



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"IZTACALA"

Etología Reproductiva e Inducción al Celo Mediante la
Hormona Estimulante del Folículo Bovina (bFSH),
en el Cocodrilo de Pantano (Crocodylus moreletii)
en Cautiverio.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
Bernardo Bautista Calderón





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Angelica Salas,
por su apoyo invaluable
y a quien le debo mucho
más que esta tesis.

A Paco Remolina, por haber
me introducido al mundo
enigmático del cocodrilo
de pantano y por su ayuda
incondicional en el tra-
bajo de campo.

A Carlos Romero, por su
ayuda y facilidades en
la realización de esta
tesis.

A Esteban X, Javier
Cavitz y Simón Balam,
gente maya que cola-
boraron en el traba-
jo de campo.

A mis padres, por su amor y empuje, y a quienes debo todo.

A mis hermanos, por compartir toda una vida de amor y trabajo.

A mis maestros, quienes me prepararon como hombre y profesionalista.

A todas aquellas personas, que fueron participes en la realización de esta tesis.

A la ENEP Iztacala y a la UNAM, que me cobijaron en sus aulas y laboratorios, dándome la oportunidad de realizarme como Biólogo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, muy en especial al Laboratorio del Banco de Hormonas de Origen Animal, por darme todas las facilidades en la realización de esta tesis.

A la familia Juárez Acosta,
por su gran ayuda como familia durante mi estancia en la ciudad de México.

A Carlos Arambulo, por su apoyo total.

A mis compañeros de aula y de trabajo, con quienes compartí experiencias amargas y maravillosas.

A Marthita, Gerardo y Rosario, por compartir conmigo el trabajo de laboratorio, y por que sin -- ellos no hubiera sido posible la culminación de esta tesis.

A mi esposa, por su comprensión, aliento y estímulo.

A mi hijo, que tanto lo esperamos y será un estímulo adicional en nuestras vidas.

I N D I C E

1.- INTRODUCCION	PAG. 1
2.- OBJETIVOS	PAG. 24
3.- HIPOTESIS	PAG. 25
4.- MATERIAL Y METODOS	PAG. 26
5.- RESULTADOS	PAG. 44
6.- DISCUSION	PAG. 75
7.- CONCLUSIONES	PAG. 91
8.- BIBLIOGRAFIA	PAG. 93

INTRODUCCION

Los cocodrilos son organismos ancestrales que convivieron con sus parientes cercanos ahora extintos, los dinosaurios. Actualmente sufren el embate del "desarrollo humano", lo que tiene a varias especies de cocodrilos al borde de la extinción; son animales que han vivido decenas de millones de años y fueron los grandes reptiles del periodo secundario. Los ancestros de los cocodrilos aparecieron en efecto con el grupo de los tecodontos, y hace aproximadamente 230 millones de años que hicieron su aparición en la era secundaria. Se piensa que los cocodrilos actuales datan de la era terciaria y que no han tenido cambio alguno durante 60 millones de años (Dufaure, 1986).

Los cocodrilos presentan características primitivas con ciertas propiedades especiales en relación con su modo de vida anfibio y también con características muy modernas, ya sea anatómicas, por ejemplo el corazón tetracavitario como el de los mamíferos, o los cuidados maternos; de estos últimos, se citan los cuidados maternos prodigados a las crías, una particularidad probablemente relacionada a la complejidad relativa de su cerebro comparada con la de los otros reptiles.

La investigación sociobiológica de la integración de estímulos externos que controlan la reproducción de los cocodrilos ha sido muy oscura, porque tradicionalmente los experimentos se han realizado con especies de laboratorio o que viven completamente en condiciones artificiales.

De acuerdo con las teorías paleontológicas actuales, los cocodrilos y las aves son organismos vivientes estrechamente cercanos a los dinosaurios (Whetstone and Martin, 1979) y deberían estar incluidos con ellos en la Clase Archosauria (Romer, 1956). Los cocodrilos se separaron de otros órdenes de reptiles al menos durante el periodo Triásico. La poca información que tenemos acerca del sistema endócrino de los cocodrilos y los aligatores muestra que en muchos aspectos ellos son más parecidos a las aves que a otros reptiles (Lance et al., 1984, 1985; Powell et al., 1987). En tanto que recientemente se ha descubierto que las acciones de las gonadotropinas en vertebrados terrestres no mamíferos son similares al patrón de los mamíferos; además se sugiere que la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la estimulante de la tiroides (TSH) de los mamíferos son producto de una molécula glicoproteica ancestral (Licht et al., 1977)

Estos antecedentes, que hasta ahora sólo se consideran como propuestas, hacen de los cocodrilos sujetos importantes de estudio, tanto de su neuroendocrinología en general, como de su conducta reproductiva en particular.

ANTECEDENTES:

Los cocodrilianos aparecieron en la Tierra hace más de 200 millones de años. Son los únicos sobrevivientes de los arcosaurios, grupo que incluía a los dinosaurios, y del cual se originaron las aves, motivo por el cual tienen un ancestro más

reciente con las aves que con los demás grupos de reptiles. En México existen tres especies de cocodrilos, distribuidos por las vertientes del país: el Cocodrilo de río (Crocodylus acutus) el Cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii) y el Caimán (Caiman crocodylus) (Alvarez del Toro; 1974).

Los estudios realizados en el cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii) comprenden los siguientes: Thatcher (1964) hizo un estudio sobre nemátodos de reptiles e incluye a los que parasitan a C. moreletii. Powell (1965, 1971), menciona la situación de C. moreletii en el Edo. de Yucatán y proporciona información acerca de Crocodylus acutus y C. moreletii; un resumen acerca de la situación y distribución de los C. moreletii y C. acutus en América Central y en México; propone el establecimiento de zonas protegidas y programas de comercialización. Beltrán (1968), propone programas de propagación, investigación, conservación y mantenimiento para C. moreletii. Campbell (1972), examina el estado de varias poblaciones de C. moreletii, con lo que obtiene información básica de su historia natural y ecológica en el estado de Veracruz. Hunt (1973, 1974, 1975, 1977), realiza observaciones en el zoológico de Atlanta (E.U.A.), sobre apareamiento, nidación y nacimiento de C. moreletii; agrega observaciones sobre el comportamiento materno y agresivo de los adultos. Guzmán (1973, 1974), analiza antecedentes históricos y científicos de los crocódilidos mexicanos, relaciones filogenéticas, distribución mundial actual de los grupos vivientes, distribución geográfica en México incluyendo factores que la determinan; proporciona

claves para la identificación de las subfamilias, géneros y especies. Gustavo Casas-Andreu (1977), realiza un estudio en cautiverio de C. moreletii, en el cual experimenta diferentes dietas y la relación de éstas con el aumento de peso y longitud de estos animales. Virgen (1978), estudia el crecimiento del C. moreletii y C. acutus en cautiverio. Flores (1980), proporciona una información general sobre la reproducción, ecología, explotación, distribución, protección y administración de C. moreletii. Méndez (1986), propone bases de mejoramiento genético en C. moreletii, partiendo de un modelo de producción que puede ser aplicado con fines comerciales, de repoblación o bien de investigación. Flores (1988), realiza un proyecto de un criadero de C. moreletii en Quintana Roo. Herrera (1989), lleva a cabo un estudio sobre la situación actual del comercio de cocodrilos en el sureste de México y Lazcano (1990), efectúa un estudio en una población protegida de C. moreletii la reserva de Sian Ka'an, que coexiste con otra de C. acutus.

Crocodylus moreletii, Duméril and Bribon:

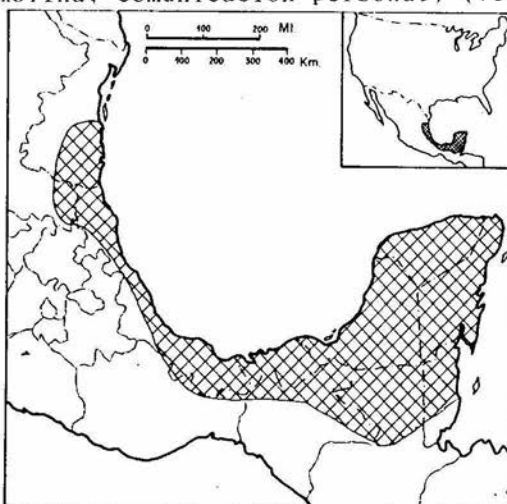
Al cocodrilo de pantano o Crocodylus moreletii se le pueden definir las siguientes características según (Ross, 1987): Es un cocodrilo que mide a lo máximo 3.5 m de longitud total. La sutura premaxilar y maxilar es casi transversa al nivel de los primeros dientes maxilares. Las fosas nasales están por lo general prominentemente levantadas. Algunos individuos muestran una prominencia (joroba) preorbital, aunque la mayoría tiene únicamente una ligera elevación de la región lacrimal. La tabla o

coraza craneal está casi flanqueada. El cuello está armado normalmente de cuatro o más escamas postoccipitales y seis o más nucales. El cuello exhibe escamas ventrales y frecuentemente intercalaciones irregulares ventrolaterales provenientes de escamas de la región caudal. Las escamas en los flancos de los pies son lisas, mientras que las escamas dorsales contiguas son asimétricas frecuentemente con una disminución en el número de escamas osificadas contiguas, las que hacen algunas hileras alrededor del lomo de la mitad del cuerpo. La coloración del adulto es café oscuro a negro. La coloración de los juveniles es variable, con la tabla craneal moteada con café y negro; el cuerpo y el cuello con cinco bandas transversales negras, el vientre es blanco y las escamas ventrales posteriores de la cola son oscuras. El iris es ligeramente café a plata.

DISTRIBUCION:

Esta especie se localiza al norte de América Central. Costas del Atlántico y Pacífico, Honduras y Guatemala. En México la distribución de esta especie es básicamente sobre la planicie costera del Golfo, desde el centro de Tamaulipas hasta el centro de Yucatán. También se le puede encontrar en Chiapas y al Norte de Oaxaca. Ha sido registrada en los Estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas y Oaxaca (Flores, 1980). En Tamaulipas se le ha encontrado en las siguientes localidades: Soto La Marina, Carmen Farlas, Tampico. En Veracruz ha sido vista en Catemaco,

Huexapan, Tecolutla. En Tabasco se ha localizado en Macuspana, Tenosique, Jonuta, Teapan . En Campeche se ha registrado en Palizada, Balchaca, Río Usumacinta (Lazcano 1990). En Quintana Roo se ha visto en Isla Mujeres, Puerto Morelos, Chichancanab, Muyil, Bacalar, laguna Kana, Coba, Leona Vicario, Kantunatkin. En Chiapas se ha encontrado en Reforma, Juárez, Pichucalco, Catazajá y Ocosingo (Remolina, comunicación personal) (Ver figura 1).



I. - DISTRIBUCION DE *C. moreletii* EN LA REPUBLICA MEXICANA SEGUN ROSS. (1987)

HABITAT:

El cocodrilo de pantano es una especie anfibia que desarrolla sus actividades tanto en tierra como en agua. Frecuenta arroyos, ciénagas y lagunas de agua dulce al interior de bosques, selvas y rios de poca corriente; se le puede encontrar cerca del mar. En algunos lugares coexiste con el cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*), pero éste desplaza al de pantano y lo hace emigrar hacia otras áreas.

NEUROENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA:

La poca información que se tiene del sistema endócrino de cocodrilos y aligatores demuestra que en muchos aspectos, se parecen más a las aves que a otros reptiles (Lance et al., 1984; 1985; Powell et al., 1987).

Puesto que las hormonas son mensajeros químicos elaborados por el sistema endócrino, comenzaremos por decir que una hormona es una sustancia química producida por una glándula (zona restringida), que se difunde o es transportada por la sangre a otra región del organismo, donde ejerce su actividad y cuya función es regular (disminuir o aumentar) el ritmo o intensidad de los procesos específicos sobre los que actúan. Aunque no proporcionan energía directamente, lo hacen indirectamente a través de influir en las reacciones enzimáticas involucradas en la generación de energía, y otras. Se sabe que tanto su exceso como su carencia inducen patologías bien definidas. (Mc Donald, 1981).

La hipófisis anterior secreta por lo menos siete hormonas de naturaleza proteica. Estas pueden clasificarse en 2 grupos, en base a su estructura y probable origen evolutivo. El primer grupo está formado por la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona adenocorticotrófica (ACTH) y la estimulante de los melanocitos (MSH) que son estrictamente péptidos. En el caso de GH y PRL, tienen algunas secuencias de aminoácidos comunes, lo que sugiere una cercana interrelación evolutiva y explica la

actividad biológica e inmunológica que han demostrado tener en común estas hormonas. El segundo grupo de las hormonas de la adenohipófisis incluye las gonadotropinas: la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH), y además la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Todas estas hormonas son glicoproteínas; es decir, que además de la molécula proteica, ésta lleva insertada cadenas de carbohidratos. Sus pesos moleculares oscilan desde 28 000 a 32 000 daltones, mientras que los de las peptídicas son inferiores a los 22 000 daltones.

Los estudios bioquímicos han revelado que cada glicoproteína consiste en dos subunidades químicas no idénticas, designadas como alfa y beta, de las cuales, la alfa es común a las tres hormonas dentro de la misma especie, mientras que la beta es específica para la actividad de cada hormona (Adler, 1984). La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), son las hormonas proteicas involucradas en la foliculogénesis y en la espermatogénesis. Estas estimulan la actividad enzimática esteroideogénica en las células de la granulosa, de la teca, de las células de Sertoli y de Leydig después de interaccionar con sus receptores, que activan los procesos dependientes del cAMP. Para el caso de las hembras, la resultante es que hay una aumentada síntesis y acumulación de esteroides, sobre todo de estradiol en la circulación general, y en el líquido folicular de los folículos antrales. Se sabe que el estradiol es la hormona clave para promover la foliculogénesis (Richards, 1980, citado por Adler, 1984). Para disparar los

eventos fisiológicos necesarios para la reproducción, el (los) folículo(s) dominante(s) debe(n) poseer una mejor capacidad que la de los otros folículos, para sintetizar y liberar este esteroide. Esta mejor capacidad para producir estradiol involucra la acción de la FSH y de la LH sobre las células de la granulosa y de la teca. Mucho de nuestro entendimiento actual de los mecanismos de acción de la FSH y la LH en la foliculogénesis se deriva de estudios en ratas maduras e hipofisectomizadas, y de cultivos primarios de células de la granulosa, de la teca, y de células intersticiales de ratas y especies domésticas (Adler, 1981). Se acepta que la naturaleza y acciones de las gonadotropinas en otros vertebrados, o al menos en las especies de tetrápodos grandes, son similares al patrón de los mamíferos. Sin embargo, estudios recientes en especies de vertebrados terrestres no mamíferos empiezan a dar resultados inexplicables. Muchos de los datos fisiológicos fueron compatibles con la hipótesis de algunos grupos, de que los anfibios o reptiles podrían poseer únicamente una glicoproteína con amplias acciones como las de FSH y la LH en los mamíferos. Esta idea fue interesante a la luz de la evidente homología estructural entre las subunidades de LH, FSH y TSH de los mamíferos, lo que sugirió que las tres pueden provenir de una molécula glicoproteica común ancestral (Licht et al., 1977).

En la actualidad, se reconoce que los aspectos climáticos y físicos del medio ambiente estimulan la secreción gonadotrópica necesaria y consecuentemente el desarrollo del ovario, estereoidogénesis y comportamiento reproductivo en los vertebrados

superiores (Crews, 1975).

Licht et al (1977), mencionan que se han aislado 2 distintas glicoproteínas de la hipófisis del aligador, que son químicamente similares a la FSH y la LH de los mamíferos. Tsui y Licht (1977), han observado que exponiendo ovario de aligador a dosis de FSH y LH ovinas, se estimula la secreción de testosterona y que la FSH es claramente más potente que la LH. También Licht et al (1977), afirman que las dosis se deben aplicar en relación con el peso del organismo y no a la especie o Clase, y que la aplicación debe ser por vía intramuscular, ya que así el efecto es paulatino y no tan rápido como si fuera por vía intravenosa.

Callard y Lance (1977), mencionan que inyecciones intravenosas de LH-RH en tortugas de agua dulce (Chrysemys picta), produjeron un aumento en los niveles de LH y progesterona en el plasma, aunque la magnitud y duración de la respuesta varió de un individuo a otro. Sin embargo, inyecciones crónicas de dosis fisiológicas o farmacológicas del mismo péptido en machos de Chrysemis picta, no aumentaron las gonadotropinas de la testosterona (Lance et al., 1985). De la misma manera que con las tortugas de agua dulce, los experimentos con tortugas marinas han dado resultados ambiguos (Lance et al., 1985). Licht (1980), informó que en un experimento, Chelonia mydas tuvo un moderado aumento de LH en el plasma, en respuesta a una inyección intravenosa de 1 mg de la hormona liberadora de LH (LH-RH). No obstante, el péptido LH-RH de mamíferos o análogos superactivos

han fracasado para estimular el aumento de gonadotropinas o testosterona en Chelonia mydas o Lepidochelis olivacea (Licht 1982; Licht et al., 1982).

Lance (1985 y 1987), realizó experimentos en aligatores, a los cuales les inyectó LH-RH, y se midió testosterona en plasma a diferentes tiempos; la respuesta fue muy variable de aligatores a aligatores, por lo que concluyó que es virtualmente imposible establecer una curva de dosis respuesta en aligatores maduros.

Sin embargo, las hipófisis aisladas de Chrysemis picta y Pseudomis scripta secretaron LH en respuesta a dosis fisiológicas de LH-RH en sistemas de perfusión (Licht y Porter, 1985), mientras que las culebras parecen no tener ningún tipo de respuesta a las hormonas de mamíferos (Licht et al., 1977).

Lance, Vliet y Bolaffi (1985), postulan que el LH-RH de los mamíferos es activo en tres diferentes grupos de vertebrados: teleosteos, cocodrilos y aves, cuyo LH-RH endógeno tiene diferentes secuencias de aminoácidos del péptido de mamíferos, pero es inactivo en quelonios y culebras.

Además, Lance (1987), señala que preparaciones de FSH y LH ovinas y porcinas han estimulado la secreción de testosterona en aligatores machos. Licht (1977), señala que aunque los experimentos en vivo no se pudieron evaluar, si respondían inquietamente los aligatores a la FSH y a la LH.

