprano de *Drosophila* se diferencia de los transcritos tardíos por la inclusión de un exón (E1) en la región 5' y la eliminación de los exones dos y tres (exón eliminado en transcritos hembra-tardíos) en la región 3', lo que da lugar a las mismas proteínas *Sxl* que los hembra-específicos tardíos además de una diferencia de 25 aa en la región N-terminal (Bopp *et al.* 1996; Saccone *et al.*, 1998; Salz y Erickson, 2010). En *L. vannamei* se observó un patrón similar en el transcrito embrionario al incluir una secuencia de 50 pb en el sitio 642, además de la eliminación de una secuencia de 76 pb que también se eliminan en los transcritos de hembra; la traducción conceptual de este transcrito da lugar a una secuencia de 335 aa (16 aa más que la variantes hembra-específico 319 aa) y contiene una región de unión a ARN (RRM) específica de la variante embrionaria y otra RRM presente en la variante de hembra, por lo que se puede decir que esta variante corresponde a hembra-específico temprano de *L.vannamei*.

Los transcritos tardíos de *Drosophila*, además de tener el exón 5' (exón L1) en común, los ARNm de macho se distinguen de su contraparte femenina por la presencia de un exón extra interrumpiendo el marco de lectura abierto largo (Samuels, 1991; Salz y Erickson, 2010). En los transcritos *Sxl* de *L. vannamei*, también se observó esta diferencia entre los transcritos hembra-específicos tardíos (1321 pb y 1253 pb) y un transcrito macho-específico tardío (1334 pb) el cual incluye un fragmento de 76 pb ausente en los transcritos de hembra. El segundo transcrito tardío macho-específico (1868 pb) en lugar de incluir el fragmento de 76 pb, se elimina un fragmento de 154 pb.

La traducción conceptual de los transcritos tardíos da lugar a secuencias de aminoácidos de diferentes tamaños que tienen en común una RRM en la región N-terminal, mientras que hacia la región C-terminal las variantes de hembra se diferencian de las de macho por la presencia de la RRM específica de hembra. Sin embargo se observó que la variante proteica presente en embrión y hembra tiene el marco de lectura más corto (188 aa) causado por la delección de una adenina en el sitio 612. Esta variante contiene únicamente a la RRM común en todas las variantes, y sorprendentemente está constituida por los dos primeros exones observados en *Sxl* de *D. pulex*, por lo que es necesario realizar análisis posteriores con el fin de validar esta variante.

A pesar de que a la fecha no se cuenta con la estructura exón-intrón de *Sxl*, se pueden hacer comparaciones con los exones ya descritos en las variantes *Sxl* de *D. pulex* (Colbourne *et al.*, 2011), con base en ello se puede decir lo siguiente de los tres splicing observados en transcritos *Sxl* de *L. vannamei*:

- 1) El primer splicing elimina un fragmento (50 pb) en los transcritos tardíos (macho y hembra) y se mantiene en el transcrito embrionario (o temprano), este fragmento (50 pb) se encuentra justo al terminar los dos primeros exones, dentro de una región donde se introduce un fragmento intrónico en las secuencias *Sxl* de *D. pulex*; este splicing alternativo es conocido como retención de intrón (*intron retention*), sin embargo también puede corresponder a un exón que se transcribe específicamente en el desarrollo embrionario como se observa en *Drosophila* (exón E1).

2) En segundo splicing elimina una secuencia (76 pb) en los transcritos tardíos de hembra y en el exclusivo de embrión, y se retiene en el transcrito macho-específico, este splicing se encuentra en el límite entre los exones cuatro y cinco descritos en *D. pulex*, por lo que puede corresponder a un splicing de eliminación de exón en transcritos femeninos como se observa en *Drosophila* (exón 3 macho-específico).

3) Finalmente, el splicing de mayor tamaño (154 pb) observado en el segundo transcrito macho-específico (1868 pb) puede corresponder a la eliminación de dos exones diferentes o al tamaño alternativo de un exón, ya que la región 3' de este splicing coincide con el anterior (76 pb) y se encuentra en el límite entre los exones cuatro y cinco de *D. pulex*.

Los tipos de splicing que aquí se mencionan deben ser validados con la estructura exón-intrón de *Sxl* en *L. vannahmei*.

En los transcritos *Sxl* de *L. vannahmei* se observaron motifs de reconocimiento de ARN (RRMs, por sus siglas en inglés), también conocidos como dominios de unión al ARN (RBDs) o dominios ribonucleoprotéicos (RNPs) que corresponde a la RRM de *Sxl* conservada en *D. melanogaster* y otros artrópodos, esta dirige la diferenciación sexual y sistema de compensación de dosis de cromosoma X en *D. melanogaster*. *Sxl* se une a su mismo pre-ARNm y promueve el splicing alternativo hembra específico del pre-ARNm de *tra*, mediante su unión a la región polipirimidina rica en uridina de *tra* en el sitio de splice 3' no sexo-específico durante el proceso de determinación sexual. (Handa *et al.*, 1999).

En las secuencias traducidas *Sxl* de *L. vannahmei*, la región carboxilo presenta un dominio rico en Glicina (G) / Asparagina (N), que coincide con la RRM específica de embrión y hembra (hembra-específico temprano y tardío) las cuales codifican las secuencias de aminoácidos de mayor tamaño (339 aa y 319 aa respectivamente). En *Sxl* de *Drosophila* este dominio se encuentra en la región N-terminal y puede ser responsable de la interacción proteína-proteína y motifs de reconocimiento de ARN en tándem, que muestran alta preferencia a unirse a transcritos RNA objetivo de cadena sencilla ricos en uridinas (Handa *et al.* 1999). Lo que sugiere la función de unión a RNA de transcritos *Sxl* hembra específicos de *L. vannahmei*.

En este sentido, las comparaciones de proteínas Sxl de especies de dípteros han mostrado tener dominios RRM altamente conservados mientras que las regiones N- y C- terminales muestra variación significativa. La gran mayoría de cambios nucleotídicos en la RRM son sinónimas, indicando acción de la selección purificadora (Serna *et al.*, 2004). Estos resultados apoyan el supuesto de que la proteína Sxl con su especificidad funcional se encuentra en los dominios terminales fuera de los dominios conservados de unión al ARN (Samuels *et al.*, 1991, Meise *et al.*, 1998, Saccone *et al.*, 1998 y Serna *et al.*, 2004).

8.1.1. *Sxl* en otros invertebrados

Por otro lado, en otras especies de invertebrados no drosofilidos, se han descrito transcritos *Sxl* que presentan patrones de splicing que dan lugar a diferentes variantes proteicas con RRM conservados en *Drosophila*, pero éstos no tienen función clave discriminante en la determinación sexual al no ser sexo-específicas, es decir, el mismo transcrito *Sxl* codifica la proteína funcional Sxl en ambos sexos. Por ejemplo: en el orden de los dípteros suborden Brachycera, *Crysomya ruffifacies* (Müller-Holtkamp, 1995), *Megaselia scalaris* (Sievert *et al.*, 2000) y *Musca domestica* (Meise *et al.*, 1998); en los tefritidos *Ceratitis capitata* (Saccone *et al.*, 1998) y *Bactrocera oleae* (Lagos *et al.*, 2005); y en el suborden Nematocera *Sciara ocellaris* (Ruiz *et al.*, 2003), *Sciara coprophila*, *Rynchosciara americana*, *Trichosia pubescens* (Serna *et al.*, 2004); y en el orden Lepidóptera *Bombyx mori* (Niimi *et al.*, 2006). Aparentemente, en estas especies otros genes como el gen *Tra* en *C. capitata* y el gen *F* en *M. domestica* desempeñan este papel (Sánchez, 2008).

Así, se ha propuesto que la función primaria o exclusiva de *Sxl* en estas especies radica en modular la actividad génica a través de la inhibición de traducción de ARNm en ambos sexos (Saccone *et al.*, 1998). Esto se basa en tres observaciones: 1) *Sxl* controla la compensación de dosis en *Drosophila* mediante la regulación traduccional de ARNm del gen *msl-2* (Kelley *et al.*, 1997); 2) la proteína Sxl se acumula en muchos sitios activos de transcripción en el politeno de cromosomas femeninos; y 3) la expresión ectópica de proteína Sxl de *C. capitata* (Saccone *et al.*, 1998) y *M. domestica* (Meise *et*

al.,1998) en *D. melanogaster* no ejecutó ningún efecto notable en los genes objetivo conocidos de *Sxl* endógeno, sin embargo la sobreexpresión forzada del transgen es letal en ambos sexos, y desencadenó anomalías en el desarrollo de algunos machos, probablemente dada la presencia de dominios de unión al ARN conservados en la proteína *Sxl* en *D. melanogaster*, la cual es funcional y sólo se necesita en hembras dado que los machos carentes de éste son viables y fértiles (Cline, 1978).

El modelo de Wilkins (1995) propone que la evolución de las cascadas génicas de determinación sexual se establecieron de abajo hacia arriba, siendo los genes de abajo (*dsx- tra* ó *F- tra2*) más conservados que los genes cascada arriba. Esto significa que es probable que en el linaje filogenético que dio lugar a los drosófilidos, la evolución co-optó por el gen *Sxl*, lo modificó y lo convirtió en el gen clave controlador de la determinación sexual en *Drosophila*.

Por lo que llama la atención que en otros crustáceos el gen *Sxl* parece tener una función en la diferenciación sexual temprana ya que los análisis de expresión de las dos variantes *Sxl* (*MnSxl1* y *MnSxl2*) y *Tra-2* aisladas en *M. nipponense* mostraron que durante la embriogénesis, ambos genes alcanzan su máxima expresión en fase nauplio, disminuyendo a sus niveles más bajos al final de la metamorfosis, y ambos incrementan gradualmente desde el primer día de eclosión (PL1) hasta el décimo (PL20) siendo significativo en PL5 y PL20 (Zang *et al.*, 2013 a y b). Adicionalmente, en el peneido *F. chinensis*, el gen *Tra-2* mostró un incremento repentino de niveles de expresión en estadio de mysis, posteriormente en juveniles, y mostró mayor nivel de expresión significativo en hembras que en machos, presentando mayor expresión en ovario que en otros tejidos.

Lo anterior es importante, ya que tanto en *M. nipponense* como en dos especies de peneidos (*P. japonicus* y *L. vannamei*) se ha demostrado que la diferenciación sexual ocurre durante el desarrollo temprano de postlarva (PL) una vez que la determinación sexual se ha establecido (Ventura *et al.*, 2011; Charniaux-Cotton y Payen, 1985; Nakamura *et al.*, 1992; Campos-Ramos *et al.*, 2006; Garza-Torres *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009).

Esto sugiere que ambos genes están involucrados en la determinación sexual de *M. nipponense* y de *F. chinensis*, y que posiblemente *Sxl* actúe en conjunto con *Tra-2* en funciones complejas e importantes durante la embriogénesis, metamorfosis, desarrollo sexual somático y diferenciación sexual de ambas especies (Li *et al.*, 2012a; Zang *et al.*, 2013 a y b).

Dado lo discutido en esta sección, es importante revisar a detalle lo siguiente: 1) verificar mediante PCR en diferentes muestras de embrión y gónada femenina la variante de menor tamaño (118 aa), ya que ésta es resultado de la delección de una adenina y no una variante de splicing propiamente dicha; 2) obtener la estructura exón-intrón de *Sxl*, a fin de validar los tipos de splicing alternativo en las variantes sexo-específicas y embrionarias; y 3) cuantificar la expresión de *Sxl* durante el ciclo de vida de la especie (desde desarrollo embrionario hasta etapa adulta).

