

11
03081 2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL CEREBRO Y
TEJIDOS UROGENITALES EN EMBRIONES DE LA TORTUGA
MARINA *LEPIDOCHELYS OLIVACEA* INCUBADOS A
TEMPERATURA FEMINIZANTE O MASCULINIZANTE**

T E S I S

**Que para obtener el Grado Académico de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
presenta**

M. en C. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ

Director de tesis: Dr. Horacio Merchant Larios

México, D. F.

1998

262900

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo concluyo mi *ontogenia académica* la cual, desde el pregrado y continuada con mis posgrados, ha sido dirigida por el Dr. Horacio Merchant Larios. Gracias maestro.

A lo largo de esta ontogenia, afortunadamente he contado con colegas y profesionales quienes en determinados momentos me han dado su tiempo para comentar, sugerirme y apoyar mi trabajo de investigación y, lo más importante, brindarme su amistad. Por todo lo anterior, les doy las gracias. La lista es muy larga, sin embargo quiero hacérselo patente en este trabajo a las Doctoras Alondra Castro Campillo; Galia Castro Campillo; Ana Elena Lemus Bravo; Concepción Sánchez Gómez; María Inés Forray Clap; Gabriela Morali de la Brena; Irma Villalpando Fierro; Maricela Villagrán Santa Cruz; Mercedes Perusquía Nava; Rocío Vargas; Mtra. Luz del Carmen Medina; Mtra. Rosa Obdulia González; Mtra. Juana Enríquez; Mtra. Elvira González Soto; Mtra. Norma Moreno Mendoza; Mtra. Rosa Ma. Viguera Villaseñor; Mtra. Xochitl Aguilar Miguel y Biól. Lilulí Millán. A los Doctores Numa Castro Guevara; Horacio Merchant Larios; José Ramírez Pulido; Fernando Antón Tay; Raymundo González Méndez; Jesús Chimal Monroy; Gregorio Pérez Palacios; Lino Díaz de León Hernández; Carlos Forray Clap; Fausto Méndez de la Cruz; Gustavo Casas Andreu; Roberto Domínguez Casalá; Marco Antonio Cerbón Cervantes; Arturo Alvarez Buylla; Enrique Pedernera Astegiano; Alberto Huberman Wajzman; Carlos Kubli Garfias; Miguel Angel Morales Mendoza; Vicente Díaz Sánchez; Javier Velázquez Moctezuma; Mtro. Jose Luis Contreras Montiel; Mtro. Jorge Olivera; Mtro. Jorge Haro Castellanos; Mtro. Felipe Vilchis; Mtro. Joaquín Herrera Muñoz; Mtro. Salvador Ruiz Ramírez; Mtro. Alejandro Marmolejo Valencia; Mtro. Enrique Mendieta; Biól. Vicente Hernández Hernández; Ing. Sergio Martínez Sopeña; Arq. Raymundo González Coronel; Biól. Braulio Centeno Uruiza; Quim. Héctor Macías Hernández; Biól. Jorge Vieyra Durán; Biól. Arturo Paredes; Pueblito; José G. Baltazar y Juan Patiño.

Al Biól. Cuahutémoc Peña Flores, al T. A. Ermeli Nataren y a Javier Vasconcelos Director del Centro Mexicano de la Tortuga (Mazunte, Oaxaca), les doy las gracias por su ayuda incondicional durante el trabajo de campo.

Agradezco a los miembros del jurado: Dr. Enrique Pedernera Astegiano (presidente); Marco Antonio Cerbón Cervantes (secretario); Dr. Horacio Merchant Larios

(vocal); Dr. Alberto Huberman Wajzman (vocal); Dr. Roberto Domínguez Casalá (vocal); Dr. Lino Díaz de León Hernández (suplente) y al Dr. Fernando Antón Tay (suplente), su tiempo cedido para leer las versiones preliminares de la tesis y por sus comentarios, críticas y sugerencias vertidas, las cuales en lo posible, se consideraron y están plasmadas en este documento.

Por último, quiero hacer nuevamente mi más reconocido agradecimiento a mi madre, hermanos Enrique y Susana, a mi cuñada Dra. Galia Castro Guevara, a mi cuñado Dr. Héctor Salazar Sánchez, a mis sobrinos Héctor y Alejandra, al Sr. Raúl Rivera, a las familias Castro-Campillo, Hernández-Ortiz y Sánchez-Hernández, a mis familiares ausentes, a mi colega y esposa Dra. Alondra Castro Campillo y a mi hija Aglaia, por su apoyo y compañía a lo largo de mi preparación académica.

Para mi AA: *Aglaia y Alondra.*

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	4
Declaración del Trabajo Realizado	5
Introducción	6
Antecedentes	6
Las Hipótesis	7
Las Evidencias Experimentales	9
Planteamiento del Problema	15
Hipótesis de Trabajo	18
Objetivos	18
Materiales y Métodos	19
Materiales	19
Material Biológico	19
Esteroides de Referencia	19
Esteroides Radiactivos	19
Antisueros	19
Métodos	20
Determinación de los Contenidos de Esteroides Sexuales	20
Extracción de los Esteroides	20
Separación de los Esteroides Sexuales por Cromatografía en Capa Fina	22
Radioinmunoanálisis	22
Biotransformación	23
Análisis Estadísticos	25
Resultados	26
Radioinmunoanálisis	26
Vitelo	26
Suero	26
Gónadas	26
Mesonefros	27
Interrenales	27
Cerebro	28

Telencéfalo y Diencéfalo	28
Biotransformación	30
Gónadas	30
Mesonefros	30
Interrenales	31
Cerebro	31
Telencéfalo y Diencéfalo	32
Discusión	34
Tejidos Urogenitales	34
Sistema Nervioso Central: Cerebro	37
Conclusiones	41
Perspectivas	41
Literatura Citada	42
Anexo 1. Especificidad de los Antisueros.	I
Anexo 2. Distancias Relativas (rf) de los Esteroides Evaluados.	II
Anexo 3. Exactitud de los Sistemas utilizados en los Radioinmunoanálisis.	III
Anexo 4. Sensibilidad de los Sistemas utilizados en los Radioinmunoanálisis.	IV
Anexo 5. Porcentaje de Biotransformación de Pregnenolona Tritiada.	V
Anexo 6. Porcentaje de Biotransformación de Testosterona Tritiada.	VI
Anexo 7. Artículo	VII