La actividad biológica de la FSH de vertebrados no mamíferos

en sistemas "in vitro", tal como la de las células de la granulosa de rata, expresada en la producción de estrógenos, es mayor para la FSH que para la LH (Dahl et al., 1989). Este autor ha señalado que la actividad de la FSH se relaciona directamente con la pureza de la hormona y a la especificidad filogenética del reconocimiento de la hormona por sus receptores en las células de la granulosa de la especie tratada.

SITUACION ACTUAL:

Debido a que la piel del cocodrilo de pantano es más codiciada y cotizada que la de caimán(Caiman crocodylus) y la del cocodrilo de río(Crocodylus acutus), sus poblaciones están en riesgo de extinción. Su explotación es mayor en Tabasco, Campeche y Veracruz, a pesar de que hay veda. La destrucción de su habitat por actividades ganaderas contribuye de forma secundaria a la desaparición del cocodrilo de pantano.

Recientemente se ha comenzado a entender el papel ecológico que desempeñan muchas de estas especies. Es evidente que son especies clave en los ambientes acuáticos tropicales; algunas especies que habitan pantanos construyen albercas o fosas circulares proporcionando refugios a organismos acuáticos durante la temporada de sequía. Se ha observado que el número y densidad de peces e invertebrados acuáticos disminuye después de la extracción de cocodrilianos de ciertos ecosistemas acuáticos. Actúan también como puente entre dos ecosistemas introduciendo nutrientes al medio acuático a través de las heces producidas por

la ingestión de animales terrestres. Como depredadores tope intervienen en el control de las poblaciones de muchos animales (Lazcano, 1990).

Los cocodrilianos pueden ser indicadores ambientales de importancia, ya que acumulan en su cuerpo y huevos, contaminantes radiactivos, metales pesados y pesticidas cuya presencia, niveles y fluctuaciones pueden detectarse al monitorear poblaciones silvestres. Se utilizan en investigaciones biomédicas; anomalías tales como la espina bífida, el paladar hendido, y el labio leporino se han inducido en los embriones de algunas especies. Estos estudios están proporcionando información valiosa sobre las causas de las malformaciones congénitas en humanos y ayudarán a desarrollar métodos reconstructivos (Lazcano, 1990).

Estos reptiles han sido elementos importantes en las creencias de las culturas mesoamericanas. En la mitología náhuatl la Tierra estaba formada por el dorso de un cocodrilo que flotaba en una laguna. Las numerosas representaciones de símbolos de fertilidad asociados a cocodrilos en la iconografía religiosa de varios grupos prehispánicos han dado pie a la hipótesis de que las sociedades maya, olmeca, izapan y chavin derivan de una civilización anterior de agricultores de campos elevados que adoraban al cocodrilo. Los aztecas le atribuyen propiedades medicinales. Actualmente para los huaves de Oaxaca, el caimán tiene un valor totémico, y es respetado y adorado como protector del grupo (Lazcano, 1990).

Conocida la importancia que tiene el cocodrilo de pantano y

que actualmente se encuentra en peligro de extinción, es necesario buscar alternativas que permitan recuperar las poblaciones de cocodrilos hoy en día disminuidas por el hombre; una posibilidad es inducir celo en los cocodrilos mediante la hormona estimulante del folículo después de su etapa de apareamiento, con el propósito de tener dos producciones de crías anuales.

ETOLOGIA REPRODUCTIVA DEL COCODRILO DE PANTANO (Crocodylus moreletii).

La época reproductiva del cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii) comienza a fines de febrero (Huerta, 1984), o durante el mes de marzo (Alvarez del Toro, 1974). Los machos más vigorosos son los que participan principalmente en el cortejo; cada macho dominante puede controlar a dos o tres hembras (Pérez-Higareda et al., 1989).

Los apareamientos se inician hacia fines de febrero con el cortejo cuando los machos empiezan a lanzar sus desafíos, que consisten en rugidos o ronquidos (Alvarez del Toro, 1974; Huerta, 1984), y muestran mayor agresividad que la normal; en cambio al descubrir una hembra se comportan de manera diferente. Si una o más hembras están tomando el sol en la orilla, el macho se aproxima y saca toda la cabeza fuera del agua pero paralela a la superficie, luego encorva el cuello (Alvarez del Toro, 1974; Huerta, 1984), y abre las fauces las cuales cierra al momento de golpear con la cabeza sobre la superficie del agua dando como

resultado un sonido hueco y sonoro (Alvarez del Toro, 1974; Huerta, 1984). Al mismo tiempo transmiten cierta vibración al agua con el cuerpo (Huerta, 1984); la cual Garrick y Lang (1977) han observado en A. mississippiensis y la denominan vibraciones subaudibles (SAV). O también mueven vigorosamente la cola, produciendo así gran agitación en el agua; en ocasiones el SAV es lo que desencadena esta pauta de comportamiento (Huerta, 1984).

Normalmente este tipo de comportamiento es contestado por otro macho territorial y probablemente también funciona como establecimiento de territorio (Alvarez del Toro, 1974; Huerta 1984) y como mecanismo de atracción hacia las hembras (Garrick y Lang, 1977).

Dufaure (1986) y Ross (1989), argumentan que la ovogénesis en Alligator mississippiensis inicia durante el mes de marzo y creen que concluye hacia fines de junio, que es la temporada que concuerda con la nidación. En cambio, la espermatogénesis del macho se inicia en el mes de marzo y concluye hacia fines de julio.

Al llegar la época de apareamientos que es a mediados o a fines de marzo, los desafíos y manifestaciones se hacen más frecuentes o sucesivos. Si existe una hembra dentro del agua o en la orilla de la pileta el macho se aproxima lentamente y saca la cabeza, el cuello, y de improviso golpea el agua ruidosamente con la mandíbula y con la cola al mismo tiempo. Esta pauta de comportamiento se repite dos o tres veces, luego se

sumerge y reaparece varias ocasiones; en cada salida lanza por los orificios de la nariz un pequeño chorro de agua o expulsa el aire por las fosas, ocasionando el burbujeo antes mencionado (Alvarez del Toro, 1974; Huerta, 1984; Pérez-Higareda et al., 1989).

Cuando la hembra se encuentra en el agua el macho se le aproxima nadando suavemente; si no está receptiva, abre la boca amenazante y huye del lugar; en caso contrario, el macho levanta verticalmente la cabeza y luego la sumerge expulsando por las fosas nasales un ruidoso chorro de burbujas. Usualmente el apareamiento ocurre en el agua; el macho se sumerge junto con la hembra inmediatamente y luego ambos reaparecen y levantan las cabezas. A esto sigue un mutuo frotar de cuellos mientras profieren suaves ronquidos; otras veces, la hembra golpea el agua con las mandíbulas y el macho expulsa burbujas por las fosas nasales, después el macho muy lentamente da una o dos vueltas en torno a la hembra, luego se le monta por atrás desde la cola y se corre hasta llegar al lomo. Inmediatamente la abraza con fuerza y en seguida la pareja comienza a nadar por los alrededores unos instantes; después de unos minutos asoman en la superficie sólo el lomo y la cabeza del macho quien aún sigue fuertemente abrazado a la hembra; ésta no aparece, y sólo de vez en cuando saca la punta del hocico para respirar (Alvarez del Toro, 1974; Huerta 1984; Pérez-Higareda et al., 1989). Lang (1976, 1980, 1986), ha informado de un comportamiento similar en Alligator mississippiensis. Gorzula y Seijas (1989), han observado comportamientos parecidos en los diferentes tipos de caimán (Crocodylus sp), al igual que Thorbjarnarson (1989) lo informa

para Crocodylus acutus; y Kofron (1991), para C. niloticus.

Para la cópula, el macho mete la cola bajo la hembra y se ladea un poco, a veces la hembra se ladea también ligeramente, lo que facilita la inserción del pene y en esa posición se realiza el coito (Alvarez del Toro, 1974; Huerta, 1984 ; Pérez-Higareda, 1989).

El proceso precopulatorio tiene una duración que va de algunos minutos hasta más de media hora (Alvarez del Toro, 1974 y Huerta, 1984) mientras que la cópula propiamente dicha dura de entre 5 a 10 minutos (Alvarez de Toro, 1974), o no pasa de 15 minutos (Huerta 1984); no obstante, Pérez-Higareda et al (1989), han observado cópulas de 1 a 2 minutos, en tanto que Kofron (1991), informa que en Crocodylus niloticus las cópulas tienen una duración de 10 a 120 segundos y Modha (1967) para la misma especie ha observado que se realizan en un lapso de 1 minuto.

Kofron(1991) ha observado que en C. niloticus, una hembra adulta, sobresintiendo un macho adulto durante el cortejo, señalará su estatus reproductivo por ajuste de su hocico. Lang (1986), refirió levantamiento de hocicos por hembras (y machos subdominantes), como comportamiento de sumisión , mientras que Kofron (1991) niega el levantamiento de hocicos para la cópula en machos. Los machos cortejan a las hembras frecuentemente oliendo la piel expuesta del cuello. Los machos también olfatean las cabezas de las hembras, y las hembras las de los machos cortejadores. Las hembras frecuentemente frotan su región gular (cuello) con la cabeza de los machos y posicionan su cabeza por

debajo de la región gular del macho. Frecuentemente, la pareja de cocodrilos se olfatean la base de las colas durante el cortejo. Posiblemente las secreciones gulares y cloacales son para identificar el sexo y el estatus reproductivo o para excitar sexualmente al sexo opuesto (Kofron, 1991).

La actividad del cortejo se presenta únicamente entre los 28°C y 31°C, y el apareamiento se ha observado entre los 28°C y 30°C. La actividad disminuye al medio día, tarde y noche cuando la temperatura sobrepasa los 31°C. La actividad del cortejo aumenta cerca del amanecer y temprano por la mañana, cuando la temperatura oscila entre los 29°C y 30°C (Pérez-Higareda et al., 1989).

Se han observado casos de 3 diferentes hembras de C. moreletii iniciando cortejo para diferentes machos emitiendo un corto y fuerte rugido, compaseado con la cabeza en el agua; conducta a la que según los autores, los machos respondieron con interés (Pérez-Higareda et al., 1989).

El periodo de incubación se extiende de mayo a agosto y varía de 60 a 90 días (Huerta, 1984), pero Casas-Andreu y Rogel (1986), dan un lapso de entre los últimos días de abril y primeros quince días de julio, con el máximo en la primera quincena de junio, coincidiendo con el final de la época de sequía y el inicio de las lluvias.

Cuando el desove se aproxima, la hembra escoge un lugar apropiado y no consiente a otra hembra en las cercanías. Comienza

a defender su territorio entre diez y quince días antes de iniciar el nido. El lugar escogido puede estar a pleno sol o bajo sombra no muy oscura. Las hembras forman el nido, empezando por arañar la tierra y hojarasca alrededor del sitio que ocupará el montículo y conforme éste aumenta de altura, el material de construcción es acarreado cada vez más lejos, hasta llegar a una distancia más o menos de seis metros, lo cual varía acorde con la abundancia del material y compactación del terreno (Alvarez del Toro, 1974; Huerta, 1984). La construcción del nido tarda de dos a cuatro días; terminado el nido transcurre un tiempo variable hasta la postura de los huevos. Puede ser tan corto como de 12 horas, o tan largo como de cuatro días. Tampoco hay hora fija para ovopositar; unas hembras ovopositan por la mañana y otras por la tarde, casi al oscurecer (Alvarez del Toro, 1974).

La forma en que construyen el nido es rascando la tierra hacia atrás con las patas y ocasionalmente con las manos; también de vez en cuando aflojan alguna porción más dura de la tierra con dentelladas y luego la arrojan hacia atrás con las patas. Con bastante frecuencia apoyan su hocico contra la tierra, usándolo a modo de arado lo meten bajo la hojarasca o zacate, levantándolo para luego echarlo hacia atrás con las patas; de ésta manera rascando y caminando del centro hacia afuera, levantan el montículo que les servirá de nido (Alvarez del Toro, 1974; Hunt, 1973, 1974, 1975 y 1977; Huerta, 1984; Casas-Andreu y Rogel, 1986). Huerta (1984), señala que el tamaño del nido es aproximadamente de 1.5 m de diámetro por 0.70 m de alto, aunque las medidas varían según el tamaño de la hembra y si es

construido sobre el mismo montículo del año anterior. Por otro lado, Casas-Andreu y Rogel (1986), dan un diámetro promedio de 2.40 m en su base, y una altura media de 0.50 m, sin que haya una relación entre esas dimensiones y el tamaño de la hembra que lo construyó. Una vez construido el nido, las hembras pasan la mayor parte del tiempo cuidándolo, para lo cual permanecen echadas sobre él. De la construcción del nido a la postura de los huevos Alvarez del Toro (1974), menciona un plazo de 12 horas hasta cuatro días, mientras que Huerta(1984), informa que transcurren dos días, a veces de dos o tres semanas y tal vez más.

Para la puesta de los huevos, la hembra sube al nido y excava un agujero hacia la mitad, de aproximadamente unos cuarenta centímetros de profundidad. Después, la hembra se coloca sobre el hoyo, de tal manera que la cloaca quede directamente sobre la cavidad, arquea el cuerpo haciendo una curvatura de modo que la región sacra y la base de la cola queden hundidas en el hoyo. Durante la postura la hembra cambia de apoyo, sobre una pata y sobre la otra; con la pata libre detiene la calda del huevo; posiblemente lo baja hasta el fondo, pues se nota que lo acomoda con cuidado y lo mete entre el material de que se forma el nido; con cada huevo cambia de pata. Al terminar la postura rellena el hoyo con el material que haya sacado, lo aprieta con las patas, y luego se echa encima durante horas. Después de la postura, la hembra ya no abandona el nido, cuando lo hace es por cortos períodos para entrar al agua y seguramente también para buscar algo de alimentos. Durante la incubación la cocodrila no consiente en la cercanía del nido a ningún animal, ni siquiera

otros cocodrilos con excepción del macho que es su pareja. Este incluso puede treparse al nido durante largos periodos. Esta conducta no es general, pues hay hembras que no permiten que el macho se aproxime; a causa de ésto a veces se desarrollan tremendas peleas (Alvarez del Toro, 1974).

La hembra que previamente ha construido su nido lo defiende contra cualquier otra hembra que pretenda ovopositar, embistiendo por un costado el nido con las fauces abiertas y emitiendo una especie de rugido, después se desplaza hacia el frente de la intrusa y trata de morderla, mientras que la invasora levanta el hocico y abre las fauces pero sin intención de morder, a la vez que produce un sonido semejante a un ronquido. Aún así la dueña reanuda furiosamente sus ataques hasta que logra expulsar a la otra; empero cuando la necesidad de oviponer es eminente se desencadena una actitud por parte de las hembras contendientes; como ya se dijo, la hembra del nido embiste por un costado a la intrusa, pero ésta toma una actitud de sumisión permaneciendo quieta, levantando la cabeza verticalmente, mientras que mueve vigorosamente la punta de la cola y emite un ronquido algo más bajo que en la actitud descrita anteriormente. Esto se repite por varias veces, hasta que logra empezar a escarbar. Esto provoca que los ataques de la primera se reduzcan a pequeñas embestidas, hasta el punto de cesar cuando la hembra empieza a desovar; la dueña del nido permanece expectante, hasta que la segunda se retira y después vuelve a defender el nido aún contra la o las hembras que desovaron en él (Huerta, 1984). Por esta situación es probable que se lleguen a encontrar nidos de hasta 60 huevos

(Huerta, 1984; Flores, 1988). Alvarez del Toro (1984), ha observado que en C. moreletii, la nidada fluctúa entre los 20 y 42 huevos, mientras que Casas-Andreu y Rogel (1989), dan un rango de 11 a 52 huevos por nido con un promedio de 30.3, mientras que Greer (1975) da un valor promedio de 32.

Se ha informado que existe vocalización desde dentro de la membrana del huevo, justo antes de la eclosión. Algunos autores informan que este tipo de vocalización estimula la eclosión sincrónica y que también funciona como señal para la hembra indicándole que la eclosión ha empezado; ésta comienza a desbaratar el montículo valiéndose de las mandíbulas y las patas delanteras (Godwin and Marion, 1978). Al descubrir las crías, la hembra ladea la cabeza y las toma cuidadosamente con los dientes y se las echa dentro del hocico. Si los cocodrilos no han salido aún del cascarón, coge el huevo y abriendo y cerrando la boca lo tritura suavemente entre la lengua y el paladar, así permanece un rato machacándolo hasta que lo rompe y logra liberar a la cría. Es indudable que la hembra distingue los huevos que van a nacer, porque a los infértiles los aparta a un lado, junto a los restos del material que ha sacado del nido. En algunas ocasiones, la hembra transporta a las crías hasta el agua llevándolas en su boca; nada agua adentro, con la cabeza en la superficie del agua, además de mover la garganta, abriendo y cerrando parcialmente las mandíbulas, provocando una corriente de agua para que lave las crías y las libere de todo resto de membranas que aún conserven adherido. Después de varios minutos de esta actividad la hembra suelta a las crías en el agua y regresa al nido a continuar

sacando a las restantes. Una vez transportados todos los cocodrilitos al agua, la hembra permanece cerca de ellos, cuidándolos celosamente (Alvarez del Toro, 1974; Hunt, 1975; Pooley and Gans, 1976 ; Garrick, Lang y Herzog 1978; Huerta, 1984).

OBJETIVOS

Generales

- Extracción, purificación y Caracterización Fisicoquímica y Biológica de la Hormona Estimulante del Folículo bovina (bFSH).

- Adiestramiento en el manejo de metodología para la purificación de la Hormona Estimulante del Folículo bovina (bFSH).

- Adiestramiento en el manejo del cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii), en cautiverio.

Específicos:

- Describir la conducta del cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii), durante la etapa reproductiva en cautiverio.

- Inducir a conducta sexual al cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii), mediante la Hormona Estimulante del Folículo bovina (bFSH).

- Observar los efectos que produce la Hormona Estimulante del Folículo bovina (bFSH), en el cocodrilo de pantano en cautiverio.