8.2. Localización de células de expresión *Sxl*.

Los resultados obtenidos en los análisis de localización de células de expresión mediante hibridación *in situ* con la sonda *Sxl*-específica de *L. vannamei*, mostraron señal positiva en todos los estadios del desarrollo embrionario y gametogénico de ambos sexos, tanto en células germinales como somáticas. Lo anterior se debe a que *Sxl* se transcribe en ambos sexos, tanto la línea germinal como el soma despliegan dimorfismo sexual (Penalva y Sánchez, 2003), y la sonda diseñada para dicho análisis corresponde a una región común en todos los transcritos *Sxl* aislados a partir de embrión, gónada femenina y masculina de *L. vannamei*.

Particularmente, el patrón de hibridación de ARNm *Sxl* en los estadios desarrollo embrionario analizados en *L. vannamei* es consistente con el patrón observado en la hibridación de ARNm *vasa-like* en el desarrollo embrionario de *F. chinensis* (Fig. 13 y 19) (Feng *et al.*, 2011). *Vasa* codifica una proteína miembro de la familia DEAD-box y es el gen específico de línea germinal mejor caracterizado y analizado en diversas especies como: mosca *Drosophila* (Hay *et al.*, 1998), pez *Danio rerio* (Wolke *et al.*,

2002), ostión *Crassostrea gigas* (Fabioux *et al.* 2004 a-b), cladóceros *Daphnia magna* (Sagawa *et al.* 2005), anfípodo *Pahryale hawaiianensis* (Extavour, 2005; Özhan-Kizil *et al.*, 2009); y decápodos como (*Marsupenaeus*) *P. japonicus* (Sellars *et al.*, 2007), *L. vannamei* (Aflalo *et al.*, 2007) y *Fenneropenaeus chinensis* (Zhou *et al.*, 2010).

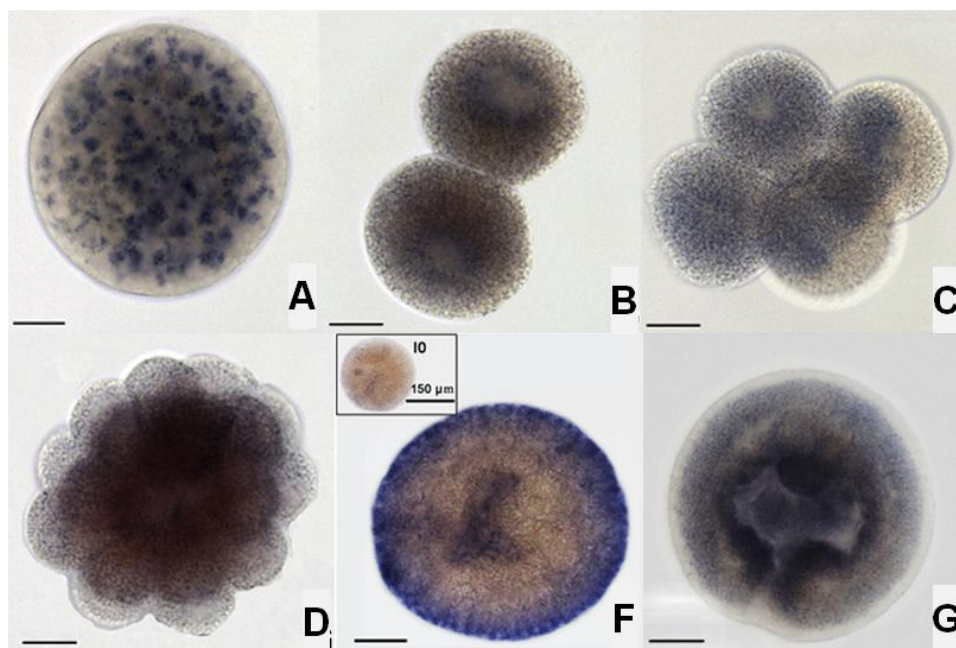


Figura 19. Expresión de *Fc-vasa-like* RNAm durante el desarrollo embrionario de *F. chinensis*, mostrando señal positiva y uniforme en huevo fertilizado (A), embrión de 2, 4 y 32 células (B, C y D respectivamente); y mayor señal de hibridación en región germinal en gástrula temprana (F) y tardía (G). Tomado y modificado de Feng *et al.*, (2011).

El patrón de expresión de *vasa* observado en *D. rerio* (Wolke *et al.*, 2002), *Ctenopharyngodon idella* (Xu *et al.*, 2005), *Carassius auratus gibelio* (Li *et al.*, 2010), *Drosophila* y *Xenopus* (Li *et al.*, 2010), consiste en la presencia de grandes cantidades de *vasa* ARNm hasta el estadio de gástrula, disminuyendo rápidamente después de la eclosión; en las últimas dos especies, la expresión cigótica de *vasa* ARNm fue específicamente restringida a la línea germinal a través del desarrollo embrionario hasta la gónada adulta, sin observar expresión en tejido somático.

Por el contrario, en el desarrollo embrionario de *L. vannamei*, la expresión de *Sxl* se observó en el soma del embrión (desde la primera división celular hasta gástrula tardía),

y en mayor intensidad en la región correspondiente a la línea germinal marcada con *Vasa* en *F. chinensis* (Fig. 13 y 19) (Feng *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en la hibridación de *vasa* (Feng *et al.* 2011) y *Sxl* ARNm (este trabajo) sustentan las observaciones realizadas en el análisis de división y gastrulación del desarrollo embrionario en *L. vannamei* (Hertzler, 2005) y *M. japonicus* (Pawlak *et al.*, 2010), donde reportan la localización de las células de mesodermo (mesendodermo) y la línea celular que potencialmente dará origen a línea germinal del individuo (Fig. 20).

En este sentido, se ha observado que en peneidos la segmentación es completa y la gastrulación se da por la ingresión de las células del mesendodermo (ME) hacia el blastocele, seguido de la invaginación de la corona de células que darán lugar al mesodermo naupliar (Zilch, 1979; Hertzler y Clark, 1992). Las células ME arrestan la división celular durante tres ciclos celulares, mientras que el resto del embrión continúa dividiéndose (Zilch, 1979; Hertzler y Clark, 1992), cuando las células ME reanudan la división las células dan lugar a ocho células, las ME dorsales dan lugar a células del endodermo, mientras que las células ME ventrales dan lugar al mesoteloblasto primordial y a la presunta línea germinal primordial (Fig. 13E y 20) (Zilch, 1979; Hertzler 2002, 2005)

En metazoarios, las células germinales primordiales se especifican mediante dos mecanismos:

1) Epigénesis, que involucra interacciones célula-célula y el tejido de la periferia transmite señales que inducen a la célula a la diferenciación a célula germinal. Este mecanismo ha sido observado en *Mus musculus* (McLaren 2003, Saga 2008), *Strongylocentrotus purpuratus* (Juliano *et al.* 2006, Voronina *et al.* 2008), *Platynereis dumerilii* (Rebscher *et al.* 2007), *Blatta germanica* y *Mnemiopsis leidyi* (revisado por Extavour y Akam, 2003).

2) Preformación, observada en *C. elegans*, *Xenopus laevis* (Ikenishi 1998), *D. rerio* (Weidinger *et al.* 2002), *D. melanogaster* (Sano *et al.* 2002, Hashiyama *et al.*, 2011; Van Doren, 2011), *P. hawaiianensis* (Extavour 2005), *D. magna* (Sagawa *et al.* 2005) y copépodos (Extavour y Akam 2003), donde se encuentran componentes citoplásmicos (nombrados germoplasma) dentro de la presunta célula germinal y

especifican su rasgo autónomamente (Whittington y Dixon, 1975; Strome y Wood, 1982; Extavour y Akam, 2003) es decir, sin ser influenciadas por el soma.

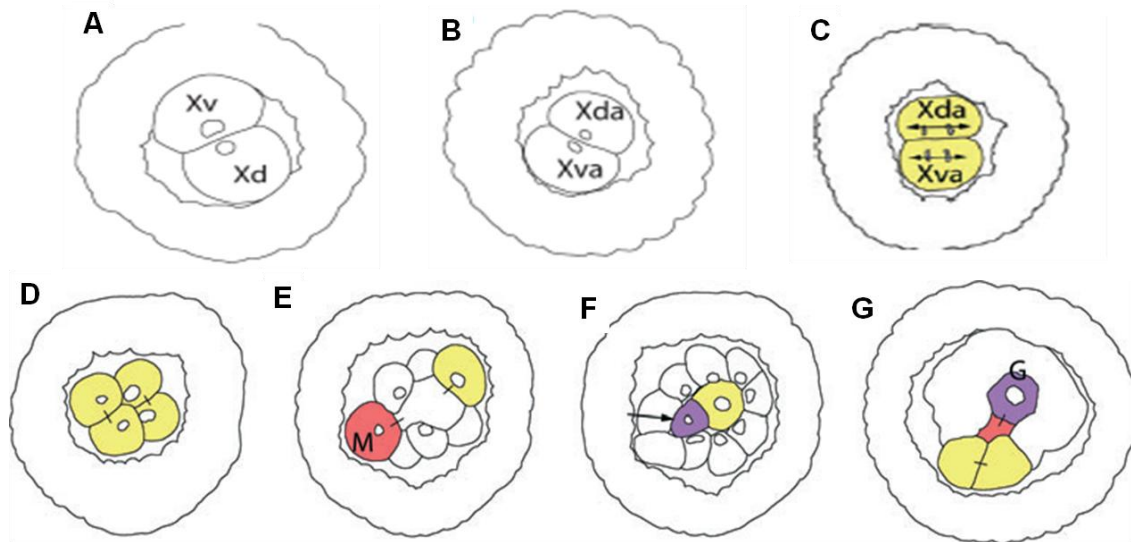


Figura 20. Esquemas gastrulación avanzada y desarrollo de derivados del mesendodermo. A) sección transversal media de células del mesendodermo (ME) mostrando cromosomas condensados después del arresto celular; B) embrión con cuatro derivados ME (Xa, Xp) seguido de la primera división ME; C) embrión durante la segunda división del ME, corte transversal anterior mostrando los dos derivados anteriores dividiéndose a lo largo del eje izquierda-derecha; D) corte transversal anterior mostrando cuatro células ME dorsales (endodermo); E) corte transversal posterior mostrando otras dos células ME, el mesoteloblasto primordial (M) se ubica en la región ventral del embrión; F) corte transversal posterior mostrando otras dos células derivadas del ME, la presunta célula germinal primordial (flecha-G) es hermana del mesoteloblasto primordial en E; y G) corte transversal de otro embrión en estadio ligeramente más avanzado, mostrando la presunta célula germinal primordial (G) con núcleo grande característico. Tomado y modificado de Pawlak *et al.* (2010).

En este sentido, se ha observado que el mecanismo mediante el cual se especifica la línea germinal en camarones peneidos es mediante preformación, dado que experimentos en donde se realizó el aislamiento de blastómeros mostraron que el mesendodermo se forma autónomamente (Kajishima, 1951; Hertzler *et al.*, 1994).

Recientemente, se ha observado una estructura denominada cuerpo intracelular (ICB por sus siglas en inglés), presente desde embriones de dos a 122 células, el cual está constituido por ARN y marca el linaje de una de dos células del mesendodermo (células alargadas y arrestadas) que inician la gastrulación; este cuerpo sugiere la presencia de un gránulo germinal en camarones peneidos como evidencia del mecanismo de preformación (Biffis *et al.* 2009, Pawlak *et al.* 2010).

Se ha observado que los gránulos germinales de algunos animales contienen productos génicos característicos de la línea germinal como Vasa, Nanos, Pumilio, Tudor y miembros de la familia PIWI (revisado Ewen-Campen *et al.* 2010) y, por lo tanto, estos son componentes candidatos del cuerpo intracelular (ICB) en camarones (Pawlak *et al.* 2010).