RESUMEN

En algunas especies de vertebrados el sexo es determinado por la temperatura de incubación (TI); sin embargo, los mecanismos por los que este factor lo lleva al cabo se desconocen. A partir de la hipótesis de que el tejido gonadal es el sensor de la TI, la mayoría de los estudios se han enfocado sobre la producción y efecto de los estrógenos sobre la determinación del sexo y la diferenciación gonadal, respectivamente. Pero otros estudios han sugerido que la determinación del sexo por la TI es extragonadal, postulando como el sensor al sistema nervioso central. Para examinar las dos proposiciones se analizaron en embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* el contenido y producción de esteroides en su periodo termosensible (PTS), periodo de gónada indiferenciada (PGI) y periodo de gónada diferenciada. Fueron incubados 234 huevos a $27\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (temperatura masculinizante) y 216 huevos a $32\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ (temperatura feminizante) valorándose en el vitelo, en el suero y en las gónadas, mesonefros e interrenales, así como en el cerebro (Ce), el telencéfalo (Te) y diencéfalo (Di) en los tres periodos y en cada TI el contenido de nueve esteroides sexuales y la producción de ocho de estos esteroides. En el vitelo únicamente se detectó corticosterona (B). Las interrenales de embriones masculinizados y feminizados en los tres periodos, su capacidad esteroideogénica principalmente es para la producción de corticosteroides, estando los contenidos de B en el rango de nanogramos. En todos los embriones, sin importar el periodo, las gónadas produjeron más P4 que DHA. En los embriones feminizados los contenidos y producción de testosterona (T) fueron mayores que los de estradiol (E2) con respecto a los masculinizados; sin embargo, el contenido y producción de E2 fue similar en ambos sexos. De tal manera que en *L. olivacea* en el PTS y durante la diferenciación gonadal, la TI en las gónadas regula la producción de T y no la de E2; además, la producción de esteroides sexuales precede a la diferenciación histológica de las gónadas. En el Ce de los embriones feminizados, los contenidos y producción de P4, T y E2 son mayores que en los embriones masculinizados en los tres periodos. En el Di es mayor el contenido y producción de esteroides sexuales que en el Te. En el Di de los embriones feminizados del PTS fue mayor tanto el contenido como la producción de P4 y T; por su parte, el contenido de E2 pero no su producción fue mayor en el Di de estos embriones. Por lo que el Di de *L. olivacea* al sentir la TI durante el PTS se regula la producción de P4 y T.

ABSTRACT

In some vertebrate species, sex is determined by incubation temperature (IT); nevertheless, the mechanisms involved are not completely understood. Based on the hypothesis that gonadal tissue is the sensor of IT, most studies have focused on the production and the effect of estrogens on sex determination and gonadal differentiation, respectively. Conversely, other studies have suggested that sex determination by IT is extragonadal, postulating the nervous central system as the sensor. To examine both propositions 234 embryos of the marine turtle *Lepidochelys olivacea*, were incubated at masculinizing temperature (27 ± 0.05 °C) and 216 at feminizing temperature (32 ± 0.01 °C). The levels and production of nine and eight steroids, respectively, were analyzed in both sexes during three periods of development (thermosensible period, TSP; period of undifferentiated gonad, PUG; and period of differentiated gonad, PDG). Analyses were performed on yolk, serum, gonads, mesonephros, interrenals, brain, telencephalon-olfactory bulb, and diencephalon-mesencephalon. Only corticosterone (B) was traced in yolk. Interrenals produced mainly corticosteroids, being the contents of B in nanograms in any case. The gonads of all embryos produced more progesterone (P4) than dehydroepiandrosterone (DHA). In feminized embryos, contents and production of testosterone (T) surpassed those of estradiol (E2) with respect to masculinized embryos; however, contents and production of E2 was similar in both sexes. Therefore, in *L. olivacea*, IT regulates production of T instead of E2 in TSP and throughout gonadal differentiation; moreover, production of sexual steroids precedes histological differentiation of gonads. The feminized brain has higher contents and production of P4, T, and E2 in all periods. On the other hand, contents and production of sexual steroids are greater in the diencephalon-mesencephalon as compared to telencephalon-olfactory bulb in both sexes. Both the content and production of P4 and T was higher in the diencephalon of feminized embryos of the TSP. On the other hand, the content of E2 but not its production was higher. Concluding, in *L. olivacea*, the diencephalon-mesencephalon regulates production of P4 and T through sensing IT during TSP.

DECLARACIÓN DEL TRABAJO REALIZADO

El trabajo reportado en esta tesis fue llevado a cabo por mi y en algunas etapas del proyecto conté con la ayuda de: i) Dra. Alondra Castro Campillo y M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia en la colecta de los huevos de tortuga, para lo cual se hizo con un permiso de la Secretaría de Pesca e Instituto Mexicano de la Pesca No. 180895-214-03 otorgado al Dr. Horacio Merchant Larios; ii) M. en C. Norma Moreno Mendoza y Dr. Horacio Merchant Larios en la disección de los tejidos y en la obtención de la sangre de los embriones de tortuga estudiados; iii) M. en B. E. Joaquín Herrera Muñoz investigador titular de la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social en la asesoría para determinar los contenidos y producción de esteroides sexuales; iv) Q. F. B. Héctor Macías Hernández en el procesamiento de las muestras; v) Dra. Alondra Castro Campillo en los análisis estadísticos y vi) Arq. Raymundo González Coronel en la realización de las figuras y gráficas.

INTRODUCCIÓN

En la evolución de las especies, la reproducción ha sido el evento fundamental para su perpetuación. Este hecho biológico es la integración en el tiempo y el espacio de procesos etológicos, fisiológicos y moleculares que confluyen en el desarrollo y madurez sexual de las especies animales. Sin embargo, para reproducirse las especies han tenido que sortear diversas vicisitudes y así los vertebrados han experimentado estrategias reproductivas para adaptarse a los constantes cambios del ambiente. Como ocurre, por ejemplo, con el fotoperiodo (ciclos circadiano y circanual), cambios que resultan a su vez, en fluctuaciones en la temperatura (Holmes, 1968; van Tienhoven, 1983). Las fluctuaciones ambientales han causado, por ejemplo, la extinción en masa de reptiles (v. gr., los dinosaurios, Reader, 1991), pero también han participado como moduladores de la reproducción (Sadleir, 1969). De hecho, algunas especies de vertebrados de las clases Pisces (Conover y Heins, 1987; Lagomarsino y Conover, 1993), Anfibia (Dournon *et al.*, 1990; Chardard *et al.*, 1995) y Reptilia (Spotila *et al.*, 1994) han obtenido ventaja de la temperatura ambiental de tal manera que ésta actúa como modulador epigenético en la determinación del sexo (Salame-Méndez, en prensa). En los reptiles se ha demostrado que en 52 especies, pertenecientes a los órdenes Chelonia, Crocodylia y Sauria (Janzen y Paukstis, 1991), la temperatura de incubación (TI) determina su sexo. Por ejemplo, al incubar huevos de un nido a 26-28°C (temperatura masculinizante) el 100% de la descendencia será masculina y al incubarlos a 30-32°C (temperatura feminizante) el 100% de la descendencia será femenina (Vogt y Flores-Villela, 1986).

ANTECEDENTES

Con sus estudios sobre la diferenciación sexual en anuros, Witschi (1914a, b; 1929) demostró que la temperatura del agua del acuario determinaba el sexo de las larvas que se desarrollaban ahí. Luego, Uchida (1937) y Yoshikura (1959) en urodelos y Harrington (1967) en peces, corroboraron lo mismo.

En reptiles, Riskey (1933) encontró la primera evidencia sobre el efecto de la TI en la diferenciación gonadal en tortugas. Si colocaba huevos de la tortuga *Sternotherus odoratus* que provenían de una TI mayor a los 30°C a una temperatura inferior, los ovarios de los embriones se revertían en testículos. Treinta y tres años después, el

efecto de la TI fue observado en otro reptil cuando Charnier (1966), al estudiar la biología reproductiva de la lagartija *Agama agama*, demostró que si los huevos de esta especie los incubaba a una temperatura constante de 27°C se desarrollaban principalmente hembras y si los incubaba a 29°C machos.

A partir del trabajo de Charnier (1966) fue en la década de los 70's que se acrecentó el interés por estudiar el efecto que tiene la TI sobre la determinación del sexo, así como por la diferenciación gonadal en los reptiles (Salame-Méndez, en prensa), publicándose trabajos sobre las implicaciones evolutivas (Bull, 1983), ecológicas (Vogt y Bull, 1982) y conservacionistas (Mrosovsky y Yntema, 1980), además de aspectos básicos del dimorfismo sexual gonadal con base en estudios morfológicos (Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990; Merchant-Larios *et al.*, 1989, 1997) y bioquímicos (Pieau *et al.*, 1994a; Salame-Méndez *et al.*, en prensa).