HIPOTESIS

Dados los antecedentes de que la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) de diferentes especies de animales en la escala evolutiva ha resultado activa para inducir ovulación, la FSH bovina será capaz de inducir algún tipo de conducta sexual en el cocodrilo de pantano adulto (Crocodylus moreletii), lo cual podría propiciar la reproducción entre la especie en una época distinta a la normal, obteniéndose dos producciones de crías anuales.

MATERIAL Y METODOS

Se describe la metodología utilizada para las tres fases experimentales: a) la extracción, purificación y caracterización de la hormona estimulante del folículo bovina (bFSH); b) la observación de la conducta sexual de los cocodrilos durante el periodo reproductivo en cautiverio; y c) efecto de la bFSH en los cocodrilos en cautiverio.

a).- Extracción, purificación y caracterización de la bFSH

Se llevó a cabo en el Laboratorio del Banco de Hormonas Proteicas de Origen Animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Esta etapa se efectuó del 4 de enero al 25 de mayo de 1990.

Materia prima:

La hormona se obtuvo de 535 hipófisis bovinas captadas en el rastro de Ferrerla y se colectaron en frasco ámbar con acetona fría; en el laboratorio, se cambiaron las hipófisis a acetona limpia y se conservaron a 4°C hasta su uso. Las glándulas se pesaron deshidratadas e hidratadas y se disecaron, y se pesaron los lóbulos anteriores. Así, la materia prima correspondió a 535 adenohipófisis hidratadas.

Ruptura de la estructura tisular y deslipidización

Se llevó a cabo secuencialmente con 10 ml de acetona (Baker) fría/x g de adenohipófisis (x 3) y 10 ml de éter anhidro (Baker) frío (x1), en presencia de hielo seco, en licuadora metálica a 15000 rpm, por 2 minutos. El licuado se filtró en Buchner con

vacío, sobre papel filtro Whatman No 1. La pasta final resultante se extendió sobre papel filtro y se dejó evaporar el solvente bajo campana durante 48 horas, al cabo de las cuales había un polvo de color rosado y grumoso, que se pesó y que se designa como "polvo de acetona".

Extracción de las glicoproteínas:

Se realizó con amortiguador de acetato de amonio 10 %, pH 5.1 y etanol 96% (Baker) (6:4/g de polvo), en presencia de Phenyl-methyl-sulphonyl fluoruro (PMSF) al 0.02% y agitación enérgica durante 48 horas, a 5 °C, centrifugación a 8000 rpm (Refrigerated Centrifuge, Sorvall RC-5 Superspeed, rotor CGA) durante 30 min ; se recuperó el sobrenadante (S1) y el residuo (R1) se reextrajo de la misma manera, con lo que se obtuvo un segundo sobrenadante (S') y un residuo (R'). Este último se extrajo una vez más (por contener aún grumos), con agua desionizada, pH 5.5, en las mismas condiciones ya descritas: S acuoso y R acuoso.

Precipitación etanólica:

A cada uno de los sobrenadantes (S1, S1' y S acuoso) de las correspondientes centrifugaciones se le ajustó el pH a 5.1, se midió el volumen (del extracto proteico) y se agregaron dos volúmenes de etanol 96%, gota a gota y con agitación magnética. Cuando se terminó de agregar el etanol la agitación magnética de la solución se prolongó por 30 minutos más y se dejó en reposo en el cuarto frío (5°C) durante 48 horas. El sobrenadante del precipitado blanco encontrado se sifoneó y el precipitado se separó por centrifugación (8000 rpm); Su escaso sobrenadante se agregó al volumen sifoneado. El precipitado se dializó contra una

solución de bicarbonato de amonio ($\text{NH}_4 \text{HCO}_3$) 0.05M, pH 8.5 por otras 24 horas, con cambios cada 8 horas; después, contra agua desionizada por otras 24 horas y se liofilizó. Este producto es el extracto glicoproteico (Glp-1, 2 y 3:acuoso), que contienen principalmente la FSH, LH y TSH. El volumen total del sobrenadante se ajustó a pH 5.1, y se le agregaron simultáneamente 10 ml de acetona fría y 1 ml de solución de NaCl 5.0 N por cada 25 ml de sobrenadante y se dejó en reposo x 24 horas, al cabo de las cuales el precipitado (NaCl-1, 2 y 3) se dializó con agua, se liofilizó y se conservó a 5 grados centígrados. Estos productos que antes desechaban en el procedimiento ahora están en estudio en el laboratorio. La figura 2 presenta el resumen de todo el procedimiento.

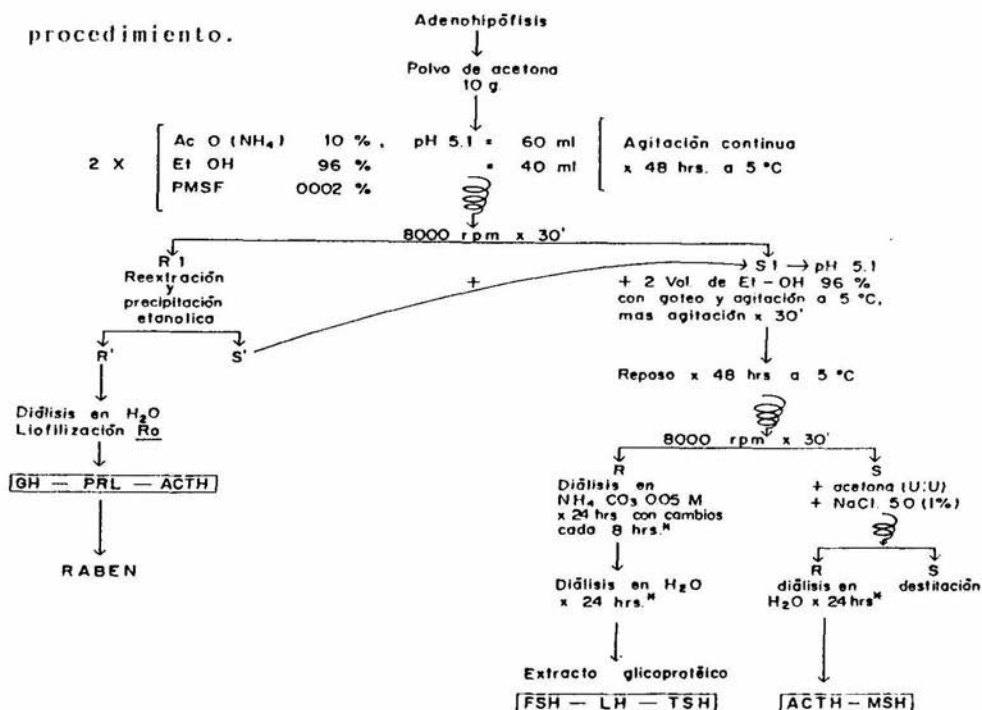


Figura 2: Extracción de la bFSH.

Purificación y separación de las glicoproteínas:

Los extractos glicoproteicos 1 y 2 se mezclaron; 700 mg de esta mezcla se disolvieron en 10 ml de acetato de amonio (AcONH_4) 0.005 M, pH 5.1 y se dializaron durante la noche en la misma solución y se aplicaron al día siguiente en una columna (4.5 x 39.3 cm), empacada con CM-Celulosa (Sigma), previamente activada y equilibrada con la misma solución de la diálisis. La elución se hizo con un gradiente discontinuo de pH y fuerza iónica: AcONH_4 0.005 M, pH 5.1; AcONH_4 0.1 M, pH 6.8 y AcONH_4 1.0 M + Glicina 0.1 M, pH 9.5. en dos veces el volumen del lecho efectivo de la columna (625 ml); se colectaron fracciones de 5 ml (Colector Eberbach), con una velocidad de flujo de 6 gotas por minuto.

Las fracciones obtenidas se agruparon y se dializaron contra bicarbonato de amonio ($\text{NH}_4 \text{HCO}_3$) 0.010 M, pH 8.5, luego con agua desionizada y se liofilizaron. Las fracciones no retenidas corresponden a la FSH. Los subsecuentes procedimientos se refieren solamente a estas fracciones.

Caracterización Físico-química

El patrón electroforético de la proteína y su correspondiente movilidad relativa (Rf) se realizaron con electroforesis analítica en gel de poliacrilamida (según Nicoll, 1971), a pH 8.3. Los pesos moleculares de las fracciones CM-1 y CM-3 se determinaron en electroforesis en gel de poliacrilamida y en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), en condiciones no reductoras y reductoras (2-beta mercaptoetanol al 1 %), según la técnica de Laemmli (1970).

Caracterización biológica:

La actividad biológica de las fracciones CM-1ab y la CM-1c se determinó en ratas prepúberes (22 a 23 días de edad) con el aumento del peso de los ovarios (Steelman & Pohley, 1953) bajo la acción de una dosis total de 2, 4 y 8 ug de cada uno de los productos, aplicadas cada 24 horas en 0.5 ml de solución salina y en presencia de 25 U I de hCG (gonadotropina coriónica). Un grupo control que sólo recibió solución salina. Cada grupo formado por cinco animales. Ya que no se disponía de un estándar, se utilizó la FSH porcina (pFSH) (Biotec. Lab), contenido del frasco, cuya actividad se define como equivalente a 50 mg de la de Armour, la que analizada correspondió a 1.35 U/ mg de polvo. La potencia biológica de los productos se determinó entonces en ensayos balanceados de 3 + 3 y con un análisis de varianza para los tratamientos, las preparaciones, la regresión, el paralelismo, la curvatura y la curvatura opuesta. Después de graficar los resultados, si no había un completo paralelismo para las tres dosis, la potencia se obtenía con el ensayo balanceado de 2 + 2, utilizando las respuestas que sí tuvieran paralelismo. El análisis estadístico se hizo mediante un programa manual (Figuras 3 y 4), de los que se utilizan regularmente en el laboratorio, en lugar de los programas estadísticos de computación, los cuales son muy rápidos, pero nada dicen de la contribución que cada parámetro del bioensayo tiene en el resultado final. Los resultados se expresaron como la potencia en unidades Armour con límites de confianza del 95 %. Otra forma de expresar la actividad biológica de los dos productos fue referirla en porciento de la

CONTROL	ESTANDAR		PROBLEMA	
	S ₁	S ₂	U ₁	U ₂
DOSIS				
TOTAL				
C	W	X	Y	Z
Efecto en % $100 \times (C/A)$				

BIOENSAYO 2 + 2 BALANCEADO

tipo: fecha: n° sec:

n° de animales/grupo n = _____ I = $\log (s_1/s_2) =$ _____

actividad del estándar A = $\frac{mU}{\mu g}$ B = $\sqrt{s_1 s_2 / U_1 U_2} =$ _____

D = $W \cdot X - Y \cdot Z =$ _____ Q = $(\sum T)^2 / 4n =$ _____

E = $W \cdot Y - X \cdot Z =$ _____ H = $\sum T^2 / n =$ _____

F = $W \cdot Z - X \cdot Y =$ _____ K = $\sum X^2 =$ _____

ANALISIS DE VARIANZA						
Fuente de Variación	grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P	
Tratamientos	3	N = H - Q = _____	N/3 = _____			
Preparaciones	1	D' = D ² /4n = _____	D' = _____			
Regresión	1	E' = E ² /4n = _____	E' = _____			
Paralelismo	1	F' = F ² /4n = _____	F' = _____			
Error	4(n-1) = 16	R = Q - N = _____	S ² = _____			
Total	4n-1 = 19	O = K - Q = _____		F(3, 16) = 3.24		

$t = t_{0.05, 4(n-1)} =$ _____

$L = \left(\frac{1}{b} (1-g) \right) \sqrt{\frac{S^2}{n} \left[\left(\frac{D}{E} \right)^2 + (1-g) \right]}$

M = DI / E = _____

M₁ = M - L = _____

M₂ = M + L = _____

Pendiente combinada, $(-E)/2nI =$ _____

Varianza de la pendiente: $S^2/nI^2 =$ _____

Criterios de validez: $\left\{ \begin{array}{l} S/b = \lambda = \dots \\ I^2 v(b)/b^2 = g = \dots \end{array} \right.$

Potencia relativa del problema: $AB \cdot 10^M =$ _____

Intervalo de confianza: $\left\{ \begin{array}{l} AB \cdot 10^{M_1} = P_1 = \dots \text{ mU/}\mu\text{g} \\ AB \cdot 10^{M_2} = P_2 = \dots \text{ mU/}\mu\text{g} \end{array} \right.$

Figura 4.- Bioensayo 2 + 2 balanceado

Otra demostración de la actividad biológica de la bFSH fue la constancia fotográfica del efecto de la hormona sobre el crecimiento folicular de los ovarios de las ratas Wistar, prepúberes, en presencia de hCG.

La concentración de proteínas en cada una de las fracciones obtenidas a través del procedimiento se determinó con la técnica colorimétrica de Hartree (1972), la cual es una modificación de la de Lowry (1951).

Las fracciones CM-1ab y CM-1c se envasaron en alícuotas de 4 ml, se liofilizaron y se sellaron al vacío en liofilizador Labconco 5 (Tray Dryer) y se almacenaron a 5°C.

b).-Observación de la conducta sexual de los cocodrilos durante el periodo reproductivo en cautiverio.

La segunda fase se llevó a cabo desde el 4 de junio al 30 de septiembre de 1990, la cual correspondió a la observación del comportamiento de los cocodrilos adultos en la época reproductiva. Esta parte experimental se realizó en el criadero de cocodrilos de Profauna A. C., el cual se encuentra localizado a la altura del kilómetro 30 de la carretera que va de Playa del Carmen a Can Cún en el Estado de Quintana Roo. Contaba hasta julio de 1990 con 256 crías, 75 juveniles, 15 semiadultos, 25 hembras adultas y 6 machos adultos y para la realización de esta tesis, se trabajó únicamente con los animales adultos.

Las hembras y los machos adultos se encuentran en un acuaterrario de 30 metros de diámetro, dividido en 5 secciones; cada sección cuenta con 5 hembras y un macho. El acuaterrario está diseñado de la siguiente manera: es de forma circular, con estanque en la parte central, fraccionado con esclusas. Cada sección del estanque presenta diferentes profundidades, que llegan hasta un metro, y cada una tiene un desagüe (el desagüe se encuentra en el nivel más bajo de la sección). A cada lado de los estanques se encuentran los terrarios que presentan arbolado natural y que proveen zonas de sol y de sombra. Cada sección está

dividida por concreto en la base, con una altura de 10 cms, continuado por una malla de alambre ciclónica, de 1.60 m de altura (dando una altura total de 1.70 m). Existe un puente hacia el sur y una zona libre en la parte central, dentro de la cual se localiza un pequeño observatorio apropiado para examinar la actividad de los cocodrilos a cualquier hora del día. Cada sección cuenta con puertas hechas con mallas de alambre, las cuales dan hacia la zona libre; éstas se hicieron con el fin de poder sacar los animales enfermos, agresivos, o para sacar los huevos que serían incubados después (Ver figura 5).

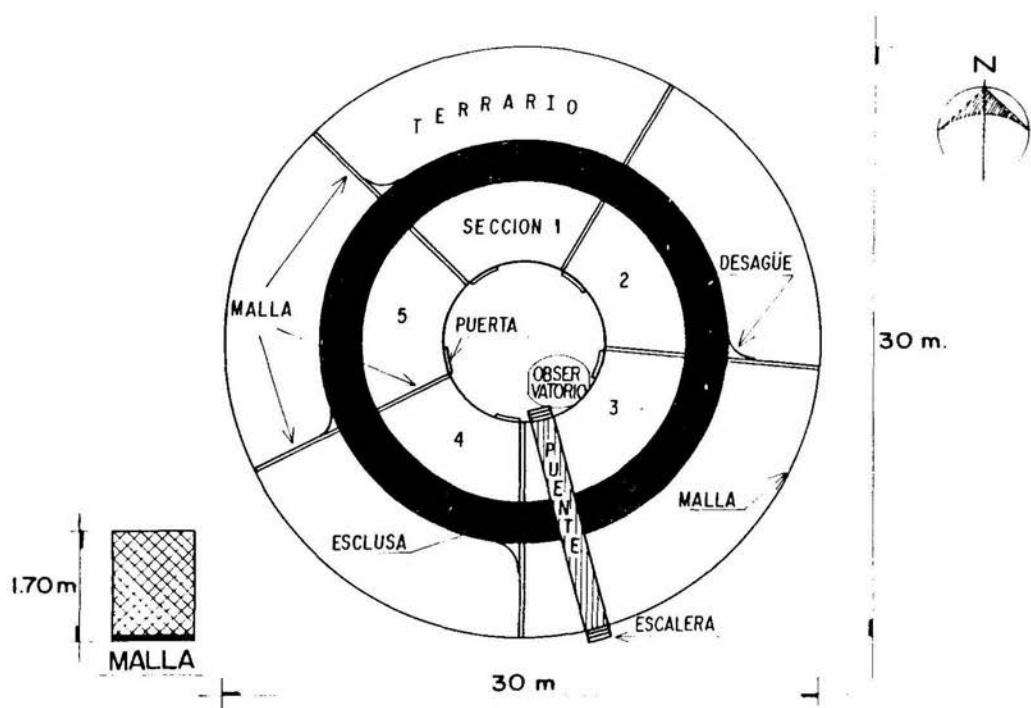


Figura 5.- Diseño del acuaterrario propiedad de PROFAUNA en Puerto Morelos.

A los adultos se les alimentó generalmente 2 veces por semana, aunque en ocasiones fue 1 sola vez. El alimento era a base de pescado que se obtenía de las pescaderías de la ciudad de Can Cùn, la cual se localiza a 37 kilómetros del criadero. El agua se cambiaba generalmente cada semana en cada estanque y era bombeada de un cenote que se encuentra a unos 60 metros del acuaterrario.

Para tener antecedentes observacionales del comportamiento de los cocodrilos en cuanto a su conducta sexual, se hicieron observaciones del 1 de junio al 14 de julio de 1990; diurnas (3 a 4 veces) y nocturnas (2 a 3 veces) a la semana, utilizando de 8 a 12 horas por observación.

