



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL
PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN CETÁCEOS Y SU
APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DE CACHALOTES
(*Physeter macrocephalus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

Nadia Tamara Rubio Cisneros

La Paz, B.C.S., diciembre del 2005

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 16 del Mes de noviembre del 2005, 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:

“Desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real para la determinación del sexo en cetáceos y su aplicación en el estudio de cachalotes (*Physeter macrocephalus*) del Golfo de California.”

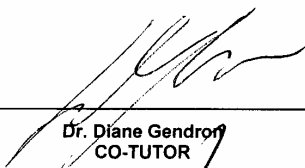
Presentada por el alumno:

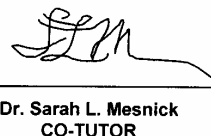
Nadia Tamara Rubio Cisneros

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

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


Dr. Diane Gendron
CO-TUTOR


Dr. Sarah L. Mesnick
CO-TUTOR


Dr. Ricardo Vázquez Juárez
DIRECTOR DE TESIS

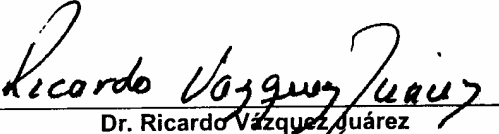

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real para la determinación del sexo en cetáceos y su aplicación en el estudio de cachalotes (*Physeter macrocephalus*) del Golfo de California. ”

Resumen

La determinación del sexo en cetáceos es esencial para el estudio de sus poblaciones, pero en observaciones de campo esta limitada por la presencia de genitales internos y la carencia de dimorfismo sexual en la mayoría de las especies de este orden. Los métodos genéticos usados hasta ahora para la determinación del sexo se limitan a algunas especies, amplifican regiones grandes (300-700 bp) y requieren en su mayoría de ADN de alta calidad. Se desarrolló el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa, el cual está basado en la amplificación de SNP's (polimorfismos nucleotídicos simples) en los genes ZFX y ZFY. Se utilizaron sondas fluorescentes y oligonucleótidos diseñados de regiones conservadas de los genes ZFX/ZFY de 7 familias de cetáceos. El ensayo obtiene un producto pequeño de 105 pb y permitió determinar el sexo 33 especies de cetáceos de 9 familias distintas de forma rápida y definitiva. Posteriormente, se aplicó este ensayo en 66 muestras de piel descamada de cachalote, tejido que se caracteriza por tener baja concentración y calidad de ADN. El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa fue exitoso en piel descamada ya que se amplificó el 83% de las muestras. En conjunto, se asoció la información del sexo con la presencia o ausencia del “callo” de la aleta dorsal para 19 individuos. Se determinó que en mayoría las hembras de distintas clases de edad presentan callo pero también se registró un macho joven con callo. Se utilizaron microsatélites para individualizar 9 cachalotes machos adultos muestreados en el Golfo de California entre 1996 y 2004. No se encontraron recapturas entre éstos machos adultos, lo cual es consistente con la sugerencia de que el Golfo de California representa un área importante de reproducción y crianza para esta especie.

Palabras clave: cetáceos, polimorfismos nucleotídicos simples SNP's, determinación del sexo, 5' exonucleasa, *Physeter macrocephalus*.


Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Abstract

In cetaceans sex determination is essential for population studies. But is difficult at field because most species lack sexual dimorphism and have internal genitalia. Previous genetic sexing methods have been limited to a subset of species, and require sampling of high quality DNA. We developed a 5'-exonuclease fluorescent assay based on ZFX/ZFY gene orthologs. This method produces a small 105-bp PCR product. Using primers and sex-specific fluorescent probes designed from conserved regions of seven families, a rapid, highly sensitive, and unambiguous sex determination is available. We demonstrated sex specificity for 33 cetacean species in nine families. We found the ZFX/ZFY 5'-exonuclease assay method highly successful for sloughed skin of 66 samples of sperm whales. This is important because slough skin usually bears low quality or concentration of DNA. Of the 66 sperm whale samples 19 had information on the presence or absence of callus. The animals bearing the callus were mainly females from different age classes but one juvenile male had a callus. Microsatellite markers were used to search for individual identity in adult male sperm whales from the Gulf of California between 1996 and 2004. We did not find individual matches between the adult males that were sampled. These results are consistent with the suggestion that the Gulf of California is an important breeding ground for sperm whales.

Keywords: cetaceans, single nucleotide polymorphisms, 5' exonuclease, *Physeter macrocephalus*, sex determination

El comité tutorial y revisor del examen de grado que estuvo integrado por:

Dr. Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Director CIBNOR S. C.

Dr. Diane Gendron, Cotutor CICIMAR-IPN¹

Dr. Sarah L. Mesnick SWFSC, Cotutor SWFSC²

El jurado del examen de grado estuvo integrado por:

Dr. Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Director CIBNOR S. C.

Dr. Diane Gendron, Cotutor CICIMAR-IPN¹

Dr. Sarah L. Mesnick SWFSC, Cotutor SWFSC²

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez, Suplente CIBNOR S. C.

1. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S.

2. Southwest Fisheries Science Center, NOAA Fisheries, La Jolla CA.

MUCHAS GRACIAS!!!

Mamá, hermanito y a cada uno de los miembros de mi familia por estar conmigo en cada paso y darme todo el amor y apoyo necesarios para continuar cumpliendo mis metas y objetivos.

A mis hermanitos del alma que siempre han ido conmigo a pesar de la distancia: Carlitos y Chonch.

A mis amiguitos y amiguitas que han estado conmigo a lo largo de estos 2 años de la maestría brindándome su sincera amistad y apoyo: hermanis Zeidis, Lily, Memito, Hector, Catalina, Octavio, Alex Olivera y Karola.

A mis amigos de San Diego que me cuidaron durante todo un año de estancia y me dieron todo su cariño: Josh, Ezequiel, Cristina, Melisa, Anette, Mark.

A mis amigos de generación del CIBNOR: Aline, Alex Ramos, Gaby, Maria, Rosario, Camilo, Polo, Albert, Yummy, Horacio, Annie, Tony, Wences, Lupita.

My dear Ira thanks!!! for the infinite friendship, care and spiritual support during these two crazy busy busy years.....thanks for always having a moment for me.

A Sarah por todo el apoyo y amistad, gracias por tus ganas de querer enseñarme a hacer el trabajo que más me gusta.

A Diane por su apoyo incondicional y dedicación para este proyecto.

A Ric por creer en mí y darme la confianza, amistad y apoyo en el tiempo que llevo de conocerlo.

Al Laboratorio de Ecología Molecular del Southwest Fisheries Science Center (SWFSC), NOAA-Fisheries quien patrocina el proyecto de esta tesis, en particular a Phillip Morin, Carrie Le Duc, Kelly Robertson, John Hyde y Aimee Lang.

Al CONACYT por la beca # 178290 otorgada para llevar a cabo la maestría.
Al CIBNOR, departamento de Posgrado y departamento de cómputo por ofrecer las facilidades, espacios y apoyo económico para llevar a cabo el grado de Maestría.

CONTENIDO

Capítulo 1: Determinación del sexo en cetáceos por medio del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	1
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1. Cetáceos.	2
2.2. Determinación del sexo en cetáceos y su importancia en el estudio de la ecología de poblaciones.....	2
2.3. Cromosomas Sexuales y Determinación del sexo en mamíferos.....	6
2.4. Desarrollo de las técnicas de determinación del sexo en cetáceos.....	7
2.5. Bases para el desarrollo del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.....	11
3. Objetivo	13
4. Materiales y Métodos	14
4.1. Muestras utilizadas para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	14
4.2. Cebadores y sondas diseñadas para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	16
4.3. Optimización del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	17
4.3.1. Optimización de los cebadores CETZFX_Y_F1 y CETZFX_Y_R1 a través del uso de PCR.	17
4.3.2. Optimización del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa a través de PCR en tiempo real.	20
4.3.2.1. Prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY.....	21
4.3.2.2. Prueba de concentración de los cebadores.....	22
4.3.2.3. Prueba de tipos de <i>Taq</i> polimerasa	22
4.3.2.4. Prueba de Suero de Albúmina Bovina SAP (BSA Bovine Serum Albumina por sus siglas en inglés).....	23
4.3.2.5. Cantidad de ADN: PCR cuantitativo (qPCR).....	23
4.3.2.6. Prueba de sensibilidad a la contaminación con ADN humano para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.....	24
4.3.2.7. Replicabilidad del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	24
5. RESULTADOS	25

5.1. Optimización de cebadores CETZFX_Y_F1 y CETZFX_Y_R1 por medio de PCR.....	25
5.2. Optimización de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real.....	26
5.2.1. Prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY.	28
5.2.2. Prueba de concentración de los cebadores.	30
5.2.3. Prueba de tipos de <i>Taq</i> polimerasa.....	32
5.2.4. Prueba de Suero de Albúmina Bovina SAB (BSA Bovine Serum Albumina por sus siglas en inglés).	33
5.2.5. Cantidad de ADN: PCR cuantitativo (qPCR).	35
5.2.6. Prueba de sensibilidad a la contaminación con ADN humano para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	36
5.2.7. Replicabilidad del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	38
5.2.8. Resultados del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la determinación del sexo en diferentes especies de cetáceos.....	39
6. Discusión.....	39
6.1. Resultados de la optimización de la prueba exonucleasa 5' ZFX/ZFY.....	40
6.2. Propuestas y Recomendaciones.	43
6.3. Beneficios del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.....	45
7. Literatura Citada.....	46

Lista de Tablas: Capítulo 1

- Tabla I. Muestras usadas para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para determinar el sexo. La columna del método presenta los métodos con que las muestras fueron sexadas ya sea para obtener el sexo del individuo por primera vez, o bien para confirmar el sexo del individuo en algunos casos. La sonda SRY se refiere al método de Fain y Lemay (1995). 14
- Tabla II. Cebadores utilizados para amplificar la región de 105 pares de bases de los genes ZFX y ZFY. 17
- Tabla III. Sondas Taq Man utilizadas en el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa. 17
- Tabla IV. Reactivos de la mezcla de PCR utilizadas en los procesos de optimización de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa. La concentración final, se refiere a 25 µl de reacción de PCR. El amortiguador 10X tiene iones de Mg²⁺. Las diferentes concentraciones de MgCl₂ fueron utilizadas en los procesos de optimización (1.5 mM, 2.0 mM, 4.0 mM, 6.0mM). 19
- Tabla V. Ciclo de PCR utilizado en los procesos de optimización. Temperatura de alineamiento (56°C-58°C). 1° Desnaturalización: se abre la cadena de ADN. Desnaturalización: es llevada a cabo a una temperatura de 94-95°C, el producto de PCR sintetizado en el primer ciclo de amplificación es significativamente menor que el amortiguador de ADN. Alineamiento de cebadores: los cebadores se anexan a los sitios complementarios en las cadenas sencillas de ADN. Extensión de los oligonucleótidos: se llevó a cabo a los 72 °C, la síntesis de ADN se llevo a cabo a través de la Taq DNA Polimerasa. Extensión final: las muestras fueron incubadas a los 72°C durante 5min para terminar de amplificar los nuevos productos de PCR. Numero de ciclos: para una alta cantidad de templete de ADN, se llevaron a cabo entre 25-35 ciclos. 19
- Tabla VI. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 y FAM en muestras de machos y hembras de *Tursiops truncatus*. 27
- Tabla VII. Prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 y FAM a diferentes concentraciones de sondas (100 – 300nm) en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. M= machos, F= hembras. Subrayados se encuentran los valores mas altos de fluorescencia obtenidos en esta prueba. 28
- Tabla VIII. Pruebas de concentración de cebadores. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 y FAM a diferentes concentraciones de cebadores (300 – 600nM) en muestras de hembra y macho de *Tursiops truncatus*. M= machos, F= hembras. 30
- Tabla IX. Prueba de tipos de *Taq* polimerasa. Valores de fluorescencia para los colorantes de CY5 y FAM con *Taq* polimerasa de inicio regular y de alta temperatura (AT) en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. M= macho, F= hembra. Subrayados se encuentran los valores 32

mas altos obtenidos en esta prueba.

Tabla X. Prueba de concentración de suero de albúmina bovina (SAB). Valores de fluorescencia para los colorantes CY5 y FAM con SAB en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. M= machos, F= hembras. Los valores más altos obtenidos en esta prueba se encuentran subrayados. 34

Lista de Figuras: Capítulo 1

- Figura 1. La sonda TaqMan flúorese cuando la actividad de la 5' exonucleasa de la ADN polimerasa rompe la sonda separando así el colorante FAM o CY5 del extintor de fluorescencia. 13
- Figura 2. Gel de agarosa al 2%. Primer línea marcador de 100 pb. Líneas de la 1-5 distintas muestras de cachalote (*Physeter macrocephalus*), línea 6 corresponde a muestra del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), línea 7 control negativo (H₂O). Temperatura de alineamiento 58°C, 1.5mM. MgCl₂. En esta figura no se observan resultados positivo las bandas son apenas visibles. 25
- Figura 3. Gel de agarosa al 2%. 1ª línea corresponde al marcador de 100 pb. Líneas 1-2 macho y hembra de la marsopa de Dal (*Phocoenoides dalli*), línea 3 macho de ballena piloto de aleta corta (*Globicephala macrorhynchus*), línea 4 delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), línea 5 control negativo (H₂O). Temperatura de alineamiento 56°C, MgCl₂ 2.0mM. 26
- Figura 4. Gel 2% de agarosa. 1er línea marcador de 100 pb. Línea 1, hembra de ballena franca del Pacífico Norte (*Eubalaena japonica*), línea 2 macho de ballena de Bryde (*Balaenoptera edeni*), líneas 3 y 4 macho y hembra de ballena bowhead (*Balaena mysticetus*), línea 5 delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), línea 6 control negativo (H₂O). Temperatura de alineamiento 56°C y MgCl₂ 6.0 mM. 26
- Figura 5. Ejemplo de cómo el software de PCR en tiempo real agrupa las muestras de acuerdo a los valores de fluorescencia de los colorantes CY5 (Y locus) y FAM (X locus). Las Hembras se muestran en color rosa y los machos en color azul. El control negativo (agua) se muestra en verde. Los números de muestra son iguales a los mostrados en la Tabla VI. Las muestras A2/A3 y A4/A5 son duplicados. 27
- Figura 6. Valores de fluorescencia de las diferentes concentraciones de sonda en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. La flecha verde muestra la región en el eje x donde comienzan los valores de Ct. 29
- Figura 7. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 (locus Y) y FAM (locus X). El color rosa representa a las hembras, el azul a los machos y el verde al agua. Las muestras A2/A3, A4/A5 son réplicas. 29
- Figura 8. Valores de fluorescencia de las diferentes concentraciones de cebadores en muestras de hembra y macho de *Tursiops truncatus*. Los valores más bajos de Ct para los colorantes CY5 y FAM fueron 26.92 y 28.91 para hembras (A9), y 27.39 y 31.93 para machos (A8). Estas muestras contenían una concentración de cebadores de F600nM:R600nM, y presentaron los valores más altos de fluorescencia. 31
- Figura 9. Pruebas de *Taq* polimerasa de inicio regular y de alta temperatura. Los valores de fluorescencia más altos fueron para las muestras A6 – A8, donde se utilizó *Taq* polimerasa de alta temperatura de inicio. 32

Figura 10. Prueba del suero de albúmina bovina (SAB). Las muestras con 2 mg/ μ l de SAB presentaron los valores más altos de fluorescencia.	33
Figura 11. Curva estándar del colorante CY5 (cromosoma Y) para una muestra de ADN de <i>Tursiops truncatus</i> macho.	35
Figura 12. Curva estándar del colorante FAM (cromosoma X) para una muestra de ADN de <i>Tursiops truncatus</i> macho.	35
Figura 13. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 58° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.	36
Figura 14. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 60° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.	37
Figura 15. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 62° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.	37
Figura 16. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 64° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.	38

Capítulo 1: Determinación del sexo en cetáceos por medio del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

1. Introducción

La determinación de sexo en los organismos sujetos a estudio es fundamental para la comprensión de numerosos aspectos de su biología, así como para su efectiva conservación. En algunas especies, se puede distinguir el sexo de un individuo a simple vista; en otras, determinar el sexo resulta difícil o casi imposible debido a que los genitales de los organismos no son visibles o los individuos carecen de diferencias morfológicas entre machos y hembras. Por tal motivo, los mastozoólogos marinos han utilizado técnicas moleculares para asistirse en la determinación de sexo. En el presente capítulo se resumen los antecedentes acerca de la determinación de sexo en cetáceos y su importancia en el estudio de la ecología de poblaciones naturales. Además, se presenta una breve descripción de los cromosomas sexuales de los mamíferos, los métodos moleculares de la determinación del sexo en mamíferos y se mencionan aspectos del desarrollo de las técnicas de determinación de sexo en cetáceos. El objetivo principal de este capítulo es la optimización de un novedoso método que permitió una rápida y precisa determinación de sexo en cetáceos.

El desarrollo del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa fue posible mediante la amplificación de una pequeña región de 105 pares de bases (pb) de los genes ZFX/ZFY debido a que entre machos y hembras se presentan diferencias entre los polimorfismos nucleotídicos simples (Single Nucleotide Polymorphisms SNP's, por sus siglas en inglés). También se demostrará que el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa es herramienta útil y confiable disponible para la determinación del sexo en cetáceos. El presente trabajo se

antepone a métodos cualitativos y cuantitativos utilizados previamente en la determinación de sexo a través del uso de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) en tiempo real. Con el uso de este método se espera contribuir a los esfuerzos compartidos para la conservación y el manejo de las poblaciones de mamíferos marinos.

2. Antecedentes

2.1. Cetáceos.

Los mamíferos del orden Cetacea son comúnmente conocidos como ballenas, delfines y marsopas. Este orden comprende aproximadamente 84 especies de 14 familias distintas clasificadas en dos subórdenes: Odontoceti (ballenas dentadas) y Mysticeti (ballenas barbadas) (Rice, 1998, Reeves *et al.*, 2004). Los cetáceos muestran un amplio intervalo de variaciones morfológicas, ecológicas, de comportamiento y distribución entre sexos. En ciertas especies de cetáceos los machos y hembras son prácticamente monomórficos, es decir, son muy similares en forma, talla y coloración. En otras especies se observan diversos rasgos de dimorfismo sexual que en algunos casos pueden ser útiles para identificar el sexo de individuos en el campo (Ralls y Mesnick, 2002).

2.2. Determinación del sexo en cetáceos y su importancia en el estudio de la ecología de poblaciones.

La determinación del sexo en el área de los cetáceos se ha caracterizado por ser complicada y en ocasiones imposible (Palsboll *et al.*, 1992). La forma en la cual los investigadores pueden obtener evidencia anatómica del sexo de un individuo es únicamente mediante la inspección ventral de la región genital (Mathews, 1937; Clarke y Paliza, 1994).

Cuando se estudia a los cetáceos en su medio natural, estos presentan una amplia distribución y movimiento, por lo tanto, las oportunidades de inspeccionar los órganos genitales son raras, a menos que el animal gire ventralmente y permanezca invertido en la superficie (Clapham y Mayo, 1987).

Como alternativa, la región genital puede ser visible para un observador bajo el agua (Whitehead y Gordon, 1986). Clarke y Paliza (1994) mencionan que para asegurarse del sexo de un individuo bajo el agua el observador necesitaría colocarse por debajo de la ballena y permanecer con una vista directa a 90° sobre la región genital – anal, ya que al colocarse en ángulos más agudos la distancia entre el pene y el ano puede confundirse con el área correspondiente a la cloaca de la hembra. Por esta razón, y otras tales como la biología y comportamiento de las diferentes especies de cetáceos, el riesgo para los observadores submarinos cuando nadan cerca de los animales o la imposibilidad para determinar el sexo de un grupo grande de individuos, entre otras situaciones, la determinación del sexo en cetáceos mediante observaciones submarinas resulta poco confiable o posible.

En algunas especies con dimorfismo sexual, la determinación del sexo puede llevarse a cabo mediante observaciones a simple vista o utilizando la foto identificación. Por ejemplo, en el caso de los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) la cabeza de un macho adulto representa aproximadamente un cuarto de su longitud (Best, 1979; Whitehead y Gordon, 1986). En el delfín tornillo (*Stenella longirostris orientalis*), los machos adultos exhiben una joroba post – anal, sus aletas dorsales se encuentran inclinadas hacia el frente y las puntas de sus aletas caudales presentan un doblez hacia arriba (Perrin y Mesnick, 2003). En el caso de los narvales (*Monodon monoceros*), el colmillo frontal se desarrolla

generalmente sólo en los machos (Ralls y Mesnick, 2002). En las orcas (*Orcinus orca*), los machos adultos son mucho más grandes que las hembras y tienen la aleta dorsal más grande (Mann *et al.*, 2000). En los delfines de Risso (*Grampus griseus*) los animales más viejos de ambos sexos tienden a acumular mayor número de cicatrices, esto va cambiando los patrones de coloración en la piel; además, en los machos de esta especie se presenta una decoloración ontogénica en la piel, provocando que ésta se vea más clara (Kruse *et al.*, 1999). Los adultos del delfín moteado (*Stenella attenuata*) presentan quillas postanales conspicuas cuyo estrado tiene puntas blancas, las cuales se pueden visualizar a distancia (Ralls and Mesnick 2002). Entre las ballenas barbadas, los balaenoptéridos muestran ligeras variaciones morfológicas, por ejemplo, las hembras suelen ser más grandes que los machos (Garrigue *et al.*, 2002).

La creciente aplicación del uso de herramientas moleculares y del ADN recombinante para el estudio de la biología de la conservación, aumentó las posibilidades para la determinación del sexo de cetáceos en su medio natural. Generalmente, esto se realiza mediante la toma de biopsias o piel descamada de animales vivos, donde una vez que se tiene el tejido, se realizan extracciones de ADN (Haig, 1998; Palsball *et al.*, 1992, Berube y Palsball, 1996, Richard *et al.*, 1996, Enriquez-Paredes, 2005). El ADN también se puede obtener de diversas fuentes como: muestras de animales varados, muestras forenses obtenidas de distintos mercados alrededor del mundo, huesos, dientes o especímenes provenientes de museos (Rastogi *et al.*, 2004, Rosenbaum *et al.*, 1997).

La determinación individual del sexo en cetáceos resulta esencial para tener un mejor escenario de la ecología de poblaciones en organismos de vida salvaje. Por ejemplo, Ruiz-Cooley *et al.*, (2004) combinan el análisis de isótopos estables y la determinación del

sexo (observaciones de campo y determinación del sexo por medio de la genética). Esto con el fin de determinar relaciones tróficas entre machos y hembras de cachalotes (*Physeter macrocephalus*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) del Golfo de California.

La relación de isótopos estables de C y N de cachalotes en hembras y machos inmaduros son significativamente diferentes de los de machos adultos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos inmaduros. Ya que los valores de C y N fueron más altos en hembras y machos inmaduros con respecto a *D. gigas* se sugiere que existen relaciones predador-presa entre ellos. En los machos adultos, los valores isotópicos fueron menores que en las hembras y no se observaron relaciones tróficas con *D. gigas*. Basados en estos resultados, los autores plantearon la hipótesis de que los valores de los isótopos estables de los machos maduros son el reflejo de una dieta proveniente de distintos ecosistemas, quizá una zona de alimentación de altas latitudes.

La fusión entre diversas disciplinas como lo son la genética, la acústica y las observaciones en campo de ballenas de aleta (*Balaenoptera physalus*) en el Golfo de California, permitió que Croll *et al.*, (2002) sugirieran el uso de esta zona como área de alimentación y reproducción para la especie. Los autores obtuvieron biopsias de ballenas cantoras de aleta del Golfo de California. Realizaron una determinación molecular del sexo, encontrando que los animales cantores eran machos. Los autores sugieren que dichos sonidos son llamadas de apareamiento que tienen como función atraer a las hembras a través de grandes distancias hacia las agregaciones de presas.

2.3. Cromosomas Sexuales y Determinación del sexo en mamíferos.

Se piensa que los cromosomas sexuales de los mamíferos provienen de un ancestro común de hace 200 a 300 millones de años (Graves y Shetty, 2001). Generalmente se puede distinguir a los cromosomas sexuales mediante microscopía, estos presentan diferentes formas (Ayling y Griffin, 2002). En mamíferos, el sexo es determinado por el sistema XX/XY en el cual los machos son heterocigotos (XY) y las hembras son el homocigotos (XX). Esta condición se conserva entre mamíferos y está presente en mamíferos marinos (Graves y Shetty, 2001).