LAS HIPÓTESIS

Raynaud y Pieau (1985) al trabajar con la tortuga *Emys orbicularis*, postulan la primera hipótesis para explicar la influencia de la TI sobre la determinación del sexo y la diferenciación del primordio gonadal en testículos u ovarios, para lo cual se basaron en el periodo termosensible o crítico, en el antígeno de histocompatibilidad H-Y, así como en la producción de estrógenos. El periodo termosensible o crítico, es la etapa del desarrollo embrionario en la cual la TI determina el sexo; ni antes ni después de éste, la temperatura produce algún efecto en la diferenciación sexual. Cabe mencionar que el antígeno H-Y fue propuesto como el factor determinante del testículo (FDT o TDF: testicular determining factor), independientemente de que tipo de especies heterogaméticas, XY o ZW, se tratara (Wachtel y Koo, 1981). Sin embargo, McLaren *et al.* (1984) y Simpson *et al.* (1987) refutaron experimentalmente que este antígeno de histocompatibilidad fuera el FDT.

Raynaud y Pieau (1985) proponen que en los embriones con un primordio gonadal H-Y⁺ y que se desarrollan a 29°C (temperatura feminizante) se estimula durante el periodo termosensible: i) la biosíntesis del antígeno H-Y y su receptor y ii) la producción de estrógenos, por lo que se llevará al cabo la diferenciación de los ovarios. Por el contrario, si el primordio gonadal de los embriones es H-Y⁻ y se desarrollan a 27°C (temperatura masculinizante), la producción de los estrógenos será baja o nula resultando en la diferenciación de los testículos.

Crews *et al.* (1989) proponen una segunda hipótesis a partir de sus resultados con la tortuga *Chelydra serpentina*. Estos autores sugieren que la determinación del sexo en esta especie, así como en otras tortugas donde su sexo se determina por la TI como *Chrysemys picta*, se debe a la regulación diferencial en la síntesis de hormonas esteroides sexuales (HES). En primer lugar, la TI en el vitelo regula la liberación tanto de precursores (pregnenolona, P5) como de HES (progesterona, P4; testosterona, T; estradiol, E2). Además, la TI regula de manera diferencial la producción de andrógenos o estrógenos en las gónadas y/o interrenales embrionarias. La diferenciación gonadal femenina se lleva al cabo porque la TI feminizante estimula las aromatasas (enzimas que biotransforman andrógenos como la T en estrógenos), lo que favorece la mayor producción de estrógenos. Los estrógenos como el E2, al antagonizar la acción de los andrógenos, estimularán el desarrollo de la región epitelial somática de la corteza del primordio gonadal, dando como resultado la diferenciación de los ovarios.

En base de la hipótesis anterior, Crews y Bergeron (1994) proponen que la determinación del sexo por la TI en la tortuga *Trachemys scripta* se debe a la regulación del metabolismo de la T. Así, la diferenciación sexual gonadal masculina se debe a que la TI masculinizante, favorece tanto la expresión de los genes de las reductasas como del gen que codifica el receptor de la 5 α -dihidro-testosterona (DHT). La TI masculinizante junto con la DHT inhibe tanto el gen de la aromatasa como el receptor a estrógenos. De tal manera, la 5 α -reductasa al biotransformar la T en DHT y al estar presente su receptor llevaría al cabo la diferenciación de los testículos. En el caso de la diferenciación sexual femenina, la TI feminizante regulará tanto la expresión del gen de las aromatasas como la expresión del gen del receptor a estrógenos. De tal manera que la diferenciación de los ovarios se daría a partir de que el gen de la 5 α -reductasa al permanecer de manera constitutiva, el E2 reprimiría al gen del receptor para la DHT o por un mecanismo de retroalimentación negativa el E2 reprimiría al gen de la 5 α -reductasa.

Merchant y Villalpando (1990) postulan una tercera hipótesis a partir de sus estudios previos en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Estos autores proponen que la TI feminizante actúa de manera indirecta, es decir a nivel extragonadal, llevándose al cabo la diferenciación de los ovarios por inducción a nivel del sistema nervioso central (SNC) de la secreción de una(s) neurohormona(s). Su modelo es el siguiente: la TI al modular la secreción de la(s)

neurohormona(s) que actuaría(n) como factor(es) morfogenético(s) sobre el primordio gonadal. En este tejido la(s) neurohormona(s) estimularía(n) la aromatización y los estrógenos producidos, como el E2, desencadenarían la diferenciación gonadal femenina.

Por su parte, Janzen y Paukstis (1991) proponen otra hipótesis que relaciona, por un lado, la regulación de genes sexo-determinantes en quelonios sexo-termodependientes (Nakamura *et al.*, 1987; Nakamura, 1989) y, por otro, la proposición hecha por Deeming y Ferguson (1989) de que la determinación del sexo por la TI en cocodrilos se da por medio de la regulación de gonadotropinas. En breve, Jansen y Paukstis (1991) plantean que la TI determina el sexo a partir de regular un gen sexo-determinante a nivel del SNC y/o gonadal. Proponiendo que en el SNC, el órgano blanco de la TI es el hipotálamo y que la TI masculinizante favorece en este tejido la expresión de un gen sexo-determinante cuya proteína al actuar como "molécula efectora", propiciaría la secreción del factor liberador de la hormona luteinizante (FLHL). El FLHL actuaría sobre la adenohipófisis estimulando la secreción de la hormona luteinizante, misma que regulará el metabolismo de andrógenos (v. gr., T). A nivel gonadal, la "molécula efectora" regularía la expresión del gen de las aromatasas por lo que se llevaría a cabo la síntesis de estrógenos (v. gr., E2).

Las hipótesis descritas no son excluyentes, sino que concuerdan en que la TI directa y/o indirectamente: i) actúa en la determinación del sexo en un estadio específico del desarrollo (periodo termosensible o crítico) y ii) a partir de la regulación en la producción de estrógenos, se llevará a cabo la diferenciación sexual gonadal.

LAS EVIDENCIAS EXPERIMENTALES

El hecho de que las HES sean el común denominador en las hipótesis descritas, se fundamenta en la teoría hormonal de la diferenciación sexual. En esta teoría se propone que la diferenciación sexual gonadal es regulada por la acción de las HES en etapas específicas del desarrollo embrionario, siendo los andrógenos los responsables de la diferenciación de los testículos y los estrógenos de los ovarios (Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, en prensa). La teoría tiene varias evidencias que la favorecen entre las que destacan: i) la reversión sexual por la administración de esteroides sexuales (ver por ejemplo peces, Hunter y Donaldson, 1983; anfibios, Villalpando y Merchant-Larios, 1990; reptiles, en especies cuyo sexo no se determina por la TI, Gallien, 1973, y

en especies con determinación del sexo por la TI, Crews *et al.*, 1994; aves, Scheib, 1983; mamíferos marsupiales, Burns, 1961) y ii) que en ausencia de enzimas involucradas en la biosíntesis de HES, no hay desarrollo gonadal (Luo *et al.*, 1994).