Además de esta metodología de observación en el período de actividad sexual, durante la nidación los huevos se retiraron de los nidos el 7 de julio, con la finalidad de que las cocodrilas, al interrumpir su conducta normal de nidación, tuvieran al menos tres semanas de descanso antes de la aplicación de la bFSH. Debe señalarse que esta conducta (el retirar los huevos antes de la eclosión natural) es habitual en la granja, debido a que se tiene la experiencia de que se aumenta la producción de crías cuando se incuban artificialmente. Los huevos se sacaron de sus nidos para ponerlos en cámaras de incubación, las que se diseñaron de la siguiente manera: en cajas de poliestireno de 30 cms de ancho, por 40 cms de largo, por 30 cms de altura. Se les puso una capa de tierra de unos 8 cms de espesor; cuando los huevos se sacaron de los nidos fueron puestos

en estas cajas con la misma colocación que tenían en el nido. Los huevos se colocaron en hileras, separados 2 cms uno de otro y se cubrieron con otra capa de tierra de unos cinco centímetros de espesor. Se rociaron con agua y por último se taparon las cajas y se metieron a un cuarto cerrado para evitar la depredación. Además las cajas presentaban dos agujeros (uno de cada costado) en la parte superior que quedaba libre, para que existiera ventilación dentro de la cámara (Ver figura 6).

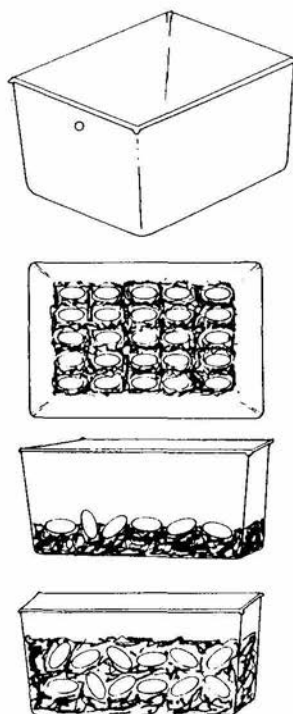


Figura 6.- Diseño de las cámaras de incubación para los huevos de cocodrilo

c).- Efecto de la bFSH en el cocodrilo de pantano en cautiverio

La aplicación de (bFSH) se efectuó el 28 de julio de 1990, ya que se pensó que 3 semanas eran suficientes para que los niveles de las hormonas involucradas en la nidación regresaran a sus niveles basales para aprovechar así el periodo de agosto y septiembre, en que los parámetros climáticos (pluviosidad, humedad, fotoperiodo y temperatura), aún son propicios para el pleno desarrollo del cortejo, cópula y nidación del Crocodylus moreletii.

Los animales fueron capturados mediante una pértiga, la cual es un vara de madera resistente, de preferencia hecha al torno, o en su defecto cortada al natural, de un grosor de 6 cms de diámetro por 250 cms de largo, todo esto para evitar que los cocodrilos se puedan romper sus colmillos al morderla. Esta pértiga presenta al final un lazo de alambre de 0.50 cms de diámetro por 150 cms de largo, terminando en una soga.

La pértiga se usa de la siguiente manera: se hace una lazada del diámetro requerido según el tamaño del cocodrilo. Se toma el primer tercio de la pértiga con ambas manos y separadas 0.5 m una de la otra. A continuación se le pasa la lazada al hocico del cocodrilo y ésta es recorrida hasta el cuello y en este momento es jalado fuertemente y sacado del estanque hacia tierra. Ya en tierra se le sigue tensando con la soga para no permitirle muchos movimientos bruscos, entonces una segunda persona le estira la cola y le empieza a recorrer sentado hasta llegar al cuello y sujetarle la mandíbula con las dos manos, presionándole a la vez con la yema de los dedos pulgares los párpados, e

inmediatamente le cierra la mandíbula con las dos manos; con estas acciones el cocodrilo queda prácticamente dominado.

Una tercera persona le amarra el hocico con ligas de hule (de 2 cms de ancho por 50 cms de largo, extraídas de cámaras de llantas). A continuación con un lazo de yute se amarran las cuatro extremidades hacia el dorso del animal (Cisneros; G, 1985). Es preferible que cuando los organismos superen los dos metros, que otra persona inmediatamente después de la segunda recorra hasta la mitad del dorso del cocodrilo sentado sobre éste, de tal manera que le cueste sumo trabajo al cocodrilo poder virarse. En este momento el cocodrilo se encuentra completamente inmóvil y disponible a ser fácilmente inyectado.

El sistema que se ha utilizado en la granja para tener un control acerca de los animales es el utilizado por Whitaker (1978), y Ferner (1979). Este sistema consiste en cortar, de preferencia con una navaja hasta el tercio de las crestas o queles que corren en los cantos de la cola y que finalmente se reducen a una sola hilera en el tercio distal. Para enumerarlos se sigue un código preestablecido en el cual se toman las crestas del lado derecho del animal como unidades, las crestas del lado izquierdo como decenas y las crestas finales como centenas. Después de efectuar el corte es indispensable aplicarles un desinfectante.

De acuerdo a lo establecido por Licht y colaboradores (1977), la aplicación de las hormonas se debe hacer por vía intramuscular para que el efecto sea paulatino, y analizando las dosis que se han utilizado en los programas de superovulación que

otros autores han utilizado con FSH porcina en vacas, se concluyó que la dosis de 0.06 mg/Kg de peso era una dosis óptima, aplicada por vía intramuscular.

Se eligieron dos secciones: la sección 1 y la sección 2, cada una de las cuales contenía 1 macho y 5 hembras; a la sección 1 se le denominó Lote 1 y a la sección 2 se le denominó lote 2. Posteriormente los cocodrilos adultos fueron capturados y pesados en una báscula para pesar costales con una capacidad de 100 kg. A continuación se les inyectó bFSH vía intramuscular, en la región ventral de la cola a 20 cms después de la cloaca. Considerando que los cocodrilos son de diferente Clase y escala evolutiva a los mamíferos, propusimos aplicarles la mitad de la dosis normal, la dosis normal y el doble de la dosis normal ante la cual ha tenido efecto la pFSH en vacas. De tal manera que el esquema de dosificación de la bFSH resultó de la siguiente forma:

A una hembra de cada lote se le aplicó una dosis de 0.03 mg de hormona por kilogramo de peso; a la segunda hembra de cada lote se le administró 0.06 mg; y la tercera de cada lote recibió 0.12 mg de hormona por kilogramo de peso. Cada una de las hembras inyectadas de cada lote se marcó con pintura de aceite blanca en la base del cráneo, con 1 punto, 2 puntos y 3 puntos respectivamente, para poder identificarlas rápidamente, sobre todo durante las observaciones nocturnas.

A un macho (a) se le aplicaron 0.06 mg de bFSH por kilogramo de peso, mientras que al otro (b) no se le administró hormona, para que sirviera como testigo.

Hasta aquí se hablan utilizado 15.18 miligramos de bFSH y

como el Banco de Hormonas Proteicas de Origen Animal donó 16 mg, la hormona restante se le aplicó a otra hembra de la sección 1 y se le marcó así (☐). La aplicación de la bFSH quedó esquematizada de la siguiente manera:

En el lote No. 1 quedó una hembra testigo (A) a la que no se le aplicó hormona, mientras que en el lote No. 2 dos hembras sirvieron de testigos (A,B), a las cuales no se les aplicó hormona.

SECCION 1

#	Marca	Peso (Kg)	Dosis/Kg (mg)	Dosis/peso (mg)
28	•	44	0.03	1.32
68	• •	35	0.06	2.10
45	• •	17	0.12	1.90
14	☐	27	0.03	0.81
59	a	68	0.06	4.00
71	A			

SECCION 2

#	Marca	Peso (kg)	Dosis/Kg (mg)	Dosis/peso (mg)
12	•	35	0.03	1.05
33	• •	30	0.06	1.80
23	• •	26	0.12	3.10
65	b	53		
8	A			
11	B			

La bFSH se diluyó en 3 mililitros de cloruro de sodio al 0.9 % y se aplicó con jeringa de 5 ml con aguja del No. 22 de 2 pulgadas de largo.

Se observó a los cocodrilos durante 3 a 4 días y 2 a 3 noches por semana, con periodos de 8 a 12 horas, durante 25 días. Cualquier cambio de su actividad al aplicarles la hormona se registró en un esquema de cuatro fases, el cual se realizó después de haber observado a los cocodrilos durante la etapa reproductiva. Puesto que en la actualidad no existe un etograma, se pensó que un esquema de dicha naturaleza facilitaría la posterior interpretación de los resultados. Dicho esquema comprende cuatro fases de conducta de celo: Fase A = (sin cambio); Fase B = (inquietud); Fase C = (cortejo) y Fase D = (cópula).

Fase A Sin cambio, comprende dos subfases:

Tranquilidad: Comprende la completa calma del animal; sus movimientos son únicamente para obtener su alimento, adentrarse al agua o salirse del estanque. Esta calma se observa cuando están en nidación o en inactividad sexual.

Rechazo: Se acerca el cocodrilo macho con la intención de cortejar a la hembra y ésta alza su hocico con actitud agresiva, indicando al macho que no se encuentra receptiva. Puede morder al macho o alejarse de éste.

Fase B: Inquietud , Comprende cuatro subfases:

Poca inquietud:Sus movimientos son algo más constantes que en la fase A, entran y salen al agua más veces de las habituales. Cambian constantemente de posición; su inquietud es notoria.

Mucha inquietud:Su inquietud es muy notoria;están muy alertas a cualquier movimiento del macho.

Mirada constante de las hembras hacia donde se encuentra el macho.Las hembras dirigen su mirada continuamente hacia donde se encuentra el macho,actitud que realizan cuando están receptivas.

Algún movimiento del macho y atención de las hembras hacia él:
El macho realiza algún movimiento e inmediatamente las hembras dirigen sus miradas hacia donde se localiza el macho, como si estuvieran esperando el momento de que el macho tome la iniciativa de cortejo.

Fase C: Cortejo, comprende 5 subfases.

Huida de la Hembra al cortejarla el macho. El macho se acerca con la intención de cortejar a la hembra, y ésta al darse cuenta, opta por huir del macho.

Acercamiento del macho con actitud de cortejo e indiferencia de la hembra:El macho se aproxima hacia donde se encuentra alguna hembra y ésta no presta ninguna atención al macho; es decir, la hembra no muestra interés por cortejar con el macho (no está receptiva).

Intentos de ataque o ataque de la hembra por cortejarla el macho.
El macho se aproxima y comienza a cortejar a la hembra, ésta

responde con actitud defensiva abriendo el hocico en actitud amenazante, o mordiendo al macho.

Acercamiento del macho con actitud de cortejo y ocurren las hembras a su encuentro: El macho, realizando pautas de cortejo, se acerca a donde se encuentra(n) la(s) hembra(s), y ésta(s), al observar ésto, acude(n) (algunas) al encuentro del macho.

Frotamiento de cuellos:Tanto las hembras como el macho frotan varias veces sus cuellos.

Fase D: Còpula

Monta: El cocodrilo macho monta a la hembra acomodándose para insertar el pene.

Còpula: El macho inserta su pene en la cloaca de la hembra y ambos deambulan por el estanque.

RESULTADOS

Obtención de la FSH bovina.

Los rendimientos y la concentración de proteínas de los productos obtenidos en el procedimiento total se muestran en la siguiente Tabla No. 1

RENDIMIENTO Y CONCENTRACION DE PROTEINAS DEL LOTE 6 BOVINO.

Productos:	Polvo (mg)	[Proteínas] (ug/mg)
Adenohipófisis	535	
Peso (g)	417	
Peso de 1 adeno. (mg)	779	
Polvo de Acetona (g)	143	
1a Extracc. (ml)	925	
2a Extracc. (ml)	1340	
3a Extracc. (ml)	650	
Glicopr.-1	536	640
Glicopr.-2	176	600
Glicopr.-3	53	320
Pptdo. S del 1	78	513
Pptdo. S del 2	154	567
Pptdo. S del	12	553
Ro	102	

Tabla 1.- El rendimiento de los extractos glicoproteicos a partir del polvo de acetona es de 765 mg (0.534%). El del precipitado del sobrenadante (s) de los extractos glicoproteicos es de 244 mg (0.17 %). El residuo final (Ro) es muy escaso. En total se obtienen 909 g de productos crudos con actividad hormonal, a partir de 143 g de acetona, lo que corresponde al 0.636%.

El patrón cromatográfico a partir de los primeros dos extractos glicoproteicos en una columna de CM-Celulosa; se observa en la siguiente Figura:

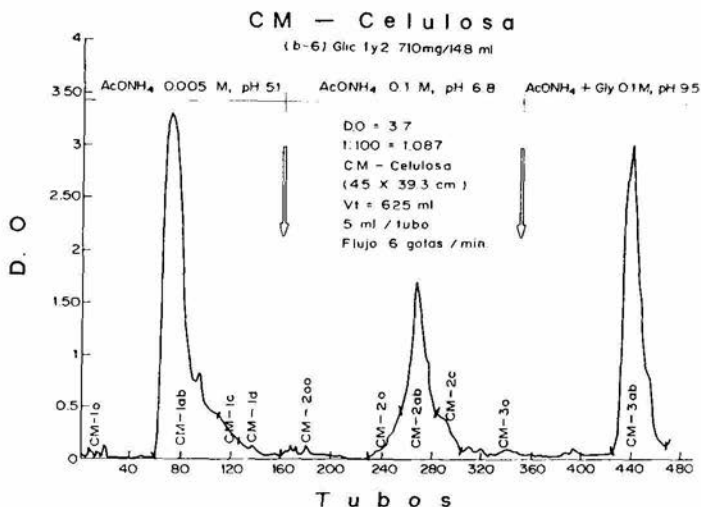


Figura 7.- Patrón cromatográfico de 710 mg de Extracto Glicoproteico a partir de una columna de intercambio catiónico, (Carboximetil celulosa), cuyas características (de la columna) aparecen en el centro. D.O. = Densidad óptica a 280 nanómetros.

Los rendimientos y concentración de proteínas de los productos obtenidos en la cromatografía de intercambio catiónico se observan en la siguiente tabla:

Productos	Polvo (mg)	[Proteínas] (ug/mg)
CM-1o	1.25	283
CM-1ab	26.80	150
CM-1c	9.04	60
CM-1d	32.20	283
CM-2o	6.1	256
CM-2ab	72.3	60
CM-2c	19.6	145
CM-3o	7.5	
CM-3ab	70.1	610
CM-3c	21.6	
CM-3d	7.8	

Tabla 2.- Rendimiento de las tres fracciones separadas en CM-Celulosa, a partir de 710 mg de extracto glicoproteico: el de CM-1 es 69.29 mg (9.759%); el de CM-2 es 98 mg (13.8%); el de CM-3 es de 107 mg (15.07%). El rendimiento total es de 274.29 mg (38.63%);

CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DE LOS PRODUCTOS

Electroforesis TRIS-PAGE al 7%, pH 8.3.

La movilidad relativa de las 3 bandas de proteína correspondientes a la CM-1ab fue: 0.53, 0.66 y 0.76 y para la CM-1c, las movilidades fueron de: 0.55, 0.66 y 0.77, según se puede observar en la figura 8.

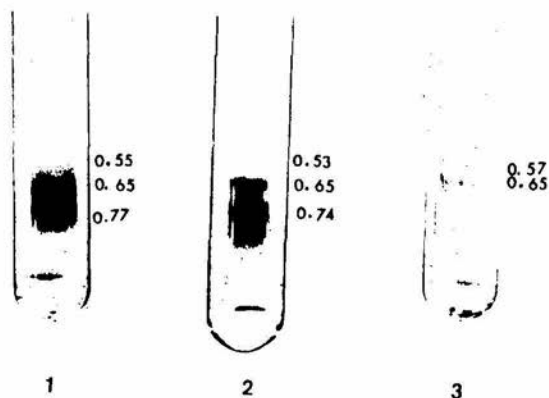


Figura 8.- Patrón electroforético y movilidad relativa de los productos de la cromatografía en CM-Celulosa del extracto glicoproteico. 1).- CM-1ab con manitol; 2).- CM-1ab sin manitol y 3).- CM-1c

Electroforesis SDS-PAGE
Condiciones no-reductoras.
Pesos Moleculares

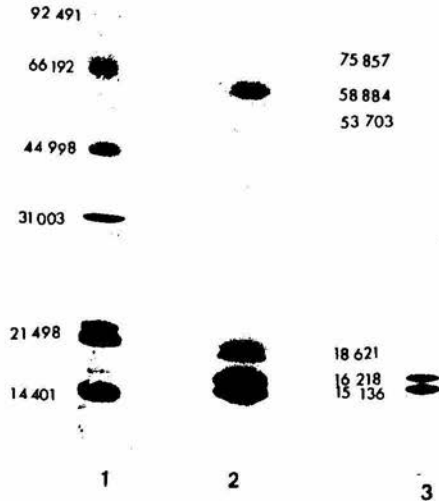


Figura 9.- Electroforesis SDS PAGE en condiciones no reductoras: 1).- Proteínas marcadoras; 2).- CM-1ab con manitol; 3.- CM-1ab sin manitol; Las bandas de la CM-1c no se observaron en la foto, únicamente en el gel recién teñido y los pesos moleculares fueron: 78432, 63096, 47000, 18621, y 16218.

En la figura anterior, tanto en la CM-1ab con manitol y CM-1ab sin manitol, así como en la CM-1c, se advierte que hay formas probablemente agrupadas (las mayores de 50000); las de 18000 o menores pueden corresponder a las subunidades o fragmentos de la hormona. En ninguno de los productos hay una forma molecular con el peso esperado de un monómero (+- 34000 a 36000 daltones), como lo han informado otros investigadores. Los pesos moleculares de la CM-1c observados en el gel son 78432, 63096, 47000, 18221 y 16218.