En los resultados obtenidos de la hibridación *in situ* de ARNm-*Sxl* de embriones no se logró observar un solo gránulo en los blastómeros; únicamente en el embrión de 32 células se observó mayor hibridación en uno de los blastómeros (Fig. 21), sin embargo es necesario realizar pruebas posteriores con marcadores de la línea germinal para verificar que lo anterior corresponda la presencia del ICB y que éste blastómero dará lugar posteriormente al mesodermo y línea germinal.

Los análisis de ISH en el desarrollo gametogénico de hembra (Fig. 14-16) mostraron que ARNm-*Sxl* de *L. vannamei* también tiene un aporte materno. Estos resultados son similares a los observados con *vasa* en gónada femenina de otros crustáceos como *D. magna* (Sagawa *et al.* 2005), *M. rosenbergii* (Nakkrasae y Damrongphol 2007), *P. hawaiianensis* (Extavour 2005 y Özhan-Kizil *et al.* 2009) *L. vannamei* (Aflalo *et al.* 2007), *P. japonicus* (Sellars *et al.* 2007) y particularmente *F. chinensis* (Feng *et al.* 2011).

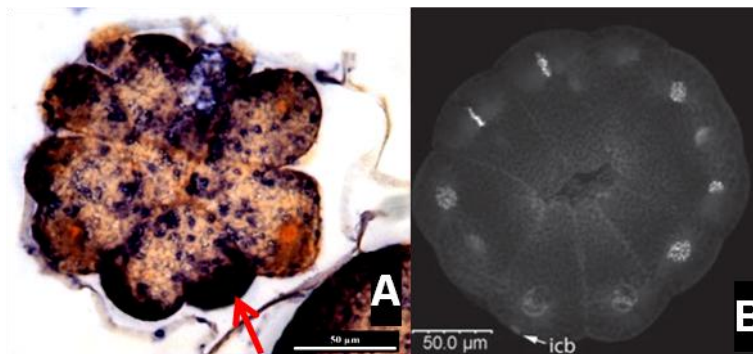


Figura 21. Embriones de *L.vannamei* 32 células: A) Expresión de ARNm *Sxl* de este trabajo y B) embrión de 23 células mostrando la presencia del ICB teñido con Sytox Green. Tomado y modificado de Pawlak *et al.* (2010)

El componente de expresión materna también ha sido observado en el gen *tra* de *Ceratitis* (Pane *et al.* 2002), *Bactrocera* (Lagos *et al.* 2007) y *Anastrepha* (Ruíz *et al.*, 2007), donde *tra* desempeña un papel clave regulatorio como dispositivo de memoria para la determinación sexual (mediante su autorregulación). Se ha propuesto que los transcritos *tra* (*tramRNA*) o su proteína, proporcionados por el ovocito, suministran al embrión con la proteína Tra necesaria para establecer el splicing hembra-específico en el ARNm cigótico inicial (embriones XX). Lo anterior produce la primer proteína tra cigótica funcional y consecuentemente el establecimiento de la autorregulación de *tra* y conduciendo a la cascada génica hembra-específica. El patrón de expresión materna y autorregulatorio también se ha observado en *M. domestica* con el gen *F* (Dübendorfer y Hediger 1998), siendo necesaria también la expresión del gen *tra-2* (Burghardt *et al.* 2005).

Por el contrario en embriones XY de estas especies, el factor M presente en el cromosoma Y, previene el establecimiento del sistema autorregulatorio de *tra*, por lo que no hay producción de tra funcional y se da lugar a la cascada génica macho-específica (Pane *et al.* 2002).

Aunado a la función de *Sxl* en la diferenciación sexual, se ha observado que *Sxl* se requiere para el desarrollo normal de la línea germinal femenina (ovogénesis) y puede poseer diferentes actividades somáticas hembra-específicas y en la línea germinal (Perrimon *et al.*, 1986; Salz *et al.*, 1987; Schüpbach, 1985; Nötiger *et al.*, 1989;

Steinmann-Zwicky *et al.*, 1989). Sin embargo, la hibridación de ARNm-*Sxl* de *L. vannamei* durante el desarrollo gametogénico de gónada femenina y masculina (subadultos y adultos) fue positiva en todas las células de la gónada, presentando mayor expresión en células germinales (Fig. 17B) en donde se está llevando a cabo la recombinación meiótica como se observa en la hibridación *in situ* de *LvDmc1* (Okutsu *et al.*, 2010). La señal de hibridación en ambos sexos incrementó junto con el estadio de desarrollo gonádico y gametogénico. Estos resultados sugieren que al igual que en *Drosophila*, además del papel de *Sxl* en la diferenciación sexual, este gen tiene función durante la gametogénesis de ambos sexos, ya que *Sxl* es necesario para la recombinación de cromosomas homólogos (Bopp *et al.*, 1999).

En gónada femenina se observó señal de ARNm *Sxl* positiva en todos los ovocitos, ésta fue intensa en el núcleo durante las primeras etapas del desarrollo gametogénico, y al final del mismo la señal disminuyó en el núcleo e incrementó en el citoplasma. Esto es una evidencia de que *Sxl* desempeña un patrón de expresión complejo y dinámico subcelular durante la ovogénesis (Bopp *et al.*, 1993). En células somáticas, *Sxl* tiene funcionamiento tanto en núcleo como en citoplasma, por lo que es probable que el patrón de distribución y trasportación de *Sxl* del núcleo al citoplasma en la línea germinal sea importante para la regulación de la ovogénesis (Hinson y Nagoshi, 2002).

La presencia de *Sxl* en testículos y tejidos somáticos sugieren funciones adicionales (Sievert *et al.*, 2000), por lo que llama la atención que en gónada masculina de adulto se observó la presencia de espermátidas con y sin hibridación de ARNm *Sxl*. Así, con el objetivo de verificar que el incremento de la expresión de *Sxl* es significativo y está relacionado con el desarrollo gametogénico en ambos sexos, y en la determinación sexual de la especie, es necesario, llevar a cabo análisis de cuantificación de transcritos *Sxl* y variantes proteicas, así como evaluar el resultado de la inhibición de transcritos *Sxl* en los diferentes estadios de desarrollo embrionario, larvario, gonádico y gametogénico de ambos sexos.

Por último, el análisis de ubicuidad de la expresión de *Sxl* por PCR, mostró que este está presente en los tres diferentes órganos/tejidos de *L. vannamei* analizados, (gónada,

hepatopáncreas y glándula neuroendocrina), lo que indica que *Sxl* potencialmente está involucrado en la regulación, función de determinación y diferenciación sexual como en otras posibles funciones de camarón blanco tanto en el soma como en células germinales (Cline y Meyer, 1996; Penalva y Sánchez, 2003). La ubicuidad de *Sxl* también se ha observado en insectos como en *Drosophila* (Salz y Erickson, 2010), *M. scalaris* (Sievert *et al.*, 2000), *S.ocellaris* (Ruíz *et al.*, 2003) y en crustáceos decápodos como *P. monodon* (Tassanakajon *et al.*, 2006) y *M. nipponense* (Zang *et al.*, 2013 a y b).

En este sentido, se ha observado que el splicing alternativo desempeña un papel importante en la definición de la especificidad tisular, es decir, diferentes tejidos pueden tener diferentes patrones de splicing alternativo (Chen y Manley, 2009); por lo que un objetivo secundario de la prueba de ubicuidad fue validar la presencia del posible exón alterno (Exón Alterno 3 - EA3) en los diferentes tejidos de ambos sexos, y se observó que aunque EA3 no se traduce en las variantes femeninas (debido a la delección de adenina en el sitio 612), este es ubicuo y se encuentra en los transcritos de ambos sexos, esto sugiere que no existen patrones de splicing alternativo tejido-específico.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que *Sxl* de *L. vannamei*, puede estar involucrado en los procesos de determinación y diferenciación sexual entre otros, dada la presencia de variantes con diferentes potenciales patrones de splicing que dan lugar a variantes proteicas sexo-específicas tempranas y tardías, además de la expresión activa durante el desarrollo embrionario y gametogénico de ambos sexos, siendo de mayor intensidad en la línea germinal en desarrollo embrionario y gonádico.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ En *L. vannamei*, se observaron variantes *Sxl* sexo-específicas que potencialmente concuerdan con el modelo *D. melanogaster*, y presentan patrones de splicing diferencial.
- ✓ Las variantes proteicas *Sxl* de *L. vannamei* son resultado de la modificación del marco de lectura, dando lugar a secuencias de aminoácidos: 118 aa en hembra y embrión, 215 y 244 aa en macho, 319 aa en hembra y 335 en embrión.
- ✓ La variante proteica de menor tamaño observada en hembra y embrión, es resultado de la delección de una adenina en el sitio 612 y no de un evento de splicing como tal, y su secuencia coincide con los dos primeros exones descritos en *D. pulex*, sin embargo es necesario verificar la presencia de dicha delección.
- ✓ Todas las variantes proteicas *Sxl* aislados en *L. vannamei* presentan regiones de unión al ARN (RRM) característicos de *Sxl*, sin embargo se observó una RRM que sólo está presente en las variantes femeninas y una RRM que sólo está presente en la variante embrionaria. Estas dos contienen un dominio en la región N-terminal (no C-terminal como en *D. melanogaster*) rico en Glicina/Asparagina que puede ser responsable de la interacción proteína-proteína.
- ✓ Los transcritos *Sxl* de *L. vannamei* están presentes durante el desarrollo embrionario y gametogénesis de camarón blanco tanto en células somáticas como germinales, por lo que su expresión es ubicua y aparentemente no existe splicing alternativo tejido-específico. En el desarrollo embrionario, se observó mayor señal de hibridación en la posible región del mesendodermo que potencialmente dará lugar a la línea germinal, por lo que es necesario realizar pruebas con marcadores específicos de la línea germinal.
- ✓ Los patrones de hibridación durante el desarrollo embrionario y gametogénico en gónada de ambos sexos sugieren que la determinación sexual tiene un componente materno y que *Sxl* pudiera tener función en el desarrollo gametogénico como ha sido descrito en *D. melanogaster*.