Algunas excepciones a este sistema son los leming, los cuales poseen un sistema X,Y y un X(X*) que suprime la actividad del Y; los roedores como *Eliobius lutescens* que presentan sólo un cromosoma X en ambos sexos, y *Eliobius tancrei* en el cual tanto los machos como las hembras tienen dos cromosomas X; ambas especies han perdido su cromosoma Y completamente (Fredga, 1998; Just *et al.*, 1995).

La mayoría de los cromosomas de mamíferos son homólogos en una región muy pequeña llamada “región pseudoautosomal”, este es el dominio donde se lleva a cabo la sinapsis y recombinación de los cromosomas sexuales (Burgoyne, 1982).

Muchos genes presentes en el cromosoma Y son pseudogenes no funcionales con homólogos en el cromosoma X. Otros se expresan de manera ubicua, tienen homólogos en el cromosoma X y aparecen como copia única en una región no recombinante del cromosoma Y (Ayling y Griffin, 2002). Por ejemplo, los genes ZFY/ZFX (zinc finger genes, por sus siglas en inglés) son genes altamente conservados entre los vertebrados y son ligados al sexo en euterios, fueron incorporados en los cromosomas sexuales hace 100

millones de años después de la divergencia de linajes dando paso a los marsupiales y mamíferos euterios (Page *et al.*, 1987; Graves y Shetty, 2001).

El gen SRY (la región de determinación del sexo en el cromosoma Y) que también se localiza en la región no recombinante del cromosoma Y, es esencial para el inicio del desarrollo de los testículos y juega un papel principal en regular la cascada de reacciones celulares para la determinación de estos (Sinclair *et al.*, 1990; Quintana – Murci y Fellous, 2001). Otro gen determinante del sexo masculino en el cromosoma Y en muchos otros euterios (excepto humanos y chimpancés) y mamíferos metaterios es el *UBE1* (Mitchell *et al.*, 1997).

2.4. Desarrollo de las técnicas de determinación del sexo en cetáceos.

Uno de los primeros intentos para la determinación del sexo en cetáceos fue utilizando muestras de piel con técnicas de histología en donde se realizaban tinciones para observar los cuerpos cromáticos sexuales, también conocidos como corpúsculos de Barr. Winn *et al.*, (1973) observaron la presencia o ausencia de los corpúsculos de Barr en los núcleos de células epiteliales de ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*), cachalotes y delfín manchado (*Stenella frontalis*). En los estadios embrionarios tempranos de las hembras, uno de los cromosomas X se vuelve heterocromático y se condensa durante la interfase formando el corpúsculo de Barr, el cual es localizado en la periferia de la membrana nuclear. Dependiendo del número de corpúsculos de Barr se puede identificar el número de cromosomas sexuales X en un individuo, es así que un corpúsculo de Barr significa que un individuo tiene dos cromosomas X, dos corpúsculos de Barr indican tres cromosomas X y así sucesivamente (Chadwick y Huntington, 2003).

Un rango positivo normal en los corpúsculos de Barr oscila entre el 20-60%. Una hembra debe estar en el rango $>$ al 15% en puntos de las muestras control, mientras que los machos deben tener $<$ del 4%. Winn *et al.*, (1973) manejaron porcentajes de control entre 74-91% para las hembras y de entre 0-2.7% para los machos. Los porcentajes de corpúsculos de Barr presentes versus ausentes reportados por los autores en las muestras de sexo desconocido fueron de menos del 80% para hembras y más del 4% para machos.

Hoelzel *et al.*, (1983) probaron el método de análisis de Winn's *et al.*, (1973) en 17 individuos de tres especies de mysticetos: ballena minke (*Balaenoptera acutorostrata*), ballena de Sei (*Balaenoptera borealis*) y ballena de aleta (*B. physalus*). En las ballenas de Sei, no se encontraron diferencias entre machos y hembras, mientras que en las ballenas de aleta las diferencias fueron significativamente diferentes entre individuos y entre las capas de tejido del mismo individuo. Sin embargo, estas diferencias fueron inconsistentes entre sexos. Los autores observaron una gran cantidad de heterocromatina en células de cetáceos, las cuales producen falsos corpúsculos de Barr, por lo cual, pudieron concluir que ésta técnica no es factible para determinar el sexo en las tres especies mencionados previamente, así como para otras especies de cetáceos.

Mathews (1986) utilizó una modificación del método de Winn's *et al.*, (1973) en ballena gris (*Eschrichtius robustus*). La autora observó proporciones similares en los cuerpos cromáticos sexuales de machos y hembras de ballena gris, sin embargo, menciona que su método no es viable para determinar dimorfismo sexual nuclear en esta especie y trata de explicar sus resultados a través de tres hipótesis particulares para el caso de la ballena gris: 1) secciones heterocromáticas en el cromosoma X, 2) heterocromatina autosomal y 3) diferencias en la cromatina visible así como la actividad metabólica.

Otra técnica empleada para determinar el sexo de cetáceos consiste en examinar los cromosomas sexuales combinando técnicas de citología y kariología. Esto se lleva a cabo por medio de cultivos *in vitro* del tejido epitelial proveniente de biopsias. Las bases de ésta técnica son la presencia o ausencia del cromosoma sexual Y, característico de los machos. En esta técnica los cromosomas de los organismos son caracterizados basándose en morfología y tamaño. Después de esta caracterización los dos cromosomas del sexo se pueden discriminar de los demás por su tamaño y forma (Lambertsen *et al.*,1988). Los autores determinaron exitosamente el género de diez ballenas jorobadas (*M. novaeangliae*), al igual que Arnason *et al.*, (1985) quienes determinaron el sexo de una hembra de ballena azul (*Balaenoptera musculus*).

Por otro lado, Baker *et al.*,(1991) utilizaron una sonda de hibridación en un ensayo Southern pDP1007 (1.3 kilo bases, kb) con una restricción de ADN de EcoRI para verificar el género de once ballenas jorobadas, una ballena gris, ballena franca de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) y una ballena de Sei. La sonda pDP1007 se deriva de la región determinante del sexo en el cromosoma humano Y. Esta sonda detecta un locus bien conservado en en el cromosoma Y de los mamíferos, así como del genoma femenino humano (Page *et al.*,1987). Los machos muestran dos fragmentos de restricción, uno de 3.8 kb de longitud y el otro de 2 kb. Las hembras sólo muestran el fragmento de 2 kb. Los resultados de Baker *et al.*, (1991) demostraron que las ballenas jorobadas y las ballenas de aleta muestran patrones semejantes en los fragmentos de enzimas de restricción al igual que en los humanos (Palsboll *et al.*,1992).

En la década de los 80's y principios de los 90's, se desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés; Saiki *et al.*,1988) creándose así nuevas

técnicas que emplearon secuencias específicas de ADN, como es el caso de las secuencias de los genes ZFX/ZFY (Page *et al.*, 1987; Schneider-Gadicke *et al.*, 1989) y del gen SRY (Sinclair *et al.*, 1990); las cuales se convirtieron en herramientas indispensables para el desarrollo de técnicas de determinación de sexo en mamíferos.

La detección del gen SRY vía PCR se convirtió en un método de determinación del sexo utilizado ampliamente en diferentes especies de mamíferos (Taberlet *et al.*, 1993; Richard *et al.*, 1994, Finch *et al.*, 1996, Takahashi *et al.*, 1998, Wilson and White, 1998, Rosel, 2003). La falta de la amplificación del gen SRY, no implica en ocasiones la ausencia del gen, sino que puede reflejar la falta de amplificación del mismo en el PCR (Palsboll *et al.*, 1992, Taberlet *et al.*, 1993). Para poder identificar resultados negativos naturales a los provocados por las técnicas (falsos negativos), existen algunos métodos que consideran el empleo de controles positivos (Taberlet *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1998, Wilson y White, 1998). Esto sirve para identificar una amplificación exitosa de PCR, estos controles positivos pueden ser la coamplificación de genes ortólogos como el de la amelogenina (Nakahori *et al.*, 1991, Morin *et al.*, 1999) o ZFX/ZFY (Aasen y Medrano, 1990; Palsboll *et al.*, 1992, Berube y Palsboll, 1996, Reynolds y Varlaro, 1996).

Debido a que el fragmento de ADN es pequeño, la resolución en los geles de agarosa es limitada, por lo que el tamaño de los productos de PCR tiende a estar en un intervalo de 300 y 800 pares de bases (pb). Si las muestras de ADN se degradan o están en una baja concentración, los fragmentos grandes pueden ser amplificados con una baja calidad o bien no amplificarse del todo, lo cual diezma la calidad y cantidad del ADN contenido en las muestras como es el caso de la piel desescamada de las ballenas azules (Enriquez-Paredes, 2005). Así también puede ser el caso de las muestras provenientes de

varamientos con distintos grados de descomposición, muestras de huesos y dientes y muestras de ejemplares provenientes de museos en donde la extracción de ADN de buena calidad es complicada (Rosenbaum *et al.*, 1997; Rastogi *et al.*, 2004).

2.5. Bases para el desarrollo del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Idealmente, una técnica de sexado debe ser altamente sensible tanto al cromosoma X como al Y. Esta debe utilizar un par de oligonucleótidos para la amplificación de loci ortólogos y el producto de PCR que se obtenga debe ser lo más pequeño posible para ser detectado y amplificado por PCR (de 70 a 150 pb). Lo mencionado anteriormente es necesario para maximizar la eficiencia en la amplificación de muestras de baja concentración de DNA (Smith *et al.*, 2002).

La técnica de PCR en tiempo real puede ser utilizada para detectar y cuantificar ADN blanco mediante el monitoreo de la acumulación de productos del PCR, que se miden por incremento de fluorescencia durante los ciclos de la reacción. Se pueden utilizar diferentes aproximaciones para generar la señal fluorescente (Newby *et al.*, 2003; Stratagene, 2003). Por ejemplo, se pueden utilizar sondas marcadas con diferentes colorantes fluorescentes para detectar secuencias con diferencias de tan sólo un nucleótido (p. e. para polimorfismo nuclear simple, SNP por sus siglas en inglés).

Con base en el trabajo previo realizado por Morin *et al.*, (1999, 2004) el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa (fluorescencia liberada por medio de enzimas), también llamado "Taqman" tiene un alto rendimiento para tamizado de SNP's. Este ensayo utiliza la ventaja de la actividad de la 5' exonucleasa y de la Taq ADN polimerasa. La 5' exonucleasa rompe las sondas allelicas específicas que se alinean con el amplicón

objetivo (i.e. ADN de doble cadena). Las sondas son doblemente marcadas en los extremos 5' y 3' con colorantes y un extintor de fluorescencia (Quencher) (Iowa Black RQ). Al hidrolizarse las sondas por la actividad de la 5' exonucleasa, el extintor de fluorescencia queda en solución esto permite que cese su actividad inhibidora y se produzca fluorescencia (Fig. 1).

El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la determinación de sexo también se basa en trabajos anteriores realizados por Rosenberg y Mesnick (2001). El último exón de ZFY/ZFX, localizado en la región más próxima al centrómero de cuatro segmentos conservados y que codifica 13 dominios de los dedos de zinc (zinc- finger domains), es altamente homólogo entre mamíferos placentarios, donde ZFX ha mostrado escapar de la inactivación del cromosoma X (Page *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 1989, Jegalian y Page, 1998). Rosenberg y Mesnick (2001) determinaron las secuencias ZFX y ZFY de los nucleótidos 96 a 699 (secuencia humana Schneider *et al.*, 1989) a lo largo de 7 familias de cetáceos. Sus resultados de amplificación múltiple, clonación y secuenciación de estas regiones previamente no caracterizadas revelaron: (1) ocho diferencias fijas entre ZFX y ZFY; (2) 29 sitios variables entre ZFX y ZFY y (3) una baja diversidad nucleotídica interespecífica para ZFX y ZFY en todas las familias examinadas.

Con base en dichos estudios previos, las sondas de machos y hembras para este estudio, fueron diseñadas especialmente (Morin *et al.*, 2005) para reconocer a las regiones polimórficas de ZFY/ZFX de los cetáceos. Cada sonda presenta colorantes fluorescentes distintos (FAM para ZFX y Cy5 para ZFY). Si el espécimen muestreado es hembra, la sonda produce únicamente fluorescencia del colorante FAM; si el espécimen muestreado es macho, ambos colorantes fluorescen. El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa genera un

producto de PCR pequeño (105 pb) para los cromosomas X y Y. Los valores de fluorescencia son mostrados directamente en el termociclador de PCR en tiempo real, y se obtiene una representación gráfica de la intensidad de la fluorescencia.

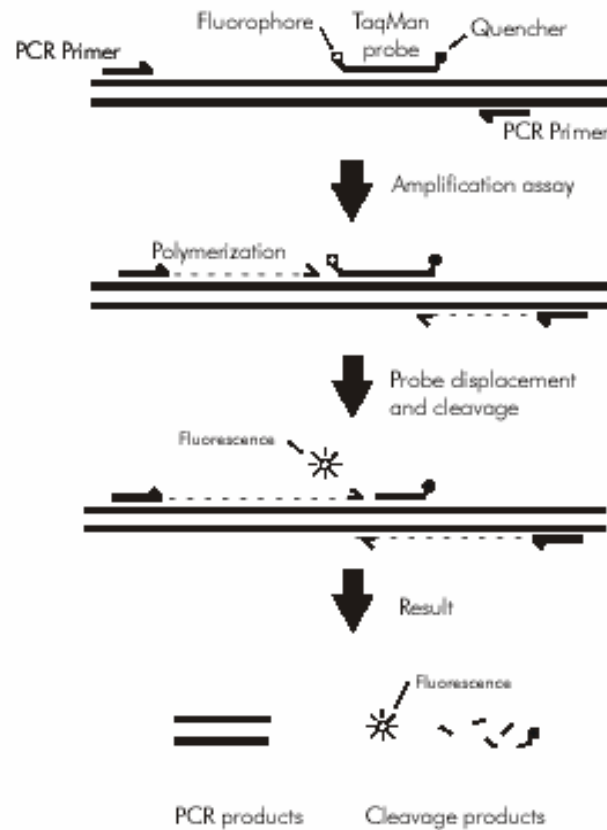


Figura 1. La sonda TaqMan fluoresce cuando la actividad de la 5' exonucleasa de la ADN polimerasa rompe la sonda separando así el colorante FAM o CY5 del extinguidor de fluorescencia.

3. Objetivo

Optimizar el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la determinación del sexo en diferentes especies de cetáceos.

4. Materiales y Métodos

4.1. Muestras utilizadas para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Las muestras utilizadas para validar el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa se obtuvieron del archivo de tejidos del Centro de Ciencia Pesquera del Suroeste (SouthWest Fisheries Science Centre, SWFSC por sus siglas en inglés), incluyeron por lo menos un organismo de cada sexo de 33 especies, en nueve familias de cetáceos (Tabla I). Cuando fue posible, se seleccionaron las muestras de los organismos cuyo sexo fue determinado previamente de manera visual o por inspección de los genitales; en caso contrario, el sexo de algunas muestras se corroboró por medio de otros métodos (*p.e.* un método alternativo para la determinación de sexo basados en la coamplificación y electroforesis de los productos de PCR de los genes SRY y ZFX (Fain y Lemay, 1995)).

Tabla I. Muestras usadas para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para determinar el sexo. La columna del método presenta los métodos con que las muestras fueron sexadas ya sea para obtener el sexo del individuo por primera vez, o bien para confirmar el sexo del individuo en algunos casos. La sonda SRY se refiere al método de Fain y Lemay (1995).

Familia	Especies	Nombre común	Lab ID	Sexo	Método
BALAENIDAE	<i>Balaena mysticetus</i>	Ballena franca del ártico	6980	F	Desconocido
	<i>Balaena mysticetus</i>	Ballena franca del ártico	6981	M	Desconocido
	<i>Eubalaena japonica</i>	Ballena franca del Pacífico Nte.	28424	F	Sonda SRY
	<i>Eubalaena japonica</i>	Ballena franca del Pacífico Nte.	28425	M	Sonda SRY
BALAENOPTERIDAE	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Ballena Minke	2161	M	gonadas
	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Ballena Minke	23633	F	Desconocido
	<i>Balaenoptera borealis</i>	Ballena de Sei	3992	F	Desconocido
	<i>Balaenoptera borealis</i>	Ballena de Sei	3994	F	Desconocido
	<i>Balaenoptera borealis</i>	Ballena de Sei	3999	M	Desconocido
	<i>Balaenoptera edeni</i>	Ballena de Bryde	7643	F	Desconocido
	<i>Balaenoptera edeni</i>	Ballena de Bryde	32258	M	gonadas
	<i>Balaenoptera musculus</i>	Ballena azul	25437	F	Sonda SRY
	<i>Balaenoptera musculus</i>	Ballena azul	29847	M	Desconocido, SRY fallada
	<i>Balaenoptera physalus</i>	Ballena de aleta	2821	M	examen externo
	<i>Balaenoptera physalus</i>	Ballena de aleta	10743	F	Desconocido
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Ballena jorobada	2813	M	examen externo
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Ballena jorobada	28499	F	Sonda SRY
	DELPHINIDAE	<i>Delphinus capensis</i>	delfin comun Long-beaked	28947	M
<i>Delphinus capensis</i>		delfin comun Long-beaked	32265	F	Desconocido
<i>Delphinus delphis</i>		delfin comun Short-beaked	32259	F	gonads

	<i>Delphinus delphis</i>	delfin comun Short-beaked	32260	M	gonads
	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Ballena piloto de aleta corta	1685	F	examen externo
	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Ballena piloto de aleta corta	2819	M	gonads
	<i>Globicephala melas</i>	Ballena piloto de aleta larga	463	M	examen externo
	<i>Globicephala melas</i>	Ballena piloto de aleta larga	469	M	examen externo
	<i>Globicephala melas</i>	Ballena piloto de aleta larga	1405	F	gonads
	<i>Globicephala melas</i>	Ballena piloto de aleta larga	1406	F	gonads
	<i>Grampus griseus</i>	Delfin de Risso	141	F	examen externo
	<i>Grampus griseus</i>	Delfin de Risso	39084	M	examen externo
	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Delfin de Fraser	394	M	Desconocido
	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Delfin de Fraser	2509	F	examen externo
	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Delfin de Fraser	2595	F	examen externo
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	Delfin White-beaked	17311	M	Desconocido
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	Delfin White	17318	F	Desconocido
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	Delfin White	17319	F	Desconocido
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	Delfin White	23523	F	Desconocido
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Delfin de costados blancos del Pacifico	741	F	gonadas
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Delfin de costados blancos del Pacifico	3724	M	gonadas
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Delfin de costados blancos del Pacifico	4817	F	Desconocido
	<i>Lissodelphis borealis</i>	Northern right whale dolphin	9217	M	Sonda SRY
	<i>Lissodelphis borealis</i>	Northern right whale dolphin	23163	F	Desconocido
	<i>Orcinus orca</i>	Orca	26565	F	Examen externo
	<i>Orcinus orca</i>	Orca	26567	M	Desconocido
	<i>Orcinus orca</i>	Orca	26568	F	Desconocido
	<i>Pseudorca crassidens</i>	Orca falsa	27456	F	Sonda SRY
	<i>Pseudorca crassidens</i>	Orca falsa	27510	M	Gonadas
	<i>Stenella attenuata</i>	Delfin moteado Pantropical	2084	F	Examen externo
	<i>Stenella attenuata</i>	Delfin moteado Pantropical	2085	M	Examen externo
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Delfin rallado	875	M	Gonadas
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Delfin rallado	876	F	Gonadas
	<i>Steno bredanensis</i>	Rough-toothed dolphin	138	M	Gonadas
	<i>Steno bredanensis</i>	Rough-toothed dolphin	139	F	Gonadas
	<i>Steno bredanensis</i>	Rough-toothed dolphin	459	M	Examen externo
	<i>Steno bredanensis</i>	Rough-toothed dolphin	461	M	Examen externo
	<i>Steno bredanensis</i>	Rough-toothed dolphin	544	F	Examen externo
	<i>Tursiops truncatus</i>	Delfin nariz de botella	4363	M	Desconocido
	<i>Tursiops truncatus</i>	Delfin nariz de botella	4366	F	Desconocido
ESCHRICTIDAE	<i>Eschrichtius robustus</i>	Ballena gris	856	M	Examen externo
	<i>Eschrichtius robustus</i>	Ballena gris	23327	F	Sonda SRY
KOGIIDAE	<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote pigmeo	10117	F	Desconocido
	<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote pigmeo	10119	M	Desconocido
	<i>Kogia sima</i>	Cachalote Dwarf	10124	F	Desconocido
	<i>Kogia sima</i>	Cachalote Dwarf	17104	F	Desconocido
	<i>Kogia sima</i>	Cachalote Dwarf	23604	M	Desconocido
MONODONTIDAE	<i>Delphinapterus leucas</i>	Beluga	26683	F	Examen externo
	<i>Delphinapterus leucas</i>	Beluga	28926	M	Examen externo
	<i>Monodon monocerus</i>	Narval	8229	F	Desconocido
	<i>Monodon monocerus</i>	Narval	8230	F	Desconocido
	<i>Monodon monocerus</i>	Narval	8243	M	Desconocido
	<i>Monodon monocerus</i>	Narval	8244	F	Desconocido
PHOCOENIDAE	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsopa de Harbor	1084	F	Gonadas

	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsopa de Harbor	1353	F	Gonadas
	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsopa de Harbor	26606	M	Desconocido
	<i>Phocoenoides dalli</i>	Marsopa de Dall	713	M	Gonadas
	<i>Phocoenoides dalli</i>	Marsopa de Dall	1880	F	Gonadas
	<i>Phocoenoides dalli</i>	Marsopa de Dall	3735	F	Gonadas
	<i>Phocoenoides dalli</i>	Marsopa de Dall	3739	M	Gonadas
PHYSETERIDAE	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	2364	F	Examen externo
	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	2365	F	Examen externo
	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	9698	F	Examen externo
	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	9708	M	Examen externo
ZIPHIIDAE	<i>Mesoplodon densirostris</i>	Zifido de Blaineville	8681	M	Desconocido
	<i>Mesoplodon densirostris</i>	Zifido de Blaineville	27415	F	Sonda SRY
	<i>Ziphius cavirostris</i>	Zifido de Cuvier	745	F	Sonda SRY
	<i>Ziphius cavirostris</i>	Zifido de Cuvier	1120	M	Gonadas
	<i>Ziphius cavirostris</i>	Zifido de Cuvier	30071	M	Sonda SRY

4.2. Cebadores y sondas diseñadas para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa delimita una región de 105 pb de las secuencias genéticas de ZFY y ZFX e incluye dos arreglos distintos de los nucleótidos 179 y 191. Los cebadores y sondas fueron diseñados por Phil Morin, quien utilizó guías publicadas (Livak *et al.*, ; Morin *et al.*, 1999) para alinear a los 59° C y cerrar los flancos a los 7° C. Los cebadores y las sondas fueron diseñados usando el programa Primer Express™ (Applied Biosystems) (Tablas 2 y 3). Las sondas fueron sintetizadas con el 5' con un colorante que reporta la fluorescencia (en donde: CY5 para ZFY, FAM para ZFX) y un extintor de fluorescencia 3' (Iowa Black FQ o RQ; Integrated DNA technologies, Inc.). La sonda ZFX tiene dos diferencias (a nivel de SNP's) con respecto a la secuencia ZFX de humano y una diferencia con respecto a la secuencia de ZFY humano. La sonda ZFY tuvo tres diferencias con respecto a la secuencia del ZFY humano y cuatro diferencias con respecto a la secuencia de ZFX de humanos.

Tabla II. Cebadores utilizados para amplificar la region de 105 pares de bases de los genes ZFX y ZFY.

