



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE MOSAICISMO  
CROMOSOMAL Y LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN EL AVE  
*Fregata magnificens***

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**NANCY LISSET TRUJILLO ROMÁN**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. DIEGO CLAUDIO CORTEZ QUEZADA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**AGOSTO, 2022**

## Resumen

Los mecanismos que inciden en la mortalidad temprana han sido objeto de estudio tanto en humanos como a través del árbol de la vida, pues su incidencia en las poblaciones es tal que se genera una brecha sexual en la longevidad que puede inferir en el comportamiento, la ecología y las dinámicas en la población.

Uno de los mecanismos estudiados que se sabe tienen efecto sobre la proporción de sexos en la población es la determinación sexual mediada por cromosomas, autores como Pipoly et al. (2015) y Xirocostas et al. (2020) han determinado que existe una correlación entre estos dos factores, debido a que se ha comprobado que la pérdida mosaica de los cromosomas es directamente proporcional con el envejecimiento temprano y con una reducción en la esperanza de vida en algunas especies con sexo heterogamético..

En este estudio se pretende comprobar si la desproporción de sexos en una población de fragatas está relacionada con la pérdida mosaica de los cromosomas sexuales, con este propósito se planteó realizar muestreos a la colonia de fragatas de la isla Isabel con el objetivo de obtener un rango de edad variable, entre los 2 y 96 meses, en el cual se obtuvieron 42 muestras de fragatas hembras para su posterior secuenciación. Se utilizó la cobertura de los cromosomas sexuales como nuevo método, en conjunto con análisis estadísticos, para determinar si existe una relación entre el envejecimiento y la pérdida mosaica de los cromosomas y se encontró que no existe una relación, por lo que se concluye que, contrastante con los resultados de la Dra. Pacheco con bobos de patas azules, en aves marinas tan longevas como las fragatas no existe una pérdida mosaica significativa para decir que se provoca una mortalidad diferencial sesgada al sexo heterogamético.

## Índice

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Sistema de determinación sexual .....	1
Determinación cromosómica del sexo .....	1
Evolución y degeneración del cromosoma W .....	2
Mosaicismo cromosómico .....	4
Proporción de sexos y la mortalidad diferencial .....	7
Efecto de los cromosomas sexuales .....	8
Brecha sexual en aves .....	11
Modelo de estudio Fregata magnificens .....	13
Distribución geográfica .....	13
Dimorfismo sexual .....	14
Ciclo de reproducción .....	16
Proporción de sexos .....	17
<b>Justificación</b> .....	<b>18</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>20</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>20</b>
General .....	20
Particular .....	20
<b>Metodología</b> .....	<b>20</b>
Toma de muestra .....	20
Extracción de ADN .....	21
Diseño de oligonucleótidos .....	22
Sexaje .....	24
Preparación y secuenciación de librerías .....	24
Ensamblaje y Análisis de cobertura .....	25
Normalización de los datos .....	25
Análisis estadísticos .....	26
<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
Extracción de ADN genómico .....	27
Verificación de oligos e Identificación del sexo .....	28

Preparación de librerías y purificación de muestras ..... 30

Análisis estadísticos ..... 30

**Discusión ..... 33**

    Perdida mosaica de los cromosomas sexuales..... 33

    Desproporción de sexos por factores extrínsecos ..... 34

    Perspectivas ..... 36

**Referencias ..... 37**

**Anexo ..... 41**

    Protocolos ..... 41

    Protocolo de Extracción de ADN de sangre..... 41

    Protocolo de amplificación por técnica de PCR para genes separados..... 43

    Protocolo de amplificación por técnica de PCR para genes juntos ..... 44

    Protocolo de purificación por perlas magnéticas ..... 45

    Material complementario..... 48

    1. Código para la obtención de coberturas ..... 48

    2. Normalización de datos ..... 49

    3. Código para la obtención de gráficos en R..... 51

### Lista de figuras

**Figura 1.** Aneuploidías en los cromosomas sexuales con fenotipos potenciales. (a) Ave con trisomía ZZW, si resultara hembra a pesar de la presencia de ZZ, se aceptaría la teoría por del cromosoma W dominante, si fuera macho se apoyaría la teoría por dosis cromosómica Z. (b) Ave con monosomía Z, si resulta macho se apoyaría la teoría del cromosoma W dominante, si resulta hembra se apoyaría la de dosis de Z. .... 2

**Figura 2.** Los cromosomas del sistema XY/ZW poseen una región homóloga denominada pseudoautosómica o apareante, donde ocurre el mecanismo de recombinación y una región no homóloga denominada segmento diferencial o región holándrica que ha perdido la capacidad de recombinación..... 3

**Figura 3.** Inactivación del cromosoma X (XCI). Al final del proceso de XCI el cromosoma inactivo se condensa durante el ciclo celular y puede observarse en la periferia del núcleo, a este se le conoce como cromatina sexual o cuerpo de Barr. .... 5

**Figura 4.** Pérdida estimada del cromosoma X y Y relacionada con la edad en los miembros del estudio deCODE en Islandia. a) Número estimado de copias del cromosoma Y en 8,703 hombres de la secuenciación completa del genoma. b) Número de copias del cromosoma X para 9,280 mujeres. En cada caso la línea negra indica la adecuación del modelo de regresión lineal donde se usa como predictor lineal a la edad del individuo en el momento de la toma de muestra..... 6

**Figura 5.** Mecanismos de los cromosomas sexuales que podrían influenciar en la mortalidad diferencial de los sexos. A) Efecto del cromosoma X/Z solitario. B) Efecto tóxico de Y/Z. C) Pérdida del cromosoma Y/W..... 9

**Figura 6.** Distribución filogenética de la proporción de sexos y de los sistemas de determinación sexual entre los *tetrápodos*. La banda interna indica el sistema de determinación sexual (rojo: XY, azul: ZW), y la banda externa muestra el sesgo de proporción de sexos (rojo  $\leq 0.5$ , azul  $> 0.5$  proporción de machos). .... 10

**Figura 7.** Dimorfismo en la esperanza de vida de diferentes especies. La filogenia de las especies se incluyó para organizarlas en categorías: primates y *homo sapiens*, Rodentia (roedores), pinnípedos (focas), mamíferos carnívoros (panteras, ungulados, etc.), cetáceos (ballenas y delfines), marsupiales, aves, reptiles, anfibios, peces (Chondrichthyes y Actinopterygii), Coleoptera (escarabajos), Diptera (moscas y mosquitos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y otros invertebrados..... **13**

**Figura 8.** Distribución geográfica de *Fregata magnificens*. A) Rango de distribución durante todo el año. B) Principales colonias de Fregata en México. Las trayectorias de los organismos rastreados por bandas o satélites se indican con flechas, donde las líneas sólidas corresponden a hembras y las punteadas a machos. .... **14**

**Figura 9.** Dimorfismo sexual en el ave *Fregata magnificens*. A) Macho en época de reproducción con exposición del saco gular; B) Hembra atrapando alimento antes de que caiga en el agua, demostrando hábitos oportunistas; C) Pichón en proceso de realizar la muda del plumaje de adulto..... **16**

**Figura 10.** Relación entre la pérdida del cromosoma W y la edad de las hembras muestreadas. .... **19**

**Figura 11.** Representación de la manipulación del ave para la recolección de sangre de la vena braquial, en la parte inferior del ala. .... **21**

**Figura 12.** Verificación de amplificación de oligos con ADN purificado del cálamo de pluma de Fregata hembra en gel de agarosa 1% y marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Amplificación en NCK2-3, APC-1 y VCAN1 a 550 pares de bases..... **28**

**Figura 13.** Amplificación de oligos en muestras de Fregata adulta, donde el individuo 2 es una hembra y el 3 un macho. Cromosoma autosomal A (NCK2-3), cromosoma W (APC1) y cromosoma Z (DMRT1 exón 1,2 y 3; VCAN)..... **29**

**Figura 14.** Sexaje de pichones con técnica de PCR. Se verificó qué muestras amplificaron con el oligo para el gen APC1 (del cromosoma W). Las hembras confirmadas fueron las muestras: 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 23 y 25. .... **29**

**Figura 15.** Amplificación de PCR múltiple con tres regiones génicas (NCK2-3, APC1 y DMRT1) de las primeras siete muestras de pichones. A) Producto de amplificación múltiple. B) Producto de amplificación purificado con el kit de purificación Beckman Coulter™ Agencourt AMPure XP PCR Purification. .... **30**

**Figura 16.** Histograma del porcentaje de alineación de las muestras de pichones hembras contra el genoma de referencia, donde se descartaron aquellas muestras que no superaran el porcentaje mínimo de alineación (>50%). .... **30**

**Figura 17.** Gráfico de caja (Boxplot) que muestran el valor de cobertura con cuartiles y la mediana del cromosoma W y Z durante dos etapas del desarrollo Wp (cromosoma W de pichones), Wa (cromosoma W de adultos), Zp (cromosoma Z de pichones), Za (cromosoma Z de adultos). .... **31**

**Figura 18.** A) Gráfico de violín donde se observa la distribución de los datos y la densidad de probabilidad, donde Wa (Cromosoma W de adultos) y Za (Cromosoma Z de adultos). B) Heatmap y Color Key donde se observa el nivel de mosaicismo por cromosoma. .... **32**

**Figura 19.** Cobertura de secuenciación normalizada de los cromosomas Y y X completos en muestras de ratas jóvenes y viejas. a) Gráfico de puntos de la cobertura de secuenciación mediana normalizada de ChrY en comparación con la edad de las ratas. b) Diagrama de caja de la cobertura de secuenciación mediana normalizada para los 22 cromosomas en ratas (20 autosomas y dos cromosomas sexuales). c) Gráfico de puntos de la cobertura de secuenciación mediana normalizada del cromosoma X en comparación con la edad de las ratas. Los tamaños de las muestras se indican en cada gráfico (valor n).. Error! Bookmark not defined.

**Figura 20.** Cobertura de secuenciación normalizada de loci ligados a W en muestras de aves marinas jóvenes y viejas. A) Gráfico de puntos de la cobertura de secuenciación mediana normalizada del cromosoma W en comparación con la edad de las aves. B)

Gráfico de puntos de la cobertura de secuenciación mediana normalizada del cromosoma Z en comparación con la edad de las aves..... Error! Bookmark not defined.

### Lista de Tablas

**Tabla 1.** Cuantificación por NanoDrop Muestras de sangre de adultos. Muestras 7 y 9 pertenecientes a machos. .... **27**

**Tabla 2.** Cuantificación por NanoDrop. Muestras de sangre de pichones. .... **27**

**Tabla 3.** Cuantificación por NanoDrop. Muestras de sangre de adultos. Todas pertenecientes a hembras..... **27**

**Tabla 4.** Datos crudos de las coberturas por loci y sus porcentajes de alineamiento. Datos obtenidos de la secuenciación pareada de muestras de fragata. Las muestras que van desde DC1\_S25\_R1\_001 hasta DC12\_S34\_R1\_001 pertenecen a pichones hembras de fragata, desde DC13\_S35\_R1\_001 hasta DC28\_S50\_R1\_001 pertenecen a fregatas adultas hembras y la muestra DC29\_S51\_R1\_001 pertenece a un macho adulto. .... **49**

**Tabla 5.** Valores normalizados a partir de los valores de corrección. .... **50**

## **Introducción**

### **Sistema de determinación sexual**

Existen diversos sistemas de determinación sexual que se dan en la naturaleza, los cuales determinan la condición de ser macho o hembra, se puede definir a los mecanismos de determinación sexual como sistemas biológicos responsables del desarrollo de las características sexuales en un organismo (Viguera, 2010), en muchos casos esta determinación suele ser genética, es decir, machos o hembras portan alelos o genes diferentes que especifican su morfología inicial, por otro lado, los sistemas de diferenciación sexual son aquellos que establecen la formación de fenotipos masculinos o femeninos (Beukeboom y Perrin, 2014) o caracteres sexuales primarios y secundarios (Matta et al, 2009).

La determinación sexual en las aves se encuentra mediada por cromosomas sexuales (Viguera, 2010), resultando en un sistema altamente definido (Matsubara et al., 2006), donde se presentan diferencias cromosómicas (Beukeboom y Perrin, 2014). Actualmente los distintos órdenes de aves poseen un cariotipo extenso y complejo, puesto que tienen entre 40 y 126 cromosomas, que varían en tamaños y disposición del centrómero (Griffiths y Phil, 2000). En todos los casos el cariotipo de ambos sexos presenta diferencias en un par de cromosomas, que se denominan cromosomas sexuales (Giráldez, 2003). Todas las aves comparten el mismo sistema de determinación sexual ZW y la evidencia genética ha llevado a la conclusión de que la constitución cromosómica en machos corresponde a cromosomas homogaméticos ZZ, mientras que en hembras se observa cromosomas heterogaméticos ZW.

### **Determinación cromosómica del sexo**

El mecanismo exacto por el cual la determinación por cromosomas sexuales es mediada no se encuentra definida en su totalidad, pero se sugiere que ocurre a nivel genético durante la formación del cigoto (Moore, 1925), con uno o más genes ubicados en los cromosomas sexuales (Smith, 2010).

Teorías como que el cromosoma W presenta una región con efecto feminizante y el Z una con efecto masculino, se han puesto a prueba para identificar los posibles mecanismos de

determinación (Figura 1) (Marshall y Shetty, 2001; Pace y Brenner, 2003). Hasta ahora, a través de estudios en aves triploides, se ha comprobado que la dosis del cromosoma Z en los individuos es de suma importancia para la determinación sexual (Smith, 2010); incluso se ha demostrado que el cromosoma Z posee genes que se expresan específicamente en el sistema urogenital de los machos, entre ellos el gen DMRT1, que participa en la diferenciación de los testículos en todos los vertebrados (Matsubara et al., 2006; Raymond et al., 1999).

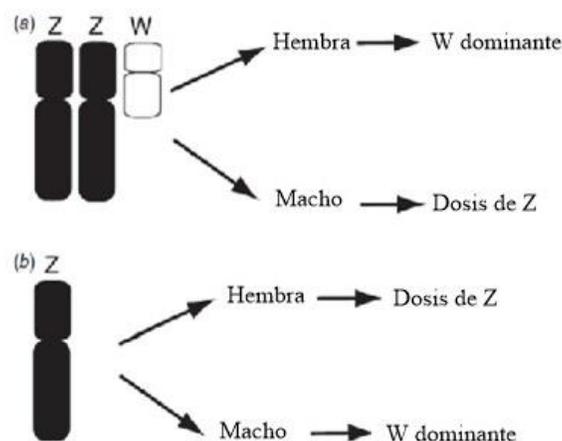


Figura 1. Aneuploidías en los cromosomas sexuales con fenotipos potenciales. (a) Ave con trisomía ZZW, si resultara hembra a pesar de la presencia de ZZ, se aceptaría la teoría por del cromosoma W dominante, si fuera macho se apoyaría la teoría por dosis cromosómica Z. (b) Ave con monosomía Z, si resulta macho se apoyaría la teoría del cromosoma W dominante, si resulta hembra se apoyaría la de dosis de Z. (Smith, 2010)

### Evoulción y degeneración del cromosoma W

Los cromosomas sexuales de serpientes, lagartijas, mamíferos y aves divergieron de distintos pares autosomales de un ancestro común (Matsubara et al., 2006) es decir, evolucionaron independientemente. Los ancestros de las aves divergieron hace aproximadamente 80 Ma, en dos subclases principales; las Ratites, aves sin la capacidad de volar y con cromosomas homomórficos ZW; y los Carinatae, aves con capacidad de volar y con cromosomas W heteromórficos que varían en tamaño según la especie (Marshall Graves y Shetty, 2001; Smith, 2010). Los cromosomas Z y W han evolucionado del mismo par autosomal ancestral (Smith, 2010), por esta razón es común encontrar homología entre los genes que conservan (Bergero y Charlesworth, 2009; Matsubara et al., 2006). A lo largo de su evolución, el cromosoma W, originado aproximadamente hace 140 Ma (Cortez et al., 2014), ha perdido la mayoría de los genes que se encontraban en su ancestro cromosómico, ahora representando una versión degradada del cromosoma Z (Ohno, 1967).

La recombinación homóloga es el mecanismo por el que las secuencias de ADN se mantienen con muy pocos cambios a través de las generaciones. Entre las funciones más importantes que tiene la recombinación están las de reparar rupturas en las cadenas de ADN. Los cromosomas heterogaméticos, al no tener un par homólogo, han sufrido cambios a lo largo de su evolución, resultando en el acortamiento del tamaño total del cromosoma y de las regiones homólogas en comparación con las de su pareja cromosómica (Figura 2) (Martínez, 2015), esto sugiere que existe una relación entre la degeneración del cromosoma y su reducción morfológica que puede observarse dentro del sistema ZW, que se soporta por evidencia en sistemas como el XY (Rutkowska et al., 2012), pero la reducción en tamaño no se encuentra necesariamente relacionada con la degeneración del cromosoma, si no con la influencia de la naturaleza de las modificaciones que sufren, como deleciones e inserciones de material genético (Bergero y Charlesworth, 2009) que se reflejan en una reducción o incremento morfológico respectivamente (Rutkowska et al., 2012). Dichos cambios delimitan así la región disponible para la recombinación, a los extremos teloméricos del brazo corto de los cromosomas (Hernández, 2006), llamadas regiones pseudoautosómicas (PAR) (Bergero y Charlesworth, 2009).