Con base en la teoría hormonal Bogart (1987) propone que la diferenciación gonadal se debe a una producción diferencial entre andrógenos y estrógenos. Si la concentración de andrógenos es mayor que la de estrógenos, se llevará al cabo la diferenciación de los testículos, si por el contrario la concentración de los estrógenos es mayor que los andrógenos se diferenciarán los ovarios.

A partir de la teoría hormonal, de la hipótesis de Bogart (1989) y de las hipótesis propuestas sobre la determinación del sexo y la diferenciación gonadal por efecto de la TI, se plantea una hipótesis integrativa (Salame-Méndez, en prensa): i) durante el periodo termosensible la TI masculinizante determina el sexo y estimula la producción de andrógenos (v. gr., T) a nivel gonadal, los cuales regularán la diferenciación de los testículos y ii) durante el periodo termosensible la TI feminizante al determinar el sexo favorecerá a nivel gonadal la biosíntesis de estrógenos (v. gr., E2), que provocarán la diferenciación de los ovarios

La hipótesis integrativa ha sido puesta a prueba en siete especies de quelonios sexo-termodependientes, cinco de ellas dulceacuícolas -*Emys orbicularis* (Pieau *et al.*, 1994b), *Chelydra serpentina* (Crews *et al.*, 1994), *Testudo graeca* (Pieau, 1975), *Trachemys scripta* (Wibbels *et al.*, 1991b) y *Malaclemys terrapin* (Jayasuria *et al.*, 1994)- y dos marinas: *Dermochelys coriacea* (Desvages *et al.*, 1993) y *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990; Merchant-Larios *et al.*, 1997; Salame-Méndez *et al.*, 1998). En general, se han llevado al cabo tres estrategias experimentales: i) administrar HES y agonistas de éstas; ii) dilucidar su síntesis y iii) determinar la presencia de sus receptores.

Para abordar la primera estrategia se han administrado: i) andrógenos: androstendiona (Crews *et al.*, 1995); T (Pieau, 1974; Gutzque y Bull, 1986; Gutzque y Chymiy, 1988; Crews *et al.*, 1989); DHT (Wibbels y Crews, 1995; Wibbels *et al.*, 1991b); ii) estrógenos: E2 (Pieau, 1969, 1970; Bull *et al.*, 1988b; Gutzque y Chymiy, 1988; Crews *et al.*, 1991; Dorizzi *et al.*, 1991; Wibbels *et al.*, 1991a; Crews *et al.*, 1994; Wibbels y Crews, 1995; Merchant-Larios *et al.*, 1997); estrona (Crews *et al.*, 1995) y iii) administrar anticuerpos contra T y E2, así como de agonistas androgénicos o estrogénicos (Crews *et al.*, 1989; Wibbels y Crews, 1995).

La segunda estrategia experimental, la determinación de la síntesis de las HES, se ha abordado de la siguiente manera: i) caracterización histoquímica de la actividad de enzimas esteroidogénicas en tejidos urogenitales (gónadas, mesonefros e interrenales) durante diversos periodos del desarrollo embrionario (Pieau, 1972, 1973, 1974; Merchant-Larios *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1992); ii) evaluación de la actividad de las aromatasas (proceso de aromatización) (Desvages y Pieau, 1992a, b; Desvages *et al.*, 1993; Crews y Bergeron, 1994; Crews *et al.*, 1994; Jeyasuria *et al.*, 1994), así como bloquear su actividad (Crews y Bergeron 1994; Rhen y Lang, 1994; Dorizzi *et al.*, 1994); iii) evaluación de los contenidos de esteroides sexuales en el suero y en las gónadas durante diferentes etapas de la diferenciación sexual (Pieau *et al.*, 1982; Dorizzi *et al.*, 1991; Salame-Méndez, 1992; White y Thomas, 1992b); iv) determinación de la producción *in vitro* de andrógenos, estrógenos y glucocorticoides, así como la determinación de sus contenidos en tejidos urogenitales (Desvages y Pieau, 1991; Desvages *et al.*, 1993; Salame-Méndez, 1992; White y Thomas, 1992a; Desvages *et al.*, 1993; Salame-Méndez *et al.*, 1998) y en el cerebro (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

Con respecto a la tercera estrategia, se ha establecido la presencia del receptor de estrógenos, complejo citoplasmático 9S, en las gónadas, mesonefros e interrenales de embriones de ambos sexos (Salame-Méndez, 1992) y por autorradiografía en órganos urogenitales embrionarios (Gahr *et al.*, 1992). También, se ha bloqueado este receptor durante la diferenciación gonadal femenina (Dorizzi *et al.*, 1987, 1991; Crews *et al.*, 1994; Wibbels y Crews, 1995).

Otras estrategias experimentales que se han llevado al cabo son las siguientes: i) determinación de antígenos de superficie como el H-Y (Engel *et al.*, 1981; Zaborski *et al.*, 1988); ii) presencia de proteínas de choque térmico (Schlesinger, 1989) y iii) determinación de la presencia de genes sexo-determinantes previamente demostrados en otras especies de vertebrados (ZFY, Bull *et al.*, 1988a; SRY, Tiersch *et al.*, 1991; Coriat *et al.*, 1994; Spotila *et al.*, 1994), así como de secuencias de ADN del cromosoma W (Bkm) (Demas y Wachtel, 1990; Demas *et al.*, 1990). Los resultados de esta última estrategia experimental, han demostrado que estos genes o algunas de sus secuencias, están presentes en animales de ambos sexos. Sin embargo, resta determinar su presencia en tejidos embrionarios, así como el estudiar en que momento de la ontogenia de la diferenciación gonadal se expresan estos genes y qué es lo que regulan.

Los resultados obtenidos en las siete especies de quelonios sexo-termodependientes a partir de la estrategia experimental de la administración de estrógenos y de agonistas, así como de bloquear tanto la aromatización como el receptor a estrógenos, se resumen como sigue: i) los estrógenos administrados contrarrestan el efecto de la TI masculinizante, de tal manera que se desarrollan ovarios; ii) los anticuerpos contra estrógenos y el bloqueo de la aromatización provocan que se diferencien testículos en los embriones desarrollados a la TI feminizante y iii) al inhibir el receptor a estrógenos en embriones desarrollados a la TI feminizante se desarrollan ovotestes.

Es importante señalar que a pesar de que estas evidencias apoyan la hipótesis de que la diferenciación sexual femenina en tortugas sexo-termodependientes es estrógeno-dependiente, son evidencias experimentales de tipo farmacológico, por lo que tal vez no sean aplicables a las condiciones fisiológicas de los organismos (Salame-Méndez, en prensa). A embriones que se desarrollan en la TI masculinizante al administrarles E2 en efecto, se provoca la formación de ovarios (Wibbels *et al.*, 1992), pero estos son de menor tamaño que los desarrollados normalmente (Merchant-Larios *et al.*, 1997); además, se pueden causar efectos teratogénicos (Pieau, 1975). O al administrar T a embriones desarrollados a la TI masculinizante, se puede producir un efecto paradójico pues se desarrollan tanto ovarios como caracteres sexuales femeninos (Gallien, 1973; Pieau, 1975).

Por su parte, los resultados referentes a los estudios de la segunda estrategia experimental que se refiere a la producción de HES, se agrupan en dos patrones: i) la existencia de una relación entre la TI, el favorecimiento de la producción de HES a nivel gonadal y su subsecuente diferenciación y ii) la existencia de una relación entre la TI y el favorecimiento de la producción de HES a nivel de las interrenales durante la diferenciación de las gónadas.