Cebador	Secuencia
CETZFX_Y_F1	5' AGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTGAAA 3'
CETZFX_Y_R1	5'TCTTGTTGGTAGTGTAATCACAGTCAGT3'

Tabla III. Sondas Taq Man utilizadas en el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Sonda	Cebador
Hembra	Fam-5'AAAACCATCCTGAACACCTTACCAAGAA 3'- IowaBlackFQ
Macho	Cy5-5'AACCACCCTGAACACCTCACCAA3'-IowaBlackRQ

4.3. Optimizacion del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

4.3.1. Optimización de los cebadores CETZFX_Y_F1 y CETZFX_Y_R1 a través del uso de PCR.

Uno de los pasos en el desarrollo el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa consistió en establecer las condiciones óptimas para el uso de los cebadores. La replicación del ADN es posible por medio de PCR, se producen múltiples copias de una determinada secuencia de un fragmento de ADN. En la amplificación de PCR, se requiere de dos cebadores para flanquear el fragmento de ADN a amplificar. La repetición de ciclos a altas temperaturas permite la desnaturalización de dicho fragmento de ADN y además que los cebadores se hibridizen a su secuencia complementaria, y la extensión de los mismos cebadores es catalizada por la enzima Taq ADN polimerasa (Saiki *et al.*, 1987). En este caso, el PCR se realizó con los reactivos descritos en la Tabla 4, con dichos reactivos se preparó un cocktail, el cual se realizó en un tubo de prueba y se colocó en el termociclador (equipo que lleva a cabo ciclos con distintos intervalos de temperatura, Tabla V).

La cantidad y concentración adecuada de los reactivos utilizados en el cocktail de PCR es necesaria para que la reacción funcione (Henegariu *et al.*, 1997). El proceso de optimización consistió en probar distintas concentraciones de algunos de los reactivos a distintas temperaturas. Para el presente trabajo se variaron las concentraciones de Mg y las temperaturas de alineamiento. El objetivo fue amplificar un fragmento de 105 pb de los genes ZFX/ZFY en distintas especies de cetáceos. Dicho fragmento se pudo visualizar por medio de geles de agarosa al 2%, en donde se determinó la longitud correcta del fragmento de ADN, así como la calidad de dicho fragmento por medio de la intensidad del brillo de cada banda (Figuras 2-4).

El Mg^{2+} es un elemento crítico para una buena eficiencia en la reacción de PCR. Éste forma complejos con los dNTP's, cebadores y ADN. La Taq ADN polimerasa depende de la presencia del Mg^{2+} y muestra una alta actividad en el rango de 1.2 a 1.3 mM libres de Mg^{2+} . La concentración óptima de $MgCl_2$ debe seleccionarse empíricamente, demasiado $MgCl_2$ puede anular la amplificación y poca concentración del mismo, puede inhibir la reacción o bien, amplificar poco producto de PCR (Mc Pherson y Moller 2000).

Generalmente una temperatura de alineamiento óptima para los cebadores es de 5°C, menor que la temperatura de derretimiento (T_m) del template cebador-ADN. En los procesos de optimización, por lo general se comienza utilizando una temperatura de alineamiento de 55°C. A partir de esta temperatura la funcionalidad de la reacción de PCR se puede ir observando y ajustando para obtener los resultados esperados. El

tiempo de permanencia de la temperatura de alineamiento puede variar entre 0.5-2 minutos.

Para el proceso de optimización de este estudio, se realizaron múltiples reacciones de PCR en donde las concentraciones de $MgCl_2$ (1.5mM, 2.0 mM , 4.0mM and 6.0 mM) y las temperaturas de alineamiento variaron (56°C, 57°C, 58°C).

Tabla IV. Reactivos de la mezcla de PCR utilizadas en los procesos de optimización de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa. La concentración final, se refiere a 25 μ l de reacción de PCR. El amortiguador 10X tiene iones de Mg^{2+} . Las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ fueron utilizadas en los procesos de optimización (1.5 mM, 2.0 mM, 4.0 mM, 6.0mM).

Reactivos utilizados en las reacciones de PCR	Concentración (Stock)	Concentración./Rxn	Vol/Rxn (ul)
Agua MQ			18.25
Amortiguador 10 X / Mg^{2+}	10	1	2.5
dNTP's	10000 μ M	600 μ M	1.5
CET ZFX R1	20 μ M	0.6 μ M	0.75
CET FXY F1	20 μ M	0.6 μ M	0.75
TaqDNA Pol	5 unidades	0.05 unidades	0.25
ADN objetivo	20-40 ng/ μ l		1
Volumen Total /Rxn			25 μ l

Tabla V. Ciclo de PCR utilizado en los procesos de optimización. Temperatura de alineamiento (56°C-58°C). 1° Desnaturalización: se abre la cadena de ADN. Desnaturalización: es llevada a cabo a una temperatura de 94-95°C, el producto de PCR sintetizado en el primer ciclo de amplificación es significativamente menor que el amortiguador de ADN. Alineamiento de cebadores: los cebadores se anexas a los sitios complementarios en las cadenas sencillas de ADN. Extensión de los oligonucleótidos: se llevó a cabo a los 72 °C, la síntesis de ADN se llevo a cabo a través de la Taq DNA Polimerasa. Extensión final: las muestras fueron incubadas a 72°C durante 5min para terminar de amplificar los nuevos productos de PCR. Número de ciclos: para una alta cantidad de templete de ADN, se llevaron a cabo entre 25-35 ciclos.

	1° Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento de cebadores	Extensión de cebadores	Extensión final	# Ciclos
Temperatura	94°	94°	56°-58°	72°	72°	35
Tiempo	3min	45 sec	45 sec	1min	5min	

4.3.2. Optimización del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa a través de PCR en tiempo real.

Por medio de PCR se amplificó la región de 105 pb de los genes ZFX/ZFY en distintas especies de cetáceos. Posteriormente, con las mismas condiciones estandarizadas de PCR mencionadas anteriormente se determinó el sexo de muestras de cetáceos machos y hembras de distintas especies (Tabla 1), pero en este caso se utilizó una máquina de PCR tiempo-real MX3000P (Stratagene). Dicha máquina detecta la fluorescencia emitada por los colorantes que van en el extremo 5' de las sondas ZFX y ZFY. Los resultados de fluorescencia de los productos de PCR son leídos por medio del software MX3000P (Stratagene) y desplegados en un monitor de computadora. Los resultados de PCR en tiempo real no necesitan un post análisis de los productos de PCR y se obtienen resultados cualitativos y cuantitativos de los productos.

Al principio del proceso de optimización de la técnica sólo se utilizaron muestras de machos y hembras de *Tursiops truncatus* ya que siempre se mostraron resultados consistentes y las secuencias de ADN de los loci ZFX y ZFY eran conocidas.

En el primer experimento en donde se utilizó PCR en tiempo real, el objetivo fue determinar el sexo de una hembra y un macho de *T. truncatus*. Se utilizó el ciclo de PCR indicado en la Tabla 5 con una temperatura de alineamiento de 56°C. Como control negativo de las reacciones de PCR se utilizó agua.

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL el cual contenía: buffer 1X para PCR, 6mM MgCl₂, 150µM de cada uno de los

dNTP, 0.05U/ μ l *Taq* polimerasa, 600nM de cada oligonucleótido, 100 nM de cada sonda y aproximadamente entre 20-40 ng de ADN.

Se llevaron a cabo distintas pruebas para la optimización del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa utilizando la máquina de PCR en tiempo real, entre estas pruebas se encuentran: (1) prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY, (2) prueba de concentración de oligonucleótidos, (3) prueba de tipos de *Taq* polimerasa, (4) prueba de Albúmina SAB (Bovine Serum Albumina por sus siglas en inglés), (5) prueba de la cantidad de ADN (PCR cuantitativo), (6) prueba de contaminación con ADN humano y (7) replicabilidad de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa . Algunos de los componentes de la mezcla de PCR fueron utilizados en la misma concentración por cada 25 μ L de reacción durante todo el proceso: 1X de buffer de PCR, 150 μ M de cada dNTP y 0.05U/ μ l de *Taq* polimerasa y

4.3.2.1. Prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY.

La concentración óptima de las sondas a utilizar se debe determinar de manera empírica (Stratagene, 2003). Se realizaron tres pruebas de concentración (100nM, 200nM y 300nM). El objetivo de la prueba experimental consistió en obtener la mínima concentración con altos valores de fluoresceína y bajos valores de Ct. El valor de Ct es calculado como el ciclo fraccional en donde la señal de fluorescencia atraviesa el umbral de detección (Luca *et al.*, 2004). A mayor cantidad inicial de la molécula objetivo se observó un incremento rápido y significativo en la fluorescencia, este incremento en fluorescencia ocasiona un punto de detección el cual sería el valor de Ct. A mayor cantidad de molécula

objetivo el Ct será menor y a menor cantidad de molécula objetivo el Ct será mayor. Esto es, que existe una correlación entre la cantidad original de moléculas objetivo (ADN blanco) y el valor de Ct.

4.3.2.2. Prueba de concentración de los cebadores.

La sonda de concentración 100 nM fue utilizada para evaluar distintas concentraciones de los cebadores (R300nM:F300nM, R600nM:F600nM y R900nM:F900nM), tanto de los que van en dirección continua ó 5' (Forward, F) y aquellos que van en dirección discontinua ó 3' (reverse, R).

La literatura sugiere que la concentración de los cebadores que se utilizan con las sondas TaqMan puede ser optimizada empíricamente variando la concentración desde 50nM a 300nM. Algunas veces la mejor concentración de los cebadores continuos y discontinuos puede no tener una molaridad equitativa (Stratagene 2003). Para esto se probaron R 300nM: F 600nM y R 600nM: F 300nM.

4.3.2.3. Prueba de tipos de *Taq* polimerasa

Utilizando los mejores resultados de concentración de cebador y sonda, se realizó una reacción de PCR en tiempo-real con dos tipos de *Taq* polimerasas, una obtenida en el laboratorio y la otra adquirida comercialmente (hot star *Taq* ADN polimerasa QIAGEN). Esta última no tiene actividad polimerasa a temperatura ambiente, lo cual previene la extensión de cebadores no alineados específicamente y dímeros formados a bajas temperaturas durante el inicio de PCR y durante los ciclos iniciales. El primer ciclo de desnaturalización para este PCR fue de 10 min. Las reacciones tuvieron 1.7 µl de cada *Taq* ADN polimerasa a una concentración de 0.05U/µl. En las reacciones

posteriores de PCR se utilizó Hot start *Taq* en donde el tiempo de la 1ª desnaturalización fue de 15 min la cual es el tiempo óptimo para dicha enzima (Quiagen 2002).

4.3.2.4. Prueba de Suero de Albúmina Bovina SAP (BSA Bovine Serum Albumina por sus siglas en inglés).

Existen sustancias que inhiben la actividad enzimática en muchas muestras y pueden limitar la funcionalidad del PCR. La SAB es un aditivo utilizado ampliamente para liberar la interferencia de dichas sustancias en la reacción de PCR o de otras reacciones enzimáticas. La SAB puede combatir una variedad de sustancias que previenen e inhiben la actividad de la *Taq* ADN polimerasa. Por ejemplo la SAB puede unir lípidos vía fuerzas hidrofóbicas y aniones, ya que tiene un alto contenido de lisina. También puede liberar a los inhibidores de PCR de muestras que contienen actividad de proteasa endógena (Kreader 1996). Utilizando los resultados de la sonda, cebadores y *Taq* ADN polimerasa, se realizó un PCR en donde se añadió SAB a distintas concentraciones por reacción (0.1mg/ µl, 0.3mg/ µl, 0.4 mg/ µl). Esto se realizó con el fin de observar si este aditivo ocasionaba un incremento en los valores de fluorescencia.

4.3.2.5. Cantidad de ADN: PCR cuantitativo (qPCR)

La sensibilidad del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa fue probada utilizando ADN de un macho de *Tursiops truncatus* en una dilución de 10X (20 ng/µl, 2.0 ng/µl, 0.2 ng/ µl y 0.02 ng/µl) en intervalos de 40ng a 4pg (en cinco ordenes de magnitud). La cantidad de template objetivo en una muestra se calcula graficando el el valor de *Ct* en una curva estándar versus la cantidad de ADN.

4.3.2.6. Prueba de sensibilidad a la contaminación con ADN humano para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa fue probado en ADN de un hombre humano. Se realizó un PCR con cuatro temperaturas de alineamiento distintas (58, 60, 62 y 64°C).

4.3.2.7. Replicabilidad del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Se determinó el sexo de 25 muestras de cachalotes previamente sexados por amplificación del gen SRY y el gen de la queratina (Richard *et al.*, 1994) (NT Rubio – Cisneros *et al.*, datos no publicados). Esto con el fin de probar el nivel de réplica y veracidad de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

5. RESULTADOS

5.1. Optimización de cebadores CETZFX_Y_F1 y CETZFX_Y_R1 por medio de PCR.

El $MgCl_2$ y la temperatura de alineamiento fueron modificados para encontrar las condiciones óptimas de los cebadores a través de PCR (Figuras 2-4). De las distintas concentraciones de $MgCl_2$ (1.5mM, 2.0 mM, 4.0mM y 6.0 mM.) y temperaturas de alineamiento (56°C, 57°C, 58°C), 6.0mM $MgCl_2$ y 56°C fueron las condiciones que mostraron los mejores resultados en los geles de agarosa al 2%, ya que las bandas de 105 pb fueron las más brillantes (Figura 4). Para este estudio la diversidad de muestras provenientes de distintas especies y distinta calidad de ADN puede ser la razón por la que la menor temperatura de alineamiento funcionara mejor. Se llevaron a cabo 27 reacciones de PCR bajo las mismas condiciones y se obtuvieron resultados exitosos, ya que se amplificó el fragmento de 105 pb (ubicado en los genes ZFX/ZFY) y se conoció el sexo de 30 especies de cetáceos de 8 familias distintas (Tabla 1).

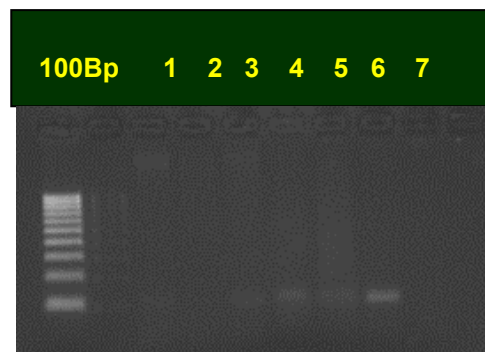


Figura 2. Gel de agarosa al 2%. Primer línea marcador de 100 pb. Líneas de la 1-5 distintas muestras de cachalote (*Physeter macrocephalus*), línea 6 corresponde a muestra del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), línea 7 control negativo (H_2O). Temperatura de alineamiento 58°C, 1.5mM. $MgCl_2$. En esta figura no se observan resultados positivo las bandas son apenas visibles.

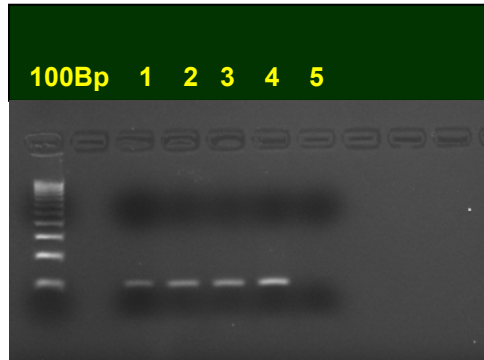


Figura 3. Gel de agarosa al 2%. 1ª línea corresponde al marcador de 100 pb. Líneas 1-2 macho y hembra de la marsopa de Dal (*Phocoenoides dalli*), línea 3 macho de ballena piloto de aleta corta (*Globicephala macrorhynchus*), línea 4 delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), línea 5 control negativo (H₂O). Temperatura de alineamiento 56°C, MgCl₂ 2.0mM.

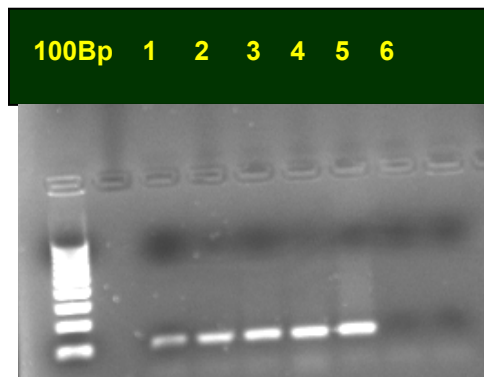


Figura 4. Gel 2% de agarosa. 1er línea marcador de 100 pb. Línea 1, hembra de ballena franca del Pacífico Norte (*Eubalaena japonica*), línea 2 macho de ballena de Bryde (*Balaenoptera edeni*), líneas 3 y 4 macho y hembra de ballena bowhead (*Balaena mysticetus*), línea 5 delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), línea 6 control negativo (H₂O). Temperatura de alineamiento 56°C y MgCl₂ 6.0 mM.

5.2. Optimización de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real.

La primera prueba con PCR en tiempo real fue verificar el sexo de un macho y una hembra de *Tursiops truncatus*. El programa de PCR se muestran en la Tabla V. Se utilizó una temperatura de alineamiento de 56°C y MgCl₂ 6.0mM. La mezcla de reactivos de PCR fue la misma de la Tabla IV. Los resultados fueron positivos para las muestras de hembra y

macho de *Tursiops truncatus*. La Figura 5 es un ejemplo de como el software de PCR en tiempo real agrupo las muestras de acuerdo a los valores de fluorescencia y asigno los genotipos alelicos de la siguiente manera: X para hembras y XY para machos (Figura 5). La Tabla VI muestra los valores de fluorescencia de los colorantes CY5 (Y locus) y FAM (X locus).

Tabla VI. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 y FAM en muestras de machos y hembras de *Tursiops truncatus*.

Muestra	Nombre correcto	Identificación de laboratorio	Fluorescencia CY5	Fluorescencia FAM	Genotipo
T tru M	A2	4363	1107.914	7124.835	XY
T tru M	A3	4363	1263.741	7165.142	XY
T Tru F	A4	4366	31.435	10824.019	X
T Tru F	A5	4366	17.079	9926.043	X
Agua	A6		6.542	29.542	Ninguno

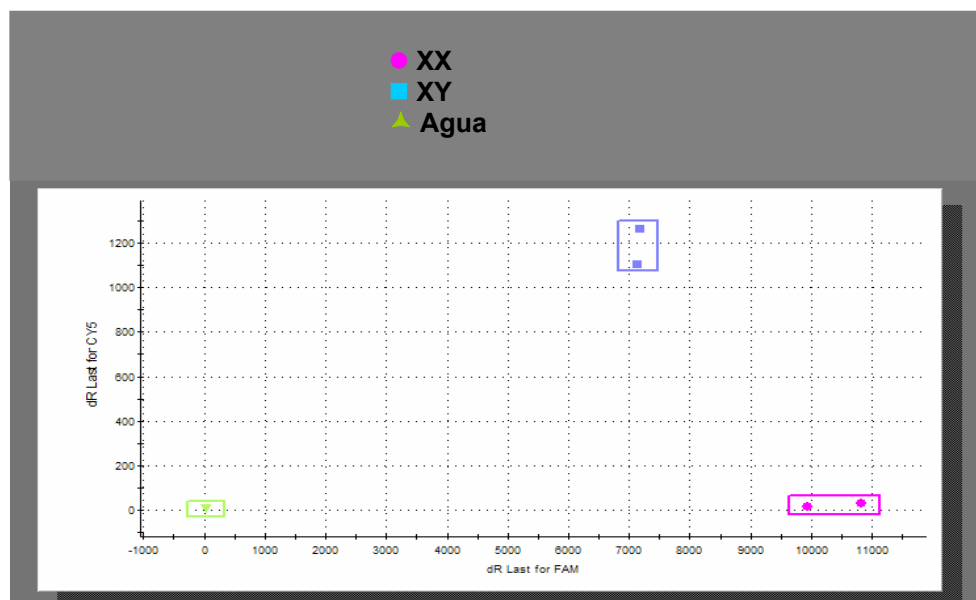


Figura 5. Ejemplo de cómo el software de PCR en tiempo real agrupa las muestras de acuerdo a los valores de fluorescencia de los colorantes CY5 (Y locus) y FAM (X locus). Las Hembras se muestran en color rosa y los machos en color azul. El control negativo (agua) se muestra en verde. Los números de muestra son iguales a los mostrados en la Tabla VI. Las muestras A2/A3 y A4/A5 son duplicados.

5.2.1. Prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY.

El objetivo de una sonda experimental es obtener la menor concentración de sonda con altos valores de fluorescencia y bajos valores de Ct. Se probaron tres concentraciones de sondas: 100 nM, 200 nM y 300 nM. Los valores más altos de fluorescencia se obtuvieron con la sonda de 100 nM, con valores bajos de Ct (ver flecha verde en Figura 6). La Figura 7 representa una manera diferente de observar que la sonda de 100nM presentó los mejores resultados. Además, se muestran los valores de fluorescencia de los colorantes CY5 (locus Y) y FAM (locus X); las hembras se representan en rosa, los machos en azul y el control negativo (agua) en verde. Los números de muestra se presentan en la tabla VII.

Tabla VII. Prueba de concentración de las sondas ZFX/ZFY. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 y FAM a diferentes concentraciones de sondas (100 – 300nm) en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. M= machos, F= hembras. Subrayados se encuentran los valores mas altos de fluorescencia obtenidos en esta prueba.

Tipo de Prueba	Conc. Muestra/Sonda	Nombre	Id. Lab	Fluorescencia CY5	Fluorescencia FAM	Genotipo
Conc. Sonda	T tru M/100 nM	A2	4363	<u>1509.92</u>	<u>2680.985</u>	XY
	T tru F/ 100 nM	A3	4366	<u>853.593</u>	<u>5518.24</u>	X
Stock (20 Mm)	T tru M/ 200 nM	A4	4363	429.935	2390.892	XY
	T tru F/ 200 nM	A5	4366	321.002	2856.894	X
	T tru M/ 300 nM	A6	4363	139.787	1644.432	XY
	T tru F/ 300 nM	A7	4366	93.508	4256.854	X
	Agua 100	A8		81.696	70.803	Ninguno
	Agua 200	A9		10.949	-99.832	Ninguno
	Agua 300	A11		57.474	-11.872	Ninguno

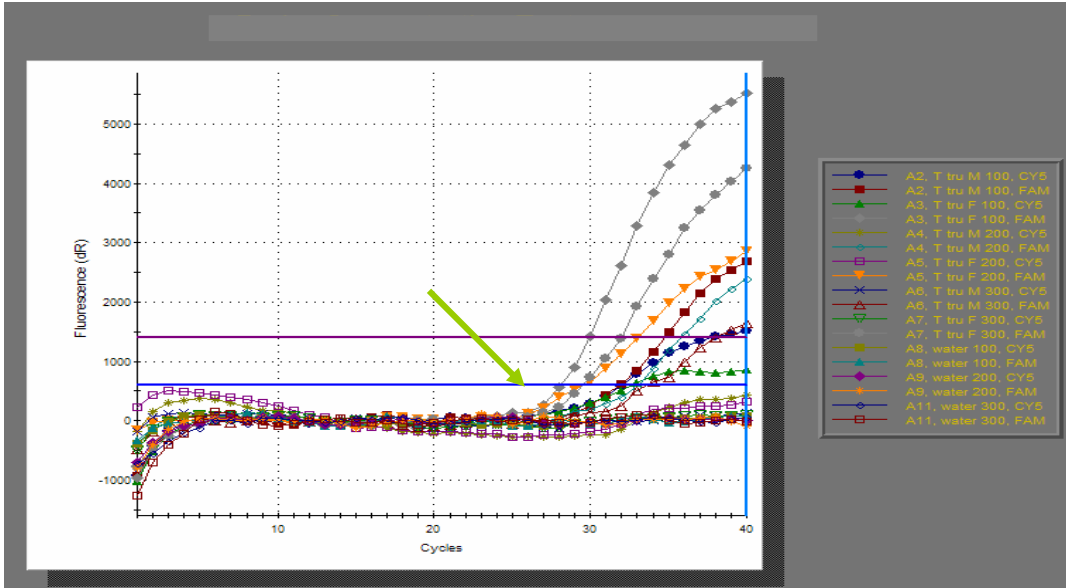


Figura 6. Valores de fluorescencia de las diferentes concentraciones de sonda en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. La flecha verde muestra la región en el eje x donde comienzan los valores de Ct.