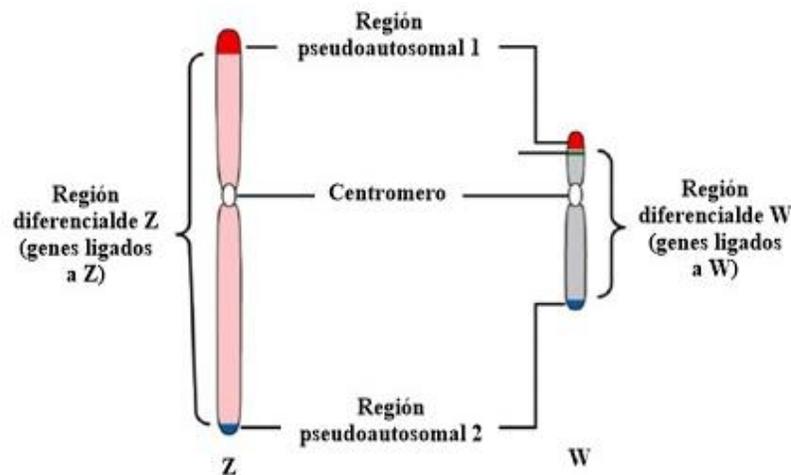


Figura 2. Los cromosomas del sistema XY/ZW poseen una región homóloga denominada pseudoautosómica o apareante, donde ocurre el mecanismo de recombinación y una región no homóloga denominada segmento diferencial o región holándrica que ha perdido la capacidad de recombinación. (A. Griffiths et al., 2002)

Dentro del sistema ZW el cromosoma W es el que presenta en su mayoría las señales típicas de un cromosoma sexual degenerado (Matta et al, 2009), al padecer una disminución en la región con capacidad recombinante, con la acumulación de secuencias repetitivas y la acumulación de elementos transponibles (que inducen la supresión de genes, degenerándolo)

(Bergero y Charlesworth, 2009). Los pocos genes que se han conservado en los cromosomas W tienen funciones de regulación de los niveles de expresión de otros genes. Por otro lado, el cromosoma Z representa uno de los cromosomas más conservados (Matta et al, 2009), pues mantiene su tamaño y contenido genético original (Ohno, 1967).

### **Mosaicismo cromosómico**

El mosaicismo celular se refiere a la presencia de células con diferentes fenotipos causados por mutaciones (Marais et al., 2018), es decir, que en el mismo organismo se encuentran tejidos que poseen poblaciones celulares con diferente constitución cromosómica, donde usualmente cada población celular proviene a partir del mismo cigoto (Strachan y Read, 2018). El mosaicismo puede ser el resultado de rearrreglos intra-cromosómicos a gran escala o por la pérdida o ganancia de un cromosoma entero. En humanos, específicamente en las mujeres, ocurre la inactivación del cromosoma X (XCI, X Chromosome Inactivation), esto significa que solo uno de los cromosomas sexuales será expresado en cada célula (Xirocostas et al., 2020). La inactivación ocurre en el estado embrionario y existe un 50% de probabilidad de que el cromosoma inactivo sea el heredado por el padre y un 50% de que se inactive el de la madre (Strachan y Read, 2018). Un XCI sesgado se asocia con envejecimiento prematuro y una vida útil más corta, por esta razón las mujeres centenarias tienden a tener un XCI balanceado (de porcentajes 50-50) (Xirocostas et al., 2020). Esta inactivación es aleatoria, es decir, que para diferentes niveles de tejidos existirán células que expresan el cromosoma X heredado por la madre, mientras que para la otra mitad se expresará el del padre, cualquiera que sea el elegido para la inactivación será el mismo en todas las células hijas de ese linaje somático (Figura 3) (Strachan y Read, 2018).

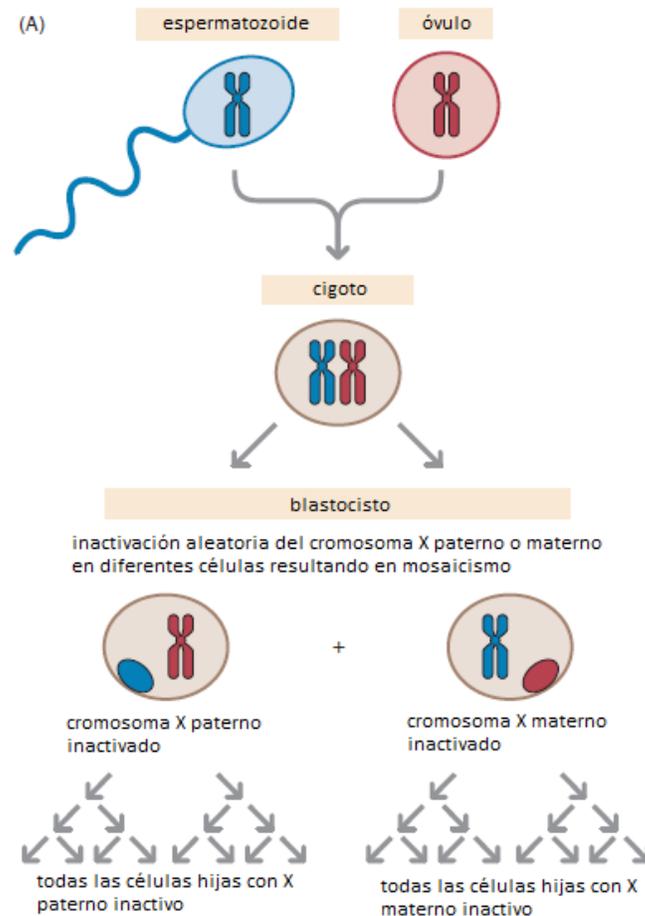


Figura 3. Inactivación del cromosoma X (XCI). Al final del proceso de XCI el cromosoma inactivo se condensa durante el ciclo celular y puede observarse en la periferia del núcleo, a este se le conoce como cromatina sexual o cuerpo de Barr. (Strachan y Read, 2018)

Se sabe que el mosaicismo aumenta con la edad en todos los cromosomas del tejido somático, pero incrementa en mayor medida en los cromosomas sexuales (Figura 4) (Marais et al., 2018), donde los eventos grandes de mosaicismo ocurren con mayor frecuencia en el cromosoma Y/W, pues en ellos ocurren alrededor de 0.25% más eventos mosaicos que la frecuencia para los cromosomas autosomales (Machiela et al., 2016), esto ha sido comprobado mediante perfiles de expresión genética y observando la composición de la cromatina, en moscas de fruta (*D. melanogaster*) jóvenes y adultas (Brown et al., 2017).

La pérdida a gran escala del tejido somático y en particular la pérdida del cromosoma Y/W, incrementa el envejecimiento en los organismos heterogaméticos y se ve fuertemente asociada con el incremento en el riesgo de padecer cáncer, diabetes, Alzheimer y en algunos casos incrementar la tasa de suicidios (Machiela et al., 2016; Wright et al., 2017).

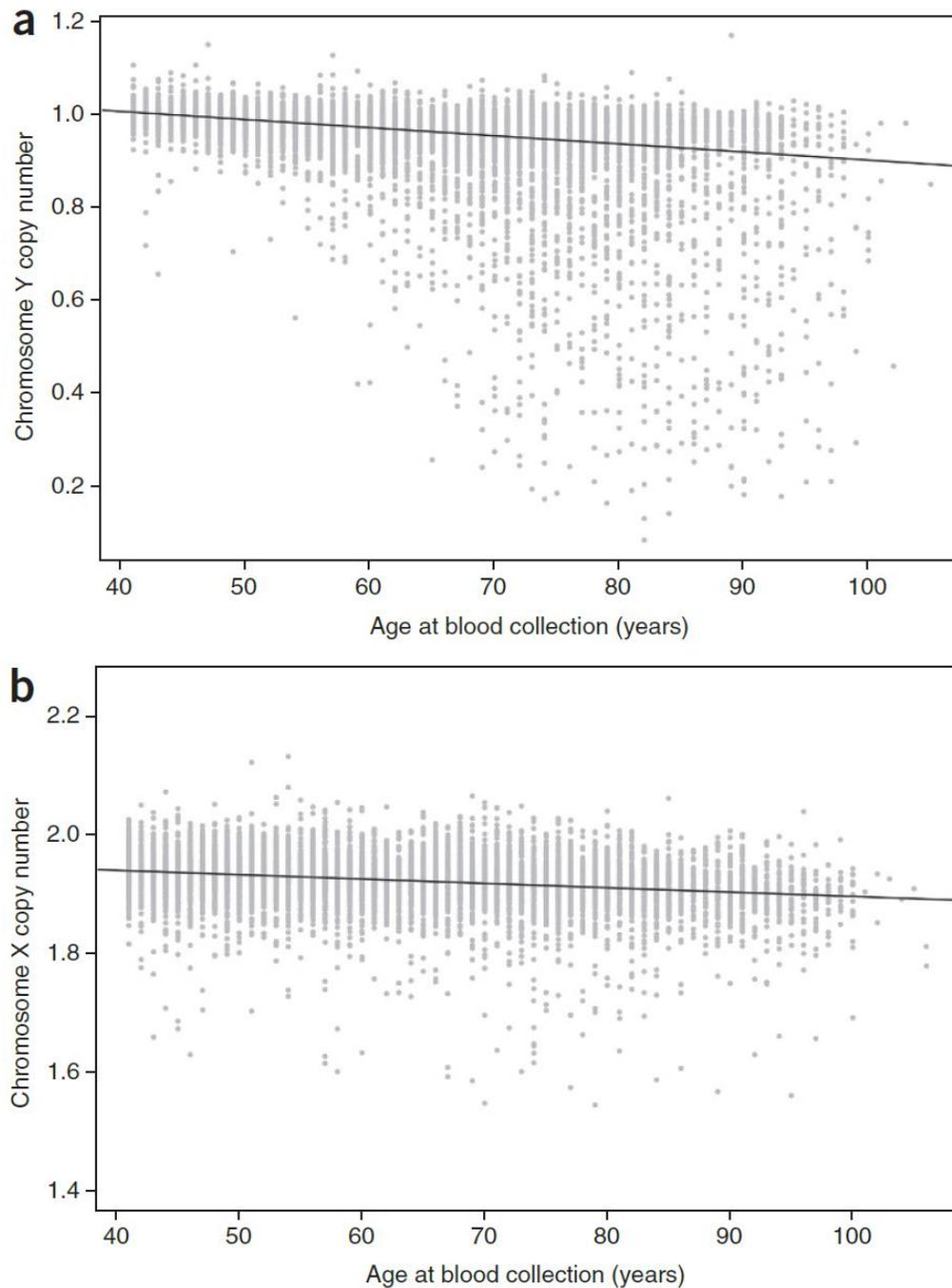


Figura 4. Pérdida estimada del cromosoma X y Y relacionada con la edad en los miembros del estudio deCODE en Islandia. a) Número estimado de copias del cromosoma Y en 8,703 hombres de la secuenciación completa del genoma. b) Número de copias del cromosoma X para 9,280 mujeres. En cada caso la línea negra indica la adecuación del modelo de regresión lineal donde se usa como predictor lineal a la edad del individuo en el momento de la toma de muestra. (Wright et al., 2017)

### **Proporción de sexos y la mortalidad diferencial**

Entender las causas y consecuencias de la variación en la proporción de sexos es de suma importancia para la biología evolutiva, la demografía poblacional y la conservación de la biodiversidad, pues una proporción de sexos sesgada afecta el comportamiento, los sistemas de anidación/apareamiento y la esperanza de vida (Pipoly et al., 2015). La relación entre la variación en la proporción de sexos y la influencia del ambiente fue inicialmente propuesta por (Williams, 1957), centrándose principalmente en el estudio de la mortalidad sobre la proporción de sexos en los adultos (ASR, adult sex ratio). Es importante hacer la distinción de los niveles a los que la proporción de sexos puede ser estudiada, pues se ha dividido en tres grupos, la proporción primaria, que ocurre al tiempo de la fertilización (PSR, primary sex ratio); la proporción secundaria, donde los individuos ya han nacido (SSR, secondary sex ratio); y la proporción terciaria, que se mide durante la vida adulta (TSR, tertiary sex ratio o ASR). El escenario ideal es aquel en el que la proporción es de 50/50, es decir, que el 50% de los individuos en la población sean machos y el otro 50% hembras (Mayr, 1939), pero esto no siempre ocurre en todos los niveles, o en todas las poblaciones. La proporción de sexos en la concepción, en el nacimiento y en la vida adulta son influenciadas por factores ecológicos, etológicos y por la historia de vida de los organismos (Székely et al., 2014), llevándolos en muchos casos a presentar sesgos hacia algún sexo, ya sea en uno o todos los niveles, lo que se puede traducir en una mortalidad diferencial (Mayr, 1939) que depende de las condiciones y factores a los que se enfrenta la población, resultando en una longevidad reducida o alargada (Marais et al., 2018).

El nivel más estudiado es el de la proporción terciaria, es decir, en adultos. En este se ha observado que los procesos que determinan la proporción en una población son principalmente aquellos factores que afectan específicamente a los sexos. Ya sea desde un sesgo en la proporción primaria o secundaria que se perpetúa a la terciaria, tener diferencias en las mortalidades o en la velocidad del tiempo de maduración (Székely et al., 2014). Se debe tener en mente que una población de adultos nunca es realmente homogénea, pues se encuentra compuesta por varias clases de edades, pero que siempre se determinará en gran parte por factores ambientales (Mayr, 1939). Un aspecto de la biología que podría contribuir con una proporción de sexos diferencial y un pronto envejecimiento tiene que ver con que el organismo herede factores genéticos que difieren entre sexos. Estos factores van desde el

genoma mitocondrial (que es heredado únicamente por la madre), hasta los cromosomas sexuales (Marais et al., 2018).

(Marais et al., 2018) realizó una revisión exhaustiva de la relación entre la proporción de sexos y la mortalidad diferencial, explicándola a través de distintos puntos de vista, como las diferencias culturales que existen en humanos, con la exposición a hormonas que aumentan la probabilidad de padecer cierto tipo de enfermedades, con los diferentes factores biológicos propios de cada sexo y con diversos mecanismos que ocurren en los cromosomas sexuales, proponiendo así la dirección del enfoque para futuras investigaciones.

### **Efecto de los cromosomas sexuales**

El único mecanismo de determinación sexual que genera diferencias en la mortalidad es el mecanismo cromosómico. Un ejemplo claro de ello se demuestra con la hipótesis del cromosoma X solitario (generalmente utilizada para mamíferos, pero que de igual forma es aplicable para organismos heterogaméticos con sistema ZW) sugiere que los organismos heterogaméticos se encuentran predispuestos a experimentar mayor mortalidad que los organismos homogaméticos de la misma especie. Esta hipótesis se basa en el hecho de que cualquier mutación deletérea o recesiva en el cromosoma X o Z tiene mayores probabilidades de expresarse en los individuos heterogamético que en los homogaméticos, pues se verían enmascaradas por la segunda copia del cromosoma (Strachan y Read, 2018). Por esta razón, en los humanos, la mayoría de las enfermedades o condiciones genéticas implicadas en el cromosoma X tienen una mayor probabilidad de expresarse en los hombres, puesto que en las mujeres el efecto del cromosoma X solitario se ve enmascarado dependiendo de qué tan bien se restaura la diploidía funcional con la inactivación del cromosoma X (Marais et al., 2018; Xirocostas et al., 2020). Otra hipótesis sugerida es la del efecto tóxico que Y/W pueden llegar a tener sobre el sexo heterogamético (Marais et al., 2018). Esta hipótesis propone que la pérdida de heterocromatina a medida que el organismo envejece se encuentra ligada con el incremento de la expresión de repeticiones localizadas en el cromosoma Y/W mediante la activación de elementos transponibles (ET) (Figura 5B) que interfieren con la epigenética de otros cromosomas (Brown et al., 2017). Por último, se habla de la teoría de la pérdida del cromosoma Y/W, debido al incremento en la frecuencia en la que ocurren los eventos

mosaicos a medida que los organismos envejecen (Figura 5C); De tal manera que las tres teorías afectan negativamente la longevidad de vida acortándola y llevando a los individuos al envejecimiento y muerte prematura (Machiela *et al.*, 2016).

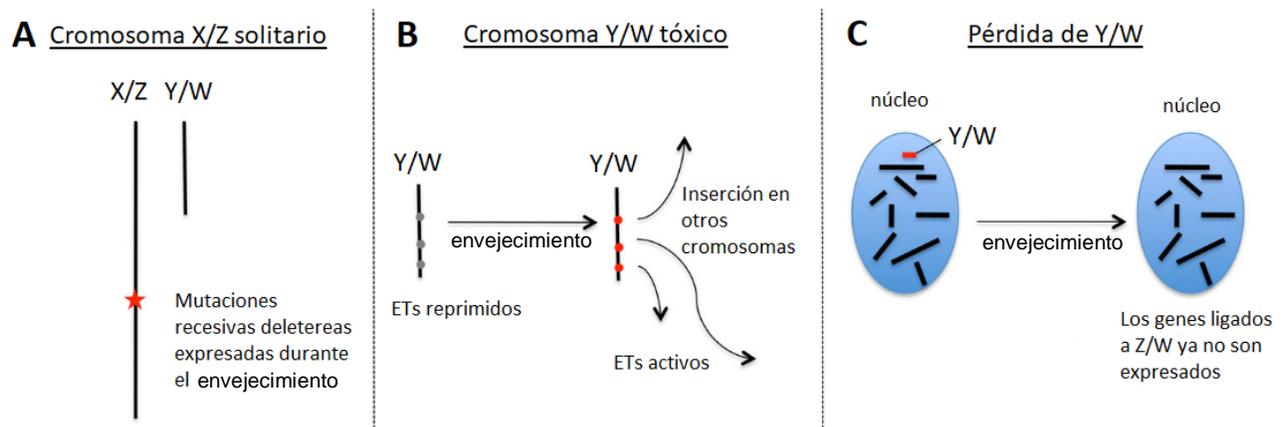


Figura 5. Mecanismos de los cromosomas sexuales que podrían influir en la mortalidad diferencial de los sexos. A) Efecto del cromosoma X/Z solitario. B) Efecto tóxico de Y/Z. C) Pérdida del cromosoma Y/W. (Marais *et al.*, 2018)

Se ha evaluado si la proporción de sexos en adultos difiere entre taxones con distintos sistemas de determinación sexual y si existe una relación entre el sistema de determinación, XY y ZW, con el sesgo a una mayor proporción de machos o hembras, respectivamente; y se encontró una correlación positiva entre la proporción de sexos y el tipo de sistema de determinación, donde las poblaciones con sistema ZW tienen un sesgo a una mayor proporción de machos en la población y el sistema XY un sesgo a una mayor proporción de hembras en la población adulta (Pipoly *et al.*, 2015). Se reunieron datos de longevidad por sexo de 229 especies, abarcando 99 familias, 38 órdenes y 8 clases diferentes, para que a través de un meta-análisis se comprobara que el sexo homogamético vive en promedio un 17.6% más que el sexo heterogamético (Figura 6). Aunado a esto, se observó un porcentaje diferencial en la mortalidad de los organismos heterogaméticos dependiendo del sistema de determinación sexual. En especies donde la hembra representaba el sexo heterogamético, los organismos homogaméticos viven un 7.1% más y donde los organismos heterogaméticos son los machos, el sexo homogamético vive un 20.9% más (Xirocostas *et al.*, 2020).