Electroforesis SDS-PAGE
 Condiciones reductoras
 (2-beta-mercaptoetanol, 1 %)
 Pesos moleculares

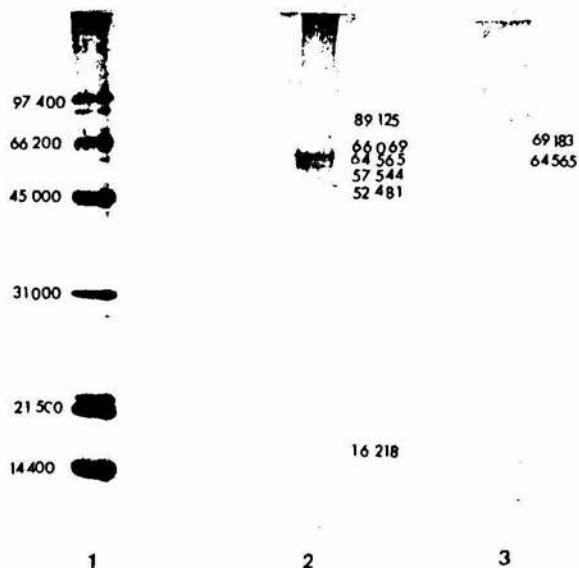


Figura 10.- Los pesos moleculares de la CM-1ab y la CM-1c, en SDS PAGE en condiciones reductoras (2-beta-mercaptoetanol 0.1%). Todas las formas moleculares aumentaron de tamaño en ambos productos; sólo permaneció la de 16218 en la CM-1ab.

Tabla J. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CM-1ab Y CM-1c EN PRESENCIA DE HCG.

La actividad biológica de los componentes más importantes de la fracción considerada como FSH en el bioensayo fue de:

 CM-1ab: 0.0027 - 0.548 - 110.023 (2 + 2) vs pFSH Armour.

CM-1c: 0.0207 - 0.839 - 33.926 (3 + 3) vs pFSH Armour.

Esta misma actividad expresada en porciento de la actividad del control (13.87 mg) fue de:

Producto:	(pFSH)		(b-6) CM-1ab		
Dosis:	12	24	2	4	ug prot.
% de aumento del peso de los ovarios	140	194	6	29	

Producto	(b-6) CM-1c		
% de aumento del peso de los ovarios	44	70	100

RESULTADOS

Del comportamiento Reproductivo.

Las observaciones acerca del comportamiento reproductivo se iniciaron el 4 de junio de 1990. Durante ese mes los cocodrilos se encontraban en plena actividad sexual: las cinco secciones presentaban gran cantidad de cópulas, los machos copulaban con una o varias de las hembras de su respectiva sección. Hacia las dos últimas semanas de junio la actividad copulatoria fue disminuyendo, terminando hacia la primera semana de julio; la última cópula se observó el 2 de julio.

Los apareamientos ocurrieron muy a menudo en todas las secciones. En total se lograron registrar 64 eventos de cortejo, culminando éstos en 42 cópulas; unas secciones mostraron mayor actividad que otras.

El cortejo se iniciaba generalmente cuando el macho se introducía al agua profiriendo bufidos (éstos podían ser de diferente intensidad), tratando de llamar la atención de las hembras, las cuales podían encontrarse, ya sea en el agua o en tierra. Los bufidos los emitía casi con el hocico cerrado a ras de la superficie del agua, levantando un leve burbujeo entre sus fosas nasales, mientras se dirigía hacia la hembra.

La hembra generalmente ponía atención cuando el macho profería los bufidos y volteaba hacia él, o esperaba a que el macho se acercara, todo esto siempre y cuando la hembra estuviera

en completa receptividad para ser copulada. El macho casi siempre deambulaba por el agua de unos cuantos segundos a varios minutos antes de acercarse a la hembra, comunmente levantaba la cabeza casi en posición vertical, inflaba la garganta, encorbaba el cuello y golpeaba bruscamente la superficie del agua con mandíbula y cola simultáneamente, a la vez que cerraba duramente el hocico emitiendo un rugido; todo esto producía un fuerte sonido parecido a un chasquido (Ver Fig 11').

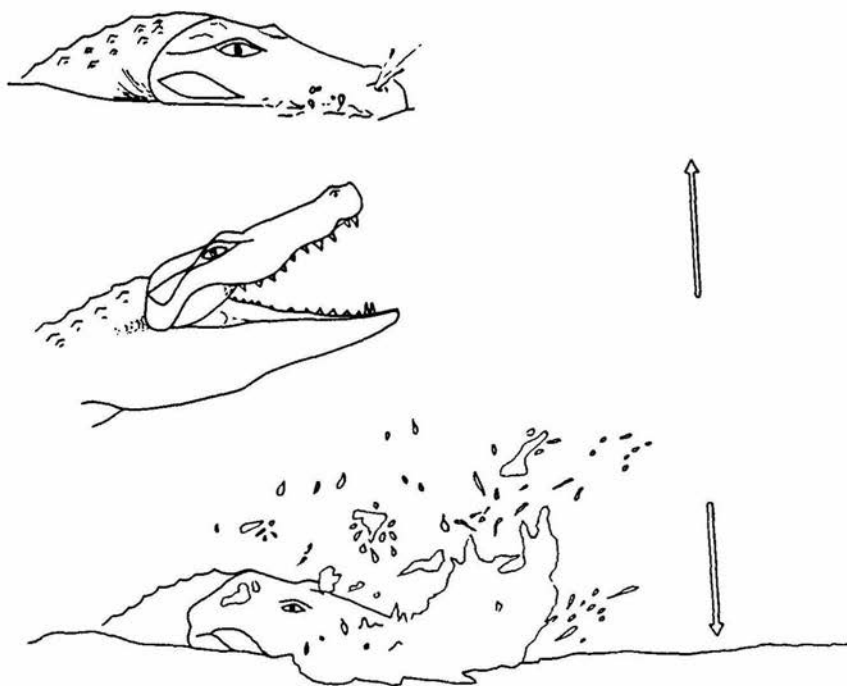


Figura 11.- Forma de cortejo del cocodrilo de pantano.

Esta actitud la podían repetir de una a tres ocasiones. Luego el macho se sumergía y salía en varias ocasiones; cada vez que

salia lanzaba al aire un chorro de agua por los orificios nasales produciendo un leve bufido.

Continuaba en su intento entonces en busca de la hembra, aunque en ocasiones la hembra ocurría al encuentro del macho tan pronto éste mostraba actitud de querer copular. El macho se aproximaba suavemente hacia un costado de la hembra, si ésta no se hallaba receptiva abría el hocico amenazante y se alejaba; otras veces la hembra se escabullía por debajo del agua o nadaba hasta salir a tierra. Si la hembra lo aceptaba, levantaba casi verticalmente la cabeza (la hembra) fuera del agua en símbolo de sumisión y comenzaba un mutuo frotar de cuellos (Ver Fotografía 1 y figura 12)



Fotografía 1.

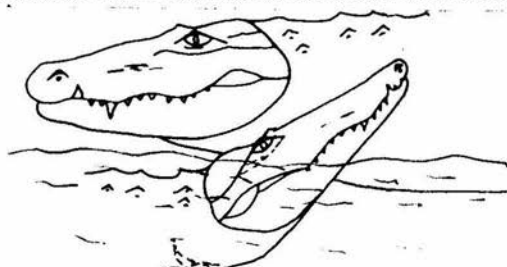


Figura 12.-Frotamientos de cuellos entre hembra y macho de C. moreletti

En ese momento el cuello del macho estaba a mayor altura que el de la hembra. Esto generalmente se acompañaba de unos suaves bufidos producidos del macho por la expulsión de agua por las fosas nasales, aunque en algunas ocasiones la hembra profería leves bufidos cuando ambos se frotaban. En seguida el macho podía dar una a dos vueltas en torno a la hembra y la montaba recorriéndola desde la cola hasta el lomo; luego el macho seladeaba, facilitando con esto la torsión necesaria para la inserción del pene, la sujetaba fuertemente con las cuatro patas e introducía el pene dentro de la cloaca de la hembra.

Ocurrido esto, la pareja fuertemente abrazada comenzaba a deambular por el agua y luego se sumergía; después de varios segundos o minutos ambos asomaban el lomo en la superficie o sacaban el hocico para respirar, aunque en ocasiones el único que salía a respirar era el macho, sin importarle aparentemente si la hembra lo hacía o no; ésta salía a respirar realmente cuando era muy necesario. Al término de la cópula el macho soltaba a la hembra y cada cual se dirigía a descansar por su cuenta.

Propiamente la cópula duraba de 2 a 4 minutos, el tiempo mínimo utilizado en realizarla fue de 35 segundos y el máximo de 6 minutos con 15 segundos. Es notable que el macho del lote 1 presentó en dos ocasiones un intervalo de 1 minuto y 30 segundos entre una cópula y otra, además de que tuvo entre 6 y 8 cópulas por noche en dos ocasiones. El mayor número de cópulas se realizó durante la noche, de las 22:00 a las 24:00 horas y de 02:30 am a las 06:00 am.

No siempre que algún macho mostraba todos los patrones de conducta antes mencionados era evidencia de que podría copular con la hembra elegida, ya que en algunas ocasiones exhibían toda la actitud de querer y poder copular, y sin embargo lo máximo que lograban alcanzar era montar a la hembra; ésta, al ver que no la penetraba el macho, optaba por zafarse de éste y alejarse. No obstante en tres ocasiones se observó que la hembra, después de alejarse, se mantenía a la expectativa de que el macho volviera con la iniciativa de querer y poder copularla. A veces, antes de copular, el macho y la hembra deambulaban por el agua de 2 a 5 minutos en promedio, con uno que otro frotamiento, que luego se volvían más constantes.

Aparentemente, los machos no copulaban al azar, porque mostraron preferencia hacia ciertas hembras para realizar las cópulas, ya que en el momento en que el macho tomaba la iniciativa para copular con alguna hembra, al hacer notar que se encontraba en plena capacidad de aparearse, éste aun a pesar que una o dos hembras acudían a él o le mostraban que ellas se encontraban receptivas, no escatimaba en llegar a la hembra elegida y empezar el cortejo. Iniciado el cortejo, en ocasiones alguna hembra interfería durante la realización de éste, pero generalmente ni el macho ni la hembra la consideraban, por lo que la hembra intrusa optaba por dejar a la pareja; aunque algunas veces el macho si mordía a la intrusa. Cuando esta hembra elegida no se encontraba receptiva, obviamente rechazaba al macho y éste tomaba la alternativa de elegir otra hembra receptiva, y en ocasiones terminaba copulando con ésta.

En algunas ocasiones utilizaron otra forma de atracción hacia las hembras como era el quedarse flotando y mover continuamente la cola de un lado hacia el otro, sacando la cabeza; o también hacia esto avanzando sobre la hembra elegida. En otras ocasiones sacaba la cabeza, levantaba un poco el lomo y arqueaba la cola, y deambulaba por el agua expulsando chorros de agua por la nariz (Ver Fig. 13).



Figura 13. C. moreletii expulsando agua por la nariz

En una ocasión una hembra inició el cortejo. Esta sin motivo alguno se acercó al macho y comenzó a frotar su cuello con la cabeza del macho, éste hizo lo mismo con la hembra y el cortejo culminó en cópula.

Resultó evidente que cada vez que un macho rugía fuertemente en pos de realizar una cópula, esto estimulaba a los demás machos, ya que instantes después contestaban con bufidos y se disponían a copular con alguna hembra de su sección y en ocasiones lo lograban. De esta manera, en ciertos momentos se pudieron observar de 2 a 3 cópulas conjuntas y en una ocasión se logró observar a cuatro machos copulando simultáneamente.

A veces sucedía que cuando algún macho copulaba con alguna

hembra, las otras hembras de su sección se mostraban en actitud de esperar al macho para que éste copulara con alguna de ellas, tanto así que algunas en ocasiones interferían durante el cortejo principalmente, y en una que otra ocasión la hembra que esperaba, minutos después copulaba con el macho.

Los machos, en algunas ocasiones, después de realizar varias cópulas, sallan del estanque profiriendo fuertes bufidos y se dirigen a descansar; a veces, después de copular continuaban los frotamientos o el macho se mantenía abrazado a la hembra durante algunos segundos.

Debe hacerse notar que únicamente al inicio de las primeras cópulas el macho realizó todos los ritos mencionados, pero más tarde, al continuar con sus cópulas, en ocasiones pasaba por alto muchas de estas pautas; a veces emitía un leve bufido y burbujeo por las fosas nasales, seguido del golpeo del agua con hocico y cola sin emitir el rugido. También hubo cortejos donde los machos no emitían el rugido fuerte, ni el golpeo del agua.

Hacia fines de junio la frecuencia de los apareamientos fue disminuyendo; las hembras mostraban menor receptividad, y aunque los machos las buscaban constantemente para copular, sólo lo conseguían ocasionalmente. A principios de julio la receptividad de las hembras había llegado a su término; los machos continuaban buscando a las hembras, pero al no obtener resultados, se producían pequeñas riñas entre macho y hembra cuando el macho persistía en querer copular; la pelea podía iniciarse dentro del agua y la hembra huía hacia la tierra perseguida por el macho,

hasta que lograba escapar de la persecución después de propinarle varias mordidas. Esta conducta se prolongó durante un par de semanas hasta que aparentemente los machos aceptaron la nula receptividad de las hembras.

La sección de mayor actividad fue la No. 1, en la que la capacidad de apareamiento del macho fue excepcional; ese macho realizó el mayor número de apareamientos por día, durante todo el periodo de observación. Dicho macho en etapa de celo, cuando las hembras se encontraban en plena receptividad, realizaba entre 3 y 6 cópulas, de las 7 pm a 6 am del otro día; mientras que los demás machos hacían de 0 a 3 cópulas en el mismo lapso. Como se mencionó antes, el mayor número de cópulas se realizó durante la noche. Se registraron pocas en las secciones 3 y 4, mientras que en las secciones 2 y 5, la actividad fue regular.

El día 5 de junio fue excepcional: a las 17:12 h el macho del lote 1 comenzó a cortejar a una hembra, aunque realmente no se observó si hubo o no cópula, y si es que la hubo fue muy rápida. 17:14, a esa hora estaba copulando realmente con la misma hembra; la cópula propiamente duró 2 minutos. 17:25 h con 30 segundos, montó a otra hembra y la cópula tardó alrededor de 45 segundos. Luego hubo calma y abandoné el lugar a las 18:15 h. De regreso alrededor de las 22:00 h el acuaterrario se encontraba en calma. A las 22:33 h el macho ingresó al estanque profiriendo bufidos y después del frotamiento de cuellos a las 22:36 h copuló con una hembra, concluyendo a las 22:41 h. Tres minutos más tarde nuevamente montó a la hembra anterior pero no se observó cópula como tal. 22:49 h, para entonces sí había evidencia real de que

copulaba con la hembra antes mencionada. A eso de las 23:03 nuevamente cortejaba a otra hembra, pero únicamente se vieron frotamientos de cuello y luego se separaron. 23:20 h, se observó una completa calma dentro del acuaterrario. 23:45 h, el macho de la sección 1 reanudó su actividad con bufidos fuertes, golpeó en una ocasión el agua, frotó su cuello con el de la hembra e intentó montarla pero no se llevó a cabo la cópula. A las 00:50 h del día 6 de junio el macho bufaba constantemente y a las 12:55 copuló con otra hembra y esto terminó a las 01:01 h. Como los bufidos en esa ocasión fueron bastante intensos tanto en el cortejo como en la cópula, varias hembras se acercaron, aparentemente con la intención de aparearse con el macho. 01:09, copuló con otra hembra durante dos minutos. 02:05, se realizó una nueva cópula por parte de este macho.

02:55: a esa hora se observó también algo interesante: un macho comenzó a bufar fuertemente y golpeó en tres ocasiones el agua e inmediatamente los demás machos (secciones 2, 3, 4, y 5), contestaron realizando lo mismo y comenzaron a cortejar con alguna hembra de su sección y terminaron 4 de los 5 copulando con ellas. Durante todo ese lapso de tiempo del que he hablado, también se observó copular de 1 a 3 veces a los machos de las demás secciones.

Otro día relevante fue el 7 de junio de 1990, en el cual el macho de la sección No. 1 (59), efectuó el siguiente número de cópulas y con la siguiente duración: Llegué a la zona a las 21:35 horas; a las 21:51 el macho inició la primera cópula que tuvo una duración de 5 minutos con 10 segundos. 10:08, inició la

segunda cópula y tuvo una duración de 2 minutos con 41 segundos. La tercera cópula la inició a las 10:13 con 31 segundos y concluyó a las 10:16 con 5 segundos . A las 10:21 el macho montó a una hembra pero no estoy seguro de si realmente la penetró, y a las 10:23 ambos se separaron. De las 10:25 con 11 segundos a las 10:26 con 54 segundos realizó otra cópula y las hembras, creo excitadas por observar al macho con bastante actividad copulatoria, se empezaron a acercar al éste, hasta una hembra que se encontraba nidando (45) también se acercó. 10:55, el macho comenzó a copular con otra hembra y la cópula duró 2 minutos con 5 segundos. Exactamente a las 11:06 con 30 segundos este macho copuló con la hembra que se encontraba nidando(45), tardando 4:30 segundos, y al término de la cópula el macho se resistía a soltarla. A las 23:26 el macho comenzó a cortejar a otra hembra pero no copularon. A las 11:55 se produjo una fuerte lluvia por lo cual tuve que abandonar el observatorio.

La hembra No. 45, que se encontraba nidando, antes de copular con el macho el día 7 de junio , el día 5 de junio se le observó cortejando con el macho, pero al acercarme para observar el apareamiento, la hembra volvió a su nido. Después de la cópula realizada el 7 de junio de 1990, esta misma hembra volvió a tener otra cópula el día 10 de junio con el macho de su sección (No. 59).

Generalmente los machos adultos eran los que se encontraban con mayor capacidad de apareamientos y los que al momento de cortejar a las hembras mostraban una conducta mucho más evidente.

En cambio, en los machos más pequeños, los bufidos y azotes con el agua eran más sutiles y menos evidentes, y muy a menudo no realizaban el azote de la quijada y la cola antes de iniciar algún cortejo; lo más evidente de estos cocodrilos de menor edad y tamaño fue la cópula. La actividad sexual de las hembras disminuyó primero que la de los machos, al menos durante esta estación reproductiva.

En cierta ocasión sucedió que una hembra se hallaba en el lugar de descanso del macho, el cual se encontraba muy cercano al nido de la hembra. El macho salió del agua y empezó con gestos agresivos, insinuándole que se alejara del nido; la hembra le contestó de la misma manera. Después de varios minutos de silencio, el macho comenzó a caminar acercándose hacia su estancia y la hembra optó por hacerse a un lado.