10. LITERATURA CITADA

- Aflalo, E.D., A. Bakhrat, S. Raviv, D. Harari, A. Sagi y U. Abdu. 2007. Characterization of a *vasa-like* gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis. **Mol. Reprod. Dev.** 74: 172–177.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers y D. Lipman. 1990. Basic local alignment tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410
- Bell, L.R., E.M. Maine, P. Schedl y T.W. Cline. 1988. *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. **Cell.** 55: 1037-1046.
- Bell, T.A. y D.V. Lightner. 1988. **A handbook of normal penaeid shrimp histology.** Allen Press, Kansas, USA.
- Biffis, C., F. Alwes y G. Scholtz. 2009. Cleavage and gastrulation of the dendrobranchiate shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda). **Arthropod Structure Development.** 38: 527–540.
- Bopp, D., C. Schutt, J. Puro, H. Huang y R. Nothiger. 1999. Recombination and disjunction in female germ cells of *Drosophila* depend on the germline activity of the gene *Sex-lethal*. **Development.** 126: 5785–5794.
- Bopp, D., G. Calhoun, J.L. Horabin, M. Samuels y P. Schedl. 1996. Sex-specific control of *Sex-lethal* is a conserved mechanism for sex determination in the genus *Drosophila*. **Development.** 122: 971-982.
- Bopp, D., J.L. Horabin, R.A. Lersch, T.W. Cline y P. Schedl. 1993. Expression of the *Sex-lethal* gene is controlled at multiple levels during *Drosophila* oogenesis. **Development.** 118: 797–812.
- Bull, J.J. 1983. **Evolution of sex determining mechanisms.** Benjamin Cummings publishing Company. Menlo Park, California.
- Burghardt, G., M. Hediger, C. Siegenthaler, M. Moser, A. Dübendorfer y D. Bopp. 2005. The *transformer 2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and

- maintaining the female pathway of development. **Dev. Genes. Evol.** 215: 165-176.
- Camara, N., C. Whitworth y M. Van Doren. 2008. The creation of sexual dimorphism in the *Drosophila* soma. **Current Topics in Developmental Biology.** 83:65-107
- Campos-Ramos, R., R. Garza-Torres, D.A. Guerrero-Tortolero, A.M. Maeda-Martínez y H. Obregón-Barboza. 2006. Environmental sex determination, external sex differentiation and structure of the androgenic gland in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.** 37: 1583-1593.
- Charniaux-Cotton, H. y G. Payen. 1985. Sexual differentiation. **In: Bliss, D.E., Mantel, L.H. (Eds.), The Biology of Crustacea. Academic Press.** New York. 217–299 pp.
- Chen, M. y J.L. Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. **Molecular cell biology.** 10: 741-754.
- Chow, S. y P.A. Sandifer. 1991. Differences in growth, morphometric traits and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. **Aquaculture.** 92: 165-178.
- Chung. J.S., R. Manor y A. Sagi. 2011. Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: Implications for eyestalk regulation of IAG expression. **General and Comparative Endocrinology.** 1: 4–10.
- Cline, T.W. 1978. Two closely-linked mutations in *Drosophila melanogaster* that are lethal to opposite sexes and interact with *daughterless*. **Genetics.** 90: 683-698.
- Cline, T.W. 1984. Autoregulatory functioning of a *Drosophila* gene product that establishes and main-tains the sexually determined state. **Genetics.** 106: 231-277.
- Cline, T.W. y B.J. Meyer. 1996. Vive la Diffèrence: Males vs females in flies vs worms. **Annu. Rev. Genet.** 30: 637–702.

- Cline, T.W., M. Dorsett, S. Sun, M.M. Harrison, J. Dines, L. Sefton y L. Megna. 2010. Evolution of the *Drosophila* feminizing switch gene *Sex-lethal*. *Genetics* 186:1321-1336.
- Colbourne J.K., M.E. Pfrender, D. Gilbert, W.K. Thomas, A. Tucker, T.H. Oakley, *et al.* 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*. 331:555-561.
- CONAPESCA. 2010. **Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2010**. México. 285 pp.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nuc.Acids Res.* 16(22):10881-10890.
- Dübendorfer, A. y M. Hediger. 1998. The female-determining gene *F* of the housefly *Musca domestica* acts maternally to regulate its own zygotic activity. *Genetics*. 150: 221-226.
- Dübendorfer, A., M. Hediger, G. Burghardt y D. Bopp. 2002. *Musca domestica*, a window on the evolution sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 75-79
- Erickson, J.W. y J.J. Quintero. 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5:e3332.
- Ewen-Campen, B., E.E. Schwater y C. G. Extavour. 2010. The molecular machinery of germ line specification. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 2–18.
- Extavour, C.G. 2005. The fate of isolated blastomeres with respect to germ cell formation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Dev. Biol.* 277: 387–402.
- Extavour, C.G. y M. Akam. 2003. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* 130: 5869–5884.
- Fabioux, C., A. Huvet, C. Lelong, R. Robert, S. Pouvreau, J.Y. Daniel, C. Minguant y M. Le Pennec. 2004a. Oyster *vasa-like* gene as a marker of the germ line cell

- development in *Crassostrea gigas*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 320: 592–598.
- Fabioux, C., S. Pouvreau, F.L. Roux y A. Huvet. 2004b. The oyster *vasa-like* gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 315, 897–904.
- FAO. 2010. **The state of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome. 197 pp.
- Feng, Z.F., Z.F. Zhang, M.Y. Shao y W. Zhu. 2011. Developmental expression pattern of the *Fc-vasa-like* gene, gonadogenesis and development of germ cell in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**. 314(1-4): 202-209
- Garza-Torres, R. 2011. Estudio sobre el órgano genital del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone), con énfasis en la glándula androgénica. **Tesis Doctorado**. CIBNOR. 86 pp.
- Garza-Torres, R., R. Campos-Ramos y A.M. Maeda-Martínez. 2009. Organogenesis and subsequent development of the genital organs in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**. 296: 136–142.
- Gempe, T. y M. Beye. 2011. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. **Bioessays**. 33:52-60.
- Handa, N., O. Nureki, K. Kurimoto, I. Kim, H. Sakamoto, Y. Shimura, Y. Muto y S. Yokoyama. 1999. Structural basis for recognition of the *tra*-mRNA precursor by the Sex-lethal protein. **Nature**. 398(6728): 579-85
- Hashiyama, K., Y. Hyashi y S. Kobayashi. 2011. *Drosophila Sex lethal* Gene initiates Females Development in Germline Progenitors. **Science**. 333: 885-888.
- Hay, B., L.Y. Jan y Y.N. Jan. 1988. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependant helicases. **Cell**. 55: 577–587.

- Hertzler, P.L. 2002. Development of the mesendoderm in the dendrobranchiate shrimp *Sicyonia ingentis*. **Arthropod Struct. Dev.** 31: 33–49.
- Hertzler, P.L. 2005. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Malacostraca, Decapoda, Dendrobranchiata). **Arthropod Struct. Dev.** 34: 455–469.
- Hertzler, P.L., Wang, S. y W.H. Clark Jr. 1994. Mesendoderm cell and archenteron formation in isolated blastomeres from the shrimp *Sicyonia ingentis*. **Dev. Biol.** 164: 333–344.
- Hertzler, P.L. y W. H. Clark Jr. 1992. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: invagination is accompanied by oriented cell division. **Development.** 116: 127–140.
- Hinson, S. y R. N. Nagoshi. 2002. The involvement of ovarian tumour in the intracellular localization of Sex-lethal protein. **Insect Molecular Biology.** 11: 241-248.
- Hu, W.S. 2004. Protocol for preparing poly-L-lysine slides for microarrays. Department of Chemical Engineering and Materials Science. **University of Minnesota.** http://hugroup.cems.umn.edu/Protocols/preparing_slides.pdf
- Ibarra *et al.* 2012. Proyecto Genómica-Reproductiva de Camarón. CIBNOR.
- Ikenishi, K., 1998. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. **Dev. Growth Differ.** 40: 1–10.
- Jin, S., H. Fu, Q. Zhou, S. Sun, S. Jiang, Y. Xiong, Y. Gong, H. Qiao y W. Zhang. 2013. Transcriptome analysis of androgenic gland for discovery of novel genes from Oriental River prawn, *Macrobrachium nipponense*, using Illumina Hiseq 2000. **PLoS ONE.** 8(10): e76840. doi:10.1371/journal.pone.0076840.

- Juliano, C.E., E. Voronina, C. Stack, M. Aldrich, R. Cameron, G.M. Wessel, G.M., 2006. Germ line determinants are not localized early in sea urchin development, but do accumulate in the small micromere lineage. **Dev. Biol.** 300: 406–415.
- Kajishima, T. 1951. Development of isolated blastomeres of *Penaeus japonicus*. **Zool. Mag.** 60: 258–262.
- Kelley, R.L., J. Wang, L. Bell y M.I. Kuroda. 1997. *Sex-lethal* controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism. **Nature.** 387: 195-199.
- Korpelainen, H. 1990. Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. **Biological Review.** 65:147-184.
- Kraemer, C. y E.R. Shmidt. 1993. The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. **Chromosoma.** 102: 553-562.
- Lagos, D., M.F. Ruiz, L. Sánchez y K. Komitopoulou. 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *sex-lethal* and *doublesex* genes of the *Drosophila melanogaster*. **Gene.** 384: 111-121
- Lagos, D., M. Koukidou, C. Savakis y K. Komitopoulou. 2007. The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. **Insect Mol. Biol.** 16: 221-230
- Leelatanawit, R., K. Sittikankeaw, P. Yocawibun, S. Klinbunga, S. Roytrakul, T. Aoki, I. Hirono y P. Menasveta. 2009. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Comparative biochemistry and physiology.** Part A 512: 66-76.
- Legrand, J.J., E. Legrand-Hamelin y P. Juchault. 1987. Sex determination in Crustacea. **Biological Review.** 62: 439-479.

- Li, C.J., L. Liu, X.H. Chen, T. Zhang, F. Gan y B.L. Cheng. 2010. Identification of a *vasa* homologue gene in grass carp and its expression pattern in tissues and during embryogenesis. **Comp. Biochem. Physiol. B** 157: 159–166.
- Li, S., F. Li, R. Wen y J. Xiang. 2012a. Identification and Characterization of the Sex-Determiner *Transformer-2* Homologue in Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Sex Dev.** 6:267-278
- Li, C., S. Weng, Y. Chen, X. Yu, L. Lü, H. Zhang, J. He y X. Xu. 2012b. Analysis of *Litopenaeus vannamei* Transcriptome Using the Next-Generation DNA Sequencing Technique. **PLoS ONE** 7(10): 1-12 e47442. Doi:10.1371/Journal.pone.0047442
- Li, Y., K. Byrne, E. Miggiano, V. Whan y S. Moore. 2003. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. **Aquaculture.** 219: 143–156.
- Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell. 2002. **Biología celular y molecular.** Editorial Médica Panamericana. México. España. 1084 pp.
- Ma, K., G. Qiu, J. Feng y J. Li. 2012. Transcriptome analysis of the oriental River Prawn, *Macrobrachium nipponense* using 454 pyrosequencing for discovery of genes and markers. **PLoS ONE.** 7(6): e39727. doi:10.1371/journal.pone.0039727.
- Ma, K.Y., J.Y. Lin, S.Z. Guo, Y. Chen, J.L. Li y G.F. Qiu. 2012. Molecular characterization and expression analysis of an *insulin-like* gene from the androgenic gland of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **General and Comparative Endocrinology.** 185: 90–96.
- Maine, E. M., H.K. Salz, P. Schedl y T. W. Cline. 1985. *Sex-lethal*, a link between sex determination and sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 50: 595-604.

- Mareddy, V.R., O. Rosen, H.B. Thaggard, R. Manor, A.V. Kuballa, E.D. Aflalo, A. Sagi, B. Paterson y A. Elizur. 2011. Isolation and characterization of the complete cDNA sequence encoding a putative insulin-like peptide from the androgenic gland of *Penaeus monodon*. **Aquaculture** 318 (3–4): 364–370.
- Marin, I. y B.S. Baker. 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. **Science**. 281: 1990-1994.
- McLaren, A. 2003. Primordial germ cell in the mouse. **Dev. Biol.** 262: 1–15
- Meise, M., D. Hilfiker-Kleiner, A. Dübendorfer, C. Brunner, R. Nöthiger y D. Bopp. 1998. *Sex-lethal* the master sex-determining gene in *Drosophila* is not sex-specifically regulated in *Musca domestica*. **Development**. 125: 1487–1494.
- Müller-Holtkam, F. 1995. The *Sex-lethal* gene in *Chrysomya rufifacies* is highly conserved in sequence and exon-intron organization. **J.Mol.Evol.** 41:467–477.
- Nakamura, K., N. Matsuzaki y K.I. Yonekura. 1992. Organogenesis of genital organs and androgenic gland in the kuruma prawn. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 58: 2261–2267.
- Nakkrasae, L. y P. Damrongphol. 2007. A *vasa-like* gene in the giant freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **Mol. Repro. Dev.** 74, 835–842.
- Niimi, T., K. Sahara, H. Oshima, Y. Yasukochi, K. Ikeo y W. Traut. 2006. Molecular cloning and chromosomal localization of the *Bombyx Sex-lethal* gene. **Genome**. 49:263-268.
- Nöthiger, R., M. Jonglez, M. Leuthold, P. Meier-Gersch-Willer y T. Weber. 1989. Sex determination in the germ line of *Drosophila* depends on genetic signals and inductive somatic factors. **Development**. 107: 505–518.