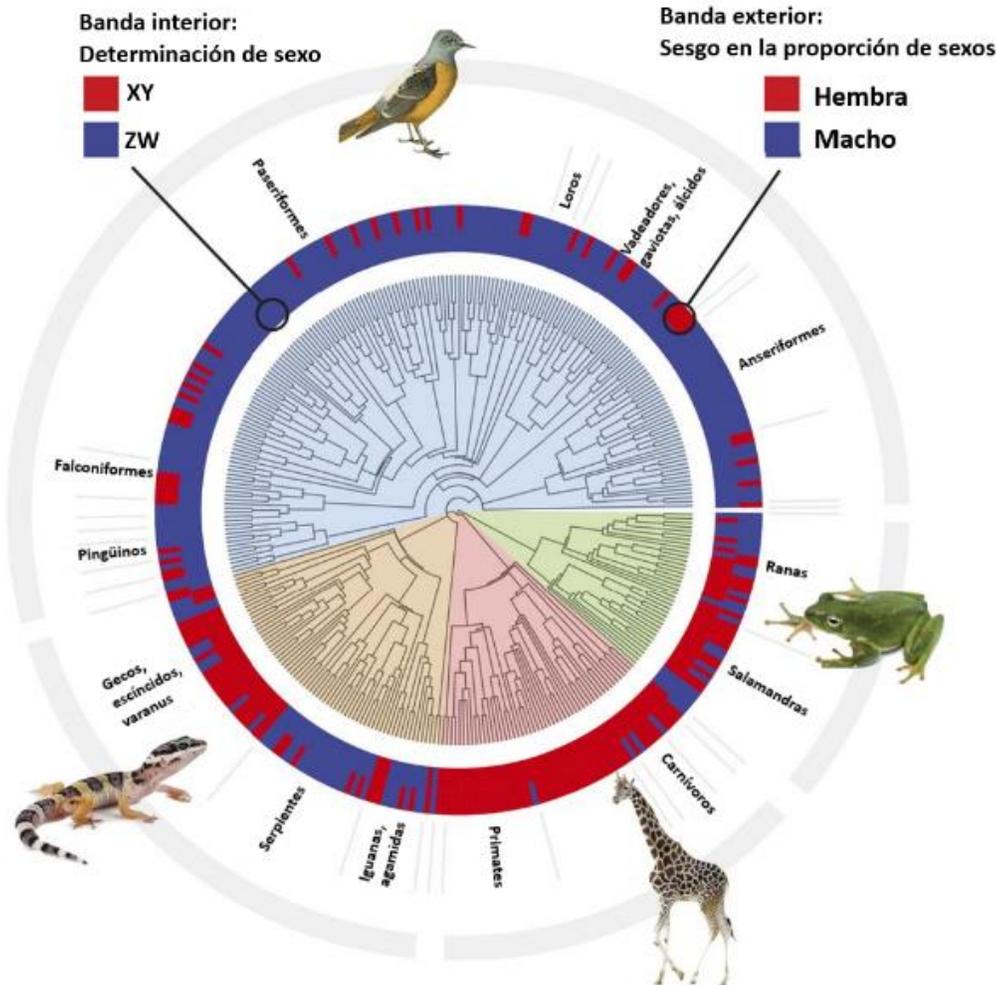


Figura 6. Distribución filogenética de la proporción de sexos y de los sistemas de determinación sexual entre los *tetrápodos*. La banda interna indica el sistema de determinación sexual (rojo: XY, azul: ZW), y la banda externa muestra el sesgo de proporción de sexos (rojo  $\leq 0.5$ , azul  $> 0.5$  proporción de machos).

(Pipoly et al., 2015).

Sin embargo, el sistema de determinación sexual puede afectar a la proporción de sexos de formas que no necesariamente resultan perjudiciales. En mecanismos como el de la selección sexual, la fijación de mutaciones beneficiosas puede ocurrir, como aquellas que incrementan el éxito reproductivo de los machos, aumentando a su vez, la probabilidad de sobrevivir. Estas mutaciones se acumulan en el cromosoma Y, pero pocas veces se observa que se acumulen en el W, y se acumulan más fácilmente en el cromosoma X, pero no en el Z si tienden a ser recesivas (Pipoly et al., 2015). Si bien es cierto que existe una clara influencia de los cromosomas sexuales sobre la longevidad, se debe tomar en cuenta que la diferencia en la esperanza de vida entre sexos no se encuentra determinada únicamente por factores genéticos, si no por una combinación de factores entre el cuidado parental, la exposición a

los depredadores, la selección sexual, entre otros factores bióticos (Trivers, 2002; Xirocostas et al., 2020).

### **Brecha sexual en aves**

Como era de esperarse, la mortalidad en aves también se ve determinada por distintos factores, tales como los ecológicos, etológicos o genéticos, estos factores incluso resultan ser de mayor importancia que los factores fisiológicos (Xirocostas et al., 2020). Por esta razón es difícil determinar qué aspectos de la vida del organismo están relacionados con la mortalidad de un sexo específico. En los adultos las diferencias en los estilos de vida pueden ser uno de los mayores contribuyentes en el sesgo de las poblaciones de aves (Székely et al., 2014). Un ejemplo de ello es el mecanismo “vive rápido-muere joven”, generalmente se puede observar como una estrategia de vida común entre los machos, que sufren mayor competencia, ya sea intra- o inter- específica, en época de apareamiento (Marais et al., 2018), por lo que se explicaría una mortalidad mayor, impulsada por el ambiente, en machos adultos a temprana edad (Williams, 1957). Las diferencias morfológicas entre sexos también se pueden traducir en diferencias en el consumo de energía, en la mortalidad y en la tolerancia a temporadas inhóspitas (Székely et al., 2014). Un ejemplo claro de esto es el dimorfismo sexual que puede tener efectos en la esperanza de vida de cada sexo (Xirocostas et al., 2020), la diferencia en los tamaños hace que el sexo proporcionalmente más grande sea vulnerable a los periodos con bajos niveles de recursos y cualquier cambio en su ambiente óptimo los afecta en mayor medida. Esta diferencia en tamaño también es responsable de una depredación diferencial, debido a que cada sexo representa un valor nutricional diferente, los depredadores cazan a aquellos de los que obtendrán mayor ganancia, en la naturaleza la depredación es 2.3 veces mayor en machos que en hembras y esto se explica por la ornamentación que muchas especies desarrollan en la época de apareamiento. La morbilidad diferencial en los sexos también contribuye a una mortalidad diferencial, pues algunos individuos experimentan mayor vulnerabilidad que otros a ciertas enfermedades o parásitos particulares. Otro diferenciador en las estrategias de vida se observa en los sistemas de apareamiento en las aves, que se dividen en dos principales: la monogamia, donde un individuo se aparee con un solo compañero en cada estación de cría, o por lo menos en el ciclo actual, y la poligamia, en donde un individuo se aparee con más de un compañero en

cada estación (Hickman et al., 2001). El 90% de las aves son especies monógamas, sin embargo, pueden existir algunas en los que la poligamia suceda (Mayr, 1939). La proporción sexual en especies monógamas puede ser desbalanceada, contrastante con la hipótesis del cromosoma X/Z, al sexo heterogamético se les atribuye una mortalidad superior (7.1%), en comparación con la del sexo homogamético (Figura 7) (Trivers, 2002; Mayr, 1939; Xirocostas *et al.*, 2020). En cambio, las especies polígamas o promiscuas favorecen un sesgo en dirección a un mayor número de hembras en la población (Mayr, 1939). Por último, se ha observado que actualmente los cambios antropogénicos representan una de las principales causas de una proporción de sexos diferencial, debido a la caza dirigida a un sexo específico, a la pérdida del hábitat, a la contaminación, etc. (Székely et al., 2014).

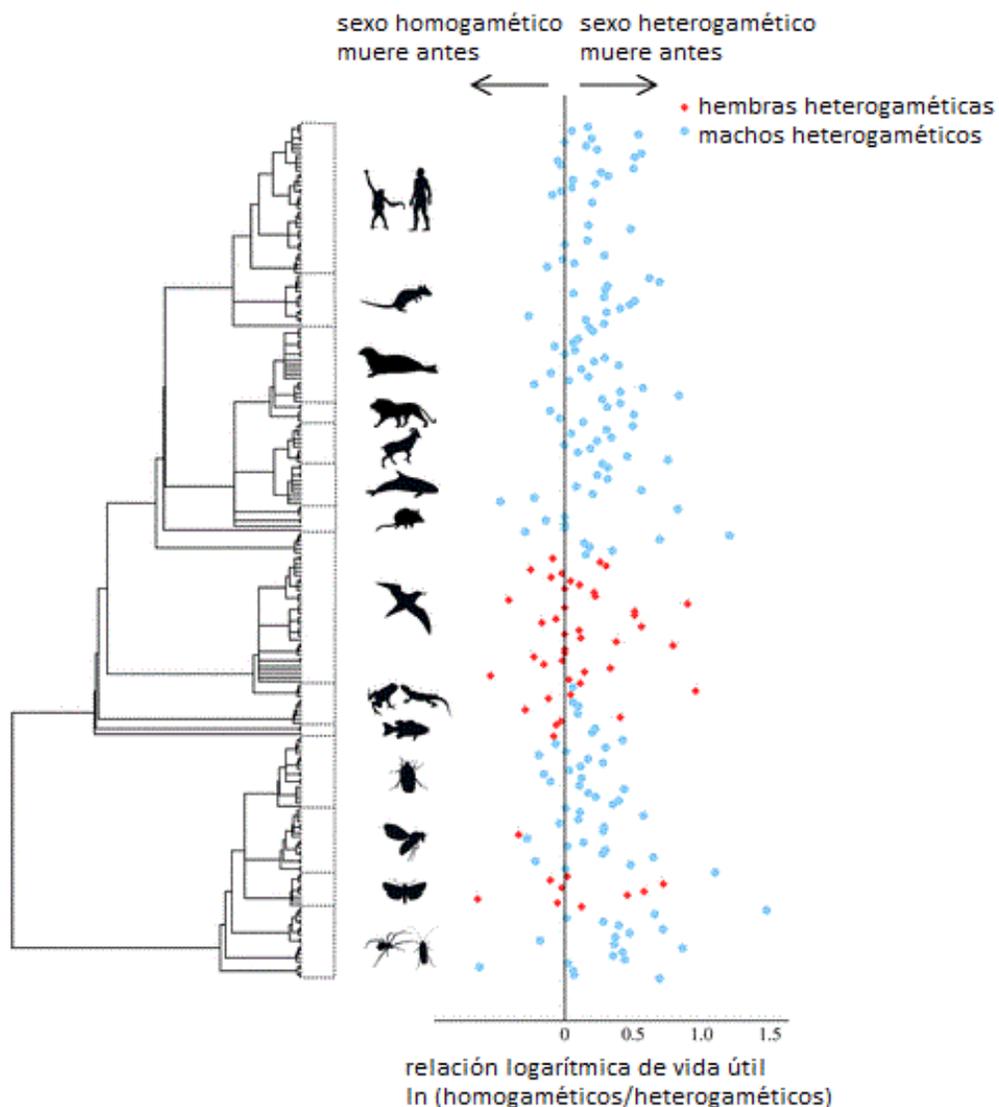


Figura 7. Dimorfismo en la esperanza de vida de diferentes especies. La filogenia de las especies se incluyó para organizarlas en categorías: primates y *homo sapiens*, Rodentia (roedores), pinnípedos (focas), mamíferos carnívoros (panteras, ungulados, etc.), cetáceos (ballenas y delfines), marsupiales, aves, reptiles, anfibios, peces (Chondrichthyes y Actinopterygii), Coleoptera (escarabajos), Diptera (moscas y mosquitos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y otros invertebrados. (Xirocostas et al., 2020)

### **Modelo de estudio *Fregata magnificens***

La Fregata Magnífica (*Fregata magnificens*) es un ave marina pelágica (Miranda 2011), estas aves se distribuyen en climas tropicales donde no existen estaciones definidas, forman colonias en diferentes islas donde no hay presencia humana (Villareal, 2019) y anidan en las costas para formar parejas monógamas. Se caracterizan por su gran longevidad, que va hasta a más de 40 años (Madsen et al., 2007)

### **Distribución geográfica**

La Fregata se distribuye principalmente en el Mar Caribe, al este del Océano Pacífico y al oeste del Océano Atlántico, cubriendo desde el centro hasta el sur de las costas del continente americano (Figura 8a). Su rango de anidación abarca islas de México, como Santa Margarita en el sur oeste de Baja California, San Benedicto, posiblemente Isla Socorro en Revillagigedo y Tres Marías en Nayarit, también los manglares de la costa de Sinaloa, las bahías del Pabellón y Santa María, las islas del Golfo como San Luis, Cholluda y Alcatraz y las costas de la península de Yucatán (Diamond y Schreiber, 2002). En México las principales poblaciones de fregatas se localizan en islas del Océano Pacífico Oriental, como Santa Margarita (24 ° 25 'N, 111 ° 07' W), Tunitas (25 ° 00 'N, 108 ° 10' W) e Isabel (21 ° 51 'N, 105 ° 54 'W) y en el Mar Caribe, como en la isla Contoy (21 ° 27' N, 86 ° 46 'W) (Figura 8b) (Rocha-Olivares y González-Jaramillo, 2014).

Asimismo, la distribución del rango de anidación se extiende fuera de México, y abarca el centro y sur del continente americano: en islas de las costas de Belice, Honduras, Panamá, las Bahamas, Cuba, Jamaica y Haití, además de las islas de las costas de Puerto Rico, Venezuela, Colombia y la Guinea Francesa (Diamond y Schreiber, 2002).

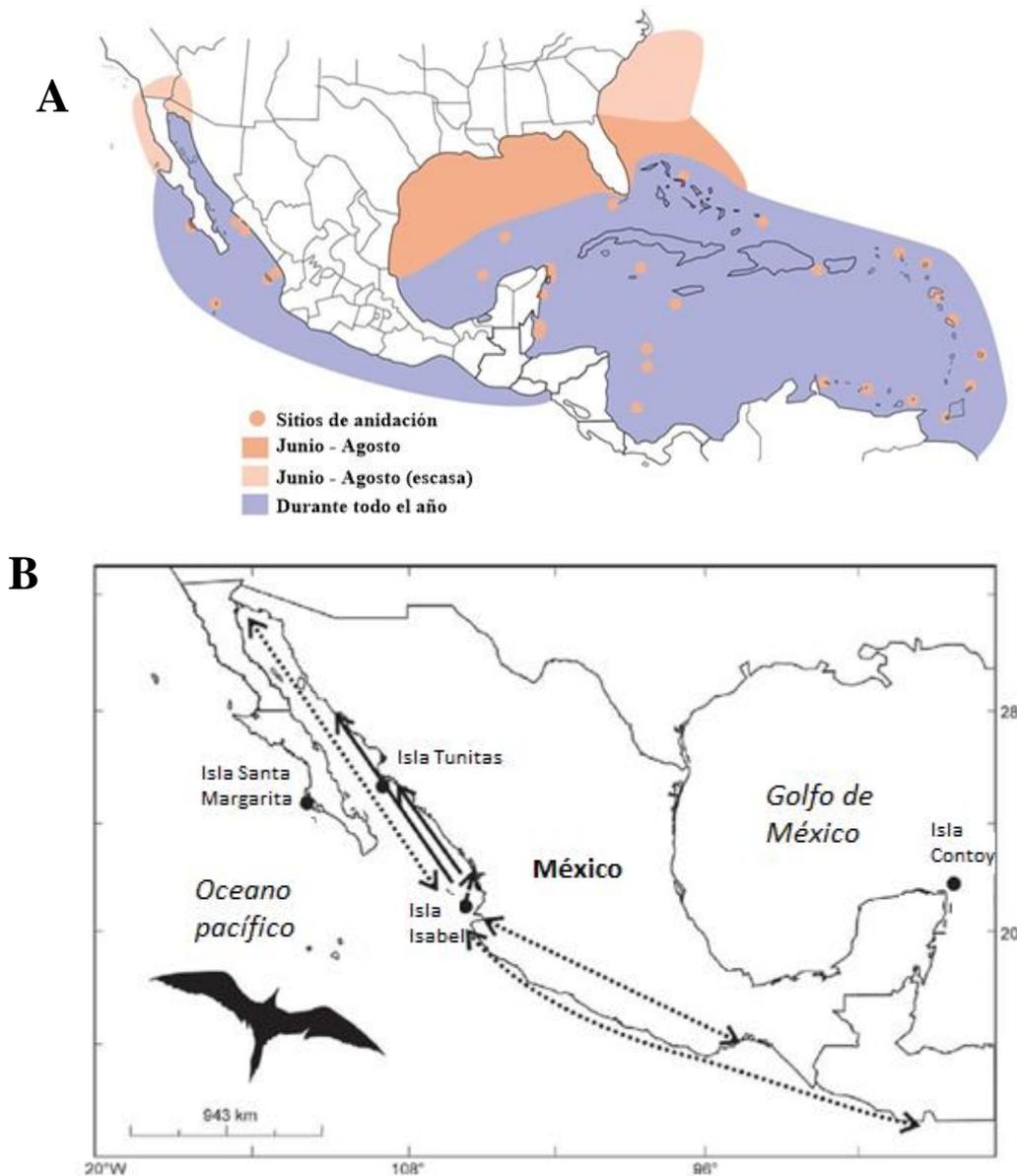


Figura 8. Distribución geográfica de *Fregata magnificens*. A) Rango de distribución durante todo el año. B) Principales colonias de *Fregata* en México. Las trayectorias de los organismos rastreados por bandas o satélites se indican con flechas, donde las líneas sólidas corresponden a hembras y las punteadas a machos. (Rocha-Olivares y González-Jaramillo, 2014; The Cornell Lab of Ornithology, 2020).