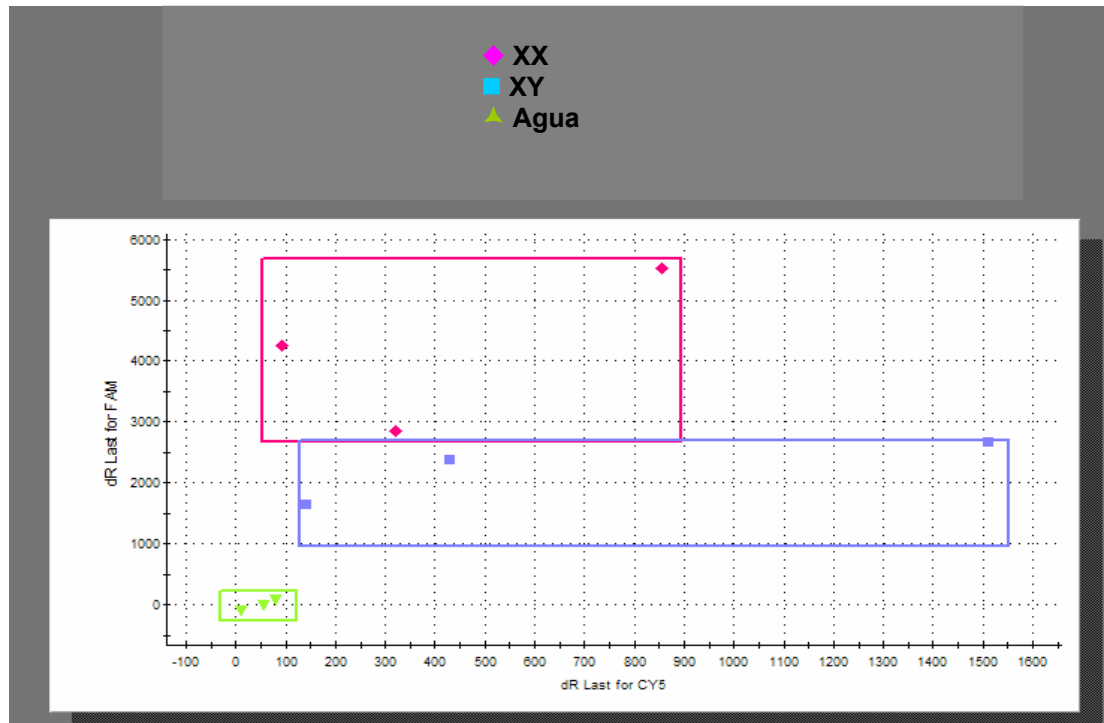


Figura 7. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 (locus Y) y FAM (locus X). El color rosa representa a las hembras, el azul a los machos y el verde al agua. Las muestras A2/A3, A4/A5 son réplicas.

5.2.2. Prueba de concentración de los cebadores.

Comúnmente las reacciones de PCR utilizan concentraciones de cebadores de 200 – 300nM (Henegariu *et al.*, 1997). En este caso se utilizó la concentración de 600nM ya que a pesar de ser una concentración alta de cebadores presentó los valores más altos de fluorescencia y bajos valores de Ct (Figura 9). Esta concentración se utilizó en todas las reacciones de PCR subsecuentes donde se amplificó la región de 105 pb de los genes ZFX y ZFY.

Tabla VIII. Pruebas de concentración de cebadores. Valores de fluorescencia de los colorantes CY5 y FAM a diferentes concentraciones de cebadores (300 – 600nM) en muestras de hembra y macho de *Tursiops truncatus*. M= machos, F= hembras.

Tipo de Prueba	Muestra	Id. Lab.	CY5	FAM	Genotipo
Conc. cebador	T tru M 300:300 nM	4363	98.805	1469.542	XY
Conc. Stock 20µM	T tru F 300:300 nM	4366	431.771	434.089	X
	T tru M R300:F600 nM	4363	69.793	1571.083	XY
	T tru F R300:F600 nM	4366	908.354	2569.879	X
	T tru M R600:F300 nM	4363	342.801	3266.754	XY
	T tru F R600:F300 nM	4366	851.77	1515.123	X
	T tru M 600:600 nM	4363	464.963	7645.235	XY
	T tru F 600:600 nM	4366	1372.646	3856.484	X
	Agua 600:600 nM			-139.372	-1178.266
2ª prueba	T tru M 600:600 nM	4363	1922.849	10058.064	XY
	T tru F 600:600 nM	4366	42.443	14929.587	X
	T tru M 900:900 nM	4363	1830.99	8682.64	XY
	T tru F 900:900 nM	4366	39.835	11890.759	X
	Agua 600:600			0.297	88.984

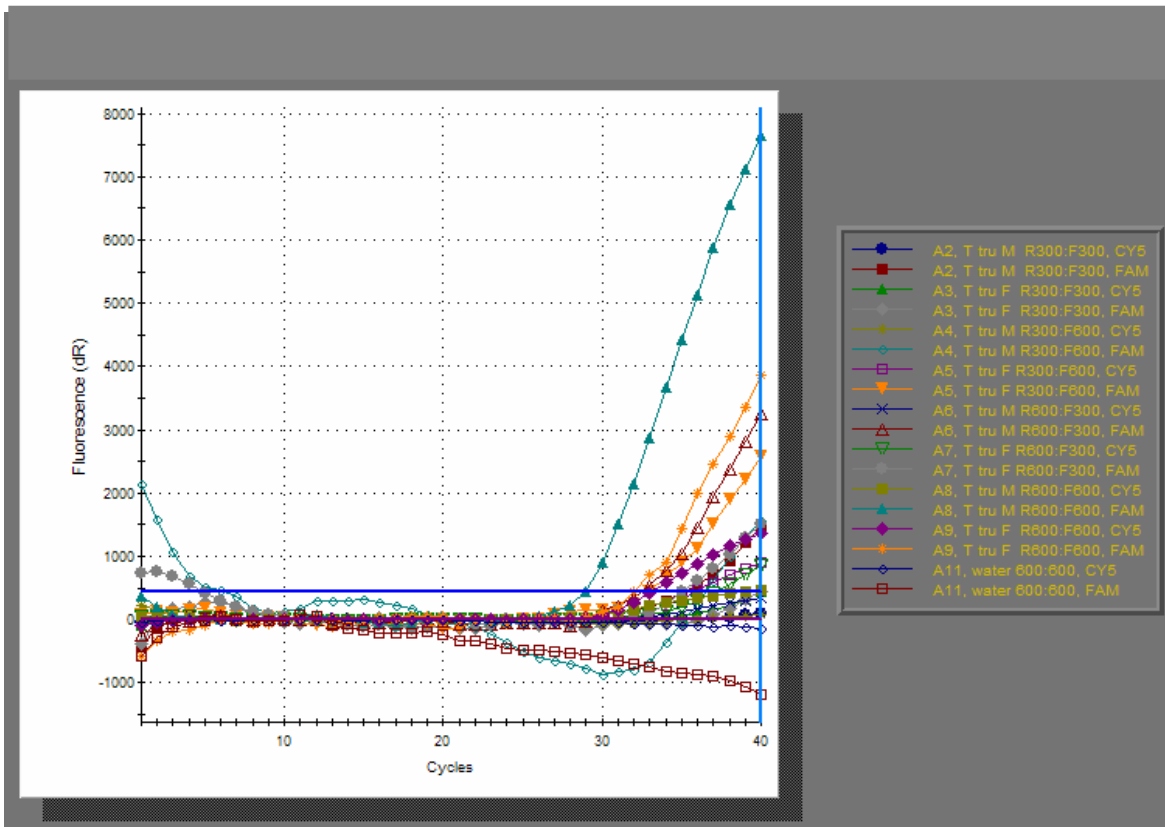


Figura 8. Valores de fluorescencia de las diferentes concentraciones de cebadores en muestras de hembra y macho de *Tursiops truncatus*. Los valores más bajos de Ct para los colorantes CY5 y FAM fueron 26.92 y 28.91 para hembras (A9), y 27.39 y 31.93 para machos (A8). Estas muestras contenían una concentración de cebadores de F600nM:R600nM, y presentaron los valores más altos de fluorescencia.

5.2.3. Prueba de tipos de *Taq* polimerasa.

Los valores más altos de fluorescencia fueron para aquellas muestras en las cuales se utilizó una ADN *Taq* polimerasa de alta temperatura de inicio (Figura 9, Tabla IX).

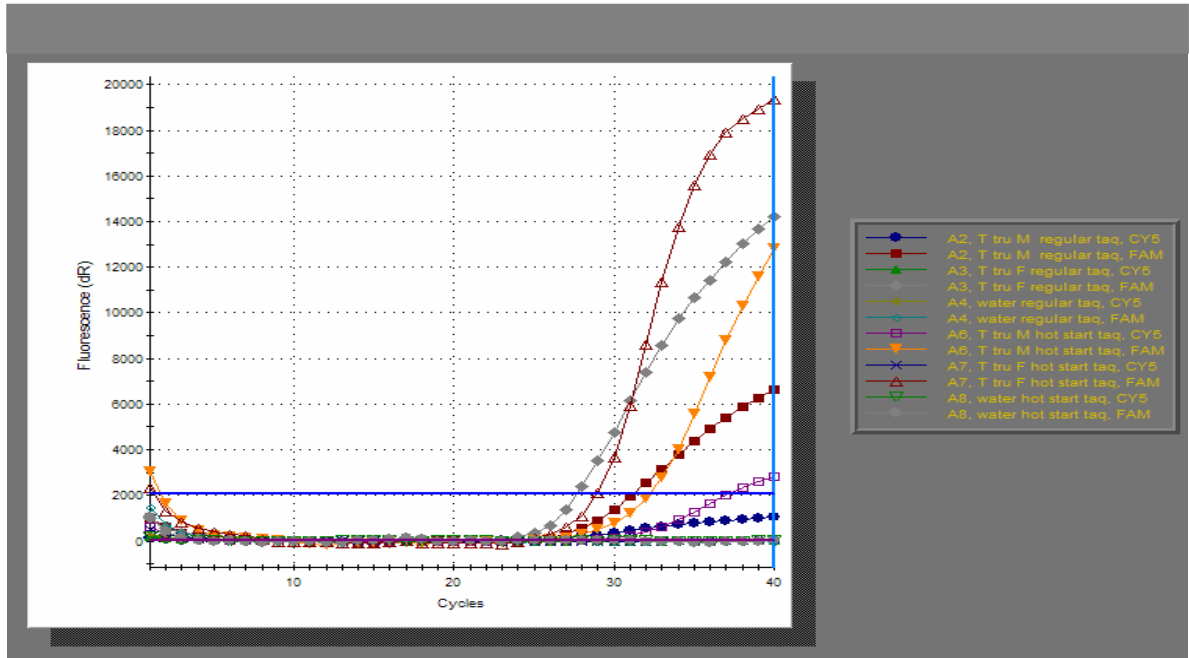


Figura 9. Pruebas de *Taq* polimerasa de inicio regular y de alta temperatura. Los valores de fluorescencia más altos fueron para las muestras A6 – A8, donde se utilizó *Taq* polimerasa de alta temperatura de inicio.

Tabla IX. Prueba de tipos de *Taq* polimerasa. Valores de fluorescencia para los colorantes de CY5 y FAM con *Taq* polimerasa de inicio regular y de alta temperatura (AT) en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. M= macho, F= hembra. Subrayados se encuentran los valores mas altos obtenidos en esta prueba.

Tipo de Sonda	Muestra	Id. Lab	CY5	FAM	Genotipo
Taq vs Taq (AT)	T tru M Taq	4363	1045.721	6634.734	XY
Conc. Stock. 5 unidades	T tru F Taq	4366	29.122	14209.66	X
	Agua Taq		5.961	0.43	Ninguno
	T tru M Taq (AT)	4363	<u>2846.758</u>	12839.985	XY
	T tru F Taq (AT)	4366	87.177	<u>19369.053</u>	X
	Taq Agua (AT)		9.435	44.655	Ninguno

5.2.4. Prueba de Suero de Albúmina Bovina SAB (BSA Bovine Serum

Albumina por sus siglas en inglés).

En las reacciones de PCR donde se utilizó suero de albúmina bovina (SAB), los valores de fluorescencia no fueron mucho mayores que los obtenidos previamente (Tabla X). En trabajos previos realizados en el laboratorio de biología molecular de SWFSC, el SAB ha proporcionado resultados positivos como aditivo en muestras cuya determinación de sexo resultaba difícil. Dado que se obtuvieron resultados similares para estas muestras con todas las concentraciones de SAB, se seleccionó la concentración de 2 mg/μl para condiciones óptimas. En el presente estudio se utilizó a las ballenas de aleta y minke, así como los cachalotes como ejemplo de una amplificación positiva de PCR tiempo real después de añadir SAB.

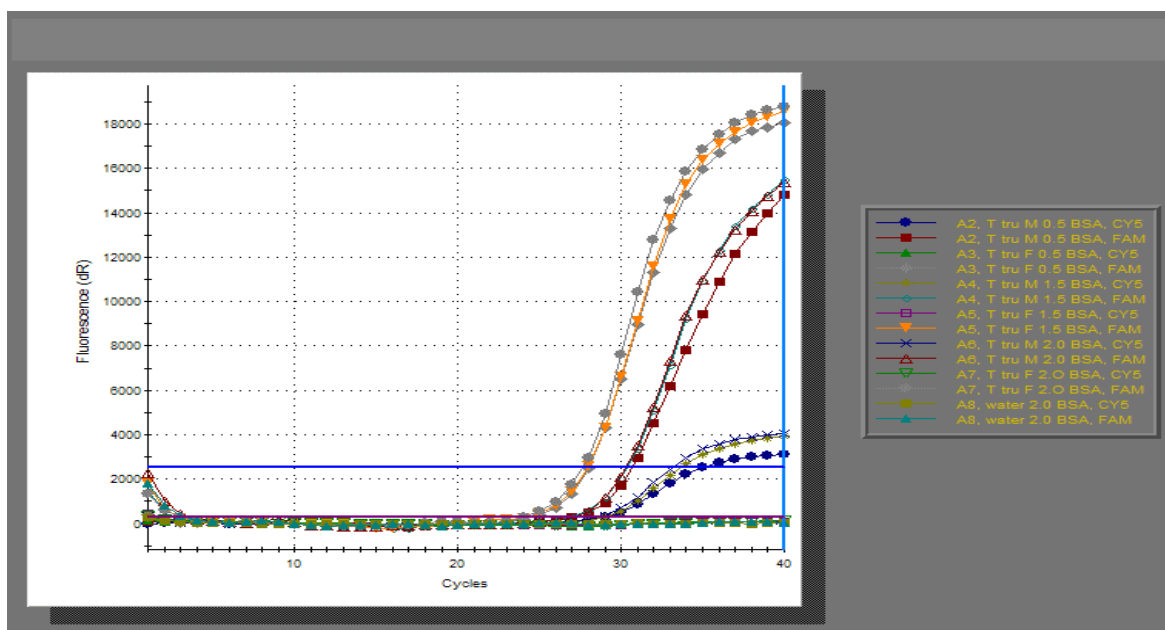


Figura 10. Prueba del suero de albúmina bovina (SAB). Las muestras con 2 mg/ μl de SAB presentaron los valores más altos de fluorescencia.

Tabla X. Prueba de concentración de suero de albúmina bovina (SAB). Valores de fluorescencia para los colorantes CY5 y FAM con SAB en muestras de hembras y machos de *Tursiops truncatus*. M= machos, F= hembras. Los valores más altos obtenidos en esta prueba se encuentran subrayados.

Tipo de Prueba	Muestra	Id. Lab	CY5	FAM	Genotipo	
Suero de Albumina Bovina (SAB)	T tru M 0.5mg/μl	4363	3129.84	14801.934	XY	
Conc. Stock 5mg/ μl	T tru F 0.5 mg/μl	4366	94.585	18033.852	X	
	T tru M 1.5mg/μl	4363	3927.829	15514.37	XY	
	T tru F 1.5 mg/μl	4366	104.127	18576.319	X	
	T tru M 2.0 mg/μl	4363	<u>4055.606</u>	15370.656	XY	
	T tru F 2.0 mg/μl	4366	115.141	<u>18773.334</u>	X	
	Agua 2.0 mg/μl			13.973	11.057	Ninguno

5.2.5. Cantidad de ADN: PCR cuantitativo (qPCR).

Los coeficientes de correlación (R^2) para los colorantes CY5 (Figura 11) y FAM (Figura 12) fueron de 0.9899 y 0.973, con eficiencias de 1.05 y 1.09, respectivamente. Los valores altos de los resultados de las regresiones, describen el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa como una reacción eficiente (Smith *et al.*, 2002).

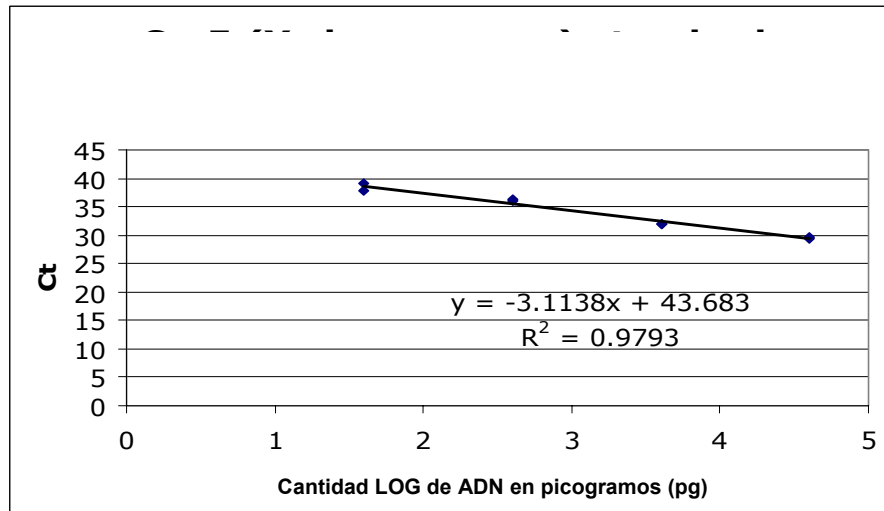


Figura 11. Curva estándar del colorante CY5 (cromosoma Y) para una muestra de ADN de *Tursiops truncatus* macho.

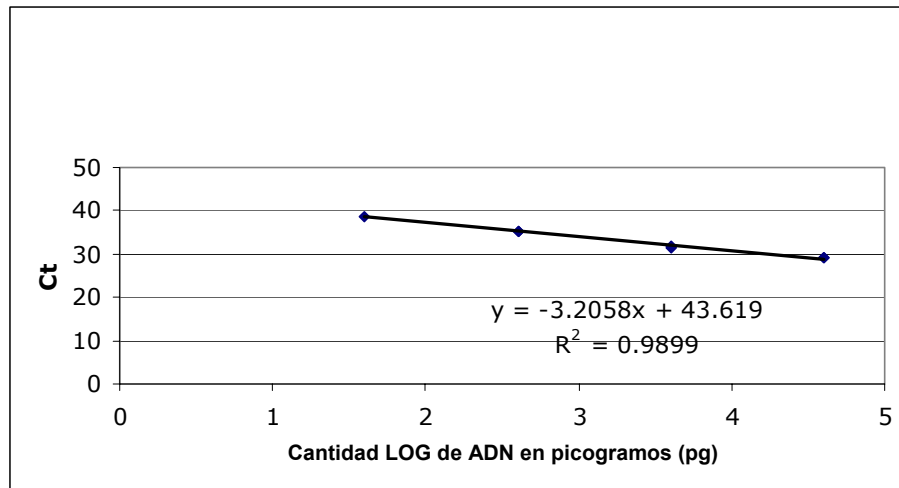


Figura 12. Curva estándar del colorante FAM (cromosoma X) para una muestra de ADN de *Tursiops truncatus* macho.

5.2.6. Prueba de sensibilidad a la contaminación con ADN humano para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

En las temperaturas de alineamiento utilizadas para analizar la sensibilidad de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa con el ADN humano (58°, 60°, 62°), la sonda del ZFX produjo una señal indicando que la sonda es lo suficientemente estable para ser dividida a pesar de 2 sustituciones con el gen ZFX humano, y se presume que se alinie al gen ZFY con el que sólo presenta una sustitución. A pesar de existir sustituciones, puede presentarse alguna señal en las pruebas de la 5' exonucleasa, dependiendo de su localización (Morin *et al.*, 199; Smith *et al.*, 2002). Esto podría solucionarse utilizando temperaturas de alineamiento mayores a las utilizadas en este trabajo, o utilizando sondas que reconocen el canal menor de la doble helice de ADN (minor groove binding probes) que utilizan nucleotidos modificados para aumentar la eficiencia de las sondas (Kutyavin *et al.*, 2000).

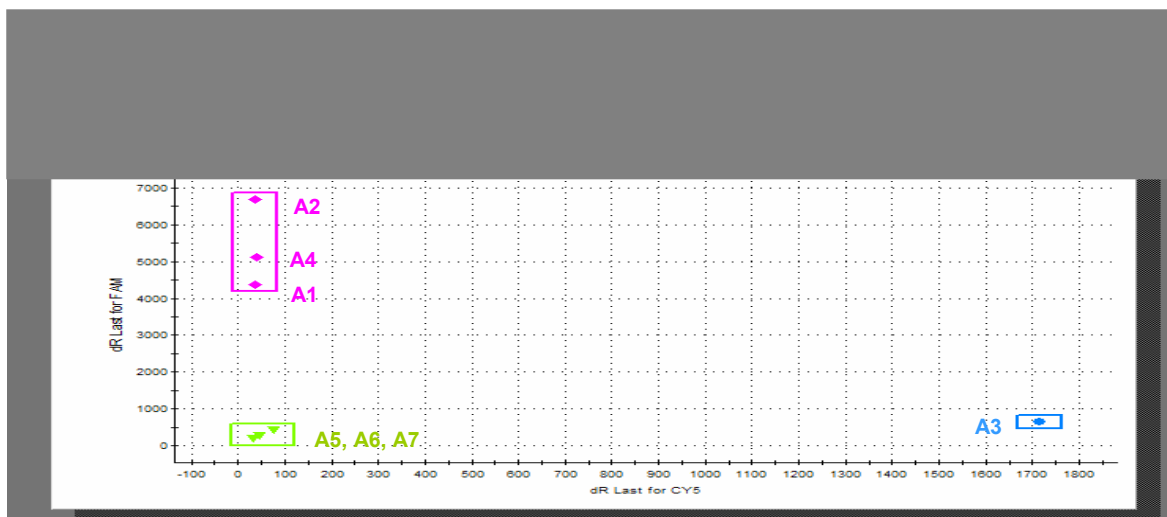


Figura 13. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 58° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.

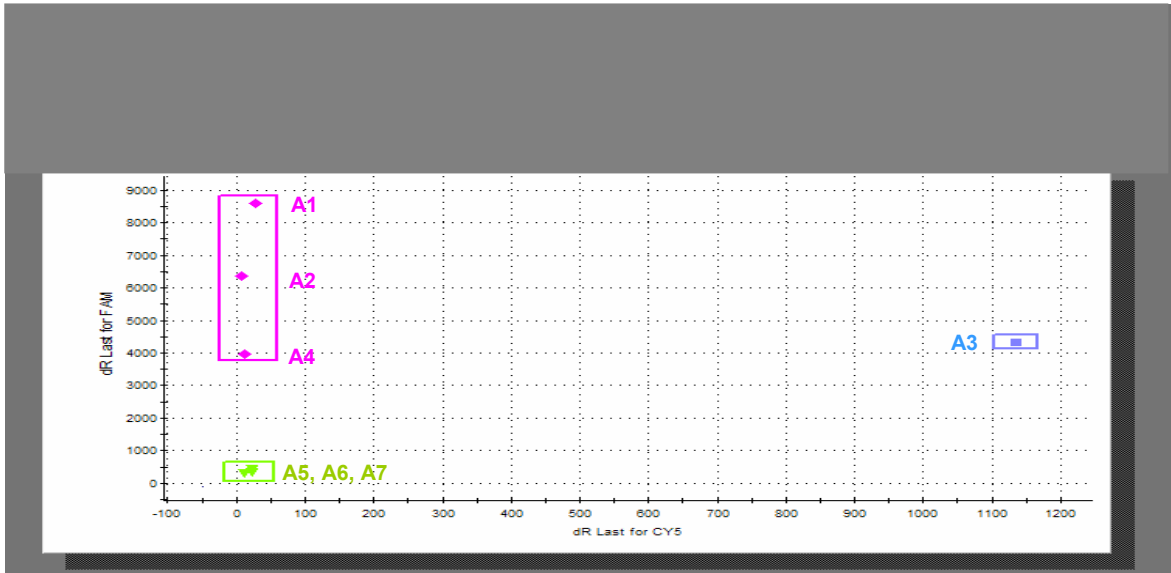


Figura 14. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 60° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.