- Okutzu, T., B.J. Kang, M. Miwa, G. Yoshizaki, Y. Maeno y M.N. Wilder. 2010. Molecular cloning and characterization of *Dmc1*, a gene involved in gametogenesis, from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish. Sci.** 76:961-969.
- Özhan-Kizil, G., J. Havemann y M. Gerberding. 2009. Germ cell in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on Vasa protein for their maintenance but not for their formation. **Dev. Biol.** 327: 230–239.
- Pane, A., M. Salvemini, P.D. Bovi, C. Polito y G. Saccone. 2002. The *transformer* gene in *Ceratitidis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. **Development.** 129: 3715–3725.
- Pawlak, J., M.J. Sellars, A. Wood y P.L. Hertzler. 2010. Cleavage and gastrulation in the Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate): A revised cell lineage and identification of a presumptive germ cell marker. **Develop. Growth Differ.** 52: 677–692.
- Penalva, L.O.F. y L. Sánchez. 2003. RNA binding protein sex-lethal (Sxl) and control of *Drosophila* sex determination and dosage compensation. **Microbiology and molecular biology reviews.** 67(3): 343-359.
- Pérez-Rostro, C.I., J.L. Ramírez y A.M. Ibarra. 1999. Maternal and cage effects on genetic parameter estimation for Pacific White shrimp *Penaeus vannamei* Boone. **Aquaculture.** 30:681-693.
- Perrimon, N., D. Mohler, L. Engstrom y A.P. Mahowald. 1986. X-linked female-sterile loci in *Drosophila melanogaster*. **Genetics.** 113: 695-712.
- Rebscher, N., F. Zelada-González, T.U. Banisch, F. Raible y D. Arendt. 2007. *Vasa* unveils a common origin of germ cell and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*. **Dev. Biol.** 306, 599–611.

- Ronquillo, J.D., T. Saisho y R.S. McKinley. 2006. Early developmental stages of the green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* de Haan (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Hidrobiología**. 560: 175-196.
- Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: **Methods in Molecular Biology**. Vol.32: Bioinformatics Methods and Protocols. Ed: Misener, S. y S.A. Krawetz. Humana Press. USA. 365-386.
- Ruiz, M.F., C. Goday, P. González y L. Sánchez. 2003. Molecular analysis and developmental expression of the *Sex-lethal* gene of *Sciara ocellarus* (Diptera Order, Nematocera Suborder). **Gene Expr. Patt. (Mech. Dev.)**. 3: 341–346.
- Ruiz, M.F., A. Milano, M. Salvemini, J.M. Eirín-López, A.L.P. Perondini, D. Selivon, C. Polito, G. Saccone y L. Sánchez. 2007. The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (dipteral, Tephritidae) and its evolution in insects. **PLoS ONE**. 2(11): e1239.doi:10.1371/journal.pone.0001239
- Saccone, G., I. Peluso, D. Artiaco, E. Giordano, D. Bopp y L.C. Polito. 1998. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. **Development**. 125: 1495-1500.
- Saga, Y. 2008. Mouse germ cell development during embryogenesis. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 18: 337–341.
- Sagawa, K., H. Yamagata y Y. Shiga. 2005. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. **Gene Expr. Patterns** 5: 669–678.
- Salz, H.K. 2011. Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. **Current opinion in Genetics and Development**. 21: 395-400.

- Salz, H.K., T.W. Cline y P. Schedl. 1987. Functional changes associated with structural alterations induced by mobilization of a P element inserted in the *Sex-lethal* gene of *Drosophila*. **Genetics**. 117: 221-231.
- Salz, H. K., E.M. Maine, L.N. Keyes, M.E. Samuels, T.W. Cline y P. Schedl. 1989. The *Drosophila* female-specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. **Genes Dev**. 3: 708-719.
- Salz, H.K. y J.W. Erickson 2010. **Sex determination in Drosophila: the view from the top**. *Fly* (Austin). 4: 60-70.
- Samuels, M.E., P. Schedl y T. W. Cline, 1991 The complex set of late transcripts from the *Drosophila* sex determination gene *Sex-lethal* encodes multiple related polypeptides. **Mol. Cell. Biol**. 11: 3584-3602.
- Sánchez, L. 2008. Sex-determining mechanisms in insects. **Int.J.Dev.Biol**. 52: 837-856.
- Sano, H., A. Nakamura y S. Kobayashi. 2002. Identification of a transcriptional regulatory region for germ line-specific expression of *vasa* gene in *Drosophila melanogaster*. **Mech. Dev**. 112: 129–139.
- Schupbach, T. 1985. Normal female germ cell differentiation requires the female X chromosome to autosome ratio and expression of *Sex-lethal* in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. 109: 529-548.
- Sellars, M.J., R.E. Lyons, P.M. Grewe, T. Vuocolo, L. Leeton, G.J. Coman, B.M. Degnan y N.P. Preston. 2007. A PL10 *vasa-like* gene in the Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, expressed during development and in adult gonad. **Mar. Biotechnol**. 9: 377–387.
- Serna, E., E. Gorab, M.F. Ruiz, C. Goday, J.M. Eirín-López y L. Sánchez. 2004. The gene *Sex-lethal* of the Sciaridae family (Order Diptera, Suborder Nematocera) and its phylogeny in dipteran insects. **Genetics**. 168: 907-921.

- Sievert, V., S. Kuhn, A. Paululat y W. Traut. 2000. Sequence conservation and expression of the *Sex-lethal* homologue in the fly *Megaselia scalaris*. **Genome**. 43: 382–390.
- Sifuentes-Romero, I., H. Merchant-Larios y A. García-Gasca. 2010. Hox gene expression in the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholt, 1829), a species with temperature-dependent sex determination. **Gene Expression Patterns**. 10(6): 290-298.
- Staelens, J., D. Rombaut, I. Vercauteren, B. Argue, J. Benzie y M. Vuylsteke. 2008. High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Genetics**. 179: 917-925.
- Steinmann-Zwicky, M., H. Schmid y R. Nöthiger. 1989. Cell-autonomous and inductive signals can determine the sex of the germ line of *Drosophila* by regulating gene *Sxl*. **Cell**. 57: 157-166.
- Strome, S. y W.B. Wood. 1982. Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 79: 1558–1562.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using MAXimum Likelihood, Evolutionary distance, and maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 28: 273-2739. (PDF en <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Tan Fermin, J.D. y R.A. Pudadera. 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture** 77: 229–242.
- Tassanakajon, A., S. Klinbunga, N. Puanglarp, V. Rimpanichayakit, A. Udomkit, S. Jitrapakdee, K. Dangtip, A. Pongdara, S. Pongsomboon, P. Supungul, S. Tang, K. Kuphanumart, R. Pichyangkura y C. Lursinsap. 2006. *Penaeus monodon* gene discovery project: generation of an EST collection and establishment of a database. **Gene**. 384: 104–112.

- Van Doren, M. 2011. Determining sexual identity. **Science**. 333:829-830.
- Ventura, T., R. Manor, E.D. Aflalo, S. Weil, I. Khalaila, O. Rosen y A. Sagi. 2011. Expression of an Androgenic land-Specific Insulin-Like Peptide during the Course of Prawn Sexual and Morphotypic Differentiation. **ISRN Endocrinology**. Article ID 476283.
- Voronina, E., M. Lopez, C.E. Juliano, E. Gustafson, J.L. Song, C. Extavour, S. George, P. Oliveri, D. McClay y G. Wessel. 2008. Vasa protein expression is restricted to the small micromeres of the sea urchin, but is inducible in other lineages early in development. **Dev. Biol.** 314: 276–286.
- Weidinger, G., U. Wolke, M. Kopranner, C. Thisse, B. Thisse y E. Raz. 2002. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. **Development**. 129: 25–36.
- Whittington, P.M. y K.E. Dixon. 1975. Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 33: 57–74.
- Wilkins, A.S. 1995. Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. **BioEssays**. 17: 71-77.
- Wolke, U., G. Weidinger, M. Kopranner y E. Raz. 2002. Multiple levels of posttranscriptional control lead to germline-specific gene expression in the zebrafish. **Curr. Biol.** 12: 289–294.
- Xu, H.Y., J.F. Gui y Y.H. Hong. 2005. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. **Dev. Dyn.** 233: 872–882.
- Yano, I. 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Mar. Biol.** 99: 549–553.

- You, E.M., K.F. Liu, S.W. Huang, M. Chen, M.L. Groumelle, S.J. Fann y H.T. Yu. 2010. Construction of integrated genetic linkage maps of the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using microsatellite and AFLP markers. **Animal Genetics**. 41: 365–376.
- Zhang, L., C. Yang, Y. Zhang, L. Li y X. Zhang. 2006. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. **Genetics**. 131: 37–49.
- Zhang, Y.P., H.T. Fu, H. Qiao, S.B. Jin, S.F. Jiang, Y. Xiong, Y. Gong y X. Zhang. 2013a. Molecular cloning and expression analysis of *transformer-2* gene during development in *Macrobrachium nipponense* (de Haan). **Journal of the world Aquaculture Society**. 44 (3): 338–349.
- Zhang, Y.P., H. Qiao, W.Y. Zhang, S.M. Sun, S.F. Jiang, Y.S. Gong, Y.W. Xiong, S.B. Jin y H.T. Fu. 2013b. Molecular cloning and expression analysis of two sex-lethal homolog genes during development in the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Genet Mol Res**. 12(4):4698-711.
- Zhao, G.F., G.L. Li y C.H. Zhu. 2009. Preliminary study on sex differentiation of *Litopenaeus vannamei*. **J. Guangdong Ocean Univ**. 3: 19–23.
- Zhou, Q.R., M.Y. Shao, Z.K. Qin, K.H. Kang y Z.F. Zhang. 2010. Cloning, characterization, and expression analysis of the DEAD-box family genes, *Fc-vasa* and *Fc-PL10a*, in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Chin. J. Oceanol. Limnol**. 28: 37–45.
- Zilch, R. 1979. Cell lineage in arthropods? **Fortschr. Zool. Syst. Evolutionforsch**. 1:19–41.

ANEXOS

ANEXO I. EXTRACCIÓN DE ARN

1. Pesar 100 mg de perlas de cristal (SIGMA)
2. Agregar 1000 μ l de TriPure en un tubo de 1.6 ml.
3. Colocar en el TriPure ~50 mg de tejido previamente lavado en H₂O DEPC para eliminar el exceso de RNAlater en el que se preservó.
4. Homogenizar la muestra con un pistilo previamente esterilizado
5. Incubar 5 min
6. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4° C
7. Adicionar 160 μ l cloroformo a cada muestra y agitar hasta obtener un color rosado (~ 15 s).
8. Incubar las muestras por 15 min a temperatura ambiente
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min.
10. Recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo de 1.6 ml.
11. Adicionar 250 μ l de isopropanol, invertir el tubo varias veces e incubar a temperatura ambiente por 15 min.
12. Adicionar 500 μ l de etanol absoluto, invertir el tubo varias veces e incubar a -20° C toda la noche.
13. Precipitar el ARN centrifugando a 12,000 rpm por 10 min a 8° C y descartar el sobrenadante.
14. Adicionar 740 μ l de etanol al 70% y lavar el pellet pipeteando suavemente.
15. Centrifugar a 7,500 rpm por 5 min a 4° C y descartar el sobrenadante quitando el exceso de etanol con la pipeta y colocando los tubos en hielo.
16. Resuspender el ARN en 50 μ l de H₂O DEPC. Almacenar a -20° C.