### Dimorfismo sexual

Los sexos se encuentran diferenciados desde el tamaño, ornamentación del plumaje y de la piel, hasta el cuidado parental que proveen a la descendencia. Además, las hembras de esta especie son de un tamaño superior a los machos (Diamond y Schreiber, 2002).

## **Ornamentación del plumaje**

La forma en la que las hembras perciben la calidad del macho se determina muchas veces por la calidad y coloración del plumaje; su condición puede determinarse por el tono, el brillo, la pureza del color y la direccionalidad que presentan. La calidad del plumaje se ve fuertemente influenciada por la nutrición durante el crecimiento del pichón al momento de desarrollar las plumas que tendrá de adulto (Madsen et al., 2007).

El plumaje de los machos es de color negro y las plumas presentan efectos con y sin iridiscencia. La iridiscencia es fundamental para la exhibición que despliegan ante las hembras en época de reproducción (Madsen et al., 2007), a distancias cortas las plumas iridiscentes con forma escapular, presentes en cabeza y cuello, reflejan colores púrpuras y verdes. Por el contrario, las hembras exhiben una coloración café sin iridiscencia, con un prominente parche blanco en el pecho y parte del abdomen, puntas blancas en los axilares y una barra alar de color marrón claro o beige en la parte superior del ala (Diamond y Schreiber, 2002).

## **Ornamentación de la piel**

La piel del macho tiene un rol fundamental en la época de reproducción ya que presentan un parche de piel desnuda debajo de la garganta, llamado saco gular, que se caracteriza por su coloración que va desde un rojo brillante a un rosa pálido. El color del saco gular sirve como indicador del estado en el que se encuentra el individuo (reposo o buscando pareja), se ha relacionado con la carga de parásitos y también con los niveles de testosterona en sangre (Madsen et al., 2007). Un patrón sorprendente de las fregatas es que el saco gular se infla como un gran globo rojo incandescente durante las exhibiciones de cortejo que realizan para atraer a las hembras, y lo mantienen inflado durante el periodo de incubación temprana. En otros periodos del año el saco gular se encoge y cambia a un tono rosa pálido (Antony W. Diamond y Schreiber, 2002).

La coloración de las ornamentaciones es determinada por los niveles de hemoglobina, carotenoides y otros pigmentos. En la fregata, el saco gular se llena o vacía de sangre para

cambiar rápidamente de coloración y forma durante el baile de cortejo (Figura 9a) (Madsen et al., 2007).

### Ciclo de reproducción

El periodo de anidación suele ser prolongado y la inversión en el cuidado parental es asimétrico: ambos sexos toman parte de la crianza durante las primeras etapas (A. W. Diamond, 1971), tanto en el periodo de incubación (durante las primeras de 6 ½ - 8 semanas), como en el periodo de emplume, (con una duración de entre 5 - 6 meses en total). Sin embargo, cuando el pichón tiene entre 3 - 4 meses de vida, los machos abandonan la colonia y no regresan hasta el próximo ciclo de apareamiento (Diamond, 1971). Los pichones siguen siendo alimentados por la hembra hasta su primer año de vida, proveyendo un cuidado prolongado para los juveniles de la temporada anterior (Figura 9c) (Diamond y Schreiber, 2002). Este gasto poco igualitario en la inversión parental permite a los machos reproducirse anualmente, mientras que las hembras exitosas lo hacen cada dos años (Diamond y Schreiber, 2002).

Un fenómeno común en las colonias es el comportamiento agonista, pues ocurre un alto grado de usurpación del territorio y del alimento, cuando se pretende alimentar a los polluelos, esto resulta en la pérdida significativa de huevos y pichones; a pesar de haber procreado exitosamente, las parejas pueden sobrellevar la pérdida e intentar nuevamente en el inicio del próximo ciclo reproductivo (Nelson, 1967). La alta mortandad de crías ha llevado a ciertas colonias a tener actividad reproductiva durante todo el año (Miranda, 2011).



Figura 9. Dimorfismo sexual en el ave *Fregata magnificens*. A) Macho en época de reproducción con exposición del saco gular; B) Hembra atrapando alimento antes de que caiga en el agua, demostrando hábitos oportunistas; C) Pichón en proceso de realizar la muda del plumaje de adulto. (Nature, 2020)

## Proporción de sexos

Existen pocos estudios que se relacionen con la proporción de sexos dentro de las colonias de aves marinas, pero sin duda *Fregata magnificens* es la especie más estudiada de su familia (Diamond y Schreiber, 2002), Múltiples hipótesis han sido puestas a prueba, entre ellas resalta la del costo energético que representa para los padres el alimentar a los polluelos hasta su periodo juvenil y la anticipación con la que los nidos son establecidos, pues algunas parejas se establecen mucho antes que otras, resultando el tiempo crucial para la sobrevivencia del polluelo. En aquellas parejas donde ocurrió un establecimiento temprano se observó que los machos contribuyeron mayor tiempo en la crianza y en aquellas de establecimiento tardío se observó una reducción en tiempo en el cuidado parental por parte de los machos, por lo que la sobrevivencia del pichón se encuentra entonces correlacionada negativamente con la edad en la que el macho adulto los abandona (Osorno, 1996).

El momento en el que los machos deciden desertar el nido, con la intención de garantizar su disponibilidad en el próximo periodo de reproducción habla también del costo energético de cuidados que cada sexo representa, pues el hecho de que los machos adultos que se establecieron en periodos tempranos abandonen el nido 20 días antes si el pichón es macho, sugiere que la crianza de hembras implica un mayor costo en el cuidado parental (Osorno, 1999 & Osorno, 1996).

Otra hipótesis afirma que las hembras son capaces de manipular la proporción de sexos mediante el abandono de nidos de la siguiente generación para su beneficio, se creería entonces que si la crianza de machos representa un menor costo, el sesgo se verá inclinado a la producción del sexo más barato o a la producción del sexo con menor varianza (machos) en condiciones pobres y al de mayor varianza (hembras) en condiciones óptimas, es decir, las parejas que se establecieron tarde sesgaron la producción en favor de los machos y las que se establecieron temprano hacia la producción de hembras (Osorno, 1996); A grandes rasgos se podría decir que la proporción de adultos en las colonias de fregatas es casi dos machos por hembra. Esto explica el alto nivel de violencia que se vive en las colonias entre machos a la hora de conseguir pareja o contra hembras y crías. Sin embargo, la proporción de sexos en una colonia cambia según la época del año. Durante el periodo de reproducción,

incubación y crianza tenemos casi 2 machos por hembra; después de esta época casi ningún macho está presente en la colonia y a los pocos meses, antes de la temporada de reproducción, la proporción de sexos alcanza 1:1 a medida que los machos regresan a la colonia (Diamond, 1971).

### **Justificación**

La proporción de sexos en cualquier población varía a través del tiempo, esta puede encontrarse sesgada a una mayor proporción tanto de machos como de hembras; este desequilibrio se asocia con cambios en la conducta de los organismos, como el incremento en la violencia y la facilidad con la que la propagación de enfermedades aumenta. En las aves, y en los organismos con sistema ZW, se observa una tendencia hacia un mayor número de machos que hembras, por lo que se ha sugerido que la presencia de los cromosomas sexuales podría incidir en la mortalidad diferencial entre sexos.

En un estudio paralelo realizado en el laboratorio de biología sintética y biología de sistemas del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Cortez; la Dra Pacheco analizó cerca de 63 muestras de sangre de hembras bobos patas azules (*Sula nebouxii*) con edades entre los 0 meses y los 21 años (longevidad máxima de la especie). A través de la técnica de amplificación y secuenciación (tecnologías de secuenciación masiva en una plataforma Illumina), analizó un locus para cada copia única en el cromosoma 1 (autosomal), un locus con copia única en el cromosoma Z y un locus con copia única en el cromosoma W. Los resultados demostraron que las hembras de esta especie (*Sula nebouxii*), no presentan pérdida del cromosoma W asociado al envejecimiento (Figura 10).

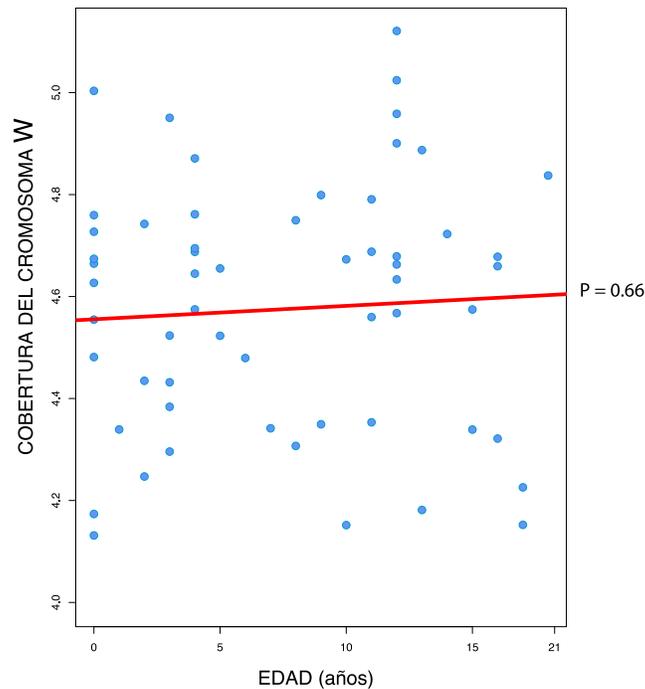


Figura 10. Relación entre la pérdida del cromosoma W y la edad de las hembras muestreadas. (Pacheco, 2019)

Sin embargo, cabe señalar que esta ave presenta una proporción 1:1 entre sexos y no existe dimorfismo sexual, pues ambos padres se ocupan de sus crías, tienen longevidades similares y la frecuencia de parejas monógamas es muy elevada. Es decir, los bobos patas azules no forman parte del patrón descrito por Pipoly et al. (2015) donde, en general, las aves presentan una proporción de sexos sesgada hacia los machos. Existen dos posibles explicaciones a los resultados en bobos patas azules: 1) Las aves no presentan una pérdida parcial del cromosoma W durante el envejecimiento, a diferencia del humano con el cromosoma Y. 2) Los bobos patas azules presentan un mecanismo que reduce la pérdida del cromosoma W y ello se relaciona con la elevada esperanza de vida de las hembras. Para resolver esta pregunta, es necesario un estudio con una población de aves que se encuentre fuertemente sesgada a un mayor número de machos en la población.

Por otro lado, las fregatas se caracterizan por ser de las aves marinas más grandes que existen, su proporción en tamaño se refleja en su gran longevidad, de hasta más de 40 años (Madsen et al., 2007), hay una fuerte selección sexual que se aprecia por los ornamentos y conductas de los machos, y lo más significativo para este estudio, estas aves presentan asimetría en la

proporción de sexos de casi 2 machos por cada hembra (Diamond, 1971). Estas razones hacen a la fregata magnífica un modelo de estudio ideal para determinar si existe alguna relación entre el desbalance de machos/hembras en poblaciones adultas y el aumento del mosaicismo del cromosoma W durante el envejecimiento de las hembras (Pipoly et al., 2015). Conocer los motivos que afectan a esta variación resulta de suma importancia para estudios de biología evolutiva, demográfica poblacional e incluso para los de conservación de la biodiversidad.

### **Hipótesis**

Las hembras de mayor edad no presentan una pérdida parcial del cromosoma W más elevada que los pichones hembra en las células sanguíneas.

### **Objetivos**

#### **General**

Determinar si existe relación entre el número de copias de los cromosomas Z y W y la edad de las hembras en una población estable de fregatas (*Fregata magnificens*).

#### **Particular**

Aislar ADN genómico de muestras de sangre obtenidas de hembras juveniles y adultas de una población de la fregata magnífica.

Cuantificar mediante secuenciación de nueva generación la cobertura de los cromosomas Z y W en células de sangre de hembras juveniles y adultas.

Comprobar a través de análisis estadísticos la relación entre mosaicismo y longevidad.

### **Metodología**

#### **Toma de muestra**

Se realizaron tres muestreos a las colonias cercanas de Baja California Sur en la isla Santa Margarita (24 ° 25 'N, 111 ° 07' O), por el equipo de investigación de la Dra. Cecilia Soldatini, perteneciente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE. El primero se llevó a cabo, el 20 de junio del año 2020, donde se

obtuvieron 25 muestras de pichones de Fregata, el segundo se realizó a finales de noviembre del año 2020, donde se obtuvieron 18 muestras de sangre de Fregata adulta y el tercero se realizó a inicios de mayo del año 2021, donde se obtuvieron muestras de sangre únicamente de hembras de Fregata adulta.

Se extrajeron muestras de sangre de hembras adultas y pichones de la vena braquial, que se encuentra justo debajo de la superficie ventral de la articulación húmero-radial-cubital (Figura 11). En este estudio el volumen recolectado de sangre fue de 200  $\mu$ l, lo que representa menos del 1% de la masa del ave en sangre, límite establecido de acuerdo con la ley (Cornell Lab of Ornithology, 2020); y se conservó en 1.2 mL de Buffer de lisis Longmire's (vol. final de 1.5 mL), conocido por neutralizar componentes celulares que puedan degradar las muestras, permitiendo que el ADN se solubilice y se acumule en el buffer a medida que pasa el tiempo; la preservación de las muestras puede durar varios años a temperatura ambiente (Longmire et al., 1997).

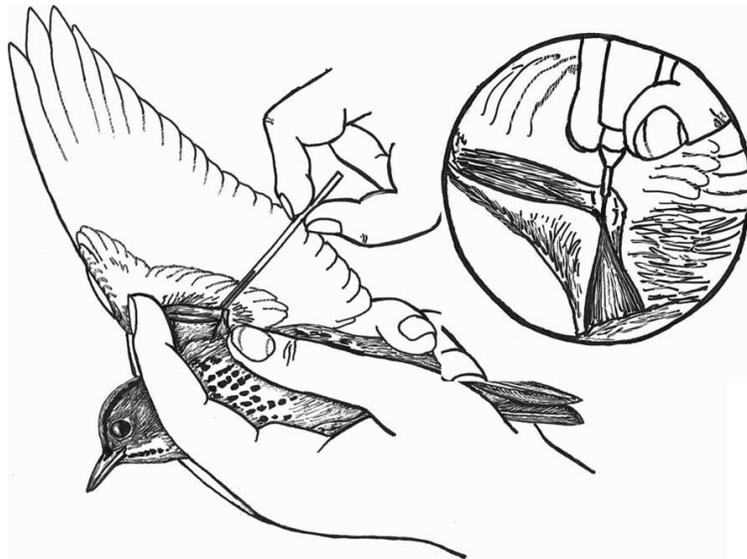


Figura 11. Representación de la manipulación del ave para la recolección de sangre de la vena braquial, en la parte inferior del ala. (Owen, 2011)

### **Extracción de ADN**

La extracción se llevó a cabo con el kit “Blood DNA Isolation Mini Kit” (Norgen). Las muestras de pichones se procesaron con el protocolo planteado en el laboratorio para

muestras de sangre de aves (Protocolo 1, Anexo), mientras que para las muestras de adultos que se encontraban coaguladas se tomaron 250 µl de muestra, 25 µl de proteinasa K, 400 µl de Buffer de Lisis B y para los casos en los que las columnas se taparon se aumentaron las rpm (revoluciones por minuto) en los pasos 2b y 3a al momento de centrifugar. Para todas las extracciones las muestras se incubaron por lo menos 12 hrs. a 750 rpm. de acuerdo con Watts (2014); al finalizar las concentraciones de ADN genómico (ng/µl) se cuantificaron espectrofotométricamente (NanoDrop “1,000 Thermo Fisher Scientific”).

### **Diseño de oligonucleótidos**

Se utilizaron los oligonucleótidos que se encontraban disponibles en el laboratorio, previamente diseñados por la Dra. Pacheco a partir de secuencias de mRNAs disponibles del cromosoma W en hembras; y de secuencias de mRNAs disponibles de los cromosomas Z y A de machos de bobos de patas azules (*Sula nebouxii*). A través de un BLAST comparando con el genoma del pollo (*Gallus gallus*) se obtuvieron secuencias cortas preliminares con ayuda del programa Ensembl. Posteriormente se identificaron las posiciones de los intrones para trabajar únicamente con la región codificante del gen (buscando solo aquellos exones que cumplieran con un tamaño de 550 pb). A través de un script se realizaron alineamientos con los transcritos de Z y A y posteriormente con un BLAST se identificaron 10 exones candidatos. Los oligos se seleccionaron con mismatches en por lo menos uno de los extremos (dentro de las últimas 5 pb se creó una secuencia no complementaria, que garantiza que solo aquellas regiones en las que el resto del primer se pegue en un 100%, serán las regiones deseadas) con la intención de obtener amplificaciones específicas. Finalmente se seleccionaron un par de oligonucleótidos para cada gen y se sintetizaron con y sin adaptadores en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

- Cromosoma Autosomal: gen NCK2-3 \*los tres con una Tm= 57°C  
 Forward:ACCACTCTCTTCCAGCAAAC  
 Reverse:TGAAGTTTGCCTATGTTGCG
  
- Cromosoma Z: gen Vcan\_1  
 Forward:AGATGTCCCTGGGTGTGTTT

Reverse:TCTCGTGTTTCTGGTCTCCC

- Cromosoma W: gen APC1

Forward:TGCCAAGAACATCGTCTCCT

Reverse:AATGAGAACGCGCTATGTCTG

Debido a amplificaciones inespecíficas en Z, fue necesario diseñar oligos específicos para Fregata. Con la publicación del genoma de *Fregata magnificens* (Feng et al., 2020), fue posible diseñar 3 para el gen DMRT1, que se sabe puede estar implicado en el desarrollo de las gónadas en los vertebrados (Matsubara et al., 2006; Raymond et al., 1999). Se diseñaron con el programa AmplifX a partir de los siguientes parámetros: longitud con rango de 19 – 24 pb, con una calidad mínima del 95%, porcentaje aproximado de GC del 50%, peso del producto de 550 pb y una Tm de 57°C:

- Exón 1

Forward: CGTCATGGCTGTACTCGTTGAG

Reverse: AATTTCTTGTCCCCAGCAGCTG

- Exón 2

Forward: CTCTGTAACACCATACCTGCCAC

Reverse: AACCTGCAGTTGGTTTTGTCTCC

- Exón 3 \* Este oligo varía en un grado en la Tm (56°C)

Forward:TCTGTGGTTGGGGCAAAGAC

Reverse: GGCTCAGCTTTCACATGCTG

A los oligos seleccionados se les agregaron los siguientes adaptadores a la región 5' para el paso de secuenciación:

Forward overhang: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG

Reverse overhang: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Obteniendo las siguientes secuencias:

- Cromosoma autosomal: NCK2-3:

F:TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACCACTCTCTTCCAG

CAAAC

R:GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGAAGTTTGCCTAT  
GTTGCG

- Cromosoma W: APC1:

F:TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCCAAGAACATCG  
TCTCCT

R:GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATGAGAACGCGC  
TATGTCG

- Cromosoma Z: DMRT1ex2:

F:TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTCTGTAACACCATA  
CCTGCCAC

R:GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAACCTGCAGTTGG  
TTTTGTCTCC

### **Sexaje**

El funcionamiento de los oligos se comprobó a través de la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, protocolo 2 anexo), con muestras de ADN purificado a partir del cálamo de plumas de Fregata adulta hembra. Habiendo obtenido las muestras de sangre de adultos, se confirmó que los oligonucleótidos diseñados para W (sin adaptadores) amplifican para el gen APC1 que se encuentra únicamente en las hembras. Se procedió entonces a sexar las muestras de pichones.