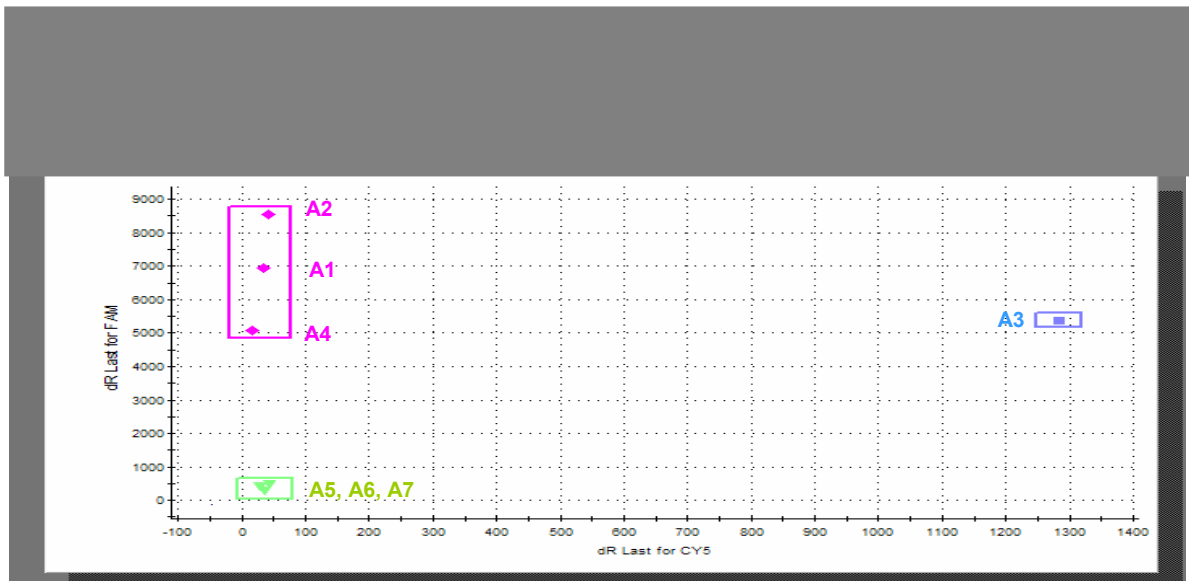


Figura 15. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 62° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua

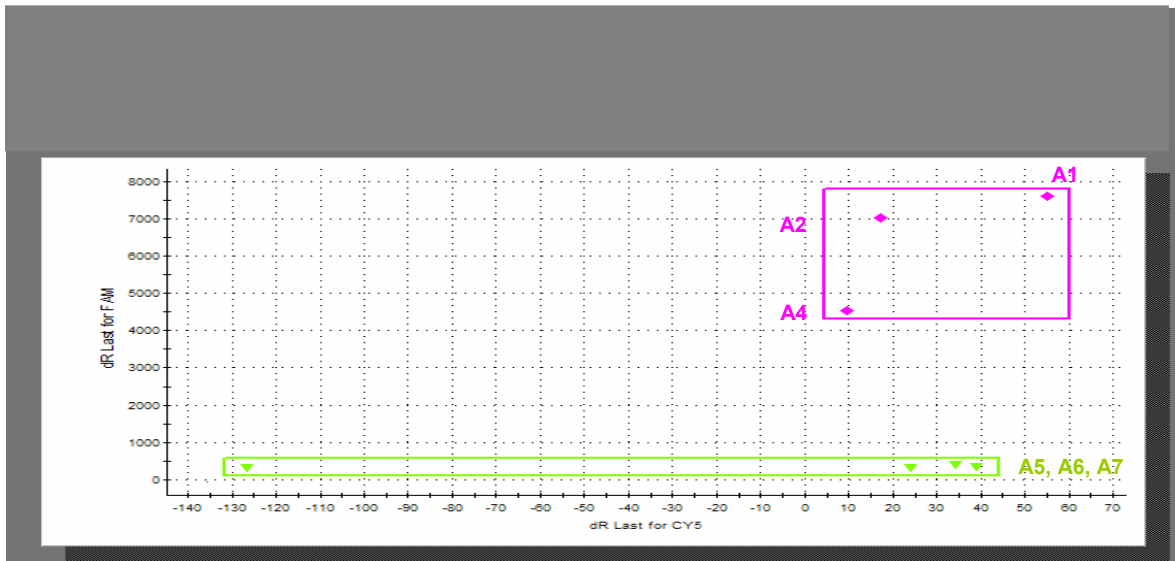


Figura 16. Prueba de sensibilidad de ADN humano. Resultados obtenidos con 64° C de temperatura de alineamiento. A1: ADN macho humano 1:100; A2: ADN macho humano 1:1000; A3: ADN cachalote macho; A4: ADN cachalote hembra; A5, A6, A7: agua.

5.2.7. Replicabilidad del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Se utilizó la prueba ZFX/ZFY en 25 muestras de cachalote previamente sexadas utilizando la amplificación del gen SRY (Richard *et al.*, 1994) y el gen de la queratina (NT Rubio – Cisneros *et al.*, Datos sin publicar); 24 de estas muestras coincidieron con la determinación del sexo previa, la muestra 25 no amplificó.

El par de muestras (4363, 4366) de delfín nariz de botella (*T. truncatus*) utilizadas para la optimización de la prueba como controles positivos fueron sexadas 10 veces con diferentes pruebas en días distintos, y siempre se obtuvo un resultado acorde con el sexo conocido de dichos individuos, indicando alta reproducibilidad de la prueba.

5.2.8. Resultados del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la determinación del sexo en diferentes especies de cetáceos.

Después del proceso de optimización, se utilizó el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para determinar el sexo de noventa muestras únicas. De las noventa muestras, veinte no amplificaron, de las cuales 18 eran muestras únicas y no amplificaron en el primer intento. Once de las muestras fallidas fueron probadas de nuevo y 10 de ellas amplificaron exitosamente. De las 83 determinaciones de sexo exitosas, inicialmente 6 presentaron contradicción con los datos de campo; dos de ellas eran errores de los datos al momento de capturarlos en el laboratorio, y tres resultaron error de clasificación ya que se basaban en observaciones de animales completos, sin una inspección de la zona genital o gónadas. La sexta muestra (3735, sexada como macho por examen de las gónadas) fue extraída de nuevo del tejido original y sexada utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa y la técnica de Fain y Lemay (1995) con base en la co-amplificación de los genes SRY y ZFX. La técnica de Fain y Lemay (1995) falló dos veces para esta muestra, mientras que el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa confirmó que la muestra pertenecía a una hembra, indicando una posible confusión de la muestra al ser archivada.

6. Discusión

Se desarrolló el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para discriminación alélica del sexo en cetáceos con base en trabajos previos realizados por Morin *et al.*, (1999, 2004). Este método presenta alta sensibilidad a las regiones polimórficas ZFX/ZFY conocidas como Polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) encontradas en los cromosomas X y Y en los genes ZFX y ZFY de cetáceos. El producto amplificado por esta ensayo tiene un

tamaño pequeño ideal de 105pb lo que permite amplificar eficientemente muestras con ADN degradado o de baja concentración (Smith *et al.*, 2002). El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa resultó ser sensible con concentraciones de ADN tan bajas como 40 picogramos. Además, se encontró que dicha prueba fue confiable, precisa y corroboró exitosamente el sexo de 33 especies de cetáceos de 9 familias.

6.1. Resultados de la optimización de la prueba exonucleasa 5' ZFX/ZFY.

El proceso de replicación artificial de ADN es posible mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), donde se pueden obtener copias múltiples de una secuencia deseada (Saiki *et al.*, 1987). Un PCR puede desarrollarse utilizando pequeñas cantidades de: (1) ADN objetivo; (2) un par de secuencias de AND sintético de cadena sencilla (cebadores); (3) deoxinucleótidos (dNTP's) como bloques constructores de ADN; (4) Taq polimerasa, que cataliza la síntesis del ADN; (5) Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y (6) Solución amortiguadora (Buffer). La cantidad y concentración de los diferentes reactivos en la mezcla de PCR son esenciales para que la reacción funcione. El proceso de optimización engloba la prueba de diferentes cantidades y concentraciones de los reactivos, la mayoría de las veces de manera empírica. En ésta sección se discuten aspectos de la optimización de la concentración de $MgCl_2$, concentración de cebadores, la adición de suero de albúmina bovina (SAB), y cómo se evitaron errores por contaminación.

Una estrategia sencilla e importante para la optimización del PCR es la titulación de la concentración del ión de magnesio (Mc Pherson y Moller, 2000, Henegariu, 1997). El Magnesio es el segundo elemento más abundante en los sistemas celulares (Hartwig, 2001).

Los iones de magnesio son esenciales para la fidelidad de la replicación del ADN, ya que forman complejos con los dNTP's y posicionan los nucleótidos. La ADN Taq polimerasa requiere de iones libres de Magnesio (Mg^{2+}) y muestra su actividad más alta alrededor de concentraciones de 1.2-1.3 mM Mg^{2+} libre. Existe unión equimolar entre los dNTP's y el Magnesio. En los resultados de la optimización encontramos que la concentración más alta de Mg^{2+} de 6mM funcionó mejor. En nuestra reacción final, se utilizó una concentración de dNTP's igual a 150 μ M de cada uno, con un total de dNTP's igual a 600 μ M. La concentración total de Mg^{2+} libre fue de 5400 μ M Mg^{2+} , que es mucho mayor que la concentración óptima de Mg^{2+} para la ADN Taq polimerasa. Un exceso de Magnesio en la reacción puede causar una predisposición de la Taq polimerasa a cometer errores. Este no fue el caso para el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa y la concentración 6mM Mg^{2+} mostró la banda brillante esperada en las 105 pares de bases en un gel de 2% agarosa. Henegauri *et al.*, 1997 analizaron parámetros críticos en PCR multiple y reportaron que los cebadores con productos de amplificación cortos trabajan mejor en concentraciones mayores de sales, mientras que los cebadores con productos de amplificación largos trabajan mejor con concentraciones bajas de sales.

La concentración de cebadores para su uso con sondas Taq Man puede ser optimizada empíricamente variando la concentración de 50nM a 300nM (Stratagene, 2003). Henegauri *et al.*, (1997) sugieren que la concentración de cebadores para reacciones de PCR multiples debe variar de 200 a 300nM. Mc Pherson y Moller (2000) presentan un intervalo de concentración de cebadores de 100-1000 nM en la optimización de reacciones de PCR. Nuestra mejor concentración de cebadores para la exonucleasa 5' ZFX/ZFY fue de

600nM; a pesar de que es una alta concentración para su uso con sondas Taq Man se encuentra dentro del intervalo propuesto por Mc Pherson and Moller para la amplificación mediante PCR.

La actividad de la Taq polimerasa puede ser inhibida por sustancias presentes en las muestras de tejido. Para evitar esta situación, se utilizó suero de albúmina bovina (SAB) como aditivo por sus propiedades de adhesión a lípidos vía fuerzas hidrofóbicas evitando así la inhibición del PCR provocada por muestras que contengan actividad endógena de proteasas (Kreader 1996). A pesar de que el uso de este aditivo no incrementó los valores de fluorescencia, ayudó a obtener resultados con muestras de ballena de aleta, ballena minke, muestras de piel descamada de cachalote y ballena azul que presentaron problemas de amplificación.

Las muestras de piel de cachalote (n=5) y ballena azul (n=5) fueron colectadas entre los años de 1996 y 1999, donde la determinación del sexo se realizó utilizando amplificación por PCR regular. Los resultados fueron ambiguos a pesar de repetidos intentos de amplificación por PCR utilizando una variedad de métodos. El ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa se probó en estas 10 muestras y todas presentaron una determinación de sexo positiva. Este resultado positivo puede ser debido a que este ensayo es sensible a una amplia gama de concentraciones de ADN (Morin *et al.*, 1999 y 2004).

La contaminación de las muestras siempre es un problema, particularmente en casos donde el técnico porta uno de los genes a prueba. Se controló la posible contaminación mediante dos procedimientos. Primero, en cada conjunto de experimentos utilizamos tres reacciones de PCR con agua como control negativo. En todas las reacciones llevadas a cabo en este estudio no se obtuvo contaminación en ningún control negativo. El segundo

procedimiento consistió en llevar a cabo una prueba de sensibilidad de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa al ADN humano, a diferentes temperaturas de alineamiento (58° C, 60° C y 62° C). La sonda ZFX produjo señal, indicando que la sonda es lo suficientemente estable para ser dividida a pesar de 2 sustituciones con el gen humano ZFX, y supuestamente se anilla con el gen ZFY, que sólo posee una sustitución. El uso de temperaturas de alineamiento mayores a las utilizadas en este trabajo pueden solucionar dicho problema; otra solución es el uso de sondas 3' de menor unión de ADN (3'-minor groove binder-DNA probes), que son sondas cortas con alta sensibilidad a sustituciones de bases que utilizan nucleótidos modificados para la especificidad de la sonda (Kutyavin *et al.*, 2000). Dichas sondas resultan una opción más costosa cuando se les compara con el uso de las sondas Taq Man. La amplificación del gen humano ZFX al utilizar el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa es posible si existe una contaminación significativa de ADN humano. Una forma de identificar la contaminación por ZFX humano puede ser la co – amplificación de otro loci humano específico (Wandeler *et al.*, 2003).

6.2. Propuestas y Recomendaciones.

El objetivo de este capítulo fue optimizar el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la determinación de sexo en cetáceos. Existieron algunos aspectos técnicos que no permitieron ser examinados debido a la falta de recursos y tiempo; dichos aspectos se discuten a continuación. Este método no fue probado con diferentes tipos de tejido, a pesar de que se realizaron pruebas preliminares con piel descamada. Sería recomendable probar este nuevo método con diferentes tipos de tejido como hueso, sangre, ADN antiguo, entre

otros tejidos. Tampoco fue posible examinar las diferencias en los resultados para muestras que varían en el tiempo de permanencia en el archivo de tejidos del SWFSC. Por último, sólo se tuvo tiempo suficiente para probar un tercio de todas las especies de cetáceos, y dentro de una especie, únicamente logramos probar dos muestras. Por lo tanto, no se examinó en su totalidad la variación entre individuos dentro de la especie, así como entre especies.

La técnica propuesta en este trabajo es relativamente costosa, pero rápida y factible. Esperamos que el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa comience a tener factibilidad en los laboratorios a nivel mundial lo que propiciará la actualización del mismo. Hasta hace algunos años, tener un termociclador en un laboratorio era poco frecuente, especialmente en laboratorios foráneos a los Estados Unidos de América, sin embargo, hoy en día, se comienzan a encontrar dichos equipos en otros países alrededor del mundo. Actualmente existe una variedad de métodos útiles en la determinación de sexo en cetáceos (ver la sección 1.4). La decisión de cada investigador sobre qué método utilizar depende del número de muestras, facilidades de laboratorio y presupuestos. Inicialmente, se espera que este método sea más útil en laboratorios que posean máquinas de PCR en tiempo real, o bien para aquellos investigadores que tengan que procesar un gran número de muestras. Éste método es más viable cuando las máquinas de PCR en tiempo real sean más comunes en los laboratorios.

6.3. Beneficios del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Cuando se compara con otros métodos de determinación de sexo que emplean PCR normal (ver sección 1.4), el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa tiene el beneficio de ser rápido y eficiente para muchas especies de cetáceos. En contraste, ninguna de las pruebas de determinación de sexo (e.g. Berube y Palbol, 1996, Rosel, 2003) han sido probadas en 33 especies de cetáceos de 9 familias distintas. Los resultados del PCR convencional, pueden observarse en el punto final de la reacción. Algunos de los problemas con esta forma de detección pueden incluir: baja sensibilidad, pobre detección y baja resolución. Además, los resultados sólo se expresan cualitativamente, más no cuantitativamente como en el caso del PCR en tiempo real, el cual proporciona un resultado numérico. Por lo tanto, los investigadores necesitan procesos posteriores al PCR para observar los resultados (e.g. los geles de agarosa). El uso de la tecnología de PCR en tiempo real con el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa permite obtener datos cuantitativos y cualitativos de la reacción de PCR, la sensibilidad y el intervalo de detección del producto de PCR son mayores. Además este ensayo es muy útil en muestras con distintas calidades de tejido y no son necesarios los procesos posteriores al PCR ya que los resultados se muestran directamente en el monitor de la computadora de la máquina de PCR en tiempo real.

Las crecientes aplicaciones de la genética en el estudio poblacional de los cetáceos requieren de métodos que sean precisos, rápidos, rentables y factibles. Esperamos la pronta disponibilidad de este nuevo método para los investigadores de todo el mundo que se apoyen en la genética para mejorar la conservación de las poblaciones de los mamíferos marinos. Finalmente, las facilidades tecnológicas del CIBNOR permitieran el uso de esta

nueva técnica y así seguir contribuyendo en la continua exploración de la investigación genética para la conservación de los mamíferos marinos, la cual es un área relativamente nueva en el CIBNOR.

7. Literatura Citada

- Aasen, E. y J. F. Medrano. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8(12): 1279–1281.
- Arnason, U., H. Bellamy, P. Eyporsson, R. Lutley, J. Sigurjonsson y B. Widegren. 1985. Conventionally Stained and C-Banded Karyotypes of a Female Blue Whale. *Hereditas* 102(2): 251-253.
- Ayling, L. J. y D. K. Griffin. 2002. The evolution of sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 99(1-4): 125-140.
- Baker, C. S., R. H. Lambertsen, M. T. Weinrich, J. Calambokidis, G. Early y S. J. O'brien. 1991. Molecular genetic identification of the sex of humpback whales (*Megaptera Novaeangliae*). International Whaling Commission Special Issue, 13. genetic ecology of whales and dolphins. Hoelzel, A. R. Cambridge, England, UK., International Whaling Commission VIII: 311(105-112).
- Berube, M. y P. Palsboll. 1996. Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology* 5(2): 283-287.
- Best, P. B. 1979. Social organization in sperm whales, *Physeter macrocephalus*. Behavior of Marine Animals. Olla, H. E. W. a. B. C. New York and London, Plenum Press. 3: 227-289.
- Burgoyne, P. S. 1982. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Human Genetics*(61): 85-90.
- Chadwick, B. P. y F. W. Huntington. 2003. Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome *Human Molecular Genetics* 12(17): 2167-2178.
- Clapham, P. J. y C. A. Mayo. 1987. Reproduction and recruitment of individually identified humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, observed in Massachusetts Bay, 1979-1985. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 65(12): 2853-263.

- Clarke, R. y O. Paliza. 1994. Sperm whales of the Southeast Pacific Part V. The dorsal fin callus. *Investigations on Cetacea*. Pillieri, G. XXV: 9-91.
- Croll, D. A., C. W. Clark, A. Acevedo, B. Tershy, S. Flores, J. Gedamke y J. Urban. 2002. Bioacoustics: Only male fin whales sing loud songs - These mammals need to call long-distance when it comes to attracting females. *nature* 417(6891): 809-809.
- Enriquez-Paredes, L. M. 2005. Identidad genética de la Población de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas., Universidad Autónoma de Baja California: 198.
- Fain, S. R. y J. P. Lemay. 1995. Gender Identification of Humans and Mammalian Wildlife Species from PCR amplified Sex Linked Genes. *Proceedings of the American Academy of Forensic Science*: 34.
- Finch, J. L., R. M. Hope y A. Vandaal. 1996. Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Science & Justice* 36(2): 93-95.
- Fredga, K. 1988. Aberrant chromosomal sexdetermining mechanisms in mammals, with special reference to species with XY females. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B*(322): 83-95.
- Garrigue, C. A., S. Baker, R. Dodemont y D. Steel. 2002. Estimating the abundance of humpback whales in New Caledonia using DNA genotyping and photo-identification.
- Graves, J. A. y S. Shetty. 2001. Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology* 290(5): 449-462.
- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79(2): 413-425.
- Hartwig, A. 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475(1-2): 113-121.
- Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance y V. P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Bio Techniques* 23(3): 504-511.
- Hoelzel, A. R., E. M. Dorsey, D. A. Duffield y R. H. Lambersteen. 1983. The absence of distinguishable sex chromatin in the integument of three species of mysticetes. 5th Biennial Conference on the Biology of MARine Mammals, Boston.
- Jegalian, K. y D. C. Page. 1998. A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes evolve to become X inactivated. *nature* 394(6695): 776-780.

- Just, W., W. Rau, W. Vogel, M. Akhverdian, K. Fredga, J. A. M. Graves y E. Lyapunova. 1995. Absence of Sry in Species of the Vole *Ellobius*. *Nature Genetics* 11(2): 117-118.
- Kreader, C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3): 1102-1106.
- Kruse, S., D.K. Caldwell and M.C. Caldwell 1999. Risso's dolphin *Grampus griseus* (G Cuvier, 1812). *Handbook of Marine Mammals*. Ridgeway, S. H. a. R. J. H. London, Academic Press. 6: 183-212.
- Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer y J. Hedgpeth. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures *Nucleic Acids Research* 28 (2): 655-661.
- Lambertsen, R. H., C. S. Baker, D. A. Duffield y J. Chamberlinlea. 1988. Cytogenetic Determination of Sex among Individually Identified Humpback Whales (*Megaptera-Novaeangliae*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 66(6): 1243-1248.
- Livak, K. J., S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti y K. Deetz. 1995. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting Pcr Product and Nucleic-Acid Hybridization. *Pcr-Methods and Applications* 4(6): 357-362.
- Luca Galluzzi, L., A. Penna, E. Bertozzini, M. Vila, E. Garce y M. Magnani. 2004. Development of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Quantification of *Alexandrium minutum* (a Dinoflagellate) *Applied and Environmental Microbiology* 70(2): 1199-1206.
- Mann, J., R. C. Connor, P. L. Tyack y H. Whitehead. 2000. *Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whales*. Chicago, University of Chicago Press.
- Mathews, E. 1986. Multiple use of skin biopsies collected from free ranging gray whales (*Eschrichtius robustus*): sex chromatin analysis, collection and processing for cell culture, microbiological analysis of associated microorganisms, behavioural response of whales to biopsying and future prospects for using biopsies in genetic and biochemical studies. . *Biology*. Santa Cruz, University of California Santa Cruz. Master of Science.
- Mathews, E. A. 1937. The humpback whale, *Megaptera nodosa*. *Discovery Report*: 7-92.
- Mcperson, M. J. y S. G. Moller. 2000. *PCR basics: From background to bench*. New York.

- Mitchell, M. J., S. A. Wilcox, J. M. Watson, J. L. Lerner, D. R. Woods, J. Scheffler, J. P. Hearn, C. E. y J. A. Graves. 1998. The origin and loss of the ubiquitin activating enzyme gene on the mammalian Y chromosome. *Human Molecular Genetics* 7(3): 429-434.
- Morin, P. A., G. Luikart y R. K. Wayne. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19(4): 208-216.
- Morin, P. A., A. Nestler, N. T. Rubio-Cisneros, K. M. Robertson y S. L. Mesnick. 2005. Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. *Molecular Ecology* 14(10): 3275-3286.
- Morin, P. A., R. Saiz y A. Monjabez. 1999. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' exonuclease assay. *Bio Techniques* 27(3): 538-+.
- Nakahori, Y., O. Takenaka y Y. Nakagome. 1991. A Human X-Y Homologous Region Encodes Amelogenin. *Genomics* 9(2): 264-269.
- Newby, D. T., T. L. Hadfield y F. F. Roberto. 2003. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green 1,5'-exonuclease, and hybridization probe assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8): 4753-4759.
- Page, D. C., R. Mosher, E. M. Simpson, E. M. C. Fisher, G. Mardon, J. Pollack, B. McGillivray, A. Delachapelle y L. G. Brown. 1987. The Sex-Determining Region of the Human Y-Chromosome Encodes a Finger Protein. *Cell* 51(6): 1091-1104.
- Palsboll, P. J., A. Vader, I. Bakke y M. R. Elgewely. 1992. Determination of Gender in Cetaceans by the Polymerase Chain-Reaction. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 70(11): 2166-2170.
- Perrin, W. F. y S. L. Mesnick. 2003. Sexual ecology of the spinner dolphin, *Stenella longirostris* geographic variation in mating system. *Marine Mammal Science* 19(3): 462-483.
- Quiagen. 2002. Hot Star Taq PCR Handbook, Quiagen: 36.
- Quintana-Murci, L. y M. Fellous. 2001. The human Y chromosome: The biological role of a "functional wasteland". *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 1(1): 18-24.
- Ralls, K. y S. L. Mesnick. Sexual Dimorphism. *Encyclopedia of Marine Mammals*. W.F. Perrin, B. W. a. H. G. M. T., Academic Press: 1071 – 1078.
- Rastogi, T., M. W. Brown, B. A. Meleod, T. R. Frasier, R. Grenier, S. L. Cumbaa, J. Nadarajah y B. N. White. 2004. Genetic analysis of 16th-century whale bones

prompts a revision of the impact of Basque whaling on right and bowhead whales in the western North Atlantic. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 82(10): 1647-1654.