Con respecto al primer patrón hay dos variantes. La primera ha sido demostrada en las tortugas *Emys orbicularis* (Desvages y Pieau, 1991; 1992a, b), *Malaclemys terrapin* (Jeyasuria *et al.*, 1994) y *Dermochelys coriacea* (Desvages *et al.*, 1993). Durante la etapa de la diferenciación gonadal femenina y bajo el efecto de la TI feminizante en las tres especies, es mayor la actividad de las aromatasas. Sin embargo, hay evidencias contradictorias a estos resultados. Por un lado, no se detectan estrógenos y, por otro, sus contenidos son similares o inferiores al de los embriones

desarrollados a la TI masculinizante. Pieau (1972, 1973, 1974) en *E. orbicularis* al evaluar histoquímicamente la actividad de la enzima 3 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3 β -HED), sólo encontró actividad enzimática en tejidos urogenitales masculinos. Por otra parte Pieau *et al.* (1982) al determinar en las gónadas de *E. orbicularis* los contenidos de HES (v. gr., E2), los estrógenos fueron mayores que los andrógenos en los embriones desarrollados a la TI masculinizante. Además, en esta misma especie, no hubo biotransformación de los precursores a estrógenos durante el periodo termosensible (Desvages y Pieau, 1991) y al determinar por cromatografía líquida de alta presión diversos esteroides en las gónadas de embriones feminizados Desvages y Pieau (1991) sólo encontraron restos de estrógenos (estradiol y estrona); además, de ser muy bajos los contenidos de estrógenos en las gónadas de las hembras (Dorizzi *et al.*, 1991; Desvages y Pieau, 1992a).

La segunda variante se encuentra en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. En esta especie durante el periodo termosensible al determinar los contenidos en el suero y la producción en las gónadas de T y E2 fue mayor la de T en las hembras; además, de no haber diferencia en la producción de E2 en las gónadas de los embriones feminizados con los masculinizados (Salame-Méndez, 1992; Salame-Méndez *et al.*, 1998).

En el segundo patrón también se presentan dos variantes. La primera corresponde a *Trachemys scripta* donde Thomas *et al.* (1992) al estudiar por histoquímica la actividad de tres hidroxilasas (3 α -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa; 3 β -HED y 17 β -HED) sólo encontraron su actividad en el complejo tisular adrenal-riñón sin diferencias entre embriones masculinos y femeninos. Este hallazgo fue corroborado por White y Thomas (1992a, b, c) quienes al estudiar la biosíntesis de P4, T, E2 y corticosterona (B), demostraron que únicamente el complejo tisular adrenal-riñón lo lleva a cabo antes de la diferenciación gonadal femenina. Con estas evidencias, así como lo demostrado por Merchant-Larios *et al.* (1989) de que sólo en las interrenales se hace evidente la actividad de la enzima 3 β -HED, White y Thomas (1992a, b) proponen que a partir del complejo adrenal-riñón se regula la diferenciación sexual gonadal. Por otro lado, en las gónadas de embriones de *Emys orbicularis* desarrollados en la TI feminizante son mayores los contenidos de estrógenos (Desvages y Pieau, 1992a).

La segunda variante se da en *Lepidochelys olivacea*, especie en donde los contenidos de T y E2 son mayores en el diencéfalo de las hembras durante el periodo

de determinación del sexo, así como antes y durante la diferenciación morfológica de la gónada (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

Los patrones anteriormente descritos, permiten apreciar lo complejo que hasta la fecha ha sido, al menos para estas siete especies de quelonios sexotermodependientes, establecer un modelo general que describa como la TI determina el sexo y regula la subsecuente diferenciación gonadal a través de una producción diferencial de HES. Por otro lado, al correlacionar el efecto de la TI con la morfogénesis gonadal Pieau (1978) propuso en *Emys orbicularis*: i) la TI modula la morfogénesis gonadal femenina, debido a que provoca la regresión de los cordones medulares: a mayor temperatura mayor regresión y ii) la TI feminizante es responsable de iniciar la profase meiótica, así como del crecimiento de los ovocitos. Por su parte, Ruiz-Ramírez (1995) demuestra que el E2 promueve la regresión de los cordones medulares. De tal manera que es posible que las HES tengan un efecto de tipo parácrino y/o autócrino (O'Malley, 1989) en la diferenciación gonadal en las especies cuyo sexo se determina por la TI. La T producida por las células esteroideogénicas gonadales, parácrinamente regulará el desarrollo de los cordones medulares al inhibir la acción de los estrógenos (v. gr., E2) a nivel medular y cortical, dando lugar a la morfogénesis de los testículos. Por su parte, el E2 autócrinamente provocará la regresión de los cordones medulares y estimulará el crecimiento de la región cortical, dando lugar a la morfogénesis de los ovarios (Salame-Méndez, en prensa).

A partir de los patrones antes mencionados, se puede resumir la participación de los andrógenos y estrógenos en la diferenciación sexual gonadal en quelonios sexotermodependientes de la siguiente manera: i) durante la diferenciación de los ovarios hay una correlación entre la TI feminizante y la mayor producción de estrógenos gonadales; ii) durante la diferenciación de los ovarios hay una correlación entre la TI feminizante y la mayor producción en el complejo adrenal-riñón de T y E2, así como de P4 y B y iii) durante la diferenciación de los testículos o de los ovarios hay una correlación entre la TI masculinizante o feminizante con la mayor producción de testosterona.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación del sexo es el establecimiento de procesos moleculares irreversibles a partir de los cuales se diferencian machos o hembras (Merchant-Larios *et al.*, 1997); sin embargo, estos procesos se desconocen en especies de reptiles en donde su sexo se determina por la TI. Los estudios para abordar este hecho se han enfocado principalmente en la producción de esteroides sexuales a nivel gonadal, basándose en la hipótesis general de trabajo propuesta por Raynaud y Pieau (1985), la cual sugiere que la biosíntesis de los estrógenos en las gónadas indiferenciadas es la clave tanto de la determinación del sexo como de su diferenciación en ovarios o testículos.

Al abordar esta hipótesis hay evidencias tanto a nivel de Familia (inter-especie) como de Orden que no la apoyan. En los ovarios de *E. orbicularis* (Dorizzi *et al.*, 1991) el contenido de E2 es mayor; pero durante el periodo termosensible las gónadas de los embriones feminizados y masculinizados, la producción de estrógenos es muy baja (Desvages y Pieau, 1991) a pesar de que la actividad de las aromatasas son mayores en los embriones feminizados (Desvages y Pieau, 1992a, b). Por su parte, en *Trachemys scripta* a partir del metabolismo de la T en DHT se lleva a cabo la determinación del sexo y la diferenciación gonadal (Crews y Bergeron, 1994) y en los testículos de esta tortuga (White y Thomas, 1992a), así como en las gónadas de embriones feminizados y masculinizados de *L. olivacea* (Salame-Méndez, 1992) es mayor la producción de T; además, en esta especie no hay diferencia en la producción de E2. Por otro lado, los primordios urogenitales de embriones de *Alligator mississippiensis* desarrollados a la TI feminizante, su producción de E2 no es diferente al de los embriones de la temperatura masculinizante (Lance y Bogart, 1994).

Las evidencias anteriores, permiten constatar que a nivel gonadal no hay una correlación entre el efecto de la TI feminizante y la mayor producción de E2, tanto en la determinación del sexo como en la diferenciación de los ovarios. De tal manera, es posible que la determinación del sexo y la regulación de la diferenciación gonadal en tortugas sexo-termodependientes se lleve a cabo a partir de que la TI regule la producción de testosterona.