### **Preparación y secuenciación de librerías**

La preparación de bibliotecas consistió en realizar una PCR múltiple, tanto para las muestras control (2 machos) como para las pertenecientes a hembras (protocolo 3, anexo), donde los tres loci (genes NCK2\_3, APC1 y DMRT1 exón 2) se amplifican simultáneamente en una mezcla de reacción, esto permitió la adición de las secuencias adaptadoras a los extremos 5'. Los siguientes pasos se llevaron a cabo en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática ubicada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM con el protocolo de Nextera XT DNA Library Prep para la plataforma de secuenciación de Illumina; El producto de la amplificación se purificó por perlas magnéticas (protocolo 4, anexo), donde se prepararon las muestras para su posterior secuenciación en un sistema NextSeq 500 Illumina

utilizando el NextSeq 500/500 High Output Kit v2 (150 ciclos) y en un High Output v2.5 celda de flujo, ambos del mismo proveedor, con una profundidad de 100,000x.

### **Ensamblaje y Análisis de cobertura**

Las secuencias obtenidas fueron corregidas y se evaluó su calidad con FastQC. Posteriormente los adaptadores de los amplicones obtenidos fueron limpiados con el programa Trimmomatic (versión 0.40), para que se llevara a cabo el alineamiento de las lecturas. El BioProyecto B10K Consortium, proveyó 363 genomas que abarcan la mayoría de las 236 familias de aves existentes, entre ellos, el de una hembra de *Fregata magnificens* (Feng et al., 2020); por lo que el ensamblaje se llevó a cabo a partir de un genoma de referencia con el programa Bowtie2 (versión 2.3.4.3), este programa reconfigura el genoma de acuerdo con su posición y composición para obtener lecturas en formato SAM. Debido a que se realizó una secuenciación pareada Bowtie2 se encargó de concatenar los archivos pertenecientes a cada muestra para poder realizar los análisis de cobertura (código disponible en el material complementario 1, anexo).

La cobertura en cada uno de los tres contigs se estimó a partir del promedio de las lecturas alineadas a los loci (gen NCK2-3, gen APC1 y gen DMRT1 exón 2) con el genoma de referencia y se visualizaron con el comando “perl”. El porcentaje de alineación para cada muestra y los datos de cobertura fueron recolectados para ser normalizados.

### **Normalización de los datos**

La normalización se implementó con la intención de garantizar la integridad de los datos, esta se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Se obtuvo el valor mínimo y máximo del set de datos por cada contig.
- El valor de corrección de cada muestra se obtuvo con la siguiente fórmula:  
(*Valor de corrección* =  $\frac{n_2-n_1}{n_1}$ ).
- Los datos normalizados se obtuvieron con la siguiente fórmula:  
(*Dato normalizado* = (*Valor de corrección* – *min del set de datos*)(*max del set de datos* – *min del set de datos*)).

### **Análisis estadísticos**

El porcentaje de alineamiento de cada una de las muestras secuenciadas se verificó para validar que los datos con los que se realizan los análisis estadísticos cumplan con por lo menos el 60% del porcentaje de alineación con el genoma de referencia, descartando aquellas muestras que se encuentren por debajo de dicho valor.

A través de la prueba Mann-Whitney U-test, se realizó una aproximación de la relación de dependencia entre la tasa de mosaicismo y la proporción sesgada a un mayor número de machos en la población de fregatas, corroborando si la hipótesis se rechaza. Además, el valor de cobertura de cada uno de los cromosomas responsables de la determinación sexual se estableció a través de un diagrama de caja, Boxplot y el nivel de mosaicismo se determinó con un diagrama de violín

## Resultados

### Extracción de ADN genómico

Se seleccionaron solo aquellas muestras que superaban la concentración de 15 ng/μl y que tuvieran proporciones (260/280 y 260/230) mayores a 1 y menores a 3 (Watts, 2014).

Tabla 1. Cuantificación por NanoDrop Muestras de sangre de adultos. Muestras 7 y 9 pertenecientes a machos.

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
1	34.3	1.81	1.48
2	133.4	1.87	1.91
3	35.3	1.72	1.01
4	32.2	2.32	1.55
5	25.7	1.74	1.29
6	138	1.82	1.63
7	48.4	1.80	0.85*
8	62.1	1.94	2.09
9	186.5	1.85	0.74*
10	58.6	1.90	1.86
11	47.5	2.03	1.95
12	33.4	1.63	0.80
13	45.4	1.97	1.68
14	27.8	2.09	1.70
15	22.1	1.97	1.29
16	22.3	1.98	1.50
17	145.8	1.91	2.26
18	23.2	2.03	2.15

Tabla 2. Cuantificación por NanoDrop. Muestras de sangre de pichones.

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
1	44.8	1.99	2.02
2	54.9	1.96	2.14
3	25.8	2.04	1.48
4	47.7	2.06	2.13
5	15.7	1.89	1.97
6	46.9	1.57	0.57
7	62.1	1.87	1.81
8	17.2	2.13	1.65
9	110.5	1.89	1.97
10	54.7	1.95	2.01
11	38.2	1.92	1.90
12	41.3	1.79	1.76
13	215.9	1.89	2.27
14	90.8	1.58	0.79
15	28	1.8	1.12
16	119.1	1.89	1.83
17	21.3	2.07	1.42
18	333.4	1.86	2.31
19	109.9	1.88	2.21
20	19	1.90	1.12
21	46.5	1.87	2.05
22	33.3	1.86	1.72
23	61.7	1.91	1.98
24	504.1	1.83	2.26
25	125.2	1.87	2.17

Tabla 3. Cuantificación por NanoDrop. Muestras de sangre de adultos. Todas pertenecientes a hembras.

Muestra	ng/μL	260/280	260/230
44	32.5	1.88	1.97
45	21.7	1.92	1.73
46	23.7	1.84	1.67

47	23.6	2.03	1.73
48	20.7	2.06	1.63
49	22.5	2.02	1.8
50	21.6	1.99	1.69
51	15.7	2.01	1.68
52	45.1	1.86	2.04

53	22	1.84	1.18
54	57.8	1.89	1.93
55	17.1	1.93	1.36
56	28	2.04	1.86
57	21.9	1.92	1.76
58	27.2	1.95	1.92

### Verificación de oligos e Identificación del sexo

Se amplificaron múltiples regiones de un tamaño de 550 pb, para el cromosoma A (región génica NCK2-3), el cromosoma W (región génica APC1) y el cromosoma Z (región génica VCANI) (Figura 12). Aunado a esto se identificó el mejor prospecto de oligos pertenecientes a la región DMRT1 para evitar amplificaciones inespecíficas (Figura 13), donde se seleccionó el exón 2.

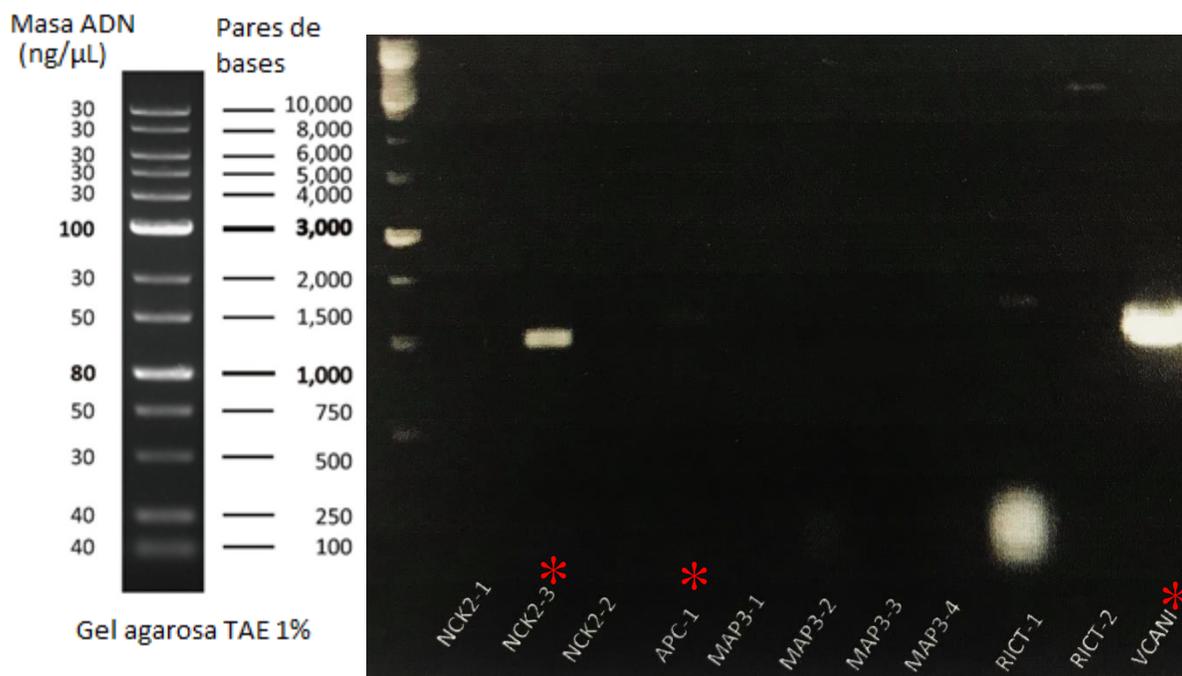


Figura 12. Verificación de amplificación de oligos con ADN purificado del cálamo de pluma de Fregata hembra en gel de agarosa 1% y marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Amplificación en NCK2-3, APC-1 y VCANI a 550 pares de bases.

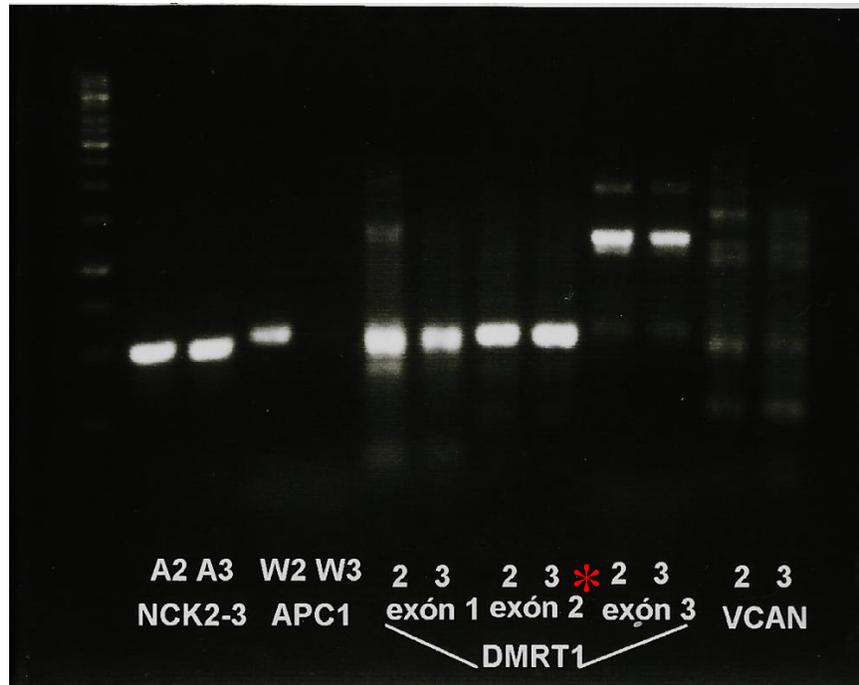


Figura 13. Amplificación de oligos en muestras de Fregata adulta, donde el individuo 2 es una hembra y el 3 un macho. Cromosoma autosomal A (NCK2-3), cromosoma W (APC1) y cromosoma Z (DMRT1 exón 1,2 y 3; VCAN).

Tras haber identificado que los oligos para la región génica APC1 únicamente amplifican una región del cromosoma W, se procedió a sexar las muestras de pichones para proceder con las muestras que pertenecieran a hembras (Figura 14).

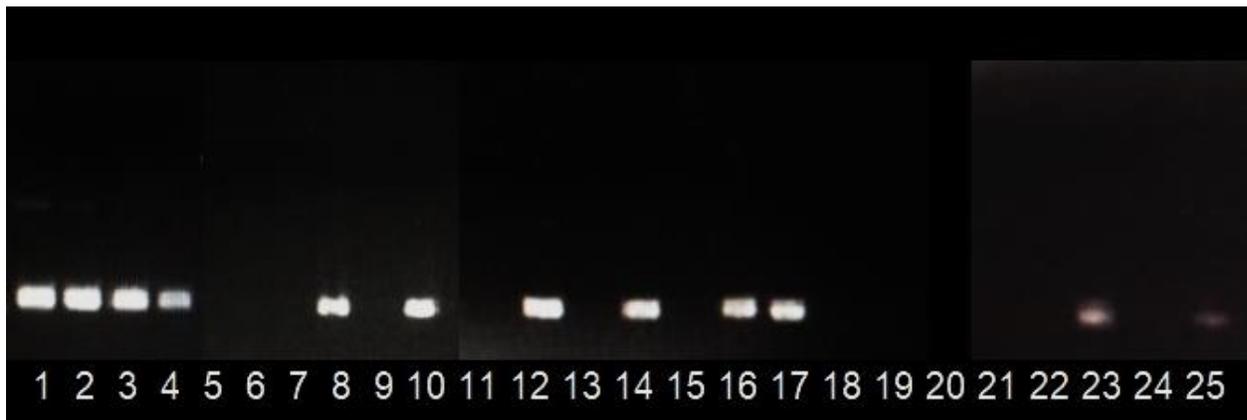


Figura 14. Sexaje de pichones con técnica de PCR. Se verificó qué muestras amplificaron con el oligo para el gen APC1 (del cromosoma W). Las hembras confirmadas fueron las muestras: 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 23 y 25.

### Preparación de librerías y purificación de muestras

Se confirmó la amplificación de las regiones génicas dentro de la misma reacción a través de una PCR múltiple (Figura 15A) para las 43 muestras pertenecientes a hembras pichones y adultas. Los productos de PCR purificados (Fig. 15B) se enviaron a un servicio de secuenciación en una plataforma de Illumina NexSeq.

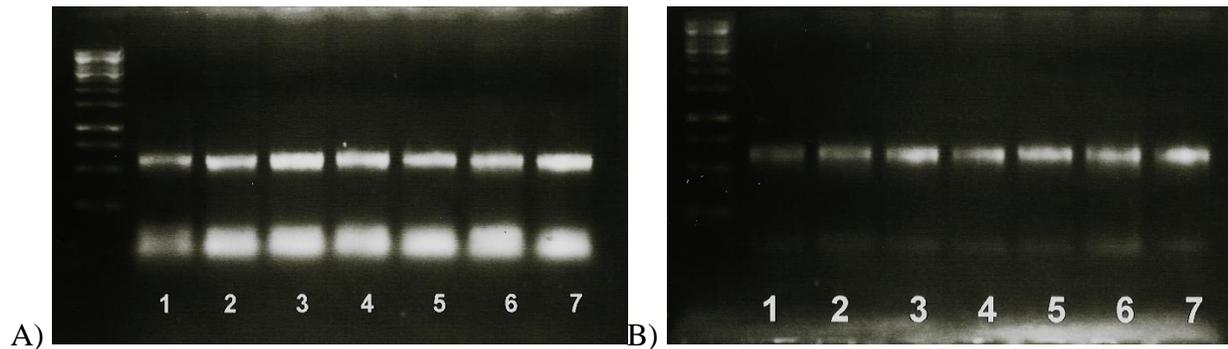


Figura 15. Amplificación de PCR múltiple con tres regiones génicas (NCK2-3, APC1 y DMRT1) de las primeras siete muestras de pichones. A) Producto de amplificación múltiple. B) Producto de amplificación purificado con el kit de purificación Beckman Coulter™ Agencourt AMPure XP PCR Purification.

### Análisis estadísticos

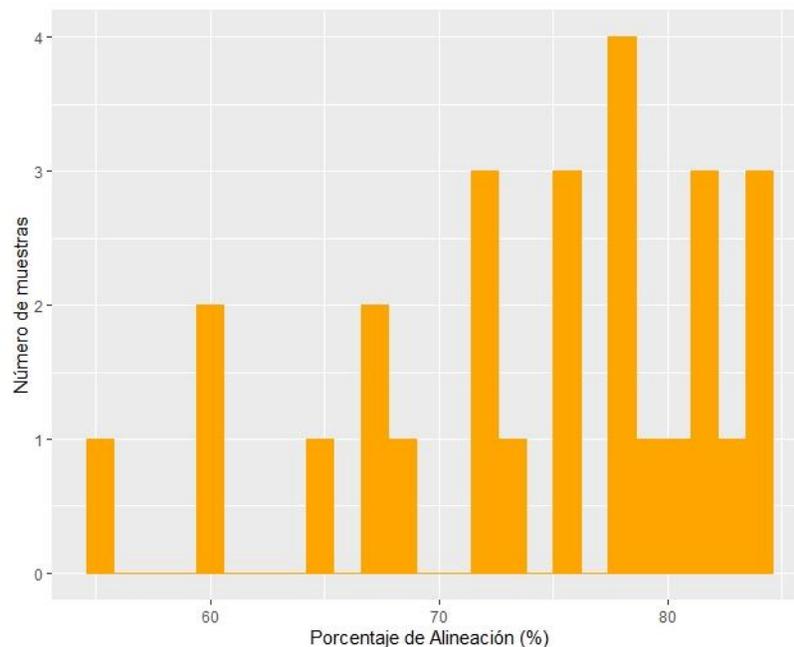


Figura 16. Histograma del porcentaje de alineación de las muestras de pichones hembras contra el genoma de referencia, donde se descartaron aquellas muestras que no superaran el porcentaje mínimo de alineación (>50%).