- Reeves, R. R., W. F. Perrin, B. L. Taylor, C. S. Baker y S. L. Mesnick. 2004. Report of the Workshop on Shortcomings of Cetacean Taxonomy in Relation to Needs of Conservation and Management La Jolla, California, NOAA-NMFS-SWFSC: 94
- Reynolds, R. y J. Varlaro. 1996. Gender determination of forensic samples using PCR amplification of ZFX/ZFY gene sequences. *Journal of Forensic Sciences* 41(2): 279-286.
- Rice, D. W. 1998. *Marine Mammals of the World. Systematics and Distribution*. The Society for Marine Mammalogy Special Publication (4): 231.
- Richard, K. R., S. W. Mccarrey y J. M. Wright. 1994. DNA-Sequence from the Sry Gene of the Sperm Whale (*Physeter Macrocephalus*) for Use in Molecular Sexing. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 72(5): 873-877.
- Richard, K. R., H. Whitehead y J. M. Wright. 1996. Polymorphic microsatellites from sperm whales and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin. *Molecular Ecology* 5(2): 313-315.
- Rosel, P. E. 2003. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation Genetics* 4(5): 647-649.
- Rosenbaum, H. C., M. G. Egan, P. J. Clapham, R. L. Brownell y R. Desalle. 1997. An effective method for isolating DNA from historical specimens of baleen. *Molecular Ecology* 6(7): 677-681.
- Rosenberg, A. y S. L. Mesnick. 2001. The cetacean ZFX and ZFY Genes: interfamilial characterization of a novel region facilitates gender determination. *LJ-01-01*, N. M. F. S. A. R.
- Ruiz-Cooley, R. I., D. Gendron, S. Aguiniga, S. Mesnick y J. D. Carriquiry. 2004. Trophic relationships between sperm whales and jumbo squid using stable isotopes of C and N. *Marine Ecology-Progress Series* 277: 275-283.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Schneidergadicke, A., P. Beerromero, L. G. Brown, R. Nussbaum y D. C. Page. 1989. Zfx Has a Gene Structure Similar to Zfy, the Putative Human Sex Determinant, and Escapes X-Inactivation. *Cell* 57(7): 1247-1258.

- Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf, R. Lovellbadge y P. N. Goodfellow. 1990. A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif. *nature* 346(6281): 240-244.
- Smith, S., L. Vigilant y P. A. Morin. 2002. The effects of sequence length and oligonucleotide mismatches on 5' exonuclease assay efficiency. *Nucleic Acids Research* 30(20).
- Stratagene. 2003. Brilliant QPCR Core Reagent Kit. Instruction Manual: 1-20.
- Taberlet, P., H. Mattock, C. Duboispapanon y J. Bouvet. 1993. Sexing Free-Ranging Brown Bears *Ursus-Arctos* Using Hairs Found in the Field. *Molecular Ecology* 2(6): 399-403.
- Takahashi, M., R. Masuda, H. Uno, M. Yokoyama, M. Suzuki, M. C. Yoshida y N. Ohtaishi. 1998. Sexing of carcass remains of the Sika deer (*Cervus nippon*) using PCR amplification of the Sry gene. *Journal of Veterinary Medical Science* 60(6): 713-716.
- Wandeler, P., P. A. Morin, S. Smith, R. A. Pettifor y S. M. Funk. 2003. Patterns of nuclear DNA degeneration over time - a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology* 12(1087-1093).
- Whitehead, H. y J. C. Gordon. 1986. Methods of obtaining data for assessing and modelling sperm whale populations which do not depend on catches. Reports of the International Whaling Commission. Special Issue, NO. 8 Behavior Of Whales In Relation to Management. Donovan, G. P. Cambridge, England., International Whaling Comission: 149-166.
- Wilson, P. J. y B. N. White. 1998. Sex identification of elk (*Cervus elaphus canadensis*), moose (*Alces alces*), and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences* 43(3): 477-482.
- Winn, H. E., W. L. Bischoff y A. G. Taruski. 1973. Cytological sexing of Cetacea. *Marine Biology*(23): 343-346.

CONTENIDO

Capítulo 2: Aplicación del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa en cachalotes: determinación del sexo y su asociación con la presencia o ausencia del “callo” y utilización de microsatélites en la identidad de los machos adultos del Golfo de California.....	52
1. Introducción	52
2. Antecedentes.....	53
2.1. Distribución geográfica del cachalote.....	53
2.2. Historia natural de los cachalotes machos.....	54
2.3. Determinación del sexo en cachalotes: estudios morfológicos y genéticos.	57
2.4. Identificación de cachalotes por métodos de foto-identificación y genéticos.	59
2.5. Estudios de cachalotes en el Golfo de California.	59
3. Objetivos	60
4. Materiales y Métodos.....	61
4.1. Recolección y preservación de muestras de piel de cachalote.....	61
4.2. Extracción de ADN.....	62
4.3. Determinación del sexo por medio de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.....	63
4.4. Microsatélites.....	63
4.5. Amplificación de los Microsatélites por PCR.	66
4.6. Genotipificación de las muestras de cachalotes machos en el Golfo de California.	67
5. Resultados.....	68
5.1. Determinación de sexo en cachalotes utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.....	68
5.2. Identidad de cachalotes machos del Golfo de California utilizando microsatélites.	73
6. Discusión	74
6.1. Determinación del sexo en cachalotes utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.....	74
6.2. Aplicación del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa en la determinación del sexo y su asociación con la presencia o ausencia del “callo” en la aleta dorsal.	75
6.3. Identificación individual de cachalotes machos.	77

6.4. Estudios futuros.	78
8. Literatura Citada.....	81

Lista de Tablas: Capítulo 2	
Tabla I. Muestras de cachalotes machos de cachalotes utilizados para la identificación a nivel individuo.	66
Tabla II. Secuencias de los cebadores y estructura de las repeticiones de los 6 juegos de cebadores utilizados en este estudio.	67
Tabla III. Perfiles de temperatura utilizados para la amplificación por cebadores de los microsatélites.	67
Tabla IV. Resultados de la determinación de sexo para cachalote utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.	70
Tabla V. Resultados de la determinación del sexo en cachalote con el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa. En la tabla se presentan las muestras que tienen información acerca del callo de la aleta dorsal.	72
Tabla VI. Resultados de los 6 marcadores microsatelitales para muestras de machos y hembras de cachalote del Golfo de California. z# = número de identificación del laboratorio; año= en el que se recolectaron las muestras. En caso de encontrar coincidencia en un solo locus, se examinó a los individuos en loci adicionales.	73

Lista de Figuras: Capítulo 2

- Figura 1. Detección de microsatélites en ADN. En la figura se observan cebadores de flanqueo del PCR en direcciones forward y reverse de la región del microsatélite. Si no hay repeticiones en la región amplificada el producto de PCR será de 100 pb de longitud. En la figura observamos que existen repeticiones en la zona amplificada por los cebadores, cuando se determina la talla de cada producto de PCR en este caso 116 pb podemos saber cuantas repeticiones de CA hay en cada microsatélite, en este ejemplo se observan 8 CA. 64
- Figura 2. Muestras de piel descamada de cachalote que fallaron para la determinación de sexo. En color azul son las muestras trabajadas el 29/03/05; en color rosa son las muestras re procesadas el 01/04/05; en morado se observa el agua. 73
- Figura 3. Muestras de hembras y machos de cachalote que tuvieron resultados positivos en la determinación de sexo. Las hembras se muestran en color rosa; los machos en color azul; el agua en color morado. 73

Capítulo 2: Aplicación del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa en cachalotes: determinación del sexo y su asociación con la presencia o ausencia del “callo” y utilización de microsatélites en la identidad de los machos adultos del Golfo de California.

1. Introducción

La conservación de las especies se respalda en el conocimiento de la biología y ecología de ambos sexos, en las distintas clases de edades de los individuos de la especie. En el estudio del cachalote se ha dedicado mayor atención a incrementar el conocimiento de las hembras y sus crías en distintos aspectos como: movimiento, estructura y comportamiento de los grupos, el grado de parentesco y la comunicación acústica (*e.g.* Richard *et al.*, 1996, Lyrholm y Gyllensten, 1998). En cambio se ha estudiado poco sobre los cachalotes machos jóvenes y adultos (*e.g.* Whitehead *et al.*, 1992; Whitehead, 1993, Christal y Whitehead, 1997, Jaquet *et al.*, 2000, Lettevall *et al.*, 2002). En este capítulo se expresa el interés de aumentar nuestro entendimiento sobre los cachalotes machos usando al Golfo de California como un laboratorio natural.

Las bases del presente estudio son: el trabajo de campo de Gendron y Jaquet que va desde 1996 a la fecha. Sus censos de cachalotes en zonas profundas del Golfo de California han permitido comenzar a estudiar a esta población incluyendo a aspectos poco conocidos de la biología de los machos adultos. A continuación se presenta un marco teórico corto acerca de la distribución geográfica por sexos de los cachalotes, así como información acerca de la historia natural de los cachalotes machos. Además se resaltan aspectos importantes de los marcadores moleculares nuevos y tradicionales utilizados en este estudio y su aplicación en preguntas acerca de la determinación del sexo e identidad individual de

los cachalotes machos en el Golfo de California. Los objetivos fueron 1) aplicar el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa para la determinación del sexo y asociar la información del sexo de los individuos con la presencia o ausencia del “callo” (Clarke y Paliza 1994) y utilizar microsatélites para identificar los individuos de cachalotes machos adultos a partir de muestras recolectada en el Golfo de California entre los años 1996-2004. En este capítulo demostramos exitosamente la aplicación del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa, como una forma rápida y eficiente en la identificación del sexo a partir de muestras de piel descamada de los cachalotes. Se obtuvo información sobre el sexo y la presencia o ausencia del callo en la aleta dorsal de 19 cachalotes, resultados preliminares que se incrementarán con un mayor tamaño de muestra. Por otra parte, se determinó la identidad a nivel individuo de 10 cachalotes machos adultos del Golfo de California. También son resultados preeliminares que al continuarse en una tesis doctoral permitirá estudiar “patrones en la residencia y movimiento de cachalotes machos por métodos genéticos”, una pieza faltante en el pobre conocimiento de la ecología de cachalotes machos.

2. Antecedentes

2.1. Distribución geográfica del cachalote.

Los cachalotes muestran una distribución cosmopolita, se encuentran en todos los océanos del mundo desde el Ecuador hasta los bordes de hielo en los polos. Los machos y las hembras tienen una distribución segregada a nivel geográfico (Rice 1989). Las hembras y sus crías habitan comúnmente en aguas tropicales y subtropicales donde forman grupos de 20 a 40 individuos (Whitehead *et al.*, 1991). Los machos subadultos se distribuyen principalmente en latitudes templadas mientras que los machos adultos se encuentran en latitudes polares (Best, 1979, Rice, 1986). La distribución diferencial entre sexos de

cachalotes es una de las razones por las cuales hembras y machos se han estudiados por separado, lo que ha promovido un distinto nivel de conocimiento por sexo. El estudio de hembras y juveniles en aguas cálidas con condiciones ambientales favorables fue mayor contrario al estudio de los machos adultos con una distribución circumpolar con condiciones ambientales adversas (Jaquet *et al.*, 2000).

2.2. Historia natural de los cachalotes machos.

Los cachalotes poseen un marcado dimorfismo sexual esto se observa en diferencias de tamaño y talla, comportamiento, distribución y ecología. Los machos son mucho mas grandes que las hembras, ya que al final de su segunda década de vida llegan a medir hasta 13 metros; a los cuarenta años pueden llegar a medir hasta 18 m y pesar mas de 57 toneladas (Best, 1979). La cabeza de un macho adulto comprende mas de la tercera parte del peso total del individuo y llega a ser más de un cuarto de su longitud total (Rice, 1989). La cabeza contiene un saco superior llamado órgano de espermaceti, el cual esta lleno de aceite espermacético y un saco inferior o “junk”, lleno de otro aceite de alta densidad. En los machos adultos ambos sacos están hipertrofiados y pueden extenderse más allá de 1.5 m de la maxila (Berzin, 1972). Esta característica morfológica hace a los cachalotes machos los mas narizones del mundo (Cranford, 1999). Este autor ha sugerido que la selección sexual ha jugado un papel importante en la gran nariz de los machos de cachalotes, ya que ésta es utilizada como una máquina bio-acústica utilizada entre los machos para realizar competencias acústicas.

En los machos de ciertas especies de cetáceos como: northern bottlenose whale (*Hyperoodon ampullatus*), orca (*Orcinus orca*), ballena piloto (*Globicephala melas*), delfín moteado (*Stenella frontalis*) se han desarrollado comportamientos agresivos como el “empalme de cabezas o head-butting” y agresiones que producen cicatrices provocadas por

dientes (Gowans y Rendell, 1999). En los machos adultos de cachalotes se pueden presentar este tipo de encuentros y ocasionarse lesiones, las cuales son visibles a manera de cicatrices en las cabezas de algunos machos (Best, 1979; Macleod, 1998). Junto con la acción de empalmar las cabezas y la aparición de cicatrices en la cabeza por encuentros agresivos Carrier y colaboradores (2002) sugieren que el órgano de espermaceti también es utilizado como un arma para la agresión entre machos.

El gran tamaño de los machos adultos ocasionó que hayan sido blanco de los balleneros durante los siglos XIX y XX. Los machos adultos fueron altamente valorados por el aceite de espermaceti, el cual tenía una gran variedad de aplicaciones comerciales (funcionaba como aceite aditivo de motor, glicerina, detergente, etc.). La captura excesiva de cachalotes durante el periodo de 1950-1985 se relaciona con la falta de conocimiento sobre la biología del cachalote (Whitehead, 1987). Como consecuencia, para 1985 se registro un decremento en la cantidad de machos adultos en las Islas Galápagos incluso se reporta que debido a la captura selectiva de los machos adultos en las Galápagos su abundancia se redujo alrededor de 10 veces entre los periodos de 1830 a 1950 y 1985 a 1989 (Hope y Whitehead, 1991).

Los cachalotes machos parten de su grupo natal a la edad promedio de seis años, durante la adolescencia maduran sexualmente, pero es hasta finales de su segunda década cuando participan en la reproducción (Best, 1979; Christal y Whitehead, 1997). Los machos subadultos forman agregaciones no cohesivas (o escuelas de solteros) conformadas por alrededor de 22 individuos. Los machos adultos tienden a ser solitarios y en la época de reproducción migran a latitudes bajas, en donde aparentemente se rotan entre grupos de hembras en búsqueda de aparearse (Best, 1979; Rice, 1986, Whitehead *et al.*, 1992). Sin embargo, la temporalidad y la frecuencia de sus migraciones hasta la fecha no han sido bien comprendidas (Best, 1979; Rice, 1986, Whitehead *et al.*, 1989, Jaquet *et al.*, 2000).

Aunque la estructura grupal de los machos es menos consistente y duradera tanto en áreas reproductivas como en altas latitudes, se han registrado varamientos masivos de machos adultos y juveniles, lo cual sigue cierta organización social entre ellos, que no ha podido ser observada en el mar (Vidal *et al.*, 1993; Christal y Whitehead, 1997). En latitudes altas, los machos adultos pueden agregarse en pares y permanecer por ciertos periodos de tiempo sin movimiento en la superficie. Sin embargo, raramente exhiben comportamientos que tengan una función social como saltos y exhibiciones de la aleta caudal 'lobe tailing'. Este tipo de comportamientos son observados frecuentemente por grupos de hembras y machos inmaduros en latitudes bajas (Gordon y Steiner, 1992, Whitehead *et al.*, 1992).

Los machos solitarios y hembras emiten sonidos de alta frecuencia "clicks" a manera de chasquidos cuando se alimentan en las profundidades (Mullins *et al.*, 1988, Weilgart y Whitehead, 1988). Los machos maduros e inmaduros generalmente se alimentan espacialmente aparte de las hembras (Whitehead *et al.*, 1992). Además de los buceos profundos que generalmente realizan los machos adultos (entre 1000 m o más), estos también bucean en aguas cercanas a la costa (50-1000 m) para alimentarse de organismos del fondo marino (Whitehead *et al.*, 1991, Scott y Sadov, 1997, Best, 1999).

Ruiz-Cooley *et al.*, (2004) combinaron análisis de isótopos estables con datos de campo y determinación de sexos para estudiar las relaciones tróficas entre cachalotes machos y hembras y el calamares gigante (*Dosidicus gigas*) del Golfo de California. La proporción de los isótopos estables de Carbono (C) y Nitrógeno (N) de hembras y machos inmaduros, fueron significativamente diferentes de la proporción de los isótopos estables del C y N en machos adultos. Pero no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos inmaduros. Esta similitud en las firmas de isótopos estables del C y N mostró que las hembras y juveniles comparten presas similares de las cuales el calamar

gigante es dominante; mientras que en los machos adultos, las proporciones de dichos isótopos no mostraron relaciones tróficas con *D. gigas*. Con base en estos resultados, los autores hipotetizaron que los valores de isótopos estables de machos adultos indican que éstos se alimentan en un área distintas en el Goflo de California, o que su dieta sea un reflejo de presas consumidas en otras zonas de alimentación de latitudes altas.

En los cachalotes existen también diferencias por sexos en la comunicación social. En contraste con los chasquidos “clicks” de alimentación (mencionados anteriormente), hay existen los sonidos llamados “codas”; el intercambio de codas puede ocurrir entre individuos como una manera de comunicación (Watkins y Schevill, 1977). Los machos adultos raramente producen sonidos tipos codas, sino producen “chasquidos lentos”, los cuales son fuertes, con tasas de repetición de un chasquido cada seis segundos. Estos se escuchan principalmente en los sitios de crianza y se piensa que son utilizados por los machos para cerciorarse o avisarse unos a otros de la presencia de hembras (Weilgart y Whitehead, 1988).

2.3. Determinación del sexo en cachalotes: estudios morfológicos y genéticos.

Como se mencionó en el Capítulo 1 (ver 1.3) la determinación del sexo en cetáceos de vida libre es complicada y algunas veces imposible (Palsboll *et al.*, 1992). En el pasado, la información del cachalote acerca del sexo, edad, talla, morfología y tipo de presa por nombrar algunos ejemplos; se obtuvieron de las capturas o de varamientos. Ambos eventos han permitido conocer aspectos acerca de las diferencias biológicas y ecológicas de cachalotes machos y hembras (Kasuya y Oshumi, 1966; Best, 1999, Evans y Hindell, 2004).

Kasuya y Oshumi (1966) reportaron la presencia de un callo de la aleta dorsal del cachalote y analizaron 32 machos y 76 hembras capturadas por balleneros de Japón, y propusieron que el callo era un carácter sexual no presente en machos maduros y a veces presente en machos inmaduros; más frecuentes en hembras preñadas o lactantes. Posterior a Kasuya y Oshumi (1966), se asumieron que era posible distinguir hembras de machos juveniles con la presencia de callo (Whitehead y Gordon, 1986; Gordon, 1987, Whitehead y Waters, 1990, Whitehead, 1990).

Clarke y Paliza (1994) refutaron el uso de la presencia o ausencia del callo como un carácter sexual secundario para hembras y machos. Estos autores estudiaron el callo de la aleta dorsal de 1,473 machos y 1,204 hembras capturadas en el Sudeste del Pacífico y compararon sus resultados con Kasuya y Oshumi (1966). Concluyeron que el callo es un fenómeno cíclico ocasionado por los estrógenos y andrógenos por lo que está presente en organismos de ambos sexos. Los autores reportan que el callo aparece antes de la madurez sexual de las hembras y antes de la pubertad en machos. Sin embargo, existe contradicción en la presencia o ausencia de el callo ya que los autores también reportan que es un fenómeno cíclico: el callo tiende a disminuir conforme crecen los machos hasta llegar a la madurez sexual (24 años); mientras que en las hembras por lo general el callo se sigue presentando después de los 39 años mucho después de alcanzar la madurez sexual. Por lo anterior el callo no es un carácter que proporcione certeza en la determinación del sexo en cachalotes, por lo que era necesaria una nueva alternativa para determinar el sexo.

La habilidad de obtener y preservar muestras de tejido de cetáceos de vida libre permitió el uso de PCR como una herramienta para determinar el sexo (ver capítulo 1). En el mar los machos adultos pueden distinguirse de las hembras y de los machos subadultos, pero la distinción entre estos dos últimos resulta imposible. Por lo que es necesario el uso de herramientas moleculares para contestar este tipo de preguntas.

2.4. Identificación de cachalotes por métodos de foto-identificación y genéticos.

El conocer la identidad individual de los organismos es importante para un mejor entendimiento de la biología de las especies, la ecología y el comportamiento, así como para eliminar muestras duplicadas en los estudios poblacionales. La identificación de individuos en diversas especies de cetáceos ha sido tradicionalmente por métodos de foto-identificación. En cachalotes los individuos son foto-identificados por medio de una fotografía de la zona ventral de la aleta caudal (Arnbom, 1987).

Por otra parte, los individuos de determinada especie pueden ser identificados a nivel individuo utilizando diversas técnicas y marcadores moleculares (*e.g.* marcadores moleculares heredados biparentalmente), como los microsatélites, mini-satélites, aloenzimas, polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) etc. (Parker *et al.*, 1998). En los cachalotes, se han empleado microsatélites en numerosos estudios para evaluar las poblaciones (Richard, 1995; Richard *et al.*, 1996, Lyrholm y Gyllensten, 1998, Bond, 1999, Drouot, 2003). Se determinaron el sexo de cachalotes mediante métodos genéticos combinado con microsatélites para identificar individuos y discriminar muestras que podían provenir del mismo animal (Richard, 1995; Richard *et al.*, 1996). Además Richard *et al.*, (1996) utilizaron la identidad individual para estudiar los grados de diferenciación genética entre grupos de cachalotes a lo largo de la costa del Ecuador.

2.5. Estudios de cachalotes en el Golfo de California.

Desde el siglo XVIII, los cachalotes se han observado de forma oportuna en el Golfo de California (Townsend, 1935, Vidal *et al.*, 1993). En este sitio se han realizado observaciones de machos adultos, grupos de machos subadultos y grupos de hembras con

crías; se hipotetiza que su aparente distribución esta relacionada con la ocurrencia de una de sus principales presas, el calamar gigante *D. gigas* (Vidal *et al.*, 1993, Jaquet y Gendron, 2002). No fue sino hasta la década de los 90's, que comenzaron estudios sistemáticos de cachalotes en esta zona (Barlow *et al.*, 1997, Gendron, 2000, Jaquet y Gendron, 2002, Jaquet *et al.*, 2003). Jaquet y Gendron (2002) identificaron sitios de agregación de cachalotes entre los meses de Mayo-Julio de los años de 1998-1999 alrededor de la isla San Pedro Mártir, en la depresión de Guaymas, y entre las depresiones de Carmen y Farallón.

Basados observaciones de altos porcentajes de machos adultos y crías comparado con otras zonas de estudios (Whitehead, 1993; Khan *et al.*, 1993) se piensa que el Golfo de California funciona como una un sitio de reproducción y crianza para los cachalotes (Jaquet *et al.*, 2003).