ANEXO II. DIGESTIÓN CON DNASA

1. Preparar 5 μ l que contengan 5 μ g de ARN
2. Agregar a cada tubo:

a. H ₂ O miliQ	3.5 μ l
b. RQ1 buffer de reacción 10x	1.5 μ l
c. RQ DNAsa	<u>5.0 μl</u>
Total	15.0 μ l
3. Incubar a 37°C por 40 min.
4. Agregar 1 μ l de RQ1 DNAsa STOP
5. Incubar a 65°C por 10 min.

ANEXO III. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNC).

1. Mezclar 5 μ l de ARN digerido con DNAsa (al menos 1 μ g por reacción) y 1 μ l de oligo (dT) en un tubo limpio de 1.6 ml y colocar en hielo.
2. Incubar a 70° C por 5 min.
3. Poner en hielo por 5 min, centrifugar 10 s y volver a colocar en hielo.
4. Preparar previamente la siguiente reaccin y añadir 14 μ l a cada tubo:

H ₂ O miliQ	5.0 μ l
ImProm II buffer 5x	4.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 μ l
dNTP's	1.0 μ l
RNAsin	1.0 μ l
ImProm II RT	<u>1.0 μl</u>
Total	14.0 μ l
+	<u>6.0 μl</u> ARN con Oligo (dt)
Volumen final	20.0 μ l
5. Incubar a 25°C por 10 min para alineamiento, a 42 ° C por 1 h para la extensión y a 70°C por 15 min para la inactivación de la enzima
6. Centrifugar y almacenar a -20° C

ANEXO IV. LIGACIÓN Y TRASFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.

a) Terminación con Adenina (A-tailing)

1. Preparar el siguiente mix:

a. Producto de PCR	6.0 μ l
b. Buffer 5x	2.0 μ l
c. MgCl ₂ (25mM)	0.6 μ l
d. dNTP's	0.4 μ l
e. <u>goTaq 5U/ μl</u>	<u>1.0 μl</u>
Volumen final	10.0 μ l
2. Incubar a 72°C por 30 min

b) Ligación con pGem T-Easy Vector

1. Preparar la siguiente reacción:

a. Buffer 2x	2.5 μ l
b. pGem T-easy vector	0.5 μ l
c. Producto PCR	1.0 μ l
d. DNA Ligasa (T4)	0.5 μ l
e. <u>H₂O miliQ</u>	<u>0.5 μl</u>
Volumen final	5.0 μ l
2. Incubar 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C
3. Almacenar a -20°C

c) Transformación de bacterias competentes

- Un día antes preparar cajas de Petri con 20 ml de medio LB/Agar/ampicilina (en 200 ml de medio: 5g LB/3g Agar /200 µl ampicilina 100mg/ml) y almacenar a 4°C.
- Calentar baño María a 42°C
- Temperar cajas Petri con medio LB/Agar/ampicilina a 37°C
 1. Descongelar bacterias en hielo
 2. En tubo de 1.5 ml agregar 5 µl de reacción de ligación en 20 µl de bacterias competentes y mezclar gentilmente
 3. Incubar en hielo por 30 min
 4. Incubar a 42°C por 45 s en baño maría e inmediatamente colocar en hielo (choque térmico),.
 5. Incubar en hielo por 2 min
 6. Agregar 250 µl de medio SOC
 7. Incubar a 37°C por una hora
 8. Preparar cada caja de Petri con 40 µl de X-Gal y 7 µl de IPTG
 9. Sembrar 50 µl de cultivo de bacterias en una caja y el resto (200 µl) en otra caja.
 10. Incubar toda la noche a 37°C

d) Levantamiento de colonias

Preparar 200 ml de LB líquido con ampicilina (10mg/ml)

1. Colocar 3 ml de medio LB/ampicilina líquido en tubo de ensayo con tapón (estéril)
2. Levantar las colonias positivas y alejadas con un palillo de madera
3. Sembrar en placa previamente etiquetada y templada a 37°C para hacer respaldo
4. Colocar el palillo en tubo con medio LB/amp. Líquido (uno por colonia)
5. Incubar a 37°C con agitación a 220 rpm toda la noche.

ANEXO V. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO (ADNp) ó MINIPREPS

1. Trasferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a tubo eppendorf
2. Centrifugar a máxima velocidad por un min y descartar por completo el sobrenadante.
3. Agregar 100 µl de solución de resuspensión (Tris-HCL 50mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; 80 µg de RNAsa) y resuspender el pellet bacteriano.
4. Agregar 100 µl de buffer de lisis (NaOH 200 mM y SDS 1%).
5. Agregar 120 µl de buffer de neutralización (Acetato de Potasio 3M pH 5.5, ajustando pH con ácido acético) y mezclar por tres min.
6. Centrifugar un min a máxima velocidad y transferir sobrenadante a un tubo nuevo previamente etiquetado.
7. Agregar 200 µl de isopropanol, mezclar por inversión e incubar por 30 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a máxima velocidad por un minuto y descartar sobrenadante.
9. Agregar 500 µl de etanol al 70% y mezclar por inversión.
10. Centrifugar a máxima velocidad por un minuto y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.
11. Agregar 25 µl de agua estéril y resuspender el pellet.

ANEXO VI. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA *EcoRI*

1. Preparar la siguiente reacción por muestra:
 - a. H₂O miliQ 7.9 µl
 - b. BSA 0.1 µl
 - c. Buffer H 1.0 µl
 - d. *EcoRI* 1.0 µl

Volumen final 10.0 µl
3. Agregar 3 µl de ADNp
4. Incubar a 37°C por hora y media.
5. Verificar producto de digestión por electroforesis en gel de agarosa para evaluar que colonia presenta el inserto.

ANEXO VII. PURIFICACIÓN POLY (A)

1. Preparar 1 mg de ARN en 750 µl de agua libre de nucleasas.
2. Agregar 750 µl de Bindig Solution y mezclar por inversión.
3. Agregar esta mezcla al tubo con oligo (dT) celulosa y mezclar en vortex hasta deshacer los grumos.
4. Incubar a 75°C en baño María por 5 min.
5. Incubar 1 h en agitación a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min.
7. Remover sobrenadante con pipeta y guardar a 4°C (se puede usar posteriormente para extraer cualquier residuo de ARN de la solución).
Calentar Storage solution a 80°C
8. Agregar 500 µl de solución de lavado 1 al pellet y resuspenderlo con vortex.
9. Agregar mezcla a columna de centrifugación y centrifugar por 3 min a 12000 rpm, descartar el filtrado.
10. Agregar 500 µl de solución de lavado 1 y mezclar con vortex.
11. Centrifugar 3 min a 12000 rpm y descartar el filtrado.
12. Agregar 500 µl de solución de lavado 1 y mezclar con vortex, centrifugar 3 min a 12000 rpm y descartar el filtrado
 - a. Repetir 3 veces.
 - b. Pasar columna a tubo de recolección nuevo.
13. Agregar 200 µl de Storage Solution a 80° y mezclar con vortex.
14. Centrifugar de inmediato a 14000 rpm por 2 min.
15. Agregar 200 µl de Storage Solution a 80°C, mezclar con vortex y centrifugar de inmediato a 14000 rpm por 2 min
 - a. MANTENER EL FILTRADO
16. Agregar 40 µl de Acetato de amonio 5 M, 1 µl de glucógeno y 1100 µl de etanol al 100%.
17. Precipitar a -20°C toda la noche o a -80°C por 30 min.
18. Centrifugar a 14000 rpm por 30 min a 4°C.
19. Descartar sobrenadante con punta, centrifugar 1 min. de nuevo para retirar exceso con punta.
20. Agregar 1 ml de etanol al 70%, mezclar con vortex y centrifugar a 14000 rpm por 10 min a 4°C. Descartar sobrenadante cuidadosamente con punta.
21. Resuspender en Storage Solution (80°C) y almacenar a -70°C.

ANEXO VIII. AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE TERMINACIONES DE ADNc (RACE)

1. Preparar las siguientes reacciones

Reactivo	3'RACE (μl)	5'RACE (μl)
Buffer FS 5x	2	2
DTT 20 mM	1	1
dNTP's 10 mM	1	1
Volumen final	4	4

2. Preparar las siguientes reacciones

Reactivo	3'RACE (μl)	5'RACE (μl)
RNA Poly (A)	1	1
CDS Primer A	1	1
H ₂ O deionizada	2.75	1.75
Volumen final	4.75	3.75

- Incubar ambas reacciones a 72°C por 3 min (desnaturalización) y a 42°C por 2 min.
- Poner en hielo inmediatamente.
- Agregar 1 μl de SMARTER II A Oligo al tubo de reacción 5' del paso 2 para obtener volumen final de 4.75 μl.
- Tomar 4μl del paso 1 y agregar a cada reacción:
 - Inhibidor de RNAsa (40U/μl) 0.25 μl
 - SMART Scribe RT 1.0 μl
 - Volumen final 5.25 μl
- Mezclar las reacciones de los paso 2 y 6 (Después de la desnaturalización y de agregar el Oligo) para obtener volumen final de 10 μl.
- Incubar a 42°C por 90 min y a 70°C por 10 min
- Diluir por separado el ADNc 3' y 5' en 250 μl de buffer EDTA tricina.

ANEXO IX. TRATAMIENTO DE LAMINILLAS CON POLY-L-LISINA

- Sumergir laminillas en solución lavado (33 g de NaOH, 133 ml de etanol 95% y 133 ml de agua MiliQ) durante 30 min.
- Sumergir las laminillas en agua MiliQ varias veces hasta eliminar la solución de lavado por completo.
- Secar con papel limpio libre de residuos.
- Sumergir las laminillas por completo en solución de Poly-L-lisina 10% (con agua MiliQ o DEPC) por 30 min.
- Sumergir una sola vez con agua MiliQ y retirar inmediatamente.
- Sumergir una sola vez con etanol 100% y retirar inmediatamente.
- Dejar secar a temperatura ambiente o en campana de extracción.
- Almacenar en refrigeración hasta su uso no más de 14 días.

ANEXO X. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON Apa I Y PstI

1. Prepara las siguientes reacciones por sonda:

	Apa I (μl)	Pst I (μl)
Agua estéril	34.5	34.5
Buffer 10x	(A) 5	(H) 5
BSA	0.5	0.5
Enzima	5	5
Total	45	45

2. Agregar 5 ul de DNAP
3. Incubar a 37°C toda la noche
4. Verificar el producto de la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1%, cortar cada banda con navaja estéril y purificar.