Se realizó un histograma en RStudio de los datos para descartar las muestras con un nivel inferior al porcentaje mínimo de alineación ( $> 50\%$ ) al genoma de referencia (Figura 16), contando con el 100% de alineación mínima requerida en todas las muestras secuenciadas. Posteriormente los datos restantes se normalizaron en Excel (Material complementario 2, anexo) para realizar los análisis estadísticos.

Contrastante con el valor obtenido en la prueba de Mann-Whitney U-test ( $p = 0.9658 > \alpha = 0.05$ ), se observó que los niveles de cobertura tanto del cromosoma Z como del W se conservaron lo suficiente como para no representar un cambio significativo conforme avanzaron las etapas del desarrollo (Figura 17).

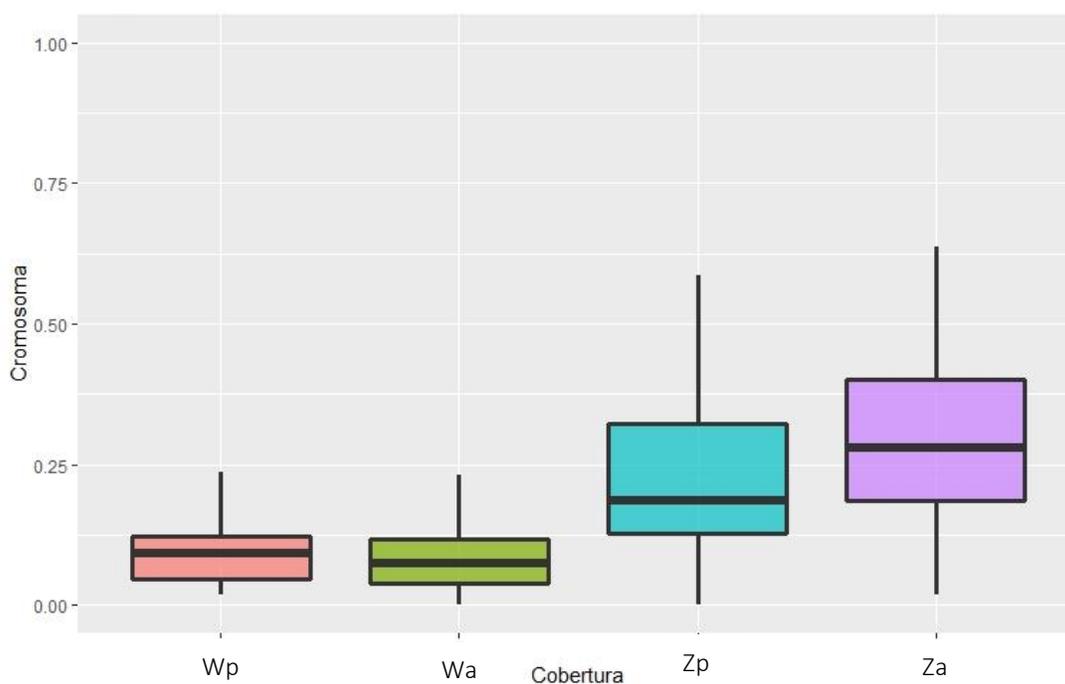


Figura 17. Gráfico de caja (Boxplot) que muestran el valor de cobertura con cuartiles y la mediana del cromosoma W y Z durante dos etapas del desarrollo Wp (cromosoma W de pichones), Wa (cromosoma W de adultos), Zp (cromosoma Z de pichones), Za (cromosoma Z de adultos).

Finalmente, tras analizar el número de lecturas obtenidas de los cromosomas sexuales, se realizó un diagrama de violín donde se representa el nivel de mosaicismo de las muestras de hembras adultas para ambos cromosomas (Figura 18).

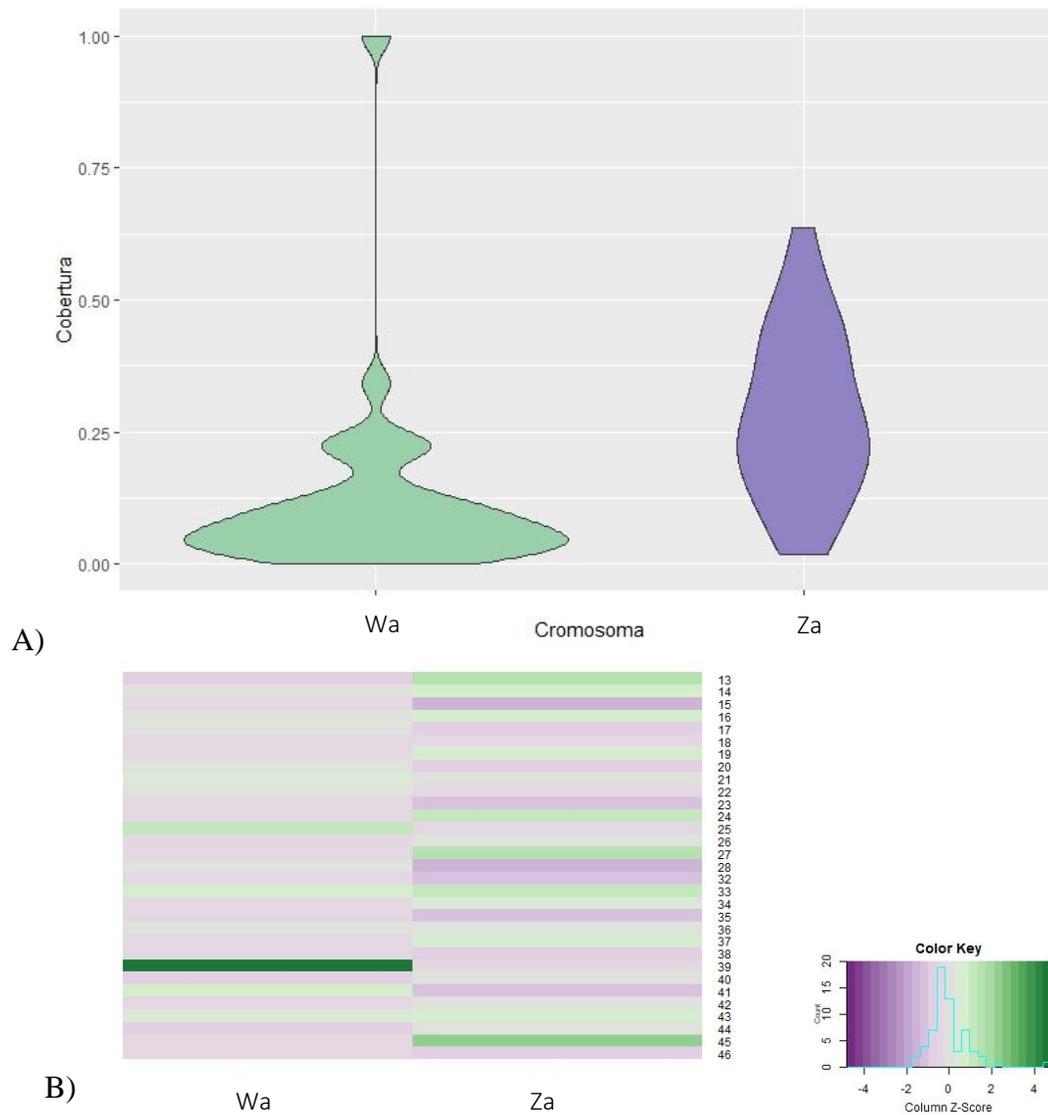


Figura 18. A) Gráfico de violín donde se observa la distribución de los datos y la densidad de probabilidad, donde Wa (Cromosoma W de adultos) y Za (Cromosoma Z de adultos). B) Heatmap y Color Key donde se observa el nivel de mosaicismo por cromosoma.

## Discusión

### Perdida mosaica de los cromosomas sexuales

Marais et al. (2018), sugiere que los cromosomas sexuales pueden influir en la proporción de sexos en las poblaciones a través de diferentes mecanismos que generen diferencia en la mortalidad, como el mecanismo del cromosoma X/Z desprotegido, el cromosoma Y/W tóxico o por la pérdida del cromosoma heterogamético Y/W. Esto llevó a sugerir que la pérdida de los cromosomas sexuales se puede estudiar en una colonia de aves como *fregata magnificens*, que presentan una desproporción de sexos en la población adulta.

En este estudio debido a que no es posible determinar la edad exacta de las fragatas hembras, se tomará la medición de la cobertura como método para determinar la pérdida mosaica en todas las muestras. En el Boxplot realizado se obtuvo que las medias (que representan el 50% de los sets de datos), se encontraron en los siguientes valores de cobertura:

Cromosoma W de pichones = 0.092938316

Cromosoma W de adultos = 0.074641537

Cromosoma Z de pichones = 0.186217341

Cromosoma Z de adultos = 0.279050462

Al interpretar estos datos tenemos que el promedio de cobertura del cromosoma W de los pichones fue de 0.09 y al pasar el tiempo este disminuyó a 0.07, lo que puede sugerir una pérdida mosaica del cromosoma, pues el número de copias disminuyó. Para el cromosoma Z tenemos que la cobertura promedio para los pichones era de 0.18 y al pasar el tiempo este valor aumentó a 0.27. En el caso del cromosoma W, se atribuye la disminución de la cobertura a la acumulación de deleciones en el cromosoma. Para el cromosoma Z este incremento de la cobertura puede indicar una acumulación de duplicaciones cromosómicas. La perpetuación de dichas mutaciones sugiere que en ambos casos los mecanismos de reparación del ADN no fueron capaces de corregir a los cromosomas (Lagunas, 2018).

Se analizó también la distribución de los datos de los cromosomas sexuales en adultos según su cobertura a través de un diagrama de violín, así se observó que para el cromosoma W la cobertura se encuentra entre los valores de 0 y 1, pero que los datos se aglomeran

principalmente por debajo del valor de 0.25, por otro lado, para el cromosoma Z, se observó que los datos se encuentran entre los valores de 0.01 y 0.63, y que se aglomeran principalmente entre el valor de 0.1 y 0.5, en ambos observamos una concentración de datos en valores de cobertura menor a 0.5, lo que podría sugerir que el nivel de mosaicismo es alto para ambos cromosomas. A pesar de esto el Heatmap que se realizó no indica que exista un patrón que relacione la pérdida mosaica entre cromosomas sexuales.

Con los resultados de este estudio podemos inferir que a pesar de que se registraron valores bajos de cobertura, no existe una relación entre la pérdida mosaica de los cromosomas sexuales y la edad de las fregatas hembras, pues podemos observar que el valor obtenido en la prueba de Mann-Whitney U-test no es significativo (valor de  $p = 0.9658 > \alpha = 0.05$ ); De igual forma para el cromosoma Z el valor de Mann-Whitney U-test no es significativo (valor de  $p = 0.832 > \alpha = 0.05$ ). Entonces se puede decir que se mantiene el supuesto, donde se afirma que “Las hembras de mayor edad no presentan una pérdida parcial del cromosoma W en las células sanguíneas más elevada que los pichones hembra”, lo que resulta contrastante con los resultados de la Dra. Pacheco y el bobo de patas azules, esto podría sugerir que la herencia de estos cromosomas es estable en las aves marinas.

A pesar de esto, que la diferencia en la mortalidad no esté relacionada con la pérdida mosaica no quiere decir que no intervenga algún mecanismo de determinación sexual mediado por cromosomas, pues la relación entre los cromosomas sexuales y la mortalidad ha sido documentada por Pipoly et al. (2015) a través del árbol de la vida; Por otro lado, Xirocostas et al. (2020) encontró que, contrastante con la hipótesis del cromosoma X/Z solitario, el sexo homogamético en promedio vive un 17.6% más que el sexo heterogamético.

### **Desproporción de sexos por factores extrínsecos**

En este estudio la diferencia en la mortalidad no se debe a la degeneración de los cromosomas sexuales, pero podría atribuirse a otros mecanismos extrínsecos, como lo son las fuerzas genéticas y ecológicas. Xirocostas et al. (2020) determinó que las diferencias morfológicas juegan un papel importante en la esperanza de vida y la proporción terciaria y secundaria de sexos; si bien los machos poseen ornamentación que es llamativa para los depredadores, proporcionalmente la hembra adulta representa un mayor valor nutricional debido a su tamaño superior; ocasionado que las hembras se vean vulnerables ante periodos de bajos

recursos cuando el ambiente es inhóspito y que se genere una depredación diferencial. A su vez la proporción secundaria de sexos termina viéndose afectada debido a que la crianza de hembras representa un mayor costo en el cuidado parental (Osorno, 1999 & Osorno, 1996).

Las causas etológicas también representan un factor extrínseco que afecta la proporción de sexos. En fragatas el establecimiento del nido en la temporada de reproducción está estrechamente relacionada con la sobrevivencia del pichón, debido a que el establecimiento temprano proporciona un mayor cuidado parental por parte de los machos a diferencia de un establecimiento tardío, debido a que los machos se van antes para asegurar su disponibilidad para el próximo periodo de reproducción, como consecuencia las hembras adultas son capaces de inclinar la producción del sexo con menor varianza en periodos donde los recursos son escasos o se cuenta con un menor periodo de tiempo donde el macho aporte al cuidado parental (Osorno, 1996), este gasto poco igualitario en la inversión parental permite a los machos reproducirse anualmente, mientras que las hembras exitosas lo hacen cada dos años (Diamond y Schreiber, 2002).

Múltiples factores etológicos entran en juego cuando se estudia las causas de la desproporción de sexos en una población, entre ellos también se observa la característica de formar parejas monógamas o polígamas. En fragatas se ha encontrado que durante el periodo de reproducción las hembras tienden a formar relaciones monógamas debido al periodo largo que la crianza del pichón conlleva, mientras que el macho solo invierte en el cuidado parental los primeros cuatro meses si el establecimiento del nido fue temprano, de otra forma, tienden a abandonar antes de este periodo de tiempo para asegurar su reproducción con otra hembra, estableciendo así relaciones polígamas (Diamond y Schreiber, 2002). Contrastante con la hipótesis del cromosoma X/Z, se ha observado que cuando las relaciones establecidas en una población de aves son monógamas el sexo heterogamético posee una mortalidad superior (7.1%) en comparación con la del sexo homogamético (Trivers, 2002; Mayr, 1939; Xirocostas *et al.*, 2020); en cambio cuando las relaciones son polígamas se favorece en la población un mayor número de hembras (Mayr, 1939).

Para finalizar se puede decir que son múltiples los factores que contribuyen a la desproporción de sexos en una población, y de ninguna forma se debe solo a un elemento como la pérdida mosaica de los cromosomas sexuales, sino a la suma de todos estos

elementos, pero estudios como este son de suma importancia, pues nos dan un acercamiento para conocer las causas de una mortalidad diferencial en las poblaciones que pueden ser extrapolables con otras especies.

### **Perspectivas**

Estudios similares pueden llevarse a cabo en otras especies si se dispone de los datos adecuados, he ahí la particularidad de esta especie, que se encuentra en colonias y el muestreo de múltiples generaciones es posible, donde además el sistema de determinación sexual es cromosómico y se observa que la proporción de sexos en la colonia se encuentra sesgada al sexo homogamético, mientras estas condiciones se cumplan es posible comprobar si en otras especies la degeneración de los cromosomas sexuales contribuye a que exista una mortalidad diferencial en la población. Mientras tanto, se encuentran latentes estudios para comprobar la teoría del efecto tóxico que posee el cromosoma W en el sexo heterogamético, por otro lado, se busca identificar los genes partícipes en la senectud de las aves, pero estudios ecológicos también pueden contribuir a poseer un panorama completo del proceso de envejecimiento en los seres vivos.

## Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., y Walter, P. (2008). Biología molecular da célula. In *Biología Molecular da Celula*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bergero, R., y Charlesworth, D. (2009). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.010>
- Beukeboom, L. W., y Perrin, N. (2014). The Evolution of Sex Determination. In *The Evolution of Sex Determination*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199657148.001.0001>
- Brown, E. J., Nguyen, A. H., y Bachtrog, D. (2017). The Y chromosome contributes to sex-specific aging in *Drosophila*. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/156042>
- Cortez, D., Marin, R., Toledo-Flores, D., Froidevaux, L., Liechti, A., Waters, P. D., Grützner, F., y Kaessmann, H. (2014). Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13151>
- Diamond, A. W. (1971). Sexual Dimorphism in Breeding Cycles and Unequal Sex Ratio in Magnificent Frigate-Bird. *Ibis, Diamond 1971*, 395–398.
- Diamond, A. W., y Schreiber, E. A. (2002). Magnificent Frigatebird (*Fregata magnificens*). *The Birds of North America Online, July 2018*. <https://doi.org/10.2173/bna.601>
- Feng, S., Stiller, J., Deng, Y., Armstrong, J., Fang, Q., Reeve, A. H., Xie, D., Chen, G., Guo, C., Faircloth, B. C., Petersen, B., Wang, Z., Zhou, Q., Diekhans, M., Chen, W., Andreu-Sánchez, S., Margaryan, A., Howard, J. T., Parent, C., ... Zhang, G. (2020). Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2873-9>
- Giráldez, R. (2003). *Determinación cromosómica del sexo. I. Sistema XX-XY. 2.*
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R., y Gelbart, W. (2002). *Genética*.
- Griffiths, R., y Phil, D. (2000). Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. [https://doi.org/10.1016/s1055-937x\(00\)80012-2](https://doi.org/10.1016/s1055-937x(00)80012-2)
- Hernández, E. (2006). Elementos genéticos móviles implicados en la evolución del cromosoma “y” con base en estudios moleculares de insectos (*Drosophila*) y de primates. *Salud Uninorte*, 22(2), 154–167.