A partir de los datos previamente obtenidos en *L. olivacea* (Salame-Méndez, 1992) de que las gónadas indiferenciadas de los embriones masculinizados y feminizados producían T y E2, era necesario conocer las vías esteroidogénicas por las

cuales estas hormonas eran sintetizadas en periodos previos a la diferenciación de las gónadas; así como, el de conocer como los producían los tejidos adyacentes a las gónadas: los mesonefros y las interrenales. Por lo tanto, para abordar el estudio del efecto de la temperatura de incubación en la determinación del sexo y en la diferenciación de las gónadas, es fundamental establecer el momento en que la TI determina el sexo. A partir de los experimentos de intercambio, transferir embriones en diferentes periodos de desarrollo de la TI feminizante a la masculinizante y viceversa, Merchant-Larios *et al.* (1997) en *L. olivacea* establecieron tres periodos relacionados con la determinación del sexo: i) el periodo indeterminado (PI); ii) el periodo termosensible (PTS) y iii) el periodo de determinación del sexo (PDS). El PI es aquel en donde todos los embriones responden a un cambio de temperatura. El PTS es el periodo en el cual algunos embriones ya no responden al cambio de TI es decir, su sexo ya se ha determinado; por lo tanto el PTS es el tiempo de incubación requerido por algunos embriones de una especie para que su sexo se determine (PDS).

Durante el PDS se inician los procesos morfogenéticos de la diferenciación gonadal, por lo que incluye dos periodos: el periodo de gónada indiferenciada (PGI) y el periodo de gónada diferenciada (PGD) (Merchant-Larios *et al.*, 1997). En el PGI, que se da después del PTS, aún no hay diferencias histológicas entre las gónadas de los embriones desarrollados bajo el efecto de la TI masculinizante o feminizante. Por su parte, en el PGD ya se distinguen histológicamente los testiculos y los ovarios.

Por otra parte, el hecho de que no hay diferencias significativas en el contenido y en la capacidad de producir E2 en las gónadas de embriones de *L. olivacea* desarrollados a la TI feminizante con los de la masculinizante (Salame-Méndez, 1992). El complejo adrenal-riñón de embriones de *T. scripta* responden sexo-específicamente a las gonadotropinas (White y Thomas, 1992b, c). La administración de E2 a embriones de *L. olivacea* desarrollados a la TI masculinizante ocasiona la feminización de la gónada pero difiere de la inducida por la TI feminizante (Merchant-Larios *et al.*, 1997) y, en cultivo de órganos, el E2 no provoca la feminización de las gónadas (Ruíz-Ramírez, 1995). Estas evidencias permiten sugerir que sería posible que la determinación del sexo y la regulación de la diferenciación gonadal en tortugas sexo-termodependientes se lleve a cabo a un nivel tisular diferente del gonadal (Salame-Méndez, en prensa). A este respecto, varios autores han encontrado relación con el SNC. Pearson *et al.* (1983) determinaron neurohormonas (v. gr., LH y ACTH) durante la ontogenia de la pituitaria

de *Caretta caretta*. Merchant-Larios *et al.* (1989) demostraron la presencia de terminaciones nerviosas en las gónadas indiferenciadas de *L. olivacea*. En el periodo termosensible Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (1990) al cultivar *in vitro* una de las dos gónadas indiferenciadas de un embrión de *L. olivacea* desarrollado en la TI feminizante, la gónada se diferencia de acuerdo a la temperatura de procedencia. Sin embargo, la gónada contralateral del mismo embrión cultivada *in vitro* no responde al cambio de temperatura de incubación. A partir de estos resultados, Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (1990) propusieron que el sistema neuroendócrino pudiera ser importante en la determinación del sexo en *L. olivacea*.

Todas estas evidencias apoyan la sugerencia de que aunque la determinación del sexo esté controlada por la TI a nivel del primordio gonadal, ésta podría darse en un órgano extragonadal termosensible (Salame-Méndez *et al.*, 1998). De tal manera, se puede suponer que durante la determinación del sexo en *L. olivacea* el órgano sensor de la TI sería el cerebro y como consecuencia se regularía la producción de estrógenos. Por lo tanto, para abordar esta proposición se tenía que conocer en el cerebro tanto los contenidos como la producción de esteroides sexuales para constatar si durante la determinación del sexo y la diferenciación histológica de las gónadas había la existencia o no de una diferencia en la producción de esteroides sexuales (v. gr., E2) entre los embriones desarrollados en la temperatura feminizante con los de la temperatura masculinizante.

En resumen, para *Lepidochelys olivacea*: i) se conoce el periodo en el cual los embriones responden a la temperatura de incubación (PTS); ii) se conoce el periodo en que la TI determina el sexo (PDS); iii) se ha demostrado que el estradiol exógeno contrarresta el efecto de la TI masculinizante; iv) el estradiol no provoca la reversión sexual *in vitro*; v) las gónadas de los embriones masculinizados y feminizados producen T y E2; vi) no hay diferencia en la producción de E2 entre las gónadas de embriones feminizados con los masculinizados; vii) se han encontrado terminaciones nerviosas en las gónadas indiferenciadas y viii) se ha comprobado que durante el PTS, las gónadas de embriones feminizados cultivadas *in vitro* no responden al cambio de temperatura.

De tal manera, Merchant-Larios propone que en *L. olivacea* puede haber dos posibles niveles a partir de los cuales la TI determina su sexo (en Salame-Méndez *et al.*, 1998). Si la determinación del sexo ocurriera a nivel gonadal sus termoreceptores

emitirían señales que regularían procesos moleculares irreversibles y, como consecuencia, se regularía la producción de andrógenos o estrógenos que serían el pivote molecular que desencadenaría la diferenciación morfológica de la gónada. Por otra parte, si la determinación del sexo se diera a nivel del cerebro, sus termoreceptores emitirían señales que regularían la producción de andrógenos o estrógenos, por lo que la diferenciación gonadal sería un proceso secundario.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la diferenciación sexual de *Lepidochelys olivacea*, si el estradiol exógeno contrarresta el efecto de la temperatura masculinizante, entonces durante el periodo termosensible la temperatura feminizante estimulará que haya una mayor concentración de estradiol en un órgano sensor, como las gónadas o el cerebro.

OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo se estudió experimentalmente en el periodo termosensible (PTS), el periodo de gónada indiferenciada (PGI) y el periodo de gónada diferenciada (PGD) de *Lepidochelys olivacea*; para lo cual se abordaron tres objetivos generales y uno particular.

Objetivos generales

- i) Determinar los contenidos de esteroides sexuales en el vitelo y el suero.
- ii) Determinar los contenidos de esteroides sexuales en las gónadas, los mesonefros y las interrenales (tejidos urogenitales), así como en el cerebro (Ce) y en dos de sus regiones: el telencéfalo (Te) y el diencefalo (Di) (Fig. 1).
- iii) Evaluar la capacidad de biotransformar precursores radiactivos en determinados metabolitos de esteroides sexuales en los tejidos urogenitales, el Ce, el Te y el Di.

Objetivo particular

Demostrar si la temperatura feminizante promueve una mayor producción de estradiol en las gónadas, en el telencéfalo o en el diencefalo en alguno de los tres periodos estudiados.