3. Objetivos

Probar la eficiencia de ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa en 64 muestras de piel descamada y 2 muestras de biopsias de cachalotes (ver descripción detallada en métodos) del Golfo de California.

Comparar los resultados del sexo con información obtenida en campo sobre la presencia o ausencia del callo en la aleta dorsal de 19 cachalotes foto-identificados.

Investigar si existen recapturas a nivel de individuo entre cachalotes machos adultos muestreados en el Golfo de California de 1996 al 2004 utilizando microsatélites.

4. Materiales y Métodos

4.1. Recolección y preservación de muestras de piel de cachalote.

Se recolectaron muestras de tejido de cachalotes en el Golfo de California entre los años de 1998 y 2004 a través de salidas al campo por CICIMAR en colaboración con la Dra. Nathalie Jaquet. Las muestras seleccionadas para este estudio provienen de individuos avistados solos (cluster de 1) pero dentro de grupos y agregaciones, esto con el fin de evitar errores entre las muestras recolectadas y la identificación individual de los organismos. Debido al comportamiento social del cachalote en cluster de más de 1 individuos, éstos se encuentran muy cerca uno del otro por lo que es difícil atribuir con certeza la proveniencia de la piel recolectada en la huella de los animales. Solamente se selecciono una muestra (Lab# 45609) la cual provenía de un individuo de un cluster mayor de uno, esto debido a que la muestra tenía información del “callo” de la aleta dorsal. Durante el muestreo en campo se determino la presencia o ausencia del callo de la aleta dorsal en algunos de los organismos muestreados. Para esto se utilizaron binoculares de (7X50) y cuando fue posible se tomo fotografía del callo. Cuando existió ambigüedad acerca de la presencia o ausencia del callo el registro fue nulo.

Las muestras de piel descamada fueron obtenidas de pedazos de piel flotantes que los cachalotes pierden en la superficie del mar. Dichas muestras se recuperaron de la superficie con una red (30 × 20 cm.; 1 mm de luz de maya) (Ruiz-Cooley *et al.*, 2004). Las muestras de biopsias fueron recolectadas utilizando una flecha con flotador lanzada por una ballesta al mismo tiempo de tomar una fotografía de la aleta caudal del organismo (Cruz-Vizcaíno, 2005).

Las muestras se almacenaron en dimethyl sulfoxido al 20% (DMSO por sus siglas en ingles) en solución saturada de NaCl (Amos y Hoelzel, 1991) hasta que fueron

transferidas a un congelador de -20° C. Los controles positivos de hembras y machos se obtuvieron de animales varados, en donde el género fue determinado mediante un examen físico (Archivo de tejidos del SWFSC). Las muestras de piel de estos organismos fueron almacenadas hasta que estuvieron listas para la extracción de ADN.

4.2. Extracción de ADN.

El ADN se extrajo utilizando el kit de extracción de Dneasy Qiagen. Cada muestra de piel fue enjuagada repetidamente antes de la extracción con agua Milli-Q. Una pequeña fracción de tejido (aproximadamente entre 10-15 mg) fue cortada en trozos pequeños y añadida a un tubo que contenía 180 μ L de amortiguador Dneasy ATL. Después a cada muestra se le añadieron 20 μ L de Proteinasa K (del kit de extracción Dneasy Quiagen). Las muestras fueron incubadas a baño María a 55° C durante 1 hora o a 37° C toda la noche. Cuando la digestión se completo se añadieron 200 μ L de amortiguador AL a los tubos y se agitaron oscilatoriamente en un vortex. Cada tubo se incubo a 70° C durante 10min en una incubadora. Posteriormente, se añadió a cada tubo 200 μ L de etanol y se centrifugaron para eliminar el sobrenadante de cada tubo, el cual era colocado dentro de una columna de Dneasy. Las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante que contenía las bajas densidades del fluido fue descartado y el residuo de la columna se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 500 μ L de amortiguador AW1 a cada tubo nuevo y se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 minuto. De nuevo se desecho el sobrenadante y el contenido de la columna se colocó en un nuevo tubo. Se añadieron 500 μ L de amortiguador AW2 a cada nuevo tubo y se centrifugaron 13 000 rpm durante 3 minutos. La colección de tubos fue desechada y cada columna fue ubicada en tubos de 1.7 ml. Posteriormente, a cada columna se le añadieron 100 μ l de amortiguador AE y se dejaron reposar durante 1 minuto. Estos tubos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 1 minuto para extraer el ADN. El

ADN fue tomado del tubo de 1.7 ml y nuevamente se colocó en la misma columna para recentrifugarlo a 8000 rpm por 1 minuto.

4.3. Determinación del sexo por medio de el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Sesenta y cuatro muestras de piel descamada de cachalote y 2 biopsias de tejido de piel de cachalote, todas provenientes del Golfo de California (temporada de 1999-2004) y pertenecientes a individuos solos fueron seleccionados para la determinación de sexo utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa (Morin *et al.*, 2005) (ver capítulo 1). Cada reacción de 25 μ L contenía: 1X de amortiguador de PCR (HotStarTaq, Qiagen), $MgCl_2$ 6mM, 150 μ M de cada dNTP, 0.05U μ l⁻¹ de Taq o HotStarTaq polimerasa, 600nM de cada cebador, 100 nM de cada sonda, 0.4 μ g μ l⁻¹ SAB (suero de albumina bovina) y aproximadamente 20-40 ng de ADN. La amplificación de PCR se llevó a cabo en un sistema MX3000P PCR en tiempo-real STRATAGENE, con 15 minutos de incubación inicial a 94° C, seguida de 40 ciclos de 94° C por 45 segundos y 56° C por 45 s.

4.4. Microsatélites.

Los microsatélites son marcadores nucleares que pueden presentarse en paquetes repetidos de secuencias. Pueden ser unidades repetidas di-, tri- tetra- o pentanucleotídicas. Generalmente pueden encontrarse en regiones que no codifican para el ADN. De cada lado de la unidad repetida existe una sola región de ADN y flanqueando esta zona específica con cebadores de PCR (Forward y Reverse) se puede amplificar la secuencia de unidades repetidas (Figura 1) (Tautz, 1989). Los productos de PCR son separados por geles o electroforesis de capilaridad. Con ambas técnicas se puede determinar el tamaño del producto de PCR y saber cuántas veces se encontraron las unidades de paquetes repetidos

de cada alelo. Los microsatélites son marcadores codominantes utilizados para los análisis de parentesco y también pueden ser utilizados para contestar preguntas relacionadas al grado de parentesco entre grupos (Buchanan *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 1996). Los mamíferos tienen dos copias de cada segmento particular de microsatélites. Por ejemplo, un padre tiene un genotipo de 14 y 20 repeticiones y la madre tiene entre 16 y 18 repeticiones, como resultado el hijo puede tener entre 16 y 20 repeticiones lo que sería heterocigoto para ese locus o si ambas repeticiones de paquetes son del mismo tamaño el organismo será homocigoto para ese locus (Tautz, 1989).



Figura 1. Detección de microsatélites en ADN. En la figura se observan cebadores de flanqueo del PCR en direcciones forward y reverse de la región del microsatélite. Si no hay repeticiones en la región amplificada el producto de PCR será de 100 pb de longitud. En la figura observamos que existen repeticiones en la zona amplificada por los primers, cuando se determina la talla de cada producto de PCR en este caso 116 pb podemos saber cuantas repeticiones de CA hay en cada microsatélite, en este ejemplo se observan 8 CA.

Para este estudio se emplearon microsatélites para determinar la identidad individual de diez cachalotes machos adultos provenientes de muestras del Golfo de California (Tabla I). Estos machos adultos fueron identificados por observaciones de campo y se les realizó una prueba a posteriori de la determinación del sexo utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Los cebadores de microsatélites utilizados en este estudio fueron EV1, EV5, EV30, SW13 y SW19 todos estos fueron aislados de cachalotes (Richard *et al.*, 1996, Valsecchi y

Amos, 1996). El primer también fue utilizado y este fue aislado de belugas (*Delphinapterus leucas*) (Buchanan *et al.*, 1996; Tabla II).

Cada macho de cachalote tendrá dos tamaños distintos de alelos para cada uno de los 6 locus de microsatélites. Se buscaron recapturas entre individuos utilizando una prueba de comparaciones pareadas entre los tamaños de los alelos de diferentes microsatélites de cada individuo. Se considero como individuos distintos a dos muestras que presentaban un perfil de multilocus distinto. Si dos muestras presentan perfiles de multilocus idénticos no podíamos asegurar que dichas muestras provinieran del mismo individuo, debido al número limitado de marcadores utilizados en este estudio. El pequeño número de muestras utilizadas (10) nos permitió llevar a cabo la búsqueda de recapturas entre individuos de manera visual. En estudios donde se genotifica una gran cantidad de muestras es necesario el empleo de software.

Tabla I. Muestras de cachalotes machos adultos (M) del Golfo de California utilizados en la identificación a nivel individuo.

	Lab. #	Fecha	Temporada	Cluster
1-	11574	11/08/98	Otoño	1M
2-	13508	20/03/96	Primavera	1M
3-	15042	12/06/99	Primavera	1M
4-	15067	18/06/99	Primavera	1M
5-	45565	28/05/02	Primavera	1M
6-	45573	29/05/02	Primavera	1M
7-	45617	20/02/03	Primavera	1M
8	45631	01/05/03	Primavera	1M
9-	45649	18/02/04	Primavera	1M
10-	45657	18/02/04	Primavera	1M

4.5. Amplificación de los Microsatélites por PCR.

Las amplificaciones de microsatélites se llevaron a cabo en 25 µl de reacción utilizando: Amortiguador 1X PCR (67 mM Tris-HCL pH8.8, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 10mM β-mercetoetanol), 1.5 mM MgCl₂, 150µM each dNTP, 0.05U/µl de Taq polimerasa o Hot Stara Taq (Quiagen) y aproximadamente 20 – 40 ng de ADN. Los perfiles de temperatura para los diferentes cebadores de los microsatélites se muestran en la Tabla III (J. Hyde *pers. comm.*). Se combinaron los productos del PCR de cada microsatélite (5 µL) y tinción azul (3 µL) y se cargó un gel de 2% de agarosa para pasarlo por electroforesis a 85 volts durante 30 minutos. Se tomó una foto de cada gel en la cual se observó cada banda de los microsatélites. Dependiendo del brillo de las bandas, se realizaron diluciones 1:5, 1:10 o se corrieron los productos del PCR en el ABI PRISM 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems).

Tabla II. Secuencias de los cebadores y estructura de las repeticiones de los 6 juegos de cebadores utilizados en este estudio.

<i>Locus</i>	<i>Repetitive sequence</i>	<i>Primer sequences</i>	<i>Allele size (bp)</i>
EV1	(AC) ₁₃ (TC) ₈	a5'-CCCTGCTCCCCATTCTC b5'-ATAAACTCTAATACACTTCCTCCAAC	139-175
EV5	(GC) ₂ (GT) ₂ (GC) ₁₁	a5'-AGCTCCCTTAGACTCAACCTC b5'-TATGGCGAGGGTTCCG	150-170
EV 30	(AC) ₂₃	a5'-GGAATAGAGGTAGGGGTGG b5'-GCTTTTGTGTGGTCATCC	132-180
SW 13	(GT) ₂₀	5'-AGCTGTCTTAATGAAATTCCC 5'-ACGTAAATGATGCTGTT	136-175
SW 19	(AG) ₄ (TG) ₂₆	5'-GTAGTTTTCTTTAACAGTAATG 5'-AGTTCTGGGCTTTCACCTA	90-160
D17		5'-TCAGCCTCTATAACGTCCTGAGC 5'-ATGGGACTGCCATATTAGTCAG	140-180

Tabla III. Perfiles de temperatura utilizados para la amplificación por cebadores de los microsátélites.

Cebadores		1ª Desnat.	Desnat.	Anillamiento	Extensión	Extensión Final
EV1, EV5, EV30	Temp	94°	94°	53°-55°	72°	72°
	Tiempo	2 min.	20 sec	1:00 min.	1:00 min.	5 min.
SW 19	Temp	97°	96°	53°	72°	72°
	Tiempo	3 min.	20 sec	1:00 min.	1:00 min.	5 min.
SW13, D17	Temp	94°	94°	53°	72°	72°
	Tiempo	15 min.	20 sec	1:00 min.	1:00 min.	5 min.

4.6. Genotipificación de las muestras de cachalotes machos en el Golfo de California.

El proceso de genotipificación en el ABI PRISM 3100 Genetic analyzer puede ser resumido de la siguiente manera (Biotechniques 2004):

Se preparó una placa de 96 pozos con 1µl de producto del PCR (puro o diluido), y 9µl de mezcla formaldehído – ROX con una razón 20:5. Se calentó la placa a 85°C por 2 minutos y se dejó enfriar durante 2 minutos, para posteriormente colocarla en el ABI PRISM 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems). La carga de las muestras de la placa se basa en inyección electroquinética. Se coloca la placa de 96 pozos en la cubierta de carga del ABI PRISM 3100 Genetic analyzer. Un arreglo de 16 capilares se hunde en los primeros 16 pozos de muestras de la placa, se aplica voltaje y en los capilares se inyectan iones con carga negativa los cuales son primordialmente extensiones de los productos de ADN. Un polímero líquido pasa por los capilares y actúa como matriz de separación. Una alícuota fresca de polímero se inyecta antes de cada corrida, eliminando el polímero de la corrida anterior.

La electroforesis se lleva a cabo por un circuito eléctrico de alto voltaje. La carga se conduce a través del circuito por: el ADN y los iones en el polímero, los iones en la solución amortiguador utilizada en el instrumento, y a través de los cables eléctricos y

electrodos. El ABI PRISM 3100 Genetic analyzer puede disipar calor provocado por el voltaje de forma homogénea y eficiente debido a la amplia superficie de área de los capilares fusionados de sílice. Esto permite la aplicación de alto voltaje durante la electroforesis, contribuyendo significativamente a una disminución en los tiempos de las corridas sin sacrificar resolución.

Los fragmentos a secuenciar pasan a través de una celda de detección situada al final del arreglo. Los fragmentos cortos migran más rápido que los fragmentos de mayor tamaño, y pasan antes por la celda de detección. Un rayo láser (ión argón) provoca excitación en los electrones del pigmento adherido a los fragmentos de ADN, y al regresar a su estado basal de fluorescencia, la fluorescencia emitida es capturada por una cámara CCD (charged – coupled device). La cámara está compuesta de un chip de sílice con miles de píxeles que guardan una carga eléctrica proporcional a la intensidad de la fluorescencia recibida. La cámara CCD convierte la información de fluorescencia en datos electrónicos que se transfieren a una computadora para ser procesados. El programa utilizado para el análisis de los datos del presente trabajo fue el Genescan. Software que crea un electróforograma donde cada pico representa un fragmento de ADN secuenciado.

5. Resultados

5.1. Determinación de sexo en cachalotes utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

Se seleccionaron 66 muestras de cachalotes (ver sección 4.3) para la determinación del sexo (Tabla IV); 2 provinieron de biopsias y las 64 restantes de piel descamada. De estas muestras, 11 provenientes de piel descamada no amplificaron. Se estableció como

amplificación positiva a cualquier muestra con señal de fluorescencia de hembra (FAM) mayor de 462, y señal de macho (CY5) mayor de 53. Todas las muestras que presentaban señales menores a 1500 para FAM y 300 para CY5 fueron re procesadas. Los resultados de las muestras de piel descamada de cachalote que no funcionaron para la determinación de sexo se muestran en la Figura 2. La fluorescencia para ambas tinciones (CY5 y FAM) presenta valores bajos. Las muestras que no tuvieron una determinación de sexo fueron re procesadas, pero continuaron arrojando resultados negativos. En la Figura 3 se muestran los resultados positivos de la determinación de sexo para cachalote. Las hembras que se observan en color de rosa presentaron valores altos de FAM (5125.951-13477.362). Los machos se observan en azul en la figura estos presentaron valores de fluorescencia para ambos colorantes en donde los valores de FAM varían de 1164.477 a 12943.64; los valores de CY5 varían de 769.614 a 7815.705.

De las $66-11=55$ muestras de cachalote que amplificaron para la determinación del sexo, $19-3$ (que no amplificaron)=16 tenían información de la presencia o ausencia del callo. De estas 16 muestras, 10 presentaron el callo. De las 10 muestras de individuos con callo, una provenía de un macho, 9 eran de hembras. De las 6 muestras de individuos sin callo la mitad eran machos (Tabla V).

Tabla IV. Resultados de la determinación de sexo para cachalote utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa. (Cluster: M= macho adulto, a= adulto, j= joven, m= macho mediano, cm= cría mediana).

	# Lab.	Piel	Fecha	Cluster	Género
1-	45490	106	29/03/00	1	Ninguno
2-	45491	107	29/03/00	1	F
3-	45492	108	29/03/00	1	M
4-	45493	109	29/03/00	1	F
5-	45494	110	29/03/00	1	Ninguno
6-	45497	118	05/04/00	1	Ninguno
7-	45513	302	05/05/02	1	M
8-	45524	315	10/05/02	1	F
9-	45525	316	10/05/02	1	Ninguno
10-	45553	326	20/05/02	1	F

11-	45545	407	27/05/02	1	F
12-	45547	409	27/05/02	1	F
13-	45550	412	28/05/02	1	F
14-	45554	416	28/05/02	1	F
15-	45558	420	28/05/02	1a	F
16-	45560	422	28/05/02	1	F/F
17-	45572	435	29/05/02	1a	M
18-	45573	436	29/05/02	1	M
19-	45571	317/434	10/05/02	1	F
20-	45562(424)/45555(417)	417/424	28/05/02	1	F/F
21-	45565(428)/45566(429)	428/429	28/05/02	1M	M/M
22-	45484	Pm1 / Pm1a	16/01/02	1M	Ninguno
23-	45499	Pm1b	17/01/02	1M	M
24-	45506	Pm250	04/04/02	1M	M
25-	PMAC#256b	Pm256b	26/04/02	1M	M
26-	45575	500	20/10/02	1a	F
27-	45576	501	20/10/02	1a	M/M
28-	45579	507	10/27/02	1a	F
29-	45580	508	10/27/02	1a	Ninguno
30-	45582	510	10/28/02	1a	F
31-	45585	513	10/29/02	1a	F
32-	45586	514	10/29/02	1a	M
33-	45594	530	31/10/02	1a	F
34-	45604	548	8/11/02	1a	F
35-	45577	502	20/10/02	1a	M
36-	45587(515)/45590(519)	515/519	10/30/02	1a	519(M)/515(F)
37-	45592	522	10/30/02	1a1cm	F
38-	45573(536)	536/546b	1/11/02	1M	M
39-	45609	560	21/02/03	3a 1m 1cm	M
40-	45610	561	20/02/03	1j	M
41-	45612	563	20/02/03	1a	F
42-	45616	568	20/02/03	1a	F
43-	45617	569	20/02/03	1M	M
44-	45618	570	20/02/03	1j	F
45-	45619	571	20/02/03	1a	F
46-	45621	600	25/04/03	1a	Ninguno
47-	45622	601	25/04/03	1a	F
48-	45626	606	29/04/03	1a	Ninguno
49-	45629	609	30/04/03	1a	F/F
50-	45631	611	01/05/03	1M	M
51-	45632	612	01/05/03	1a	Ninguno
52-	45634	617	02/05/03	1a	F
53-	45642	628	13/05/03	1a	M
54-	45646	634	16/05/03	1a	F
55-	45640	625B	03/05/03	1a	F
56-	45644	630	16/05/03	1a	Ninguno
57-	45647	700	18/02/04	1a	F
58-	45648	701	18/02/04	1a	F/F

59-	45649	702	18/02/04	1M	M/M
60-	45651	704	18/02/04	1a	F
61-	45653	706	18/02/04	1a	Ninguno
62-	45654	707	18/02/04	1a	F
63-	45655	708	18/02/04	1a	F
64-	45656	709	18/02/04	1a	F
65-	45657	710	18/02/04	1M	M/M
66-	45660	713B	18/02/04	1a	F

Tabla V. Resultados de la determinación del sexo en cachalote con el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

En la tabla se presentan las muestras que tienen información acerca del callo de la aleta dorsal.
(Cluster: a= adulto, j= joven, m= macho mediano, cm= cría mediana).

	#Lab	Piel	Fecha	Cluster	Callo	Género
1-	45580	508	10/27/02	1a	Si	Ninguno
2-	45585	513	10/29/02	1a	Si	F
3-	45586	514	10/29/02	1a	Si	M
4-	45609	560	21/02/03	3a 1m 1cm	No	M
5-	45610	561	20/02/03	1j	no	M
6-	45612	563	20/02/03	1a	Si	F
7-	45616	568	20/02/03	1a	Si	F
8-	45617	569	20/02/03	1m	no	M
9-	45618	570	20/02/03	1j	Si	F
10-	45619	571	20/02/03	1a	no	F
11-	45626	606	29/04/03	1a	no	Ninguno
12-	45629	609	30/04/03	1a	no	F/F
13-	45647	700	18/02/04	1a	Si	F
14-	45651	704	18/02/04	1a	no	F
15-	45653	706	18/02/04	1a	Si	Ninguno
16-	45654	707	18/02/04	1a	Si	F
17-	45655	708	18/02/04	1a	Si	F
18-	45656	709	18/02/04	1a	Si	F
19-	45660	713B	18/02/04	1a	Si	F

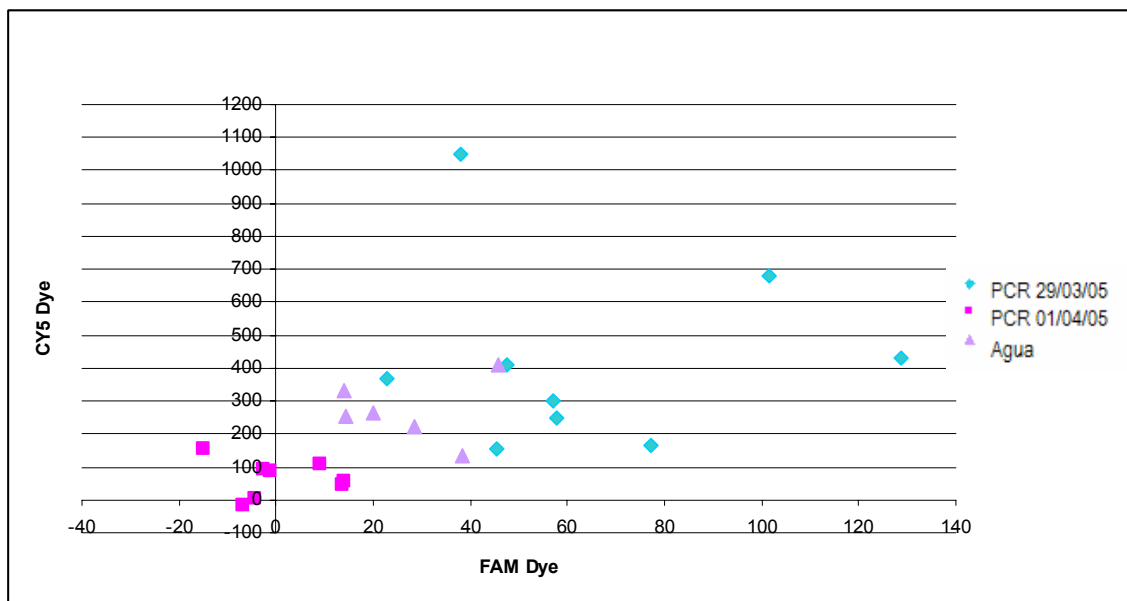


Figura 2. Muestras de piel descamada de cachalote que fallaron para la determinación de sexo. En color azul son las muestras trabajadas el 29/03/05; en color rosa son las muestras re procesadas el 01/04/05; en morado se observa el agua.