- Hickman, C. P., Roberts, L. S., y Larson, A. (2001). Integrated Principles of Zoology. In *Mc Graw Hill*. <https://doi.org/10.1039/b818618a>
- Klug, W. S., Cummings, M. R., y Spencer, C. A. (2006). *Kupdf.Com\_Conceptos-De-Genetica-Klug-Amp-Cummings*. 44–50.
- Lagunas, F. (2018). Daño y Reparación del ADN. *Ciencia*, Vol. 69 (número 4), 7-11.
- Longmire, J., Baker, R., y Maltbie, M. (1997). Use of “Lysis Buffer” in DNA isolation and its implication for museum collections. In *Use of “Lysis Buffer” in DNA isolation and its implication for museum collections* /. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.143318>
- Machiela, M. J., Zhou, W., Karlins, E., Sampson, J. N., Freedman, N. D., Yang, Q., Hicks, B., Dagnall, C., Hautman, C., Jacobs, K. B., Abnet, C. C., Aldrich, M. C., Amos, C., Amundadottir, L. T., Arslan, A. A., Beane-Freeman, L. E., Berndt, S. I., Black, A., Blot, W. J., ... Chanock, S. J. (2016). Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11843>
- Madsen, V., Dabelsteen, T., Osorio, D., y Osorno, J. L. (2007). Morphology and ornamentation in male magnificent frigatebirds: Variation with age class and mating status. *American Naturalist*, 169(SUPPL.). <https://doi.org/10.1086/510096>
- Marais, G. A. B., Gaillard, J. M., Vieira, C., Plotton, I., Sanlaville, D., Gueyffier, F., y Lemaitre, J. F. (2018). Sex gap in aging and longevity: can sex chromosomes play a role? In *Biology of Sex Differences*. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0181-y>
- Marshall Graves, J. A., y Shetty, S. (2001). Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology*, 290(5), 449–462. <https://doi.org/10.1002/jez.1088>
- Martínez, L. (2015). *La Recombinación en los Cromosomas Sexuales Masculinos*.
- Matsubara, K., Tarui, H., Toriba, M., Yamada, K., Nishida-Umehara, C., Agata, K., y Matsuda, Y. (2006). Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18190–18195. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605274103>

- Matta, Nubia; Ramírez, Nataly; Zúñiga, Betty y Vera, V. (2009). Determinación de Sexo en Aves Mediante Herramientas Moleculares. *Igarss 2014, 1*, 1–5.  
<https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Mayr, E. (1939). The Sex Ratio in Wild Birds. *The American Naturalist*.  
<https://doi.org/10.1086/280824>
- Miranda, C. (2011). Fenología reproductiva y tamaño poblacional de cuatro especies de aves marinas (*Sula granti*, *S. nebouxii*, *S. sula* y *Fregata magnificens*) en Isla La Plata, Parque Nacional Machalilla. *Office*, 2(3), 297. <https://doi.org/10.5296/jpag.v8i3.13638>
- Moore, C. R. (1925). Sex Determination and Sex Differentiation in Birds and Mammals. *The American Naturalist*, 59(661), 177–189. <https://doi.org/10.1086/280026>
- Nelson, J. B. (1967). Etho-ecological adaptations in the great frigate-bird [52]. In *Nature* (Vol. 214, Issue 5085, p. 318). <https://doi.org/10.1038/214318a0>
- Ohno, S. (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. *Teratology*.  
<https://doi.org/10.1002/tera.1420040116>
- Osorno, J.-L. (1996). *Evolution of breeding behavior in the magnificent frigatebird: copulatory pattern and parental investment*.
- Osorno, J.-L. (1999). Offspring Desertion in the Magnificent Frigatebird: Are Males Facing a Trade-Off between Current and Future Reproduction? *Journal of Avian Biology*, 30(4), 335. <https://doi.org/10.2307/3677005>
- Owen, J. C. (2011). Collecting, processing, and storing avian blood: A review. *Journal of Field Ornithology*, 82(4), 339–354. <https://doi.org/10.1111/j.1557-9263.2011.00338.x>
- Pace, H. C., y Brenner, C. (2003). Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. *Genome Biology*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-r18>
- Pipoly, I., Bókony, V., Kirkpatrick, M., Donald, P. F., Székely, T., y Liker, A. (2015). The genetic sex-determination system predicts adult sex ratios in tetrapods. *Nature*, 527(7576), 91–94. <https://doi.org/10.1038/nature15380>
- Raymond, C. S., Parker, E. D., Kettlewell, J. R., Brown, L. G., Page, D. C., Kusz, K., Jaruzelska, J., Reinberg, Y., Flejter, W. L., Bardwell, V. J., Hirsch, B., y Zarkower, D. (1999). A region of human chromosome 9p required for testis development contains

- two genes related to known sexual regulators. *Human Molecular Genetics*, 8(6), 989–996. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.6.989>
- Rocha-Olivares, A., y González-Jaramillo, M. (2014). Population genetic structure of Mexican Magnificent Frigatebirds: An integrative analysis of the influence of reproductive behavior and sex-biased dispersal. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(2), 532–545. <https://doi.org/10.7550/rmb.40246>
- Rutkowska, J., Lagisz, M., y Nakagawa, S. (2012). The long and the short of avian W chromosomes: No evidence for gradual W shortening. *Biology Letters*, 8(4), 636–638. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0083>
- Smith, C. A. (2010). Rowley review. Sex determination in birds: A review. *Emu*, 110(4), 364–377. <https://doi.org/10.1071/MU10030>
- Strachan, T., y Read, A. (2018). Human Molecular Genetics. In *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.4324/9780203833544>
- Székely, T., Weissing, F. J., y Komdeur, J. (2014). Adult sex ratio variation: Implications for breeding system evolution. In *Journal of Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1111/jeb.12415>
- Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., y Sakaizumi, M. (2007). Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma*, 116(5), 463–470. <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0110-z>
- Trivers, R. (2002). Parental investment and reproductive success. In *Natural Selection and Social Theory: Selected Papers of Robert Trivers*.
- Viguera, A. O. (2010). *Determinación Sexual*.
- Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution*. <https://doi.org/10.2307/2406060>
- Xirocostas, Z. A., Everingham, S. E., y Moles, A. T. (2020). The sex with the reduced sex chromosome dies earlier: A comparison across the tree of life. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0867>

## Anexo

### Protocolos

#### Protocolo de Extracción de ADN de sangre

Por Mónica Martínez Pacheco

Modificación del protocolo para el kit “Blood DNA Isolation Mini Kit” de Norgen

#### Componentes del kit:

Componente	Producto #46300 (50 muestras)	Producto #46380 (100 muestras)
Buffer de lisis B	20 mL	2 x 20 mL
Solución WN	18 mL	2 x 18 mL
Solución de lavado A	18 mL	2 x 18 mL
Buffer de Elución B	30 mL	2 x 30 mL
Proteinasa K	1.2 mL	2 x 1.2 mL
Columnas	50	100
Tubos colectores	50	100
Tubos de Elución	50	100

#### Especificaciones:

Especificaciones del kit	
Vol. mínimo de sangre	20 µL
Vol máximo de sangre	200 µL
Capacidad de la columna	> 50 µg
Rendimiento promedio (200 µL of blood)	4-12 µg*
Tiempo para realizar 10 purificaciones	30 minutos

#### Almacenaje:

Proteinasa K a 2-8°C

Las demás a T ambiente

#### Precauciones:

El Buffer de lisis B y la Solución WN contienen sales de guanidina. Estas son altamente reactivas con el cloro, por lo que hay que tener cuidado al desecharlos.

#### Material necesario:

- Microcentrifuga: 6,000 x g (8,000 RPM) – 14,000 x g (14,000 RPM)

Micropipetas: 10 µL, 100 µL y 1000

- Tubos eppendorf de 1.5 o 2 mL

- Etanol 96 – 100%
- Baño/Bloque de agua/Incubadora a 55°C
- Vortex
- Rnasa A (si se requiere ADN libre de ARN)
- PBS

#### **Antes de comenzar:**

- Cuando el kit es nuevo, añadir etanol a las soluciones de trabajo:
  - Solución WN + 24 mL etanol 96-100%: vol. Final de 42 mL. Marcar el frasco.
  - Solución de lavado A + 42 mL etanol 96-100%: vol. Final de 60 mL. Marcar el frasco.
- Templar (T ambiente) los reactivos y la muestra de sangre antes de utilizarlos.
- Vortexear la Proteinasa K antes de utilizarla.
- Este kit puede ser utilizado para procesar hasta 400 µL de sangre. Es importante incrementar de manera proporcional los volúmenes de los reactivos durante la preparación de la muestra (proteínasa K, Buffer de lisis B y Etanol), y luego seguir el procedimiento habitual para la unión a las columnas, lavados y elución. Por ejemplo, para procesar 400 uL de sangre, hay que duplicar las cantidades descritas para Proteínasa K, Buffer de lisis B y Etanol.

#### **Protocolo:**

Colocar los reactivos y muestras a T ambiente.

##### *1.- Preparación de la muestra*

- Colocar 200 µL de sangre en un tubo para microcentrífuga
- Añadir 20 µL de **Proteínasa K** al tubo, mezclar con pipeta y vortex

Nota: Cuando se usan volúmenes menores a 200 µL de muestra, añadir la cantidad necesaria de **PBS** para llevar a un volumen de 200 uL. El mínimo es de 20 µL.

(Opcional) Adicionar al lisado el equivalente a 100 unidades de **Rnasa A**, sin exceder los 10 uL de volumen. Para cuando se necesita ADN libre de ARN.

- Añadir 300 µL de **Buffer de lisis B** al tubo, mezclar con vortex durante 10 seg. Y centrifugar brevemente para colectar las posibles gotas de líquido que queden en la tapa del tubo.
- Incubar en termomix a 55°C durante 2-12 h a 300-750 RPM de agitación (según lo requiera la muestra de sangre).
- Centrifugar a 14,000 x g (14,000 RPM) durante 2 min para precipitarlo.

Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y continuar con el paso.

- Añadir 110 µL de **Etanol 96-100%** al tubo y mezclar con vortex durante 10 seg.
- Centrifugar brevemente para colectar las posibles gotas de líquido que queden en la tapa del tubo

##### *2.- Unión de la muestra a la Columna*

- Colocar la columna en un tubo colector (ambos vienen con el kit).
- Colocar el lisado en la columna y centrifugar a 6,000 x g (8,000 RPM) durante 1 min.
- Descartar el sobrenadante. Colocar de nuevo la columna en el tubo colector.

Nota: Asegurarse de que todo el lisado haya atravesado la columna, si no es así, centrifugarla durante 2 min más.

### 3.- Lavado de la Columna

a) Colocar 500  $\mu$ L de **Solución WN** (con etanol añadido) a la columna y centrifugar a 6,000 x g (8,000 RPM) durante 1 min. Descartar el sobrenadante y colocar de nuevo la columna en el tubo colector.

Nota: Asegurarse de que todo el lisado haya atravesado la columna, si no es así, centrifugarla durante 1 min más.

b) Colocar 500  $\mu$ L de **Solución de lavado A** (con etanol añadido) en la columna y centrifugar a 14,000 x g (14,000 RPM) durante 1 min. Descartar el sobrenadante y colocar de nuevo la columna en el tubo colector.

c) Lavar la columna otra vez añadiendo 500  $\mu$ L de **Solución de Lavado A** (con etanol añadido) en la columna y centrifugar a 14,000 x g (14,000 RPM) durante 1 min. Descartar el sobrenadante y colocar de nuevo la columna en el tubo colector.

d) Centrifugar la columna a 14,000 x g (14,000 RPM) durante 2 min para secar la columna. Desechar el tubo colector.

### 4.- Elución del ADN

a) Colocar la columna en el tubo de elución de 1.7 mL que viene con el kit.

b) Añadir 50  $\mu$ L de **Buffer de elución B** a la columna.

c) Incubar a T ambiente durante 1 min.

d) Centrifugar a 6,000 x g (8,000 RPM) durante 1 min. Cerrar el tubo.

e) Colocar la columna en un nuevo tubo de elución de 1.7 mL o para microcentrífuga. (Opcional) Realizar una segunda elución repitiendo los pasos 4b a 4d para incrementar la eficiencia de la misma y obtener mayor cantidad de ADN.

Nota: El vol. De elución más pequeño (50  $\mu$ L) puede usarse para obtener una muestra de ADN más concentrada. El máximo es de 200  $\mu$ L.

### 5.- Almacenamiento del ADN

El ADN purificado puede ser almacenado a 4°C durante algunos días. Es recomendable guardarlo a -20°C para mantenerlo a largo plazo.

## Protocolo de amplificación por técnica de PCR para genes separados

Por Mónica Martínez Pacheco

### Material necesario:

- ADN purificado
- Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix
- Oligonucleótidos A, W y Z
- Agua MiliQ
- Tubos eppendorf de 0.2 mL
- Micropipetas 10 $\mu$ L y 100 $\mu$ L

**Almacenaje:**

Todos los componentes utilizados a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

**Antes de comenzar:**

- Los oligos deben encontrarse a una concentración de  $5\text{ pmol}/\mu\text{L}$  en un volumen de  $50\ \mu\text{L}$

**Protocolo:**

Colocar los reactivos y muestras en hielo.

*1.- Mezcla de los reactivos*

- a) Se coloca el volumen necesario de ADN para tener una concentración de  $60\text{ ng}/\mu\text{L}$ , en tres tubos por muestra de ADN
- b) Se añaden  $1.5\ \mu\text{L}$  de cada oligo (Forward y Reverse) para A, W y Z en cada tubo de reacción (tubo uno con oligos para A, tubo dos con oligos para W y tubo tres con oligos para Z)
- c) A cada tubo de reacción se le añaden  $12.5\ \mu\text{L}$  de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix
- d) Se afora con agua MiliQ para obtener un volumen final de  $25\ \mu\text{L}$
- e) Los tubos de cada reacción se colocan en el termociclador bajo los siguientes parámetros:

Paso	To	Tiempo (seg.)	# Ciclos
Desnaturalización inicial	$98^{\circ}\text{C}$	10	1
Desnaturalización	$98^{\circ}\text{C}$	1	3
Alineación	$57^{\circ}\text{C}$	5	30
Extensión	$72^{\circ}\text{C}$	15	
Extensión final	$72^{\circ}\text{C}$	60	2
Hold	$4^{\circ}\text{C}$	$\infty$	$\infty$

**Protocolo de amplificación por técnica de PCR para genes juntos**

Por Mónica Martínez Pacheco

**Material necesario:**

- ADN purificado
- Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix
- Oligonucleótidos A, W y Z con adaptadores
- Agua MiliQ
- Tubos eppendorf de  $0.2\ \text{mL}$
- Micropipetas  $10\ \mu\text{L}$  y  $100\ \mu\text{L}$

**Almacenaje:**

Todos los componentes utilizados a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

**Antes de comenzar:**

- Los oligos deben encontrarse a una concentración de 5 pmol/ $\mu$ L en un volumen de 50  $\mu$ L

**Protocolo:**

Colocar los reactivos y muestras en hielo.

*1.- Mezcla de los 45emperatur*

- Se coloca el volumen necesario de ADN para tener una concentración de 90 ng/ $\mu$ L, en un tubo por muestra de ADN
- Se añaden 0.75  $\mu$ L de cada oligo (Forward y Reverse) para A, W y Z en el tubo de reacción
- A cada tubo de reacción se le añaden 15  $\mu$ L de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix
- Se afora con agua MiliQ para obtener un volumen final de 35  $\mu$ L
- Los tubos de cada reacción se colocan en el termociclador bajo los siguientes parámetros:

Paso	To	Tiempo (seg.)	# Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	10	1
Desnaturalización	98°C	1	3
Alineación	53°C	5	30
Extensión	72°C	15	
Extensión final	72°C	60	2
Hold	4°C	$\infty$	$\infty$

**Protocolo de purificación por perlas magnéticas**

Por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática

“Quick-DNA™ HMW MagBead kit” de Zymo Research

**Componentes del kit:**

Componente	Producto D6060 (96 muestras)	Temperatura de almacenamiento
Proteinasa K y Buffer de almacenamiento	2 x 20 mL	-20°C (después de mezclar)
Biofluido y Buffer de tejidos sólidos	25 mL	Temperatura ambiente
Buffer Quick-DNA™ MagBinding	150 mL	Temperatura ambiente
Buffer de prelavado de ADN	50 mL	Temperatura ambiente
Buffer de lavado de g-ADN	1 x 200 mL	Temperatura ambiente
Buffer de elución de ADN	50 mL	Temperatura ambiente
Perlas MagBinding	6 mL	Temperatura ambiente

**Antes de comenzar:**

- Reconstituya la proteinasa K liofilizada con 1040 µl de tampón de almacenamiento de proteinasa K. Vortex para disolver. Almacenar a -20°C.
- Es posible que se haya formado un precipitado en el tampón de prelavado de ADN durante el envío. Para resuspender completamente el tampón, incubar la botella a 30 – 37 °C durante 30 minutos y mezclar por inversión. NO CALENTAR EN MICROONDAS.

**Protocolo:***1.- Preparación de la muestra*

- a) Añada 20 µl de proteinasa K a 400 µl de muestra en DNA / RNA Shield™ 1 y mezcle bien. Incubar a 46temperature ambiente (20-30°C) durante 30 minutos.

Nota: El tejido sólido en ADN / ARN Shield debe homogeneizarse mecánicamente antes del procesamiento.