ANEXO XI. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE DIGESTIÓN

1. Pesar tubo de 1.6 ml antes de cortar el gel
2. Cortar el fragmento de tamaño esperado con navaja estéril
3. Añadir 10 μl de membrane binding solution por cada 10 mg de gel
4. Incubar 10 min a 50-65°C y vortexear cada 2 a 3 min hasta disolver el gel.
5. Colocar en columna un tubo colector por muestra
6. Trasferir el producto disuelto a la columna e incubar por 1 min a temperatura ambiente
7. Centrifugar a 12000 rpm por 1 min
8. Descartar el lavado y lavar con 700 μl de membrane wash solution
9. Centrifugar a 12000 rpm por un minuto y descartar el lavado
10. Lavar con 500 μl de membrane wash solution
11. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min y descartar el lavado
12. Colocar la columna en tubo eppendorf de 1.6 ml nuevo
13. Agregar 25 μl de agua libre de nucleasas e incubar 1 min a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 12000 rpm por 1 min
15. Repetir los pasos 13 y 14.
16. Retirar la columna y almacenar a -20 °C

ANEXO XII. TRASCIPCIÓN Y MARCAJE DE RIBOSONDAS

1. Colocar 10 μl de plásmido linearizado en dos tubos de 1.6 ml y agregar 3 μl de agua DEPC a cada uno, mezclar y colocar en hielo.
2. Preparar las siguientes reacciones:

	SP6 (Apa I) μl	T7 (Pst I) μl
10x NTP labeling mixture (vial 7)	2.0	2.0
10x transcription buffer (vial 8)	2.0	2.0
RNase inhibitor	1.0	1.0
RNA polymerase SP6	2.0	---
RNA polymerase T7	---	2.0
Total	7.0	7.0

3. Mezclar y centrifugar brevemente
4. Incubar por 2 h a 37 °C
5. Agregar 2 µl de DNAsa I (vial 9 del kit) e incubar por 15 min 37 °C
6. Detener la reacción con 2 µl de EDTA 0.2M a pH 8 (preparar previamente ya que no lo incluye el kit)
7. Volumen final 21 µl por sonda. Almacenar a 20 °C.

ANEXO XIII. HIBRIDACIÓN

Antes de empezar preparar paraformaldehído 4%

Desparafinar e hidratar los tejidos (laminillas) de la siguiente forma:

Paso	Solución	Tiempo (min)
1	Xilol	10
2	Xilol	10
3	Etanol absoluto	5
4	Etanol 90%	5
5	Etanol 80%	5
6	Etanol 50%	5
7	H2O DEPC	5
8	PBS 1x (DEPC)	5

Nota: todas las soluciones deben estar preparadas con agua tratada con DEPC o libre de nucleasas.

9. Drenar las laminillas y colocar en cámara húmeda con SSC 2x, agregar 100 µl de Proteinasa K (10ug /ml) a cada laminilla (solución de trabajo = 0.5 µl de proteinasa K 20 mg/ml a 999.5 µl de PBS 1x DEPC) y cubrir con parafilm evitando dejar burbujas, e incubar 15 minutos a 37 °C.

10. Lavar las laminillas en PBS 1x (DEPC) durante 5 minutos.

11. Post-fijar las muestras en paraformaldehído al 4% pH 7.4 durante 20 minutos.

12. Lavar las laminillas en PBS 1x (DEPC) nuevo dos veces durante 5 minutos cada uno.

13. Lavar en agua DEPC durante 5 minutos

Deshidratar las muestras de la siguiente forma:

Paso	Solución	Tiempo (min)
14	Etanol 50%	5
15	Etanol 80%	5
16	Etanol 90%	5
17	Etanol absoluto	5

Nota: todas las soluciones deben estar preparadas con agua tratada con DEPC

18. Colocar laminillas en cámara húmeda (SSC 2x) Dejar secar las laminillas durante 20 minutos al aire libre (encender horno de hibridación a 42°C).

19. Preparar sondas de hibridación:

Tubo 1 = mezclar pipeteando varias veces 3 μ l de sonda sentido con 66 μ l de solución de hibridación (por laminilla).

Tubo 2 = mezclar pipeteando varias veces 3 μ l de sonda anti-sentido con 66 μ l de solución de hibridación (por laminilla).

20. Agregar 70 μ l de sonda de hibridación a cada laminilla y cubrir con papel parafilm evitando dejar burbujas de aire e incubar toda la noche a 42 °C (verificar que la cámara húmeda este correctamente cerrada).

ANEXO XIV. LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN

21. Lavar dos veces con buffer de lavado 1 (SSC, SDS) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

22. Lavar dos veces con buffer de lavado 2 (SSC, SDS) durante 5 minutos cada uno a 42 °C

23. Lavar con buffer de lavado 3 (Ac. Maléico, tween 20) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

24. Drenar las laminillas y colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 100 μ l de solución de bloqueo 1x (10 μ l solución de bloqueo 10x mas 90 μ l de buffer de ácido maléico) por laminilla, cubrir con parafilm (sin dejar burbujas) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

25. Drenar las laminillas, colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 100 μ l de solución de anticuerpo a cada laminilla (1 μ l de Anti-Dig mas 999 μ l PBS 1x 1:100), cubrir con parafilm e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

26. Lavar dos veces con buffer de lavado 3 (Ac. Maléico, tween 20) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

27. Drenar las laminillas, colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 100 μ l de buffer de detección a cada laminilla, cubrir con parafilm e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

28. Drenar las laminillas, colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 150 μ l de solución de revelado (3 μ l de NBT/BCIP mas 147 μ l de buffer de detección) por laminilla, cubrir con parafilm e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

29. Lavar las laminillas con agua destilada ultrapura estéril.

30. Contrateñir con café de Bismark 0.5% durante 10 minutos.

31. Lavar con agua destilada ultrapura estéril por 5 minutos.

32. Deshidratar con etanol al 50, 70, 90 y absoluto.

33. pasar por dos xiloles, colocar resina y cubreobjetos. Dejar secar toda una noche a temperatura ambiente.

ANEXO XV. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y TRADUCCIÓN CONCEPTUAL POR VARIANTES *Sxl* SEXO-ESPECÍFICAS DE *L.vannamei*.

Emb1068/335

```

1 AACGGAGCTCGCGGCGAAAAATCGAGGAGCGAATTATCTGAGAGGTTGGCACGCGTGAGTC 60
61 AATGTTTGTGTGCCCCACGCGCGTCCACCCGGCATCGCTCTCGCCTCCAAAAGCTACATG 120
121 TTTTGTAAATTTAGGTTAGGCTTGGGAAGAGGAAGTACACAAtgagttttgagtcacct 180
1 °M S F E S S 6

181 agcagccccggtcagcgcttcccgatgggaaacgcaacaacaccttatcatcaactac 240
7 S S P G S A L P D G E T R T N L I I N Y 26

241 ctgccacagactctcactgacgggaagttttacaagatattgtgtgtgctgggcccac 300
27 L P Q T L T D G K F Y K I F V V V G P I 46

301 aaaaactgcccattatgaaggatttaaagcagactggctttcccttcggattcggcttc 360
47 K N C R I M K D L K Q T G F P F G F G F 66

361 gtggagtaccagaagccagaggacgctgcaaaggccatcctgcaattgaacaacctccca 420
67 V E Y Q K P E D A A K A I L Q L N N L P 86

421 gtgcagcacaacgatatcaaggctcctatgccccgccccctggtgaggacatcaaggaa 480
87 V Q H K R I K V S Y A R P P G E D I K E 106

481 accaacctctacattcagaatattcccagaaggaacagactccaaggaacaacacctt 540
107 T N L Y I Q N I P R K E T D S K E T N L 126

541 tacattgcaatgttccaagaccatacacattagaccagtttagaggaactgttctcttca 600
127 Y I A N V P R P Y T L D Q L E E L F S S 146

601 tatggccagattgtccagaagaatttgcctgaaggacaaggttacaggacttccacgtggc 660
147 Y G Q I V Q K N L L K D K V T G L P R G 166

661 gttggatttgtgaggtttgataagaagtctcaggcagaagcggcgattgtgggcatgaat 720
167 V G F V R F D K K S Q A E A A I V G M N 186

721 ggcggttctccgagggtgggactgagcccctagtgttaaggtagcggaggagcacggc 780
187 G V V P E G G T E P L V V K V A E E H G 206

781 aaaatgaaggctgcctactacgctggttaccatgctggcctcagcaccacgagaggtggc 840
207 K M K A A Y Y A G Y H A G L S T T R G G 226

841 ggcggtgtcggtcgagggcgtggttaactacaacaaccgagggggaggtggtggtgctac 900
227 G G V G R G R G N Y N N R G G G G G G Y 246

901 cagggacgagggaaactacaataatggtggttaagatagccccgaccgaaccgcaaac 960
247 Q G R G N Y N N M G G K I A P D R T A N 266

961 cgctacaaccgcatcgccagcggcgggcctatggcggtgggtacggaggtgggtatggc 1020
267 R Y N P I G S G G G Y G G G Y G G G Y G 286

1021 agtggcgggagttccttgggtaactccaatgatgcggtggccaatcctcgttctacagc 1080
287 S G G S S L G Y S N D A A G Q S S F Y S 306

1081 tctccacgcttccctcagtggtgggaaattacacatcgttctccggcatgagtaataac 1140
307 F S T P S F S G G N Y T S F S G M S N N 326

1141 tctggtggcgggcctatagtagtactgaAGCCAGCCCGTGTAAACAACAGCAACA 1200
327 S G G G G Y S R Y * 335
1201 ACAACAAAACGTGTTCTATGAGTGACAAGGAAAAAAAAAATGGCTTTCACGCGGGGAGCT 1260
1261 CTTCAATGAATAACAAAAAAGCAAAAAATACAAAAAATAAGGTAAGGGATTAAGG 1320
1321 TAACATGGATGAAAAGATTAACAAACAAAAAATAAGGGAATTACACAAAAGCAAAT 1380
1381 TTTCAATTGTTTTTTGTAGGATGGGAAATACTTAAATAAAAAAGAGGGAAAAAATACC 1440
1441 ACAGGAGCTTATCAACCTATTTACCCATGGTTTTTTAGGAGAAAAGTTTTTCATCCATC 1500
1501 TTTATTTTTTGTGGTAAGGAGTGGTATTTATGGTATTCCTATCAAGGTCATTTGTTGGG 1560
1561 TCATTTTTTCCCCACACGGAGAAGGTGGCCATCGGTGCATAAAAACCTTTCTTAAAGATG 1620
1621 TTGGCATCGGATGGCCTACAAAACCTAGTTTTTAAACTTAAAAAAAAAAAAAATTA 1680
1681 AAAAAAAAAAAAAA 1695

```

Secuencia nucleotídicas y traducción conceptual a aminoácidos de variantes *Sxl* de embrión (Emb1068) *L. vannamei*. El sitio de inicio de la traducción está señalado con °, los sitios de reconocimiento de ARN (RRM1 y 3 completos y RRM2 trunco) sombreado en gris, el codón de paro con * y señal de poli adenilación subrayado. Las flechas señalan los sitios de splice, en negro no splice 642 a 692 (50pb) y en blanco splice 1059 al 1135 (76 pb), en rosa el triplete AAA que no codifica el marco de lectura en esta variante.