Un comportamiento notable fue que horas y minutos antes de iniciarse alguna lluvia en el área de estudio o cercana a ésta, los cocodrilos, tanto hembras como machos adultos, comenzaban a golpear con la quijada y la cola, al mismo tiempo que rugían (chasquido), lo que repetían varias ocasiones antes de que sucediera la lluvia. Este suceso se había observado en años anteriores en el criadero. (Cisneros, G. comunicación personal).

NIDACION

Es común en esta época que las hembras al cruzarse no se toleren y comiencen a reñir. Al inicio de la observación, casi

todas las hembras ya tenían sus pequeños territorios establecidos, no obstante algunas hembras no habían conseguido obtener un territorio, y momentos antes de acercarse el desove, desplazaron a hembras que ya habían desovado y que se encontraban cuidando los nidos. Cuando la hembra era de mayor tamaño que la que había realizado el nido, generalmente desplazaba a la dueña original. Cuando la dueña original era más corpulenta que la otra por lo general dejaba que la que se encontraba grávida desovara en su nido y una vez que observaba que ésta había concluido de desovar, inmediatamente la expulsaba del nido y ella terminaba tapando el hueco. No obstante, en algunas ocasiones, estas hembras "intrusas" al intento de realizar el hueco, sacaron a la intemperie varios huevos, los que en su mayoría resultaron fracturados o rotos.

Varias hembras, en su mayoría las más corpulentas, volvieron a nidar donde anteriormente habían realizado sus nidos, en lo cual requirieron de menor trabajo (al rehacer el nido); aparentemente, estas hembras habían delimitado su territorio desde años antes.

Generalmente, el sitio elegido por las hembras para hacer su nido era una área en la cual durante el día recibían cierta sombra y también sol. Algunas hembras realizaron un primer nido en el cual nunca desovaron; después hicieron un segundo nido donde sí depositaron sus huevos. La hembra No. 14 realizó su nido pero nunca desovó. La hembra No. 4 puso un huevo doble. Era muy común que en los nidos que realizaban las cocodrilas se encontraran también incubándose huevos de una pequeña lagartija denominada comúnmente tete (Basiliscus vitatus).

Las hembras no tenían hora para desovar; era común verlas desovando tanto en la madrugada como también a mediodía o en la noche. De 5 días a 2 días antes de la depositación de los huevos, las hembras comenzaban la labor de la formación del nido; excavando, rascando todo el material que se hallaba alrededor, valiéndose de sus patas traseras y en ocasiones de las delanteras. Realizaban tres o cuatro excavaciones con alguna pata trasera y continuaban con la otra, en ocasiones alternaban pata izquierda y mano derecha y viceversa; además a veces apoyaban la base del cuello para tener más fuerza en la excavación. La hembra trabajaba algunos momentos durante el día y otros en la noche. El material con que hicieron los nidos fue principalmente hojarasca, tierra, arena y piedras, y también zacate; aunque éste les fue proporcionado por no existir en el acuaterrario suficiente hojarasca. Una vez realizado el nido se colocaban sobre él o muy cerca de éste, y lo defendían cuantas veces fuera necesario.

El periodo que transcurría desde la realización del nido a la postura era de 1 a 4 días. Generalmente 30 minutos antes de la eclosión la hembra comenzaba a excavar un hoyo con las patas traseras, tratando de ahondarlo cada vez más. Generalmente el hoyo que excavaba tenía un promedio de 35 centímetros de profundidad. Realizado el nido, la hembra colocaba su cloaca exactamente sobre el hueco, arqueaba un poco el cuerpo de tal manera que utilizaba la cola como soporte. Los huevos emergían de la cloaca uno a uno, éstos eran recibidos por una pata trasera y aparentemente acomodados en el fondo. Cuando se estaba realizando el desove la hembra cambiaba de pata de apoyo para poder continuar

el desove; así seguía el desove hasta que terminaba por depositar el último huevo. Concluida la postura, la hembra con las patas traseras, empezaba a rascar el material que se encontraba a su alrededor y comenzaba a tapar el nido, y éste quedaba concluido (Figura 14). En seguida lo cubría con su cuerpo. De allí en adelante la hembra pasaba casi todo el tiempo encima o cerca del nido, no consintiendo a ninguna hembra que se acercase; solamente al macho si es que éste lo deseaba.



NIDO NORMAL

Figura 14. Nido de una hembra de C. moreletii .
En la parte central, se encuentran los huevos.

El primer desove ocurrió el 17 de mayo de 1990, y fue de la hembra # 14; el último se observó el 6 de julio del mismo año, de la hembra # 18. Se encontró un nido con doble nidada y esto resultó evidente porque se había observado que una hembra había podido desovar en el nido donde la dueña original ya había depositado sus huevos, además de que la disposición en la que encontraban los huevos así lo demostraba, dado que los huevos del primer nido habían sido localizados a un lado y por debajo del

segundo nido (Ver Fig. 15).

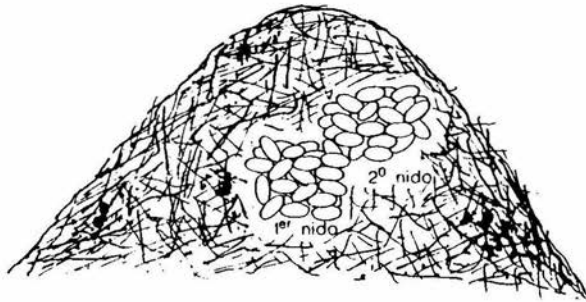


Figura 15. Nido con doble nidada de *C. moreletii* en el cual se observa la disposición de las dos nidadas

Un caso muy particular ocurrió con dos hembras de la sección # 5. Eran las 16:08 horas cuando la hembra # 13 se trató de posesionar del nido de la hembra # 22 pero ésta no lo aceptó y se enfrascaron en una muy brusca pelea, no logrando su objetivo la intrusa. Como consecuencia la hembra # 13 desovó a ras del suelo 18 huevos, 10 de los cuales resultaron fracturados y 8 aparentemente en buen estado y supuestamente sanos, por lo que más tarde se les puso en incubación. En apariencia, esa noche ambas hembras volvieron a enfrascarse en otra riña, dado que al otro día, durante la cotidiana inspección diurna, la hembra que había tratado de desovar en el nido de la otra hembra y que había desovado al aire libre; fue hallada muerta. El cuerpo presentaba múltiples mordidas y su piel se encontraba descascarada. Al

momento de sujetar la hembra muerta con la pértiga, para tratar de sacarla del acuaterrario para realizarle la necropsia, el macho de esta sección la aprisionó con el hocico con la intención de no dejar que lográramos nuestro objetivo. En dos ocasiones se arrojó hacia donde nos encontrábamos, pero rebotó en la malla de alambre. Minutos después logramos conseguir nuestro propósito.

En la necropsia, realizada por el MVZ Francisco Remolina, se determinó que había muerto por los golpes recibidos en los costados; aún presentaba 21 huevos dentro de sus conductos, 15 de los cuales se encontraban fracturados. También se encontraron 4 gastrolitos de 2 a 3 cms de diámetro y un vidrio de 2.5 cm de diámetro por 2 mm de ancho.

El día 20 de junio se observó una pelea entre dos hembras: una de ellas se posesionó del nido de otra que estaba ausente; cuando la dueña regresó a su nido, la intrusa la atacó y entonces el macho intervino realizando movimientos de ataque y bufidos, y la intrusa optó por alejarse.

Los huevos eran sacados de sus nidos cuando menos una semana antes del tiempo en que se creía iniciaría la eclosión, para ponerlos a incubar dentro de las cajas de poliestireno; todo esto con el fin de evitar que algunas crías murieran al ser abiertos los cascarones por la madre. A todos los huevos que presentaban un bandeado a lo ancho se les consideró como huevos fértiles y se les incubó; se desechó a los que no tenían esta banda (Ver Fig. 16 y 17).

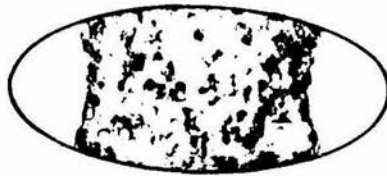


Figura 16. Huevo fértil de C. moreletii en el cual se logra ver el bandeado.

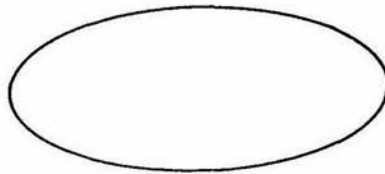


Figura 17. Huevo infértil de C. moreletii.

ECLOSION:

Cuando las crías ya habían alcanzado el completo desarrollo embrionario, al escuchar un ruido cercano comenzaron a emitir un sonido similar a un gruñido, e inmediatamente nos dispusimos a destapar la caja y empezar a excavar para sacar los huevos. Por lo general, al sacar los huevos, las crías aún no habían eclosionado, pero un polo del huevo se encontraba ya fracturado y por ahí se iniciaba la salida: primero la punta del hocico y las fosas nasales, y después la cabeza y el cuerpo. Los

cocodrilitos al nacer tenían ya un instinto de defensa muy desarrollado, ya que con la cabeza por fuera del cascarón y cuerpo por dentro, al acercarse cualquier objeto, eran capaces de arrojar mordidas.

No todas las crías eclosionaban al mismo tiempo, sino que algunas eclosionan sincrónicamente en determinado momento y otras lo hacían con un intervalo de minutos, horas, o hasta 5 días después. Algunos embriones no alcanzaron un pleno desarrollo y no eclosionaron.

De las 25 hembras adultas que se encontraban en etapa reproductiva, únicamente desovaron 20 y el tamaño de las nidadas fluctuó entre los 12 y 52 huevos, con un promedio de 35.9 y una desviación estándar (SD) 10.15. En cuanto al diámetro presentado por el nido, éste fluctuó entre los 1.40 m y los 2.70 m, con una media de 1.83 y una SD de 0.39 m. Los nidos presentaron una altura promedio de 47.69 cm con una SD de 9.30 cm (Ver **NIDACION** Tabla 3).

HEMERA NO.	FECHA DESOVE	HUEVOS NO.	DIAMETRO DEL NIDO (mts)	ALFURA DEL NIDO (cms)	MATERIAL DEL NIDO
16	170590	45	1.40	48	H-T
33	240590	41	2.50	—	H-T-P
12	310590	52	2.70	54	A-Z
1	020690	39	—	53	—
27	050690	22	2.20	48	H-T-P
4	120690	44	2.02	36	—
23	150690	41	1.45	35	P-H
14	150690	34	—	—	—
8	210690	32	—	—	T-Z
25	150690	35	—	58	H-T-P
32	170690	27	1.50	38	T-P
31	200690	39	1.50	36	P-H
22	220690	47	1.60	61	H-T-P
34	230690	12	1.80	60	H-T-P
29	250690	28	1.70	—	H-T-P
3	260690	50	1.90	48	H-T-P
13	200690	39	—	—	—
68	020790	31	1.60	45	H-T-Z
18	050790	38	1.60	—	H-T-Z
45	060790	22	2.10	—	T-P-A
PROMEDIO		35.9	1.83	47.69	
SD		10.15	0.39	9.30	

H=HOJARASCA T=TIERRA P=PIEDRAS Z=ZACATE A=ARENA

Tabla 3. Parámetros de nidación de C. moreletii

RESULTADOS

Del efecto de la bFSH en el cocodrilo de pantano:

La aplicación de la Hormona Estimulante del folículo bovina se realizó el 28 de julio de 1990. Durante las tres semanas previas a la aplicación de la hormona, todos los cocodrilos adultos del acuaterrario (al igual que los cocodrilos semiadultos, juveniles y las crías) se encontraban en plena tranquilidad, aunque ocasionalmente se observaron persecuciones de los machos sobre las hembras, que se resistían al cortejo y la cópula. Como a las hembras adultas se les habían quitado sus nidos, únicamente la hembra No. 33 volvió a hacer su nido (aunque sin huevos).

Un día después de aplicada la hormona no hubo cambio en el comportamiento que se había observado durante las últimas semanas. Para el 30 de julio de 1990 únicamente las hembras a quienes se había inyectado la hormona se mostraron con un poco de mayor actividad en comparación con las testigo y las hembras de las secciones las cuales habían sido excluidas del experimento. El 31 de julio la inquietud de las hembras marcadas se acentuaba. Para el día 1 de agosto las hembras marcadas se notaban mucho más inquietas, su actividad era más notoria; entraban, salían del agua; sus movimientos eran más frecuentes en comparación con las hembras no marcadas y que compartían el mismo lote, y de las hembras de las otras secciones. Cuatro días después de la

aplicación de la hormona, aparte de estar muy inquietas, las hembras observaban mucho a los machos con la actitud de espera; como si esperasen que el macho (de su respectivo lote) tomara la iniciativa de empezar a cortejarlas, pero ninguno mostró tal actitud.

El día 2 de agosto a las 12:45 se observó el primer comportamiento de celo por parte del macho del lote No. 1; éste comenzó a bufar fuerte e inmediatamente la hembra No. 2 fue a su encuentro y comenzaron a frotar sus hocicos, aunque no por mucho tiempo, y después se separaron.

Para el día 3 de agosto se observó al macho del lote No. 1 tratando de cortejar a una hembra que no estaba marcada; aquél la perseguía con intención de montarla pero la hembra se mostró agresiva y en dos ocasiones le propinó dos severas mordidas.

En el lote No. 1 había una hembra testigo (sin hormona), que no permitía que alguna hembra se acercara al macho. Al acercarse alguna hembra, la primera hembra se mostraba muy agresiva, abría las fauces con actitud de morder y movía constantemente la cola. Las hembras de este lote al escuchar los bufidos del macho, a pesar de la oposición de dicha hembra, acudieron al encuentro del macho y la hembra No. 1 inició los frotamientos con el macho, sin llegar a algo más. A la hembra No. 1 del lote 2, a la cual se le había quitado el nido y quien lo había vuelto a hacer, al escuchar los bufidos del macho del otro lote, se observó que en apariencia se había estimulado, ya que se acercó al macho de su lote, pero éste se encontraba en pleno

frotamiento de hocicos con la hembra No. 2, quedando únicamente ésto en cortejo.

El 4 de agosto 1990 el macho del lote 1 comenzó a bufar levemente, sus bufidos se hicieron más consistentes y comenzó a merodear por el estanque; las hembras se acercaron poco al macho y se quedaron a la expectativa de que el macho tomara la iniciativa del cortejo. En la noche (21:15), este mismo macho comenzó a bufar y se le acercó la hembra No. 2, pero hasta ahí quedó el intento. A las 23:00 pm se observó al macho del lote 2 persiguiendo a varias hembras con el afán de cortejarlas, pero ninguna hembra de su lote se mostró receptiva.

A las 15:13 pm del 6 de agosto de 1990, el macho del lote 1, con actitudes de cortejo, comenzó a bufar y varias hembras se acercaron poco y se quedaron observando al macho. 9:05 pm, este mismo macho comenzó a bufar y una hembra a la cual no se le pudo detectar el número se le acercó con la intención de que el macho la cortejara, pero éste no tuvo atención alguna hacia la hembra y ahí quedó todo. A las 00:30 del 7 de agosto se observó al macho del lote 1 bufando, lo mismo que al macho del lote 2 a la 1:05. 01:30 de la madrugada, la hembra No. 2 del lote 2 comenzó a bufar moderadamente fuerte y silbó durante unos 20 o 30 segundos además de mostrarse muy impaciente. A las 02:14 y 03:11 am esta hembra mostró la misma actitud. A las 7:03 se inició una fuerte lluvia. A las 16:36 del 8 de agosto el macho del lote 2 trató de copular con la hembra No. 2: se acercó a la hembra y comenzó a frotar su hocico con el de la hembra, pero ésta después de varios minutos no lo toleró y salió a tierra. A las 21:25,

el macho del lote 2 cortejó a la hembra No. 3, pero ésta no se mostró receptiva y lo rechazó. Diez minutos después cortejó con la hembra No () sin tener éxito. A las 23:12 el macho del lote 1 estaba bufando.

8 de agosto de 1991, a las 05:30 el macho del lote 2 cortejó a una hembra (no se identificó su número). 06:07, el macho del lote 1 estaba bufando, luego atravesó el estanque y se dirigió a la hembra No.1; ésta al escuchar sus bufidos, fue a su encuentro, y empezaron a frotarse los hocicos y luego se separaron. Cinco minutos después nuevamente el macho del lote 1 bufaba y la hembra No. 1 se le acercó y frotaron los hocicos ; entonces el macho intentó montarla, pero en apariencia éste no alcanzaba el máximo nivel para poder copularla y no hubo copulación, aunque la hembra se hallaba en actitud receptiva. A las 06:31 el mismo macho volvió a bufar y fue en búsqueda de la hembra No. 1 pero ésta se alejó de él.

10 de agosto de 1990, durante todo el día y la noche se notaron todos tranquilos, no realizaron ningún movimiento en especial. 21:10, el macho del lote 1 bufaba levemente. Este mismo macho comenzó a bufar y varios machos del acuaterrario contestaron, pero no se logró observar algo más. 11 de agosto de 1990, 01:30, el macho del lote 2 se encontraba cortejando a la hembra No. 2, ambos se acercaron y comenzaron a frotarse sus hocicos, pero en ningún momento se logró observar monta. 03:15, el macho del lote 1 bufaba fuertemente, e inmediatamente la hembra No. 1 fue hacia donde se encontraba el macho; éste intentó

montarla, pero ésta no lo permitió fácilmente y el macho optó por dejarla. 12 de agosto de 1990, durante ese día no se observó actividad. 13 de agosto de 1990, en la noche no se vio ningún cortejo. 14 de agosto, 1:30 h el macho del lote 1 comenzó a bufar, pero no hubo otra conducta significativa. 03:05 h el macho del lote 2 comenzó a bufar fuertemente y trató de montar a la hembra No. 2, pero ésta no lo permitió y se alejó de aquél. 04:16 h el macho del lote 2 comenzó a bufar fuerte y constantemente y persiguió a la hembra (♀) y sólo frotaron levemente sus hocicos.