*2.- Purificación de AND*

- b) Añada 400 µl (o el mismo volumen) de buffer *Quick-DNA™* MagBinding a 400 µl de la muestra, mezclar con pipeta
- c) Agregue 33 µl de perlas MagBinding, mezcle con pipeta (por lo menos 5 veces) y coloque las muestras en un rotador o agitador por 10 minutos
- d) Transfiera la muestra al soporte magnético hasta que las perlas se hayan separado de la solución, luego retire y deseche el sobrenadante. Transfiera la muestra del soporte magnético
- e) Añada 500 µl de buffer *Quick-DNA™* MagBinding, mezcle con pipeta para resuspender las perlas (~ 5 veces) y luego coloque las muestras en un rotador o agitador durante 5 minutos.
- f) Transfiera la muestra al soporte magnético hasta que las perlas se hayan separado de la solución, luego retire y deseche el sobrenadante y retire la muestra del soporte magnético.
- g) Añada 500 µl de Buffer de prelavado de ADN y mezcle con pipeta para resuspender las perlas (~ 10 veces).
- h) Transfiera la muestra al soporte magnético hasta que las perlas se hayan separado de la solución, luego retire y deseche el sobrenadante. Transfiera la muestra del soporte magnético.
- i) Agregue 900 µl de buffer de lavado g-DNA y pipetee la mezcla para resuspender las perlas (~ 10 veces). Transfiera todo el líquido a un nuevo tubo de microcentrífuga o a una placa de 96 pocillos.
- j) Transfiera la muestra al soporte magnético hasta que las perlas se hayan separado de la solución y luego retire y deseche el sobrenadante. Transfiera la muestra del soporte magnético.
- k) Repetir pasos del i) al j)

- l) Para secar las perlas, transfiera la muestra a un elemento calentado e incube durante 10 minutos. Si no dispone de un elemento calefactor, deje secar al aire durante 20 minutos.
- m) Añada 50  $\mu$ l de Buffer de elución de ADN a cada muestra y mezcle con la pipeta 20 veces incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos o mezclar con un agitador durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-30°C).
- n) Transfiera la muestra al soporte magnético hasta que las perlas se hayan separado de la solución, luego transfiera el ADN eluido a un nuevo tubo (placa).  
El ADN obtenido puede utilizarse inmediatamente o almacenarse a  $\leq$ -20°C.

## Material complementario

### 1. Código para la obtención de coberturas

Abrir una ventana de comandos:

Inicio → Ingresar cuenta y presionar Enter → Ingresar contraseña y presionar Enter

Una vez dentro del servidor del CCG se accede a la ubicación de los archivos:

```
> /space29/BSyBS/dcortez/fragata
> ll
> vi.pipeline.fragatas.pl
> i
```

Se observa el siguiente programa, donde se modifica la entrada de cada muestra:

```
@data = qw(
DC1_S25_R1_001 # Entrada 1
);

@dataX = qw(
DC1_S25_R2_001 # Entrada 2
);

foreach $i (0..$#data) {
    system ("bowtie2 -q -p 10 --no-unal --no-head --no-sq --un x1 -x index_genoma_fragata -U
$data[$i].fastq -S $data[$i].samR1");
    system ("bowtie2 -q -p 10 --no-unal --no-head --no-sq --un x2 -x index_genoma_fragata -U
$dataX[$i].fastq -S $dataX[$i].samR2");
    system ("cat $data[$i].samR1 $dataX[$i].samR2 > $data[$i].samR12");
    print ">>>>>>>>> $data[$i] <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<\n";

    %names="";
    open(OUT,"$data[$i].samR12") || die;
    while (<OUT>) {
        chomp;
        @w=split("\t");
        @q=split(" ",$w[3]);
        $as = $w[2]; #." _".$q[0];
        $names{$as} +=1;
    }
    close(OUT);

    foreach $j (sort keys %names) {
        if ($j=~WAAD01004845/) {
            print "Z: $j\t$names{$j}\n";
        }
        if ($j=~WAAD01016290/) {
            print "Auto: $j\t$names{$j}\n";
        }
        if ($j=~WAAD09000009/) {
```

```

        print "W: ${\t$names{$j}}\n";
    }
}
}

```

Presionar Esc

> :wq

> perl pipeline.fragatas.pl

Recolectar datos para cada muestra.

## 2. Normalización de datos

Tabla 4. Datos crudos de las coberturas por loci y sus porcentajes de alineamiento. Datos obtenidos de la secuenciación pareada de muestras de fragata. Donde las muestras en color verde pertenecen a pichones hembras de fregata, las muestras en color naranja pertenecen a fregatas adultas hembras y la muestra en color amarillo pertenece a un macho adulto.

Muestras	Contigs		
	A	W	Z
DC1_S25_R1_001	61987	5075	854022
DC3_S26_R1_001	51508	6222	777347
DC4_S27_R1_001	42628	7830	688429
DC6_S28_R1_001	38697	6610	610296
DC7_S29_R1_001	73590	3110	918805
DC8_S30_R1_001	91106	9062	549416
DC9_S31_R1_001	95135	3163	1177203
DC10_S32_Rq_001	138593	3447	845611
DC11_S33_R1_001	101121	5667	646296
DC12_S34_R1_001	138429	3031	828604
DC30_S16_R1_001	242444	8242	700168
DC31_S17_R1_001	271686	12556	577580
DC13_S35_R1_001	217865	3581	838429
DC14_S36_R1_001	29039	4902	1007280
DC15_S37_R1_001	82473	3069	631353
DC16_S38_R1_001	46008	4648	777018
DC17_S39_R1_001	26100	5606	687310
DC18_S40_R1_001	15656	3823	634074
DC19_S41_R1_001	14599	2208	800070
DC20_S42_R1_001	40481	3074	709197
DC21_S43_R1_001	28036	8263	734589
DC22_S44_R1_001	177660	10213	660236
DC23_S45_R1_001	106748	6629	498879
DC24_S46_R1_001	75529	6706	659944

DC25_S47_R1_001	54724	27782	605537
DC26_S48_R1_001	45657	22416	623104
DC27_S49_R1_001	25129	7493	893676
DC28_S50_R1_001	102198	11222	589848
DC32_S18_R1_001	226660	11403	456096
DC33_S19_R1_001	240898	32140	598524
DC34_S20_R1_001	243901	11944	670946
DC35_S21_R1_001	215895	9020	497917
DC36_S22_R1_001	157732	16757	515786
DC37_S23_R1_001	187415	14919	622932
DC38_S24_R1_001	203493	7723	537396
DC39_S25_R1_001	137391	91553	497241
DC40_S26_R1_001	223842	13804	530421
DC41_S27_R1_001	142063	39241	381051
DC42_S28_R1_001	191973	19651	391903
DC43_S29_R1_001	51085	52797	497801
DC44_S30_R1_001	508304	7233	522803
DC45_S31_R1_001	325152	4240	827292
DC46_S32_R1_001	568740	4295	731681
DC29_S51_R1_001	25443		790864

Tabla 5. Valores normalizados a partir de los valores de corrección.

	Normalización					
	Valor de Corrección			Valor Normalizado		
	A	W	Z	A	W	Z
DC3_S26_R1_001	-0.16905	0.22601	-0.08978	0.071067	0.092938	0.202147
DC4_S27_R1_001	-0.1724	0.258438	-0.11439	0.070726	0.095706	0.186217
DC6_S28_R1_001	-0.09222	-0.15581	-0.11349	0.078894	0.060353	0.186795
DC7_S29_R1_001	0.901698	-0.5295	0.505507	0.18014	0.028462	0.587527
DC8_S30_R1_001	0.238021	1.913826	-0.40203	0.112534	0.23698	0
DC9_S31_R1_001	0.044223	-0.65096	1.142644	0.092793	0.018096	1
DC10_S32_Rq_001	0.456803	0.089788	-0.28168	0.13482	0.081313	0.077915
DC11_S33_R1_001	-0.27037	0.644038	-0.23571	0.060746	0.128614	0.107677
DC12_S34_R1_001	0.368944	-0.46515	0.282081	0.125871	0.033954	0.442885
DC30_S16_R1_001	0.751396	1.719235	-0.155	0.164829	0.220373	0.159923
DC31_S17_R1_001	0.120613	0.523417	-0.17508	0.100574	0.11832	0.146923
DC13_S35_R1_001	-0.1981	-0.7148	0.451624	0.068108	0.012648	0.552644
DC14_S36_R1_001	-0.86671	0.368891	0.20139	0	0.105132	0.390646
DC15_S37_R1_001	1.840077	-0.37393	-0.37321	0.275728	0.041738	0.018659

DC16_S38_R1_001	-0.44214	0.5145	0.230719	0.043249	0.117559	0.409633
DC17_S39_R1_001	-0.43271	0.20611	-0.11545	0.04421	0.09124	0.185528
DC18_S40_R1_001	-0.40015	-0.31805	-0.07746	0.047526	0.046507	0.210126
DC19_S41_R1_001	-0.06751	-0.42244	0.261793	0.081411	0.037598	0.42975
DC20_S42_R1_001	1.772861	0.39221	-0.11358	0.268881	0.107122	0.186739
DC21_S43_R1_001	-0.30743	1.688029	0.035804	0.056972	0.21771	0.283448
DC22_S44_R1_001	5.336853	0.235992	-0.10122	0.631929	0.09379	0.194743
DC23_S45_R1_001	-0.39914	-0.35093	-0.24439	0.047629	0.043702	0.102053
DC24_S46_R1_001	-0.29246	0.011616	0.322854	0.058497	0.074642	0.46928
DC25_S47_R1_001	-0.27546	3.142857	-0.08244	0.060228	0.341867	0.206898
DC26_S48_R1_001	-0.16569	-0.19315	0.029011	0.07141	0.057167	0.27905
DC27_S49_R1_001	-0.44961	-0.66573	0.434232	0.042488	0.016836	0.541385
DC28_S50_R1_001	3.066935	0.497664	-0.33998	0.400703	0.116122	0.040174
DC32_S18_R1_001	1.217852	0.016129	-0.22676	0.212345	0.075027	0.113471
DC33_S19_R1_001	0.062817	1.818557	0.312276	0.094687	0.228849	0.462432
DC34_S20_R1_001	0.012466	-0.62838	0.121001	0.089558	0.020024	0.338604
DC35_S21_R1_001	-0.11483	-0.24481	-0.25789	0.076591	0.052758	0.093317
DC36_S22_R1_001	-0.2694	0.857761	0.035888	0.060845	0.146853	0.283502
DC37_S23_R1_001	0.188186	-0.10969	0.207733	0.107458	0.064289	0.394753
DC38_S24_R1_001	0.085788	-0.48234	-0.13731	0.097027	0.032487	0.171376
DC39_S25_R1_001	-0.32484	10.85459	-0.07472	0.055198	1	0.211896
DC40_S26_R1_001	0.629233	-0.84922	0.066728	0.152385	0.001176	0.303468
DC41_S27_R1_001	-0.36534	1.842727	-0.28161	0.051072	0.230912	0.077962
DC42_S28_R1_001	0.351323	-0.49922	0.028479	0.124076	0.031046	0.278706
DC43_S29_R1_001	-0.73389	1.686733	0.270215	0.013529	0.217599	0.435202
DC44_S30_R1_001	8.950161	-0.863	0.050225	1	0	0.292784
DC45_S31_R1_001	-0.36032	-0.4138	0.582416	0.051584	0.038336	0.637317
DC46_S32_R1_001	0.749151	0.012972	-0.11557	0.164601	0.074757	0.18545

### 3. Código para la obtención de gráficos en R

Se abre un nuevo proyecto en R

```
>library(ggplot2)
>library(RColorBrewer)
```

```
#Histograma
```

```
three <- read.csv("Histograma.csv", header = TRUE, sep = ",") #Se cargan el archivo donde se
encuentren los datos del porcentaje de alineación de las muestras
grafica3=ggplot(three, aes(Porcentaje.de.Alineación....))+geom_histogram(binwidth = 1.2,
color="orange", fill="orange")+ggtitle("histograma")+
ylab("Número de muestras")+
```

```
xlab("Porcentaje de Alineación (%)")
grafica3
```

Se exporta el gráfico.

#### #Boxplot

```
four <- read.csv("boxplot.csv", header = TRUE, sep = ",") #Se carga el archivo donde se encuentren
los datos de cobertura por cromosoma de jóvenes vs. adultos
grafica4=ggplot(four, aes(x=Cromosoma,y=Cobertura))+
  ggtitle("Boxplot")+
  xlab="Cobertura"+
  ylab="Cromosoma"
grafica4 + geom_jitter(aes(size=0.1, colour=Cromosoma)) + geom_boxplot(size=1.2, alpha=.7,
outlier.colour = NA)
n <- grafica4 + geom_jitter(aes(size=0.1, colour=Cromosoma)) + geom_boxplot(size=1.2, alpha=.7,
outlier.colour = NA)
n
```

Se exporta el gráfico.

#### #Diagrama de Violin

```
five <- read.csv("Violin.csv", header = TRUE, sep = ",") #Se cargan el archivo donde se encuentren
los datos de la cobertura de las muestras de adultos
grafica5= ggplot(five, aes(x=Cromosoma, y=Cobertura, fill=Cromosoma)) + ggtitle("Diagrama de
Violín) + geom_violin()

grafica5 + scale_fill_manual(values=c("#9ad1aa", "#9182c4"))
```

Se exporta el gráfico.

#### #Heatmap

```
six <- read.csv("Heatmap.csv", header = TRUE, sep = ",") #Se cargan el archivo donde se
encuentren los datos de la cobertura de las muestras de adultos
grafica6 <- data.matrix(six)
coul <- colorRampPalette(brewer.pal(8, "PRGn"))(25)
heatmap(grafica6, main="Nivel de Mosaicismo", scale="columna", margins=c(4,4), Colv=NA,
Rowv=NA, col=coul, cevRow=0.9)
```

Se exporta el gráfico.

Cuernavaca, Morelos a 30 de agosto de 2022

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **NANCY LISSET TRUJILLO ROMÁN**, con el título del trabajo: **ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE MOSAICISMO CROMOSOMAL Y LA PROPORCIÓN DE SEXOS EN EL AVE *Fregata magnificens***. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DR. RAUL ERNESTO ALCALÁ MARTÍNEZ

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. ALEJANDRA VÁZQUEZ LOBO YUREN

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. DIEGO CLAUDIO CORTEZ QUEZADA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. ROSA GABRIELA BELTRÁN LÓPEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DIEGO CLAUDIO CORTEZ QUEZADA | Fecha:2022-08-30 11:54:45 | Firmante**

ZaPoVoaXTkfc9RVG5/EYg5JlabQ50gmd8S2YcmlM3VY9IDdUsMylCnrJWGGfLQYUaXCRiKc9gQi0MITgvgeth99DQg1hB/3E6AmwzTAsXeTSOOHwEVbLJdFRswF67vW5/9aFXM7u4pdK2sx8qaHy9FY7IHypV+w5klozUVLycqqlM2IqIBq0IF/xjdV3SUEqVofOgBkn3CKnzauMvRNGqlLodWCbPd7/9z2Z1aGGCYf9s6p+m1Pjjuuzh6ZMsxnNTIOxe17E9BNQaxauhIRZ0qdHkwu7M7ByOeP+D09GfIS749DGBSiYlvku5MONnK3O8RI9c3tpY/YK/2+bxg==

**ALEJANDRA VAZQUEZ LOBO YUREN | Fecha:2022-08-30 12:19:18 | Firmante**

rM71d67czAN2zEuoqE2lhZu/LGM2aHNaP+k//IVCOIn3UBYY0pdiZ5ckxEfj1nXe6JbliBdu7zGJGF8qL151MsT5w8+r0m86oQ0gw1IXDh1/dMXxLZTV/YKxNRg6MP9olc+eqcsZjExG4WVUQuvBknYDB1ZX4tgFnIPHkhd8iSP/sgSdt/u3fZp/Dx7eWd254tLEJrQz6vd7bbBaplaZaKBDVeaRnDzElaUPo7dLXGnfCvt8hkydzxcCGLxM4AsjYQSoRH7EsTuBaX4VotVA/H5Zq8nV9id5faj4aDbBFHIO3k26mp929xZc9M/+W2i8kT4YIXbj7meK8InDnkK5Gw==

**RAUL ERNESTO ALCALA MARTINEZ | Fecha:2022-08-30 17:18:44 | Firmante**

CjsYj8mE4Wlx0sy2yfClgp6FKzQS54GmBsAZrb+fpPnWbM45t22KvjJVIOxFeYmkr+hNW2FpS4afDIS/Z5PnMfX1n2glXPxd+/d1BByyFZt7ejA91tGRp/bROGXyn1rbBSnIG00sODAr6vs/p8dajsOODOrpb0ApwUOHOf9ojy9jlfizseJ8Yal8MWQ8Bx07w8brGVkvJk+BT4xUcAouC8Pvc0IEUYzRtIHTpNAOIBDoni0SSxcVNVG6HX4/aEfN9fHQOaO1gzXO4RfExYXCn1aj2VCiWMDcXjIhnD9ezjLzsgzJRzKmjXBxJLaL56ZFqLn0o9UJ7pcnrhA==

**MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO | Fecha:2022-08-30 21:30:20 | Firmante**

T+knc1eHYGpCvzUHCmszc0KtGY1sTOHJM1ZvwViEjzOj/Mye774TemqA2XHGqvqr2zVTr3kyxL98AhzKIX6OT0HqjTWP+bE4guBGAL4dtJDQglZ6+i4wN/kcJw0DE03ESg3GtSRcbc1tlumfhoBaCettFcGcyU1ROIN4GzGxiwsNiil6SvruMMpjHHCkOBLQIGA493Eo+qjHBOzU3NHmkzPpQsx2OpTWu+oLfcFdsBv3IA4TC8b/ctxH9BnZ22GxdR9uiYlwecVQ3gpvJvt5yJkG9zocCYp5LA0sFPkYQzNKbyJ5i9ffGVnnk9DxcMZTPwPdpwsevoIFaA==

**ROSA GABRIELA BELTRAN LOPEZ | Fecha:2022-09-30 12:49:55 | Firmante**

id0ZMvillMDvKTDjkwQTQfEZIHk6NuR06acsFEzWfZUQ8UuO2FOJUU2m4YDmBrDq4g4Em9nTCebjnTAMC1jJmChDzh2kKpYwBO9N6kCyyF45VTwyr6APAidE7NIXJtXPY+mc tSdAubz2vfeDiKCGgTCP7C4fXtwuanyG1qMCsqNorclz3Hu/afHnhDm3k0Z0UMbsojAYwZlHKPh5w3cc3uuhpOjIIB+FbZlI7TRzXlLM6Ga22llevqfCU9ep8dKwFJhQkDBNPbXoYN6PWgnjWeHYRbZ+NAmyKaQf81OyT+014q6QiAx462G5yn4YWGqebIHKHR50GT9q25N0vaQPg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IYIZAB4RQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9mwUnl8DlvxsUa0pOSDvSNqwf0Bq24x>