Hembra1253/319, Macho 1334/244 y 1934/215.

```

1 AACCGAGCTCGCGCGAAAATCGAGGAGCGAATTATCTGAGAGGTTGGTACGCGTGAGTC 60
61 AATGTTTGTGTGCCCCACGCGCTCCACCCGGCATCGCTCTCGCTCCAAAAGCTACATG 120
121 TTTTTGTTAATTTAGGTTAGGCTTGGGAAGAGGAAGTACACAatgagttttgagtcattc 180
1 °M S F E S S 6
   °M S F E S S
   °M S F E S S
181 agcagccccagctcagcgcttcccgatgggaaacgcgaacaaaccttatcatcaactac 240
7 S S P S S A L P D G E T R T N L I I N Y 26
  S S P S S A L P D G E T R T N L I I N Y
  S S P S S A L P D G E T R T N L I I N Y
241 ctgccacagactctcaccgaccaggagttttacaagatattgtgtgtgctgggcccac 300
27 L P Q T L T D Q E F Y K I F V V V G P I 46
  L P Q T L T D Q E F Y K I F V V V G P I
  L P Q T L T D Q E F Y K I F V V V G P I
301 aaaaactgccgcattatgaaggatttaaagcagactggcattccttcggattcggcttc 360
47 K N C R I M K D L K Q T G I P F G F G F 66
  K N C R I M K D L K Q T G F S F G F G F
  K N C R I M K D L K Q T G F S F G F G F
361 gtggagtaccagaagccagagggacgctgcaagggccatcctgcaattgaacaacctcca 420
67 V E Y Q K P E D A A K A I L Q L N N L P 86
  V E Y Q K P E D A A K A I L Q L N N L P
  V E Y Q K P E D A A K A I L Q L N N L P
421 gtgcagcacaacgatcaaggctcctatgccggccccctggtgaggacatcaaggaa 480
87 V Q H K R I K V S Y A R P P G E D I K E 106
  V Q H K R I K V S Y A R P P G E D I K E
  V Q H K R I K V S Y A R P P G E D I K E
481 accaacctctacattcagaatattcccagatcatacacattagaccagttagaggaaactg 540
107 T N L Y I Q N I P R S Y T L D Q L E E L 126
  T N L Y I Q N I P R S Y T L D Q L E E L
  T N L Y I Q N I P R S Y T L D Q L E E L
541 tctcttcataatggccagattgtccagaagaatttgctgaaggacaaggttacaggactt 600
127 F S S Y G Q I V Q K N L L K D K V T G L 146
  S S S Y G Q I V Q K N L L K D K V T G L
  S S S Y G Q I V Q K N L L K D K V T G L
601 ccacgtggcggttgattgtgaggtttgataagaagtctcaggcagaagcgcgattgtg 660
147 P R G V G F V R F D K K S Q A E A A I V 166
  P R G V G F V R F D K K S Q A E A A I V
  P R G V G F V R F D K K S Q A E A A I V
661 ggcataatggcgttggcccgagggtgggactgagcccctagtggtaagtagcggag 720
167 G M N G V V P E G G T E P L V V K V A E 186
  G M N G V V P E G G T E P L V V K V A E
  G M N G V V P D G G T E P L V V K V A E
721 gagcacggcaaaatgaaggctgcctactacgctggttaccatgctggcctcagcaccag 780
187 E H G K M K A A Y Y A G Y H A G L S T T 206
  E H G K M K A A Y Y A G Y H A G L S T T
  E H G K M K A A Y Y A G Y H A G L S T T
781 agaggtggcgcgctcggtcagggcggtggttaactacaacaaccgagggggaggtggt 840
207 R G G G G V G R G R G N Y N N R G G G 226
  R G G G G V G R G R G N Y N N R G G G G
  R G G G G V G R G R G N Y N N R G G G G
  agaggtggcgcggtgctcaggggtggttaa
  R G G G G V A G W *
841 ggtggctaccagggacgaggggaactacaataatagcaggggtggaagatagccccggac 900
227 G G Y Q G R G N Y N N M Q G G K T A P D 246
  G G Y Q G R G N Y N N M Y H H R W Y*
901 cgaaccgcaaccgctacaaccgatcggcagcggcggtatggcggtgggtacgga 960
247 R T A N R Y N P I G S G G G Y G G G Y G 266
961 ggtgggtatggcagtgccggaattccttgggtactccaatgatggcggtggccaatcc 1020
267 G G Y G S G G N S L G Y S N D A A G Q S 286
1021 tcgttctacagcttctccacgccttctcctcagtgggggaaattacacatcgttctccggc 1080
287 S F Y S F S T P S F S G G N Y T S F S G 306
1081 atgagtaataactctggtggcgcggtatagtaggtactgaAGCCCAGCCCGGTGTTAA 1140
307 M S N N S G G G G Y S R Y * 319

```

Secuencias nucleotídicas y traducción conceptual a aminoácidos de variantes *L. vannamei* Hembra1253/319 en negro, Macho1334/244 en verde y Macho1394/215 en azul. El sitio de inicio de la traducción está señalado con °, los sitios de reconocimiento de ARN (RRM1 y 2) sombreado en gris, el codón de paro con *. Las flechas en blanco señalan los sitios de splice 642 a 692 (50pb) y 1059 al 1135 (76 pb). Los recuadros negros señalan diferencias entre las secuencias de aminoácidos y sombreado amarillo las diferencias nucleotídicas. En rosa el triplete AAA que no modifica el marco de lectura de estas variantes.

Hembra1292 (Hembra y Embrión)

```

1 AACGGAGCTCGCGCGAAAAATCGAGGAGCGAATTATCTGAGAGGTTGGCACGCGTGAGTC 60
61 AATGTTTGTGTGCCCCACGCGCTCCACCCGGCATCGCTCTCGCCTCCAAAAGCTACATG 120
121 TTTTGTAAATTTAGGTTAGGCTTGGGAAGAGGATACACAatgagttttgagtcac 180
1 °M S F E S S 6

181 agcagccccagctcagcgcttcccgatggggaacgcgaacaaacctatcatcaactac 240
7 S S P S S A L P D G E T R T N L I I N Y 26

241 ctgccacagactctcaccgaccaagagttttacaagatatttgttgttgcgggccatc 300
27 L P Q T L T D Q E F Y K I F V V V G P I 46

301 aaaaactgccgattatgaaggatttaagactggctattccttcgggttcggcttcgtg 360
47 K N C R I M K D L K T G Y S F G F G F V 66

361 gagtacaaaaagccagaggacgctgcaaaggccatcctgcaattgaacaacctcccagtg 420
67 E Y Q K P E D A A K A I L Q L N N L P V 86

421 cagcacaacgtatcaaggtctcctatgccccggccccctggtgaggacatcaaggaa 480
87 Q H K R I K V S Y A R P P G E D I K E P 106

481 acctctacattcagaatattcccagatcatacacattagACCAGTTAGAGGAACTGTCT 540
107 T S T F R I F P D H T H * 118
541 CTTCATATGGCCAGATTGTCCAGAAGAATTTGCTGAAGGACAAGGTTACAGGACTTCCAC
601 GTGGCGTTGGATTTGTGAGGTTTGATAAGAAGTCTCAGGCAGAAGCGGCGATTGTGGGCA 660
661 TGAATGGCGTTGTTCCCGACGGTGGGACTGAGCCCCCTAGTGGTTAAGGTAGCGGAGGAGC 720
721 ACGGCAAAATGAAGGCTGCTTATTACGCTGGTTACCATGCTGGCTTACAGCACCACGAGAG 780
781 GTGGCGCGTTTTCGTTGAGGGCGTGGTAACACACCAACCGAGGGGGAGGTGGTGGTG 840
841 GCTCCAGGGACGAGGGAATTCATTAAATATGGGTGGTAAGATAGCCCCGGACCGAACC 900
901 CCAACCGTTACAACCCGATCGGCAGCGGGCGGTTATGGCGGTGGGTACGGAGGTGGGT 960
961 ATGCCAGTGGCGGAGTTCCTTGGGTTACTCCAATGATGCGGCTGGCCAATCCTCGTFTT 1020
1021 ACAGTTTTTCCACCCCTTCTTCAGTGGGGGAAATTACACATCGTTTTCCGGCATGAGTA 1080
1081 ATAATTTTGGTGGCGCGGTTATTGTAGGTACTGAAGCCCAGCCCCGTGTTAAATAACAG 1140
1141 CAACAACAACAAAACGTGTTTATGAGTGCCAAGGAAAAAAGAATGGTTTTACGGGGG 1200
1201 GAGTTTTTTCATGAATAACAAAAAAGCAAAAAATACAAAAAATAAGTAAGGATTA 1260
1261 GTAACATGATGAAAGATTAAAAACAAAACAAATAAGGAATTACACAAAGCAATTTTCATGTT 1320
1321 TTTTGTAGATGAAATACTAAAAATAAAAGAGGAAAAATTTAAAAAATAAAAAAAAAA 1380
1381 AAAAAAAAAACGGAGCTCGCGCGGAAAAATCGAGGAGCGAATTATCTGAGAGGTTGGCACG 1440
1441 CGTGAGTCAATGTTTGTGTGCCCCACGCGCGTCCACCCGGCATCGCTTCGCTCCAAA 1500
1501 GCTACATGTTTTGTTAATTTAGGTTAGGCTTGGGAAGAGGAAGTACACAATGAGTTTTG 1560
1561 AGTCATCTAGCAGCCCAGCTCAGCGCTTCCCGATGGGAAACCGCAACAAACCTTATCA 1620
1621 TCAACTACCTGCCACAGACTCTCACCAGCAAGAGTTTTACAAGATATTTGTTGTTGTCG 1680
1681 GGCCCATCAAAAAGTCCCGCATTTATGAAGGATTTAAAGACTGGCTATTCCTTCGGGTCG 1740
1741 GCTTCGTGGAGTACCAAAAAGCAGAGGACGCTGCAAAGGCCATCCTGCAATTGAACAACC 1800
1801 TCCCAGTGCAGCACAACGATCAAGGTCTCCTATGCCCGGCCCTGGTGAGGACATCA 1860
1861 AGGAACCAACCTCTACATTCAGAATATTTCCAGATCATAACATAGACCAGTTAGAGGA 1920
1921 ACTGTTCTTTCATATGGCCAGATTGTCCAGAAGAATTTGCTGAAGGACAAGGTTACAGG 1980
1981 ACTTCCACGTGGCGTTGGATTTGTGAGGTTTGATAAGAAGTCTCAGGCAGAAGCGCGGAT 2040
2041 TGTGGGCATGAATGGCGTTGTTCCCGACGGTGGGACTGAGCCCTAGTGGTTAAGGTAGC 2100
2101 GGAGGAGCACGGCAAAATGAAGGCTGCTTATTACGCTGGTTACCATGCTGGCTTCAGCAC 2160
2161 CACGAGAGGTGGCGCGTTTTTCGTTGAGGGCGTGGTAACACCAACCGAGGGGGAG 2220
2221 TGGTGGTGGCTCCCAGGGACGAGGGAATTCATTAATATGGGTGGTAAAGATAGCCCCGGA 2280
2281 CCGAACCGCAACCGTTACAACCCGATCGGCAGCGGGCGGTTATGGCGGTGGGTACGG 2340
2341 AGGTGGGTATGCCAGTGGCGGGAGTTCCCTTGGGTTACTCCAATGATGCGGCTGGCCAATC 2400
2401 CTCGTTTTACAGTTTTTCCACCCCTTCTTCAGTGGGGGAAATTACACATCGTTTTCCGG 2460
2461 CATGAGTAATAATTTTGGTGGCGCGGTTATTGTAGGTACTGAAGCCAGCCCGTGTTA 2520
2521 AATAACAGCAACAACAACAAAACGTGTTTTATGAGTGCCAAGGAAAAAAGAATGGTTTT 2580
2581 CACGGGGGAGTTTTTTCAATGAATAACAAAAAAGCAAAAAATACAAAAAATAAGTA 2640
2641 AGGATTAAGTAACATGATGAAAGATTAACAACAAAACAAATAAGGAATTACACAAGCAAT 2700
2701 TTCATGTTTTTGTAGATGGAATACTAAAAATAAAAGAGGAAAAATTTAAAAAATAA 2760
2761 AAAAAAAAAAAAAAAAAA 2776

```

Secuencia nucleotídica y traducción conceptual a aminoácidos de variante *Sxl* hembra y embrión (Hembra1292) de *L. vannamei*. El sitio de inicio de la traducción está señalado con °, el codón de paro prematuro con *, el sitio de reconocimiento de ARN (RRM1) sombreado en gris y señal de poli adenilación subrayado. En rosa la delección de una adenina que cambia el marco de lectura, el recuadro negro señala los aminoácidos que cambian en relación a las otras variantes.