14 de agosto de 1990, en ese día a las 23:15 al cocodrilo del lote 1 se le vio bufando constantemente durante 5 minutos, al parecer se encontraba en plena actitud de cópula, se acercó a la hembra No. 2 y ambos comenzaron a frotar sus hocicos y el macho la montó e intentó penetrarla pero no pudo insertar su pene después de intentarlo afanosamente, y ambos se separaron. Más tarde, en la madrugada, el macho trató de cortejar primero a la hembra con marca (♀) y después a la hembra No. 3, sin éxito.

16 de agosto de 1990: calma durante el día y en la tarde, sólo se escuchó bufar leve al macho del lote 2. 17 de agosto. Al parecer la actividad estaba disminuyendo, porque se observó una completa calma en el acuaterrario. 18 de agosto. El macho del lote 1 cortejó a una hembra; bufó levemente, después se le acercó y frotaron sus hocicos durante unos segundos y se separaron.

19 de agosto de 1990. Lo único relevante durante la noche fue que el macho del lote 1 persiguió a una hembra con el afán de

cortejarla sin conseguirlo. 20 de agosto de 1990. Calma durante la tarde y la noche.

21 de agosto de 1990. Completa calma; en ocasiones los cocodrilos se introducían o salían del agua. 22 de agosto de 1990.

24 de agosto de 1990. Absoluta calma.

26 de agosto de 1990. Absoluta calma.

Aparentemente, el efecto de la bFSH sobre la conducta sexual de los cocodrilos se inició 48 horas después de su aplicación y perduró hasta el 16 de agosto; se había extinguido completamente para el día 21.

Utilizando el esquema antes señalado, los resultados del efecto de la hormona estimulante del folículo bovina en el cocodrilo de pantano se pueden apreciar en la siguiente página.

DISCUSION

DE LA OBTENCION DE LA bFSH

La técnica que se utilizó para la FSH bovina corresponde a la de Stockel-Hartree (1966), que es la más utilizada para la obtención de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias y que en el laboratorio se ha utilizado para las hipófisis humanas, las bovinas y las caprinas.

De las 535 hipófisis bovinas que pesaron 417 g, se obtuvieron 69.3 mg de proteína, lo que corresponde a 166 mg de proteína por kilogramo hipófisis. Este rendimiento es muy bajo si se compara con lo informado por Ellis (1961): 570 mg/Kg; Reichert (1965), 210 mg/Kg; Cheng (1976), 620 mg/Kg; y Grimek (1979), 243 mg/kg, quienes extrajeron la hormona de hipófisis congeladas. El mayor rendimiento de FSH a partir de glándulas congeladas que cuando se conservan en acetona ha quedado bien documentado en la literatura (Leep & Oliner 1964) y también se ha comprobado en este laboratorio.

La concentración de proteínas por técnica colorimétrica en los productos que corresponden a la CM-1ab y CM-1c resultó ser muy baja en comparación de lo que se esperaba, puesto que su registro a 280 nm fue muy alto; una posible explicación es que en realidad hay muy poca proteína, pero con un alto contenido de triptofano y tirosinas, aminoácidos a los que se atribuye la alta absorbencia a 280 nm. Esta baja concentración de proteínas indica que en este nivel de purificación, el producto contiene otros componentes, tales como ácidos nucleicos, lípidos y carbohidra-

tos. La contaminación con ácidos nucleicos se ha comprobado en este laboratorio (datos no demostrados) para las hormonas adenohipofisarias de grado clínico. Otra posible explicación es la técnica misma, cuya curva patrón elaborada con albúmina bovina de Sigma tiene una mayor pendiente que otras utilizadas en este laboratorio (humana y bovina de Calbiochem).

En cuanto al patrón cromatográfico del extracto glicoproteico (710 mg) en columna de carboximetil celulosa (CM-Celulosa), éste tiene la particularidad de presentar una tercera fracción importante, que no existe en la técnica original de Stockel-Hartree (1966), ni en otros lotes previamente procesados en este laboratorio. Esta tercera fracción se pudo obtener al modificar el procedimiento de elución, disminuyendo la fuerza iónica (de 1.0 M a 0.1 M) del segundo eluyente de la cromatografía en intercambio catiónico (Carranza S.M. y col. 1989). De esta manera se ha podido obtener una tercera fracción, aparentemente muy pura por su homogeneidad en electroforesis en gel de poliacrilamida y cuya identificación está en estudio en este laboratorio.

Análisis electroforético:

El extracto glicoproteico presenta el patrón electroforético típico, con bandas aniónicas que en la purificación cromatográfica darán origen a la FSH, y con bandas catiónicas que luego darán origen a la LH-TSH; la más notable de ellas puede corresponder a la LH.

La ausencia de bandas en la fracción CM-1o no es sorprendente, ya que la absorbencia a 280 nm fue muy escasa.

La fracción no retenida de dicha columna que corresponde a la FSH está formada por tres bandas, cuya movilidad electroforética (0.53, 0.65 y 0.74) es diferente a la de 0.43, informada por Cheng (1976) y la de 0.46 informada por Grimek (1979). Esto puede tener su explicación en que en este lote, la CM-1ab y la CM-1c se sometieron a una diálisis alcalina lo que evidentemente modificó su carga eléctrica y cambió así su movilidad electroforética, probablemente aumentando sus cargas negativas, lo que le dio un carácter más aniónico. Debe hacerse notar que en los lotes procesados en el laboratorio (6 lotes) cuyo producto final de FSH no se ha sometido a diálisis alcalina, su movilidad electroforética ha sido regularmente de 0.40 a 0.55. Cuando el producto estuvo en presencia de manitol, apareció una banda más aniónica, lo que sugiere que el manitol desagrupó las proteínas que en su conjunto consideramos FSH.

En cuanto a la CM-1c, aunque tuvo dos bandas, sólo la de 0.65 es aparente en la fotografía.

De la electroforesis en condiciones no-reductoras, llama la atención que la mayor parte de las proteínas permanezcan en sus formas más agrupadas (mayores de 50000), o por el contrario, en formas muy pequeñas (menores de 18000), a las que sólo puede considerarse como subunidades o fragmentos de la hormona. La banda casi imperceptible de 47000 daltones corresponde a la del peso molecular informado por Cheng (1976) y Grimek (1979).

Condiciones reductoras.

Como era de esperarse, los componentes de ambas proteínas (CM-1ab y CM-1c) aumentaron su tamaño molecular. En CM-1ab aparecen ahora dos de PM m de 50000 y en cambio, las de bajo PM quedan reducidas a una sola, la de 16000. Mientras que en CM-1c, aunque las bandas no son aparentes en la fotografía, en el gel original hubo dos bandas de alto PM.

En cuanto a la actividad biológica de la hormona de este lote, además de su utilización en los cocodrilos, también se utilizó en una serie de experimentos encaminados a encontrar una respuesta a lo muchas veces señalado en la literatura "que la FSH bovina es poco activa en el bioensayo de Steelman & Pohley (1953)" ;es decir, en el aumento del peso ovárico bajo la acción de la FSH y en presencia de hCG.

Los resultados hasta ahora obtenidos en el laboratorio, de la aplicación de la bFSH (desde 13 ng a 64 ug) en ausencia de hCG y desde 0.5 a 200 ug en presencia de cantidades crecientes de hCG (desde 1 a 25 UI) (datos no mostrados), confirman lo señalado en la literatura: que la hormona por sí sola no aumenta el peso del ovario y que se necesitan más de 20 UI de hCG para evidenciar el aumento del peso del ovario. Sin embargo, la observación macro y microscópica de dichos ovarios muestra que hay un claro y evidente crecimiento folicular, con la formación de folículos congestivos, tal y como se puede observar en la Figura 8, que es una fotografía del efecto de la bFSH en los ovarios de la rata

Fisher. En el momento actual, el concepto que se tiene en el laboratorio es que la actividad biológica de la bFSH debe evaluarse con el crecimiento folicular y no con el aumento del peso de los ovarios, como se hace en la prueba de Steelman & Pohley. En el laboratorio, este bioensayo se estudia y estandariza con dicho parámetro.

El bioensayo formal en presencia de 25 UI de hCG demostró una baja actividad (0.548 U) en relación a la FSH porcina utilizada como patrón de referencia (pFSH-Biotech. Lab), lo que está de acuerdo con la baja actividad encontrada en años anteriores para la CM-lab (0.348 U/NIH-FSH-S12) de otros lotes en este mismo laboratorio.

La mayor actividad biológica de la fracción CM-1c no fue sorprendente, porque corresponde a lo ya informado por Reichert (1965). Ya que esta fracción tiene una banda menos en electroforesis, comparada con la CM-lab (aquí utilizada como la FSH de grado clínico), puede especularse que dicha banda corresponde a una contaminación en CM-lab, que tiene acción antagónica a la actividad biológica de las otras dos. Desafortunadamente, el rendimiento de la CM-1c es muy escaso (mg) por lo que no es de uso clínico y en el laboratorio se le utiliza para su completa caracterización.

Los resultados aquí presentados demuestran que se ha obtenido una bFSH de uso clínico, que es heterogénea desde el punto de vista electroforético, y que tiene una actividad biológica inferior a la de la pFSH, pero superior a otras bFSH

obtenidas previamente en el laboratorio. También se sugiere que la actividad biológica de la bFSH debe ser evaluada con el crecimiento folicular y no con el aumento del peso de los ovarios.

COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO

Es de considerar que las observaciones durante la etapa reproductiva se realizaron cuando se encontraban ya en plena actividad sexual aunque en cautiverio; debe tomarse en cuenta que los resultados obtenidos en cuanto a conducta se deben al tiempo utilizado en las observaciones ya que anteriormente éstas eran muy escasas y poco el tiempo empleado.

Cuando se inició la observación, la mayoría de las hembras ya habían establecido sus pequeños territorios, y dado lo reducido del terreno de cada sección del acuaterrario, éstas en ocasiones se enfrascaron en algunas peleas.

Las hembras defienden su territorio

En el periodo de 33 días, se observaron 64 eventos de cortejo, de los cuales 42 se concretaron en cópulas reales, ya que no siempre se observó que los eventos de cortejo culminaran con la inserción del pene en la cloaca.

En cuanto al comportamiento del cortejo del cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii), se puede afirmar que son comportamientos estereotipados, ya que los cocodrilos machos

adultos más pequeños, es decir los que apenas tenían algunos años de haber entrado a su madurez, no realizaban todos los patrones de conducta mostrados por los adultos, además si es que los realizaban, éstos no resultaban tan evidentes. Mientras que los machos adultos por lo general presentaban casi siempre patrones establecidos y conspicuos durante el cortejo, aunque en ocasiones faltaban algunos. Todo esto es quizá debido a que las formas de cortejo son adquiridas por la experiencia durante el proceso de crecimiento. Dado que estos organismos se han desarrollado en cautiverio y como hay un macho por acuaterrario, los más pequeños no han tenido mucho que observar durante el cortejo de los adultos y retoman de éstos lo más evidente: golpeo de la quijada y cola contra el agua, y el rugido a la vez.

Otra alternativa del porqué del comportamiento no tan evidente por parte de los machos más pequeños es quizá que aún independientemente de que los cocodrilos tanto hembras como machos hayan alcanzado el estado adulto, su amplia capacidad reproductiva la alcanzan después de varios años de haber llegado a ésta, o después de adquirir determinada longitud.

Posiblemente el hecho de que los machos no muestren todo el patrón de conducta durante el cortejo se debe a que en cautiverio, el macho ya no tiene la necesidad de realizar tan conspicuamente sus patrones de conducta, dado que ya tiene un determinado número de hembras disponibles, todo lo contrario al estado silvestre donde los machos deben luchar por establecer su territorio y posteriormente hacer manifiesta su propia

capacidad copulatoria. Además también que, independientemente de que muestre todos los patrones de conducta para cortejar, ésto no será siempre evidencia de que el macho está habilitado para concretar alguna cópula, como se pudo observar en cortejos que no conclulan en cópulas y cópulas en las cuales los patrones de cortejo de los machos fueron mínimos.

Preferencia de los machos por una hembra

Se observó también que los machos tienen cierta preferencia hacia alguna de las hembras a la hora en que se encuentran disponibles para copular, lo que no ha sido informado por otros autores, pero para lo cual no tenemos explicación alguna.

Otras formas de atracción del macho

Otras de las formas de atracción por parte del macho, como el quedarse flotando y mover la cola sacando la cabeza a la vez, o esta misma acción avanzando hacia la hembra, también lo reporta Huerta (1984), para la misma especie, así como también sacar el lomo, arquear la cola y deambular por el estanque.

Otras conductas de cortejo

Pérez-Higareda et al. (1989), mencionan el cortejo de las hembras hacia los machos emitiendo bufidos, lo que también se observó en el presente trabajo. El golpeo con la quijada y cola sobre el agua y chasquido a la vez, además de ser símbolo de territorialidad, como lo afirman Alvarez del Toro (1974) y

Huerta (1984), se observó (lo mismo que Garrick y Lang, 1977), que también funciona de atracción y estimulación hacia las hembras. Además se vio que los rugidos fuertes podían estimular a los machos aledaños.

Relación con las lluvias.

Cabe mencionar que este mismo patrón de comportamiento (golpeo con la quijada y cola sobre el agua y chasquido a la vez), se observó tanto en hembras como en machos antes de acercarse alguna lluvia.

Tiempo de duración de las cópulas

En ningún momento se observó que el cortejo y las cópulas duraran hasta media hora, como lo afirman Alvarez del Toro (1974) y Huerta (1984). Los tiempos observados para dichas etapas son compatibles con lo informado por Perez-Higareda et al. (1989) para C. moreletii y, Modha (1967) y Kofron (1991) en C. niloticus. Aunque si se llegaron a observar cópulas de 5 minutos y otra de 6 minutos con 15 segundos, éstas fueron muy escasas y no de prolongado tiempo como lo reportan Alvarez del Toro (1974), en estado silvestre y Huerta (1984), en cautiverio para el cocodrilo de pantano.

Período reproductivo

Acorde con lo mencionado por Alvarez del Toro (1974) y Huerta (1984), la época reproductiva concluyó hacia fines de junio,

aunque los machos aún asediaban a las hembras, de lo cual se interpreta que la época de celo en los machos tiene una mayor duración que en las hembras. Esto concuerda con lo estipulado por Dufaure (1986) y Ross (1987), para la especie A. mississippiensis quienes creen que la época de celo comienza a descender en el mes de julio. Es de mencionar que quizá los machos, al ver que las hembras ya hablan concluido su etapa de celo, irían (los machos) perdiendo gradualmente el interés por querer copular.

Efecto de la temperatura

Un factor que no se pudo determinar fue la relación entre la temperatura y la actividad copulatoria, como lo afirman Pérez-Higareda et al. (1989). No obstante si se concuerda con ellos en que el mayor número de cópulas se da durante la noche y al amanecer.

Capacidad copulatoria del macho 1

La capacidad copulatoria del macho de la sección 1 fue excepcional; hasta ahora no se tiene información de un caso similar. La capacidad copulatoria de los machos de las secciones 2, 3, 4 y 5 estuvo dentro del marco de las observaciones realizadas por Alvarez del Toro (1974), Huerta (1984) y Pérez-Higareda (1989) en C. moreletii y dentro de otros cocodrilianos, como lo establece Lang (1986) para Alligator mississippiensis, Kofron (1991) para Crocodylus niloticus y Thorbjarnarson (1989) para Crocodylus acutus. Esto indica que la capacidad reproductiva

dentro de una población puede variar ampliamente entre los organismos que la componen, y puede quizá deberse, como en este caso, a la capacidad individual del organismo. Además de que las condiciones, tanto medioambientales como de condiciones del acuaterrario y alimentación, se puede afirmar que fueron similares.

Sumisión e identificación de la hembra receptiva por parte del macho

Al igual como afirma Lang (1986) en A. mississippiensis, también en C. moreletii se observó comportamiento de sumisión por parte de las hembras a la hora de realizar el cortejo. Creo principalmente se realiza frotamiento entre la pareja de C. moreletii como símbolo de excitamiento y no como olfateo para detectar el estatus reproductivo como lo afirma Kofron para C. niloticus. Tampoco logré observar en ningún momento que el macho olfateara la base de la cola de la hembra y viceversa, como lo ha reportado este mismo autor.

Cópula durante la nidación

Un caso paradójico resultó el de la hembra No. 45, quien se encontraba nidando y a quien se le observó en dos ocasiones copulando con el macho de su sección (1) y otras tantas cortejando con el mismo.

Nidación

En cuanto al comportamiento en la forma de realizar el nido, esto

fue similar a lo reportado por Alvarez del Toro (1974), Hunt (1973, 1975 y 1978), Huerta (1984) Casas-Andreu y Rogel (1986). Sin embargo, no se ha reportado para esta especie la muerte de alguna hembra en la lucha por la posesión del nido, aunado a esto el hecho de que el macho no permitiera que sacáramos a la hembra muerta. Esto se debió al espacio reducido en los acuaterrarios, lo cual propiciaba peleas entre las hembras por la defensa de su territorio y de su nido; al no tener terreno donde desovar algunas hembras, optaban por querer desovar en el nido de otra cocodrila, por lo cual en un caso se observó un nido con doble nidada y en el otro caso la muerte de una hembra (No. 13).

tiempo para construirlo

El tiempo entre la construcción del nido y la depositación de los huevos en este criadero concuerda con Alvarez del Toro (1974), y no tanto con lo establecido por Huerta (1984), quien menciona que ,en ocasiones , de dos días hasta dos a tres semanas después desovaron las hembras.

Tamaño del nido

En cuanto a la altura y longitud del diámetro del nido, los resultados obtenidos están dentro de los datos mencionados por Casas-Andreu y Rogel (1986). Cabe mencionar que el promedio del tamaño de la nidada está muy por encima de lo obtenido por Alvarez del Toro (1974), Greer (1975) y Casas-Andreu y Rogel (1986). Aunque no fue preciso establecer relación alguna entre el

tamaño de las hembras y el promedio del tamaño de la nidada. Esto quizá pudiera establecer una explicación de lo grande en el tamaño de la nidada.

Efecto de la hormona estimulante del folículo bovina

Debemos considerar que aunque los cocodrilos y los bovinos son especies tetrápodos ambos pertenecen a diferentes Clases y han divergido a través de miles de años, por lo tanto también sus receptores son específicos para sus propias hormonas.