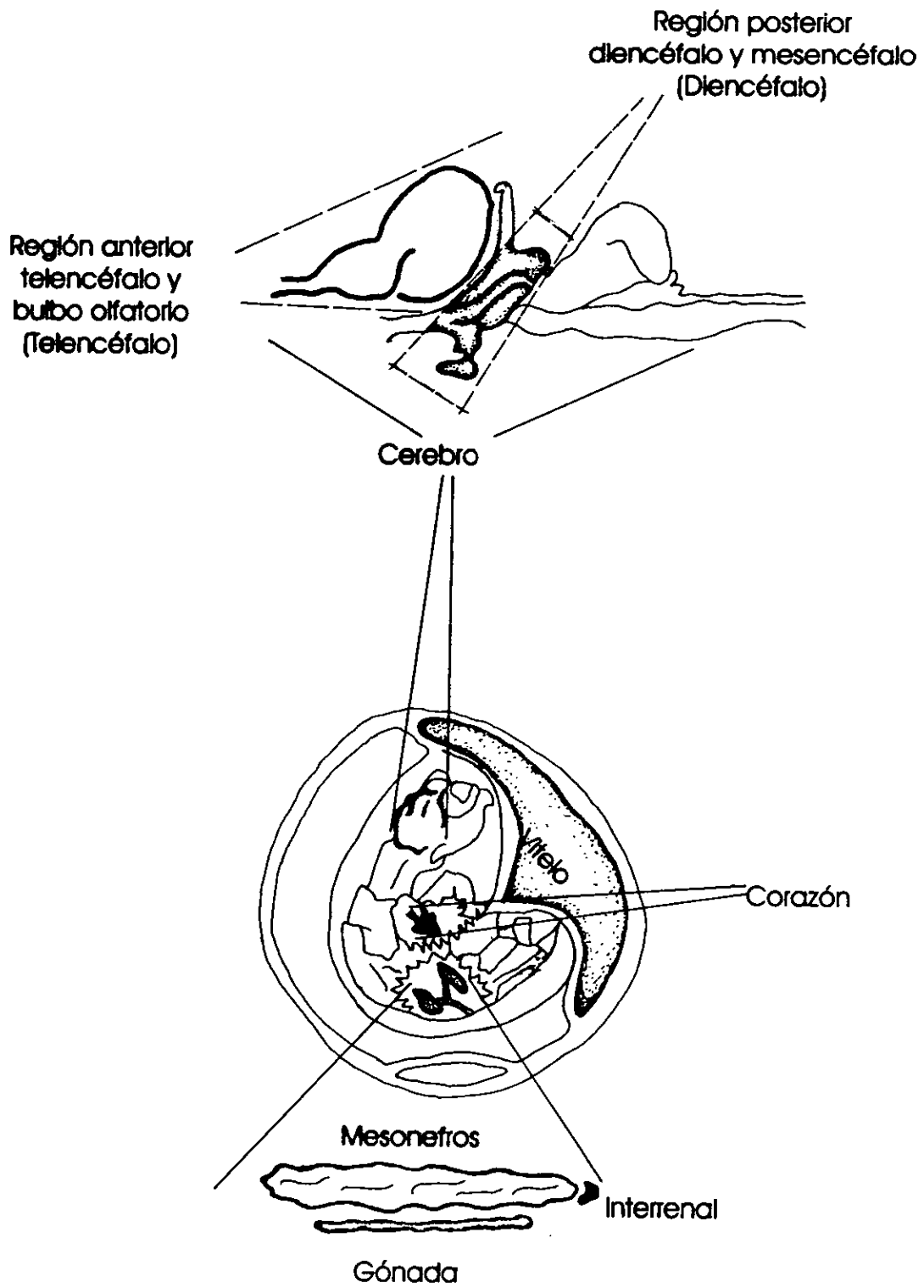


Fig. 1. Muestras en las que se evaluaron los contenidos y producción de esteroides sexuales.

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES

- **Material Biológico.** Huevos recién ovipositados de *L. olivacea* fueron colectados de nidos en la playa La Escobilla (96° 27' 16" W, 15° 40' 36" N) de la costa central de Oaxaca, México; el total de nidos utilizados fueron cinco y colectados en los años de 1993-1995. Los huevos se colocaron en cajas de unicel conteniendo vermiculita esterilizada y húmeda, transportándose por vía terrestre al laboratorio; siendo en promedio 12 hrs el tiempo transcurrido desde la colecta hasta la incubación en el laboratorio. Se incubaron 234 huevos a 27±0.5°C (temperatura masculinizante) y 216 huevos a 32±0.1°C (temperatura feminizante), bajo una humedad relativa de 40±2%.

- **Esteroides de Referencia** (nomenclatura según Kime, 1995). 3β-hidroxi-5-pregнено-20-ona (pregnenolona [P5]); 3β-hidroxi-5-androsteno-17-ona (dehidroepiandrosterona [DHA]); 4-pregнено-3,20-diona (progesterona [P4]); 17α-hidroxi-4-pregнено-3,20 diona (17α-hidroxi-progesterona [17P4]); 4-androsteno-3,17-diona (androstendiona [A]); 17β-hidroxi-4-androsteno-3-ona (testosterona [T]); 1,3,5(10)-estratrieno-3,17β-diol (estradiol [E2]); 1,3,5(10)-estratrieno-3-ol-17ona (estrone [E1]), y 11β,21-dihidroxi-4-pregнено-3,20-diona (corticosterona [B]). Obtenidos de Steraloids (Wilton, New Haven, EUA) y purificados previo uso por cromatografía en capa fina (CCF).

- **Esteroides Radiactivos.** Pregnenolona (7-³H)(ae 27 Ci/mmol); dehidroepiandrosterona (1,2-³H)(ae 46 Ci/mmol); progesterona (1,2,6,7-³H)(ae 83 Ci/mmol); 17-α-hidroxi-progesterona (1,2-³H)(ae 44 Ci/mmol); androstendiona (1,2,6,7-³H)(ae 84 Ci/mmol); testosterona (1,2,6,7,16,17-³H)(ae 139 Ci/mmol); estradiol (2,4,6,7,16,17-³H)(ae 140 Ci/mmol); estrone (2,4,6,7,16,17-³H)(ae 140 Ci/mmol) y corticosterona (1,2-³H)(ae 4 Ci/mmol) fueron obtenidos de New England Nuclear (Boston, Ma.). Purificándose previo uso por CCF.

- **Antisueros.** Estos fueron provistos por el Dr. José Arturo Bermúdez, Jefe de la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los antisueros utilizados fueron

previamente obtenidos a partir de haptenos-19-hemisuccinatos unidos a albúmina sérica bovina y generados en conejo a partir de la técnica descrita por Bermúdez *et al.* (1975). La especificidad de cada uno de los antisueros se da en el Anexo 1.

MÉTODOS

• **Determinación de los contenidos de esteroides sexuales.** La determinación de los contenidos de esteroides que conforman la vía $\Delta 4$ (P4; 17P4 y A), uno de la vía $\Delta 5$ (DHA), así como de T, E2 y B (Fig. 2) se hizo por técnicas radioinmunoanalíticas (RIA). Cada esteroide fue medido por RIA en las gónadas, mesonefros, interrenales, cerebro, telencéfalo, diencéfalo, vitelo y suero en los tres periodos, en cada temperatura de incubación, en tres series experimentales independientes y cada una de ellas por triplicado; resultando, un análisis total de 234 embriones (126 desarrollados en la TI masculinizante y 108 en la TI feminizante). Los tejidos disectados (Tabla 1) se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo 100 μ l de Ringer para reptiles (RR) (New, 1966) y se homogeneizaron. De cada homogenado se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica de bovino (ASB) para la curva patrón. La determinación de los esteroides en el vitelo se hizo sobre una muestra de 1 ml; por cada periodo y por cada temperatura se analizaron 9 huevos (54 en total). El suero se obtuvo a partir de colectar, por punción cardíaca, la sangre en tubos Eppendorf los cuales se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente, transfiriéndose el suero a otro tubo Eppendorf. Para determinar los esteroides en el suero, en el caso de los embriones del periodo termosensible desarrollados en la TI masculinizante se agruparon seis sueros y dos sueros para los de la TI feminizante, así como para los otros dos periodos a cada TI. Las muestras de los vitelos, de los sueros y de los tejidos homogenados se guardaron a -20°C hasta la previa valoración de los esteroides.