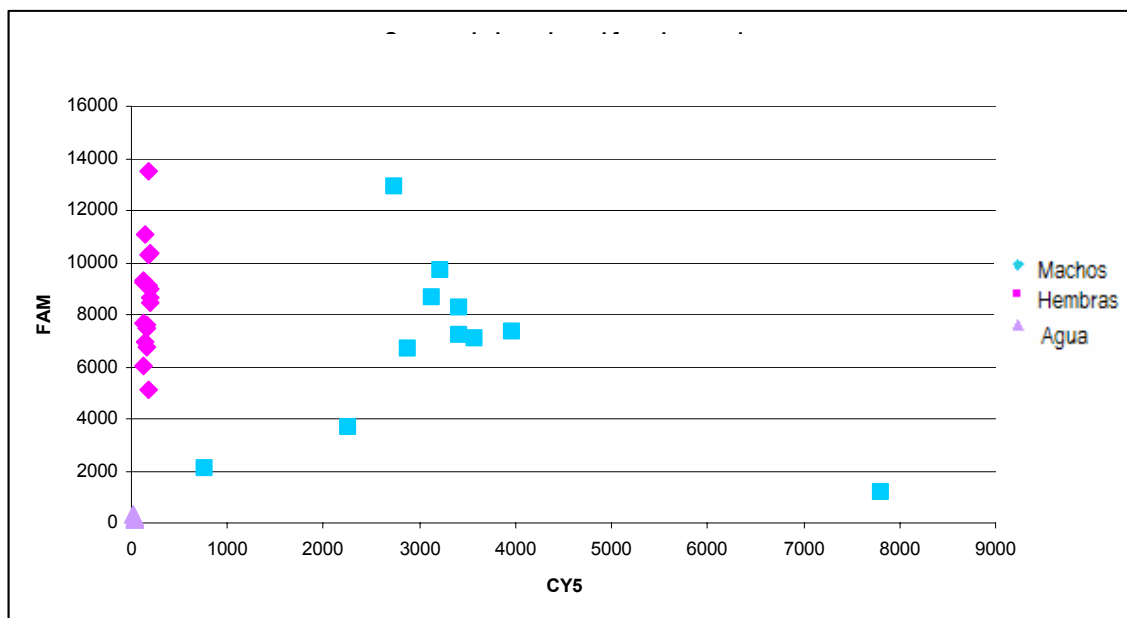


Figura 3. Muestras de hembras y machos de cachalote que tuvieron resultados positivos en la determinación de sexo. Las hembras se muestran en color rosa; los machos en color azul; el agua en color morado.

5.2. Identidad de cachalotes machos del Golfo de California utilizando microsatélites.

Los valores de los productos de PCR de microsatélites fueron obtenidos utilizando la máquina de genotipificación 3100 Applied Biosystems. De las 10 muestras de machos adultos analizadas (Tabla 1), 9 dieron resultados positivos al ser genotipificadas. La muestra 45565 no amplificó a pesar de repetidos intentos y una re extracción por lo que se le excluyó del análisis.

En la tabla VI se muestran los resultados de microsatélites; las columnas indican los diferentes valores de cada muestra (renglones). Se utilizaron comparaciones pareadas entre el tamaño de los alelos. Cuando se encontraba una coincidencia entre individuos dentro del mismo locus, comparamos los individuos coincidentes con el siguiente marcador, y así sucesivamente. Las muestras 45573 y 45657 coincidieron en 2 de los 6 marcadores microsatelitales. Ninguna muestra presentó perfiles idénticos de microsatélites multilocus. Concluimos que las 9 muestras provienen de individuos distintos.

Tabla VI. Resultados de los 6 marcadores microsatelitales para muestras de machos y hembras de cachalote del Golfo de California. z# = número de identificación del laboratorio; año= en el que se recolectaron las muestras. En caso de encontrar coincidencia en un solo locus, se examinó a los individuos en loci adicionales.

	z#	año	D17	D17	EV1	EV1	EV5	EV5	EV30	EV30	SW13	SW13	SW19	SW19
1-	11574	1998	188	163	118	128	154	156	167	167	160	166	129	132
2-	13508	1996	167	165	118	118	152	152	173	173	158	173	123	127
3-	15042	1999	178	175	139	139	156	164	171	171	160	162	119	127
4-	15067	1999	163	161	118	134	152	164	163	169	160	162	125	134
5-	45565	2002												
6-	45573	2002	163	161	118	134	152	156	165	165	160	166	121	136
7-	45617	2003	165	163	120	132	152	162	169	169	156	166	127	129
8-	45631	2003	163	163	118	118	156	166	179	179	162	166	94	94
9-	45649	2004	171	142	118	118	152	154	169	169	160	164	94	113
10-	45657	2004	163	149	134	136	152	156	165	165	158	164	119	146

6. Discusión

6.1. Determinación del sexo en cachalotes utilizando el ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa.

El innovador ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa es sensible sobre distintos ordenes de magnitud en la concentración de ADN (Morin *et al.*, 1999) lo que permite que la determinación del sexo en muestras de piel descamada de cachalotes se realice en una forma mas sencilla y rápida. La determinación del sexo de las 66 muestras de piel de cachalote se obtuvo en dos días de trabajo de laboratorio con una eficiencia del 83% (definida como una determinación de sexo exitosa en una muestra). En contraste, utilizando una modificación de Richard *et al.*, (1996) con genes de queratina como control positivo interno se sexaron 216 biopsias (Rubio-Cisneros *et al.*, 2004, datos sin publicar) con una eficiencia del 88% (191 biopsias) en tres meses de trabajo. En cetáceos la epidermis se encuentra constituida por tres estratos: el germinativo, el espinoso y el externo, los cuales decrecen en su contenido de ADN conforme se acercan a la superficie de la piel. Las biopsias son un tejido más sencillo para trabajar debido a que contiene una mayor cantidad de ADN por tener células del estrato germinativo y espinoso de la epidermis del cachalote a diferencia de muestras de piel descamada las cuales están compuestas en su mayoría por células de el estrato externo Gendron y Mesnick (2001).

En este estudio, 11 muestras de piel descamada no pudieron amplificar para la determinación del sexo, aún con repetición de PCR. Esto probablemente se debe a que estas muestras tuvieron bajas concentraciones o calidad de ADN. Sarka y Mesnick (*com. pers*) y Gendron y Mesnick (2001) analizaron muestras de piel descamada de cachalotes y

encontraron que este tipo de tejido generalmente contiene células que conforman el estrato externo, el cual tiene la menor concentración de ácidos nucleicos de las tres principales capas celulares de la piel de cetáceos. Lo anterior puede ser la razón de porque estas once muestras no amplificaron.

En otras especies como la ballena azul, Enríquez-Paredes (2005) encontró que las muestras de piel descamada presentan una menor cantidad y calidad de ADN. Para esto utilizó estándares de ADN conocidos para estimar la cantidad de ADN en una muestra y así conocer la concentración. Además midió el grado de degradación de las muestras utilizando electroforesis y un marcador de peso molecular estándar. Para el presente estudio no se realizó ningún tipo de análisis posterior del ADN de las muestras que no amplificaron ya que esto no se contempló en los objetivos de este estudio. Debido a que en un futuro continuaremos trabajando con muestras de piel descamada de cachalote consideramos importante analizar las variables de calidad y degradación en las muestras de piel descamada de cachalotes utilizando la metodología de Enríquez-Paredes (2005).

6.2. Aplicación del ensayo ZFX/ZFY de la 5' exonucleasa en la determinación del sexo y su asociación con la presencia o ausencia del “callo” en la aleta dorsal.

Los resultados de la presencia o ausencia del callo de la aleta dorsal muestran a organismos de distintas clases de edad y de ambos sexos que tienen el callo. Diez muestras fueron identificadas en campo con la presencia del callo de la aleta dorsal, de éstas 9 fueron hembras (8 identificadas en el campo como adultos y una como juvenil); una muestra fue

un macho (no adulto). Se obtuvieron seis muestras de animales en el campo que no presentaban el callo, tres de estas fueron machos de distintas clases de edad (descritas en el campo como macho adulto, adulto y juvenil); tres muestras fueron determinadas como hembras (descritas como adultos en el campo). Clarke y Paliza (1994) sugieren que el callo puede estar presente en animales maduros e inmaduros de ambos sexos, ya que el callo proponen es un fenómeno cíclico en donde los estrógenos y andrógenos presentes en animales maduros e inmaduros de ambos sexos son la principal razón del desarrollo del callo. Whitehead (2003) propone que el callo de la aleta dorsal de cachalotes puede ayudar a inferir como es la composición por sexos y edades en un grupo de cachalotes cuando se estén realizando observaciones en campo. Sin embargo con base a los resultados de Clarke y Paliza (1994) este carácter puede ser considerado ambiguo ya que se presenta tanto en hembra como en macho. En todo caso, es fundamental la toma de muestras de piel para la determinación del sexo por métodos genéticos para poder asociar este carácter con el sexo de animales de vida libre.

En base a lo anterior una de las futuras metas, es aumentar el número de muestras en donde se tome la información en campo de la presencia o ausencia del callo y combinar estos resultados con pruebas hormonales para identificar a hembras en periodo de gestación. Los resultados provenientes de un mayor número de muestras nos ayudaran a observar patrones y utilizar métodos estadísticos para realizar inferencias acerca del callo de la aleta dorsal en cachalotes.

6.3. Identificación individual de cachalotes machos.

Los microsatélites pueden ser usados para identificar a nivel individuo a los cachalotes y discriminar muestras que puedan provenir del mismo animal (Richard *et al.*, 1996, Drouot 2003). Aquí se emplearon microsatélites como marcadores moleculares para identificar machos adultos de cachalotes en el Golfo de California. No se encontraron recapturas entre machos adultos de cachalotes al hacer comparaciones pareadas de los perfiles alélicos de los microsatélites entre muestras. Los resultados indicaron que estas muestras provienen de distintos individuos, por ejemplo, existen al menos 9 machos adultos diferentes reportados durante 1996-2004 en el Golfo de California. Estos resultados son significativos por dos razones: la primera razón es que sirven para complementar datos de foto identificación de los machos adultos, debido a que en ocasiones los machos adultos no levantan la aleta caudal al momento de sumergirse (Gendron *pers.com*) lo cual es fundamental para identificar a los individuos. Entonces al no levantar los machos la aleta caudal se pierde la oportunidad de foto identificar al organismo y debido a que poco se conoce acerca de los machos adultos (Whitehead, 2003) obtener cualquier tipo de información acerca de estos es indispensable para un mejor entendimiento de su ecología y biología. La muestra de piel de cachalote es una alternativa para identificar individuos utilizando su perfil genético La segunda razón de la importancia de estos resultados es que son consistentes con Jaquet *et al.*, (2003) quienes sugieren que el Golfo de California puede ser un sitio importante de reproducción y crianza para cachalotes.

En caso de que en este estudio se hubiera registrado un recaptura entre muestras, la probabilidad de determinar si eran la misma muestra es un proceso mas complicado ya que

es necesario conocer la frecuencia de alelos de la población, objetivo que queda fuera del alcance de este estudio.

6.4. Estudios futuros.

Los resultados de machos adultos y las metodologías presentadas en este trabajo serán semilla para futuros estudios genéticos de cachalotes. La mayoría de los estudios genéticos de cachalotes están enfocados en las hembras, mientras que la estructura genética de los machos se conoce poco. Bond (1999) investigó la estructura social entre grupos de machos inmaduros (bachelor school) varados y encontró que estos grupos están compuestos por individuos no emparentados. Una extensa gama de preguntas acerca de los machos cachalotes aún quedan sin responder, entre ellas:

(1) Estructura poblacional: Se sabe que los machos pueden desplazarse entre las provincias oceánicas mientras que comúnmente las hembras se mueven a través de las provincias oceánicas pero no entre ellas (Whitehead, 2003). No se conoce si los machos se aparean ampliamente en estas distintas provincias o tienen preferencias para aparearse con los clanes del sitio donde nacieron.

(2) Identidad individual: La captura comercial de ballenas redujo el número poblacional de cachalotes al rededor de todo el mundo (Whitehead, 2003). La captura ballenera selectiva sobre los machos adultos en el periodo ballenero moderno puede haber provocado un desequilibrio en la proporción de sexos entre la población; esto pudo haber impactado

fuertemente la reproducción y por lo tanto la recuperación de la población, ya que los machos reproductores pueden ser insuficientes para la población. Lo anterior lleva a cuestionarse sobre ¿Cuántos machos adultos se encuentran actualmente en las zonas de reproducción de distintas poblaciones del mundo? ¿Cuál es la identidad genética de los machos adultos, como es el grado de parentesco entre los machos de distintas partes del mundo?

(3) Estructura social: Se conoce que los machos adultos tienden a ser solitarios (Best, 1979): pero en zonas de reproducción coexisten con las hembras por periodos cortos de tiempo. Resultaría interesante tener un seguimiento a través del tiempo de estos 9 machos adultos analizados en este trabajo y de un mayor número de muestra. Esto con el fin de observar si hay recapturas entre años y como fueron observados en el campo “solos o en compañía de hembras”. Estos datos de campo aunados con datos genéticos de parentesco entre machos adultos y muestras de crías, nos ayudarían para hacer inferencias de cuales de los machos adultos identificados en el Golfo de California juegan un papel importante en la reproducción.

Estas y otras preguntas sobre machos de cachalotes no han sido contestadas y pueden ser respondidas empleando marcadores moleculares. Los microsátélites resultan útiles para identificar números de machos adultos muestreados y registrar relaciones de paternidad. Los marcadores moleculares provenientes del gen SRY serian otra opción útil para obtener información acerca de los cachalotes machos. Esto es posible porque la información del cromosoma Y es heredad de padres a hijos, pudiendo obtener información acerca de la estructura genética de los machos y filo geografía (análisis espacial de los linajes génicos

para reconstruir la historia evolutiva de una especie). Como sucede con un marcador heredado maternalmente, por ejemplo ADN mitocondrial en el cual se pueden trazar las relaciones entre hembras (Gusmão y Carriacedo, 2003). En el futuro se pretende utilizar un mayor número de muestra de distintos machos adultos distribuidos alrededor de todo el mundo y desarrollar marcadores genéticos del SRY para responder preguntas acerca de la ecología y biología poblacional de cachalotes machos.

8. Literatura Citada

- Amos, W. y A. R. Hoelzel. 1991. Long term preservation of whale skin for DNA analysis. Report of the International Whaling Commission Special Issue: 99-103.
- Arnbom, T. 1987. Individual identification of sperm whales. Report to the International Whaling Commission(37): 201-204.
- Barlow, J., K. Forney, A. Von-Saunders y J. Urbán-Ramirez. 1997. A report of cetacean acoustic detection and dive interval studies (CADDIS) conducted in the southern Gulf of California, 1995. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-250: 48.
- Berzin, A. 1972. The Sperm Whale. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations.
- Best, P. B. 1979. Social organization in sperm whales, *Physeter macrocephalus*. Behavior of Marine Animals. Olla, H. E. W. a. B. C. New York and London, Plenum Press. 3: 227-289.
- Best, P. B. 1999. Food and feeding of sperm whales *Physeter macrocephalus* off the West Coast of South Africa. South African Journal of Marine Science-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Seewetenskap 21: 393-413.
- Best, P. B., P. A. Canham y N. Macleod. 1984. Patterns of reproduction in sperm whales, *Physeter macrocephalus*. Report of the International Whaling Commission. Special Issue 6: 51-79.
- Bond, J. 1999. Genetic analysis of the sperm whale using microsatellites, Cambridge University. Ph.D: 205.
- Buchanan, F. C., M. K. Friesen, R. P. Littlejohn y J. W. Clayton. 1996. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. Molecular Ecology (5): 571-575.
- Carrier, D. R., S. M. Deban y J. Otterstrom. 2002. The face that sank the Essex: potential function of the spermaceti organ in aggression. Journal of Experimental Biology 205(12): 1755-1763.
- Christal, J. y H. Whitehead. 1997. Aggregations of mature male sperm whales on the Galapagos Islands breeding ground. Marine Mammal Science 13(1): 59-69.

- Clarke, R. y O. Paliza. 1994. Sperm whales of the Southeast Pacific Part V. The dorsal fin callus. *Investigations on Cetacea*. Pillieri, G. XXV: 9-91.
- Cranford, T. W. 1999. The sperm whale's nose: Sexual selection on a grand scale? *Marine Mammal Science* 15(4): 1133-1157.
- Cruz-Vizcaino, M. 2005. Relación del perfil de ácidos grasos del Cachalote (*Physeter macrocephalus*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California. La Paz, B.C.S., CICIMAR. Maestría en Ciencias con especialidad en manejo de recursos marinos
- Cunningham, E. P. y C. M. Meghen. 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* 20(2): 491-499.
- Detwiler, M., T. L. Hamp y A. L. Kazim. 2004. DNA sequencing using the liquid polymer POP-7™ on an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer *BioTechniques*(36): 932-933.
- Drouot, V. 2003. Ecology of sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in the Mediterranean Sea. Institute of Environmental Science. Bangor, UK, University of Wales. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy.
- Enriquez-Paredes, L. M. 2005. Identidad genética de la Poblacion de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacifico Nororiental: Agregaciones Mexicanas., Universidad Autonoma de Baja Claifonria. Doctorado: 198.
- Evans, K. y M. A. Hindell. 2004. The age structure and growth of female sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in southern Australian waters. *J. Zool., Lond.*(263): 237–250
- Gendron, D. 2000. Family *Physeteridae*. Mamíferos del noroeste de México Patton, Á.-C. S. T. a. J. L. La Paz, Mexico, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. . II: 635-637
- Gendron, D. y S. L. Mesnick. 2001. Sloughed skin: a method for the systematic collection of tissue samples from Baja California blue whales. *Journal of Cetacean Research and Management*(3): 77-79.

- Gordon, J. 1987. Sperm whale groups and social behaviour observed off Sri Lanka. Report to the International Whaling Commission(37): 205-217.
- Gordon, J. y L. Steiner. 1992. Ventilation and dive patterns in sperm whale, *Physeter macrocephalus*, in the Azores. Report to the International Whaling Commission 42: 561-565.
- Gowans, S. y L. Rendell. 1999. Head-butting in northern bottlenose whales (*Hyperoodon ampullatus*): A possible function for big heads? Marine Mammal Science 15(4): 1342-1350.
- Gusmão, L. y A. Carracedo. 2003. Y Chromosome-Specific STRs Profiles in DNA: 1-6.
- Hope, P. L. y H. Whitehead. 1991. Sperm whales off the Galápagos Islands from 1830-50 and comparisons with modern studies. Reports of the International Whaling Commission(41): 273-286.
- Jaquet, N., S. Dawson y E. Slooten. 2000. Seasonal distribution and diving behaviour of male sperm whales off Kaikoura: foraging implications. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 78(3): 407-419.
- Jaquet, N. y D. Gendron. 2002. Distribution and relative abundance of sperm whales in relation to key environmental features, squid landings and the distribution of other cetacean species in the Gulf of California, Mexico. Marine Biology 141(3): 591-601.
- Jaquet, N., D. Gendron y A. Coakes. 2003. Sperm whales in the Gulf of California: Residency, movements, behavior, and the possible influence of variation in food supply. Marine Mammal Science 19(3): 545-562.
- Kahn, B., H. Whitehead y M. Dillon. 1993. Indications of Density-Dependent Effects from Comparisons of Sperm Whale Populations. Marine Ecology-Progress Series 93(1-2): 1-7.
- Kasuya, T. y S. Ohsumi. 1966. A secondary sexual character of the sperm whale. Scientific Report. Whales Research Institute(20): 89-93.
- Lettevall, E., C. Richter, N. Jaquet, E. Slooten, S. Dawson, H. Whitehead, J. Christal y P. M. Howard. 2002. Social structure and residency in aggregations of male sperm

- whales. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 80(7): 1189-1196.
- Lyrholm, T. y U. Gyllensten. 1998. Global matrilineal population structure in sperm whales as indicated by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 265(1406): 1679-1684.
- Macleod, C. D. 1998. Intraspecific scarring in odontocete cetaceans: an indicator of male 'quality' in aggressive social interactions? *Journal of Zoology* 244: 71-77.
- Morin, P. A., A. Nestler, N. T. Rubio-Cisneros, K. M. Robertson y S. L. Mesnick. 2005. Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. *Molecular Ecology* 14(10): 3275-3286.
- Morin, P. A., R. Saiz y A. Monjazebe. 1999. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' exonuclease assay. *Bio Techniques* 27(3): 538-+.
- Mullins, J., H. Whitehead y L. S. Weilgart. 1988. Behavior and Vocalizations of 2 Single Sperm Whales, *Physeter-Macrocephalus*, Off Nova-Scotia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45(10): 1736-1743.
- Palsboll, P. J., A. Vader, I. Bakke y M. R. Elgewely. 1992. Determination of Gender in Cetaceans by the Polymerase Chain-Reaction. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 70(11): 2166-2170.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology (Washington D C)* 79(2): 361-382.
- Rice, D. W. 1986. A mass stranding of Sperm whales in Oregon : sex and age composition of the school. *Marine Mammal Science* 2 (1): 64-69.
- Rice, D. W. 1989. Sperm whales (*Physeter macrocephalus*). *Handbook of marine mammals*. Ridgeway, S. H. a. R. H. London, Academic Press. 4: 177-233.
- Richard, K. R. 1995. A molecular genetic analysis of kinship in free-living groups of sperm whales Canada, Dallhousie. PhD.

- Richard, K. R., H. Whitehead y J. M. Wright. 1996. Polymorphic microsatellites from sperm whales and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin. *Molecular Ecology* 5(2): 313-315.
- Ruiz-Cooley, R. I., D. Gendron, S. Aguiniga, S. Mesnick y J. D. Carriquiry. 2004. Trophic relationships between sperm whales and jumbo squid using stable isotopes of C and N. *Marine Ecology-Progress Series* 277: 275-283.
- Scott, T. M. y S. S. Sadove. 1997. Sperm whale, *Physeter macrocephalus*, sightings in the shallow shelf waters off Long Island, New York. *Marine Mammal Science* 13(2): 317-321.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16): 6463-6471.
- Townsend, C. H. 1935. The distribution of certain whales as shown by the logbooks records of American whalships. *Zoologica*(19): 1-50.
- Valsecchi, E. y B. Amos. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5(1): 151-156.
- Vidal, O., L. T. Findley y S. Leatherwood. 1993. Annotated checklist of the marine mammals of the Gulf of California. *Proceedings of the San Diego Society of Natural History*(28): 1 - 16.
- Watkins, W. A. y W. E. Schevill. 1977. Sperm Whale Codas. *Journal of the Acoustical Society of America* 62(6): 1485-1490.
- Weilgart, L. S. y H. Whitehead. 1988. Distinctive Vocalizations from Mature Male Sperm Whales (*Physeter-Macrocephalus*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 66(9): 1931-1937.
- Whitehead, H. 1987. Social Organization of Sperm Whales off the Galapagos: Implications for Management and Conservation. Paper SC/38/Sp1. Presented in the IWC Scientific Committee.
- Whitehead, H. 1990. Assessing Sperm Whale Populations Using Natural Markings Recent Progress. Hammond, P. S., S. a. Mizroch and G. P. Donovan: 377-382.

- Whitehead, H. 1993. The Behavior of Mature Male Sperm Whales on the Galapagos-Islands Breeding Grounds. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 71(4): 689-699.
- Whitehead, H. 2001. Direct estimation of within-group heterogeneity in photo-identification of sperm whales. *Marine Mammal Science* 17(4): 718-728.
- Whitehead, H. 2003. *Sperm whales Social Evolution in the Ocean*. Chicago, University of Chicago Press.
- Whitehead, H., S. Brennan y D. Grover. 1992. Distribution and Behavior of Male Sperm Whales on the Scotian Shelf, Canada. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 70(5): 912-918.
- Whitehead, H. y J. C. Gordon. 1986. Methods of obtaining data for assessing and modelling sperm whale populations which do not depend on catches. *Reports of the International Whaling Commission. Special Issue, NO. 8 Behaviour Of Whales In Relation to Management*. Donovan, G. P. Cambridge, England., International Whaling Commission: 149-166.
- Whitehead, H. y S. Waters. 1990. Social Organization and Population Structure of Sperm Whales Off the Galapagos Islands Ecuador 1985 and 1987. Hammond, P. S., S. a. Mizroch and G. P. Donovan: 249-258.
- Whitehead, H., S. Waters y T. Lyrholm. 1991. Social Organization of Female Sperm Whales and Their Offspring Constant Companions and Casual Acquaintances. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 29(5): 385-389.
- Whitehead, H., L. Weilgart y S. Waters. 1989. Seasonality of sperm whales off the Galápagos Islands, Ecuador. . *Report to the International Whaling Commission(39)*: 207-210.