Puesto que la aplicación de la bFSH se hizo en una temporada en la que las hembras se encontraban normalmente nidando y los machos sin ninguna actividad reproductiva, la reactivación de la conducta sexual de los cocodrilos, tanto de hembras como de machos después de la aplicación de la hormona, sólo puede entenderse como inducida por la hormona; efecto relativo durante 3 semanas, obteniéndose el máximo efecto después del quinto día de haber sido inyectada hasta el día 17.

Respuesta del macho 1

El macho del lote 1 fue el que presentó mayor actividad, con el mayor número de golpes de quijada y cola al mismo momento de rugidos, bufidos, frotamientos de cuellos, y montas, en comparación con el macho del lote 2, a quien en ningún momento se le observó golpear la superficie del agua a la vez que rugía; sus bufidos fueron en menos ocasiones y de menor intensidad, los

frotamientos de cuellos fueron más escasos y aunque se le vio la intención de montar, en ningún momento se le observó monta como tal.

El efecto de la bFSH quedó real y efectivamente comprobado dado que la actividad de cortejo de los *moreletii* únicamente se observó en las secciones 1 y 2 (lote No. 1 y No.2); secciones en las cuales se encontraban aquellos cocodrilos tanto hembras como machos a quienes se les había aplicado la hormona. Además, dentro de estos mismos lotes se hallaban las hembras a quienes no se les había inyectado hormona alguna, y en ningún momento presentaron cortejo hacia el macho. Mientras que en las demás secciones en las cuales se hallaban machos y hembras a quienes no se les había aplicado dosis alguna de hormona, tampoco hubo muestras de actividad concerniente al celo.

Aunque es cierto el efecto es relativo, se debe considerar que en ningún experimento anterior sobre reptiles se había pretendido observar la conducta de un organismo tras la aplicación de una hormona. Los experimentos anteriores únicamente habían evaluado el efecto de alguna hormona a nivel de esteroides, tal como los experimentos llevados a cabo por Licht et al. (1977), Tsui y Licht (1977), Callard y Lance (1977), Lance (1985) y Licht y Porter (1985).

Efecto de la dosis

Realizando una evaluación, se pudo observar que las hembras que habían tenido más actos de cortejo y monta resultaron las hembras

marcadas con 2 puntos (0.06 mg de FSH) dentro de su respectivo lote. No obstante, las hembras marcadas con 1 punto (0.03 mg de FSH/Kg) también mostraron una buena cantidad de eventos de cortejo. Mientras que en las hembras marcadas con 3 puntos (0.12 mg de FSH/kg) no se apreciaron actitudes de cortejo, lo que sugiere que esta última dosis puede ser ya excesiva y funciona ya como inhibitoria y no como estimulante.

En el caso concreto del macho 1, probablemente no alcanzó a copular con alguna hembra debido a :a) que la dosis aplicada no fue la óptima. b) el tiempo dado para que volvieran a alcanzar sus niveles basales no fue lo suficiente, con lo cual, independientemente de que la dosis fuera la óptima, el cocodrilo no respondió como era de esperarse o, c) las dosis, tanto en el macho como en las hembras, pudieron no ser las óptimas, esto es que como no se tiene una dosis establecida, unos mg de hormona de más o de menos pudieron repercutir en que, tanto el macho como la hembra no alcanzaran los estímulos suficientes, o en su caso resultara excesiva.

Efecto de imitación

En el caso del macho No. 2, aún a pesar de que no se le aplicó hormona, sí mostró algunos momentos de cortejo con algunas hembras, aunque en ningún momento llegó a montar alguna. Este comportamiento pudo haberse debido probablemente a que aún a pesar de que ya se encontraba en descenso de su capacidad reproductiva, a) se estimuló aunque no lo suficiente por los bufidos del macho del otro lote; b) por la presencia de hembras en celo, o porque c)

las hembras despiden por sus glándulas algunas sustancias químicas, que se transmiten por el agua y que tienen la función de estimular al macho. O también como lo menciona Kofron (1991) quien afirma que se llegan a olfatear sus regiones gulares (cuellos), para identificar su estatus reproductivo.

CONCLUSIONES

El comportamiento del cocodrilo de pantano es similar a lo reportado para todo el orden Crocodrilia aunque con algunas variantes. La capacidad copulatoria de los machos varía de un individuo a otro. Estos presentan un patrón estereotipado en el cortejo hacia las hembras y es adquirido con la experiencia. Los patrones de cortejo y nidación de las hembras son similares a los de otras hembras del orden Crocodilia. Las constantes peleas por las hembras se deben al espacio reducido del acuaterrario. La incubación reduce la mortalidad obtenida de manera natural. Aún se conoce muy poco la etología reproductiva de Crocodylus moreletii.

Quizá un factor primordial en los resultados de este estudio fue el pequeño número de cocodrilos utilizados en el experimento. Estos probablemente no resultaron ser representativos para esta investigación, como lo afirma Lance (1985, 1987), quien indujo LH-HR y midió testosterona en plasma y observó que los resultados variaban de aligator a aligator.

El efecto de la bFSH únicamente se observó en los animales a los cuales les fue aplicada la hormona; en algunos organismos fue más evidente el efecto que en otros, quizás debido a la dosis aplicada en los acuaterrarios donde se encontraban.

Se puede concluir que la bFSH sí fue activa en los cocodrilos y fue capaz de reactivar su conducta sexual. El hecho de que la reactivación de la conducta sexual no culminara con la

copulación, sólo puede explicarse por a) una dosis insuficiente, o porque una sola dosis es insuficiente; b) el grado de actividad biológica de la hormona y, c) la especificidad filogenética para reconocer los receptores de las células de la granulosa a la bFSH

RECOMENDACIONES: Repetir el experimento en otro año, en las mismas fechas, explorando las mismas y otras dosis, aumentar el número de aplicaciones y aumentar el número de animales; todo lo cual requiere una cantidad importante de hormona, que se espera esté pronto disponible mediante la tecnología del DNA recombinante.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, T. N. (1984). Neuroendocrinology of reproduction. 2a. eds. Joanen T. and Mac Nease. U.S.A. 470 pp.
- Alvarez del Toro, M. (1974). Los crocodylia de México, un estudio comparativo. Inst, Mex. Rec. Nat. Renov. México.
- Beckers, J.F. (1987). Isolation use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle. Theriogenology. January, Vol. 27, No.1.
- Beckers, J.F.; Ballman, P.W.; Viviers, I.D.; Touati, K.; Doem, G.; Lhoest, B.; Lambert, E.; Laurent Y.; Ectors, F.J. and Ectors, F. (1989). Low doses of FSH stimulate follicular growth and maturation in anestrous heifers. Theriogenology; January, Vol. 31 No. 1.
- Beltrán, E. (1968). Inst. Mex. Rec. Nat. Renov. Décimo informe anual. México. 32 pp.
- Blake, D. K. and J. P. Loveridge (1975). The role of commercial farming in crocodile conservation. Biol. Conder., (8):261-272.
- Callard, I. P. and Lance, V. (1977). The control of reptilian follicular cycles. In "Reproduction and evolution". J.H. Calaby and C. H. Tyndale-Biscoe eds. pp 199-210. Australian Acad. Sci. Camberra.
- Campbell, H. W. (1972). Stauts of Morelet's crocodile in Mexico. Zoologica 57 (3): 135-136.
- Carranza, S.M.; Reinoso, M.W.; Sarquis R.S.; Perera, M.G.; Moreno, P.F.; Salas, V.A. (1989). La FSH bovina (bFSH): su caracterización. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec Mor, México.
- Casas-Andreu, G. (1977). Notas preliminares sobre la cría en cautiverio de Crocodylus moreletii, en la Estación de Biología Tropical " Los Tuxtlas ", Ver. México. Biología C.N.E.B., México, 7(1-4): 19-27.
- Casas-Andreu, G. y Rogel, A. B. (1986). Observaciones sobre los nidos y las nidadas de Crocodylus moreletii en México. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal Autón. México, 13(1): 323-330.
- Cheng, K. W. (1976) Purification and properties of bovine pituitary follitropin. Biochem J. 159: 651-659.

- Cisneros, G. (1985). Manejo de la fauna silvestre en cautiverio; Curso para vigilantes de la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. S.E.D.U.E., Oaxaca, México.
- Crews, D. (1975). Psychobiology of reptilian reproduction. *Science*, Vol. 189: 1059-1065).
- Dahl, K.; H. Papkoff and Hsueh, A. (1989). Effects of diverse mammalian and nonmammalian gonadotropins in rat a granulosa cell bioassay for Follicle-Stimulating Hormone. *General Comparative Endocrinology*; 73, 368-373.
- Dufaure, J. P. (1986). La reproduction des crocodiles. *La recherche*; 17, No. 179:902-911. Francia.
- Ellis, S. (1961). Studies on the serial extraction of pituitary proteins. *Endocrinology* 69: 554-570.
- Ferner, J. W. (1979). A review of marking techniques for amphibians and reptils. *S.S.A.R. Herpetol. Circ.* 9: 41 pp.
- Flores, O. (1980). Reptiles de importancia económica en México. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. 278 pp.
- Flores, M. G. (1988). Proyecto para la instalación de un criadero de cocodrilos en Quintana Roo. Tesis Facultad de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México.
- Garrick, D. L. and J. W. Lang (1975). Alligator courtship. *American zoologist (Abstracts)*. 15(3): 813.
- Garrick, D.L.; J. W. Lang and H. A. Herzog (1978). Social signals of adult american alligator. *Bull. of American Museum of Natural History*, New York. 160(3):155-152.
- Greer, A. E. (1975). Clutch size in crocodilians. *Jour. Herpetol.*, 9(3): 319-322.
- Goodwin, T. M. and R. Marion (1978). Aspects of nesting ecology of alligator in the North-Central Florida. *Herpetologica* 34(1):43-47.
- Gorzula, S. (1989), The common caiman. *International Union for the Conservation for the Nature. Publications New series.*
- Guzmán, A. M. (1973). Biología e importancia económica de los cocodrilos mexicanos. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. 123 pp.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of proteins: A modification of the Lowry Method that gives linear photometric response. *Ann. Biochem.* 48:422-427.

- Herrera, O. A. (1989). Situación actual del comercio de cocodrilos en el sureste de México. Tesis Profesional, Escuela Nacional De Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. México.
- Huerta, P. M. (1984). Etología, reproducción y biometría del cocodrilo (Crocodylus moreletii, Dumeril, Bribon y Dumeril), en cautiverio. Tesis, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Inst. Pol. Nal. México.
- Hunt, R. H. (1973) Breeding of Morelet's crocodiles, Crocodylus moreletii, at the Atlanta Zoological. International Zoological Yearbook: 13(9): 33-37.
- Hunt, R. H. (1974). Hatching and rearing of the morelet's crocodile (Crocodylus moreletii). A.A.Z.P.A. Conference, Texas.
- Hunt, R. H. (1975). Maternal behavior by adult morelet's crocodile (Crocodylus moreletii). COPEIA., (4): 763-764.
- Hunt, R. H. (1977). Aggressive behavior by adult morelet's crocodile (Crocodylus moreletii), toward young. Herpetologica, 33(2): 195-201. U.S.A.
- Hunt, R. H. (1980). Propagation of the american alligator in captivity. Proceedings of the 25th. Annual Conference of the Southeastern Association of Game and Fish Commissioner; 106-116
- Joanen, T. and L. Mc Nease (1971). Propagation of the american alligator in captivity. Proceedings of the 25th. Annual Conference of the Southeastern Association of Game and Fish Commissioner; 106-116.
- Kofron, K. P. (1991). Courtship and mating of the Nile crocodile (Crocodylus niloticus). Amphibia-Reptilia 12: 39-48.
- Laemli, L.V.K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of head of bacteriophage T4. Nature 224: 680.
- Lance et al. (1984). Endocrinology of reproduction in male reptils. Symp. Zool. Soc. Lond., 52:357-383.
- Lance V. A.; K. Vliet; and J.L. Bolaffi (1985). Effect of mammalian luteinizing hormone-releasing hormone on plasma testosterone in male alligators with observations on the nature of alligator hipotalamic gonadotropic-releasing hormone. Gen Comp. Endocrinol. 60:138-143.
- Lance, V. and K. Vliet (1987). Effect of mammalian on testosterone secretion in male alligators. Journal Experimental Zoology 214:91-94.
- Lang, W. J. (1976). American crocodile courtship. American zoologist (Abstracts). 16(2): 197.

- Lang, W. J. (1980). Reproductive behaviors of the New Guinea and saltwaters crocodiles. " S.S.A.R. Symposium " The reproductive biology and conservation of crocodilians". 6-8 august, Milwaukee.
- Lang, W. J. (1986). Crocodiles and alligators ,ed Surrey Beattty and Sons Pty limited in association with The conservation Commission of the Northern Territory. U.S.A. 273-294 pp.
- Lazcano, M. A. (1990). Conservación de cocodrilos en Sian Ka'an. Boletín Amigos de Sian Ka'an. No. 6; Junio. México.
- Licht, P. (1977). Evolution in roles of gonadotropins in the Gonadotropins in the regulations of the tetrapod testis in reproduction and evolution. J. H. Calaby Biscoe eds. Australian Academy of Sciences, Camberra pp. 101-110.
- Licht et al. (1977). Evolution in gonadotropins structure and function. Rec. Progr. Horm. Res. 33:169-248 pp.
- Licht, P. (1980). Evolutionary and functional aspects of pituitary gonadotropins in the green sea turtle (Chelonia mydas). Amer. Zool. 20:565-574.
- Licht, P. (1982). Endocrine patterns in the reproductive cycle of turtles. Herpetologica, 38:51-61.
- Licht, P. Owens, d. W., Clifton, K. and Peñaflores, C. (1982). Changes in LH and progesterone associated with the nesting cycle and ovulation in olive Ridley sea turtle, Lepidochelys olivacea Gen. Comp. Endocrinol. 48:247-253.
- Licht, P., Millar, R., King, J.A., Mc Creery, B.R. Mendonca, M.T., Bona-Gallo, A., and Lots, B. (1984). Effects of chicken and mammalian gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) on in vivo pituitary gonadotropin release in amphibians and reptils. Gen Comp. Endocrinol. Gen. Comp. Endocrinol. 54:89-96
- Licht, P. and Porter, D. (1985). LH secretions in response to gonadotropin releasing hormone (GnRH) by superfused pituitaries from two especies of turtles. Gen. Comp. Endocrinol., in press.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L. and Rondall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mc Donald, L. (1981). Reproducción y endocrinología veterinarias. 2a ed Interamericana, México. 466 pp.
- Méndez, J. A. (1988). Bases para el mejoramiento genético del cocodrilo de pantano (Crocodylus moreletii), en cautiverio. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM., México.

- Modha, M. L. (1967). The ecology of the Nile crocodile (Crocodylus niloticus Laurenti) on Central Island, Lake Rudolf. East African Wildlife Journal. 5:74-95.
- Nicoll, C.S.; Mayer, G. L.; Russel, S. M. (1986). Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. Endocr. Rev. 7: 169-203.
- Pérez-Higareda, G., Rangel, A., y Smith, H. (1989). The courtship and mating behavior of morelet's crocodile (Crocodylus moreletii) in southern Veracruz, Mexico. Bull. Chi. Herp. Soc. 24(7): 131-132.
- Pooley, A. C. 1971. Crocodile rearing and restocking special. U. I. C. N. Pub., Supp.: Paper No. 11:104-130
- Pooley, A. C and Gans. The Nile crocodile. Scientific American 234 (4):114-124.
- Powell, J.H. 1965. The status of Crocodylus moreletii in Yucatan I.U.C.N. Bull. New series 1(16):6
- Powell, J. H. (1971). The status of crocodilians in the United States, Mexico, Central America and the West Indies. I.U.C.N. Pub. New series. 32:72-82.
- Powell, R.; C. G. Ciarcia; V. Lance; R.P. Millar and J.A. King (1987). Identification of diverse molecular forms of GnRh in reptile brain. Peptides, in Press.
- Reichert, L. E.; Jiang N. S. (1965). Studies on bovine pituitary follicle-stimulating hormone. Endocrinology. 77:124-132
- Romer, A.S. (1956). Osteology in the reptils. ed. University of Chicago Press, Chicago.
- Ross, C.A. (1987). Crocodylus moreletii Dumeril and Bribon (Morelet's crocodile). Society for the study of amphibians and reptils. (407:1-3). U.S.A
- Ross, C. A., S. Garnet and T. Pyrzakowsky. (1989). Crocodiles and alligators. Facts on File, New York. 240 p.
- Steelman J. L. and F. M. Pooley (1953). Assay of the Follicle Stimulating Hormone based on the argumentation with human Chorionic gonadotropin. Endocrinology, 53:604.
- Stockell, H. A. (1966) Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. Biochem. J. 100:754.
- Thatcher, V. E. (1964). Estudios sobre los tremátodos de reptiles de Tabasco, México: lista de huéspedes y sus parásitos. An. Esc. Nac. Cienc. Biol. 13 (1-4): 91-96.

Thorbjarnarson, J. B. (1989). Ecology of the american crocodile, Crocodylus acutus. Crocodiles. Their ecology, management and conservation. I.U.C.N. Publications New series.

Tsui, H. W. and Licht (1977). Gonadotropin regulation of in vitro androgen production by reptilian testes. Gen. Comp. Endocrinol., 31: 422-434.

Virgen, A. J. (1978). Resultados sobre el crecimiento entre dos especies de cocodrilo: Crocodylus moreletii (A. Dumeril y Dumeril) y Caiman sclerops chiapasus (Boucort), en el centro aculcola de Temascal Oaxaca. Reunión Latinoamericana de acuicultura., México.

Whetstone and Martin (1979) New look at the origin of birds and crocodiles. Nature, 279: 234-236.

Wilhelmi, A. C. (1973). Bioassay methods in investigative and diagnostic. Endocr. 2A. Amsterdam-London.

Whitaker, R. (197). Permanent marking systems for cocodriles. Bombay Nat. Hist. Soc. 75(2): 496.

Yrimek, H. J., Yorski J., Wenworth B. C. (1979). Purification and characterization of bovine follicle-stimulating hormone : comparison with ovine follicle-stimulating hormone. Endocrinology 104(1): 140-147.