• **Extracción de los esteroides.** Las muestras de los vitelos, de los sueros y de los tejidos homogenados se transfirieron a tubos cónicos para su extracción conteniendo cada uno de los tubos ≈ 1000 cpm de cada esteroide tritiado como trazadores para valorar el porcentaje de recuperación. La extracción de los esteroides se hizo gregando a cada tubo 500 μ l de éter dietílico mezclándose en vórtex por 1 min; la extracción se realizó por duplicado. Para separar la fase orgánica de la acuosa, cada tubo se colocó

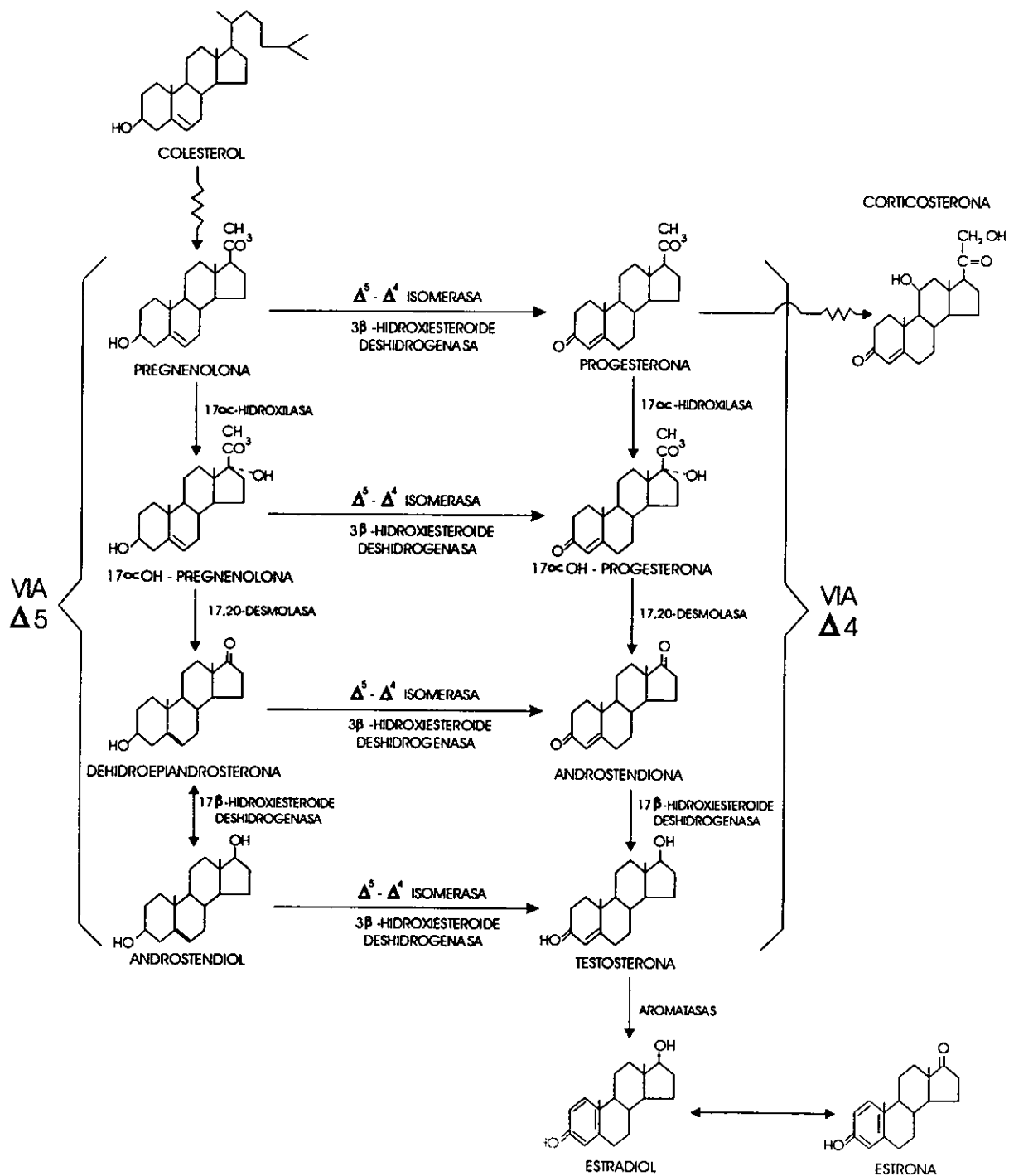


Fig. 2. Vías biosintéticas descritas para las hormonas esteroideas

Tabla 1. Muestras de los tejidos y número total de embriones de *Lepidochelys olivacea* utilizados para determinar los contenidos de esteroides sexuales.

P	TI	DI	EDE	Go	Me	In	Ce	Te	Di
PTS	27±0.5	20	20/21	6* (27)*	2(9)	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
PTS	32±0.1	20	23/24	2(9)	2(9)	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
PGI	27±0.5	27	23/24	2(9)	2(9)	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
PGI	32±0.1	27	26/27	2(9)	2(9)	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
PGD	27±0.5	45	27/28	2(9)	2(9)	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
PGD	32±0.1	33	27/28	2(9)	2(9)	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)

P, periodo: PTS, periodo termosensible; PGI, periodo de gónada indiferenciada; PGD, periodo de gónada diferenciada; TI, temperatura de incubación; 27±0.5, temperatura de incubación masculinizante; 32±0.1, temperatura de incubación feminizante; DI, días de incubación; EDE, estadio de desarrollo embrionario; Go, gónadas; Me, mesonefros; In, interrenales; Ce, cerebro; Te, telencéfalo; Di, diencéfalo. ♦ este número que antecede al paréntesis se refiere al número de tejidos que se agruparon para cuantificar cada esteroide. * este número entre paréntesis indica el número total de embriones analizados.

en un baño de hielo seco-acetona; al congelarse la fase acuosa, la orgánica se decantó a otro tubo y se evaporó a sequedad.

• **Separación de los esteroides sexuales por cromatografía en capa fina.** A cada tubo que contenía los esteroides extraídos, se le agregó una disolución de éter dietílico:metanol (2:1 v/v) con la que se transfirió a placas de vidrio cubiertas con 0.25 mm de gel de sílice e indicador para absorción de radiación ultravioleta de 254 nm (Merck). En un par de zonas de la cromatoplaque se aplicaron 2 μ g de cada esteroide no marcado como referencias. Cada esteroide a ser analizado fue separado a partir de colocar cada cromatoplaque en tres sistemas cromatográficos (i: benceno; ii: benceno-acetato de etilo 7:3 v/v y iii: benceno:metanol 95:5 v/v). El esteroide de referencia presente en cada cromatoplaque se visualizó con radiación uv (254 y 366 nm), así como con el reactivo de Oërtel (ácido sulfúrico:etanol, 2:1 v/v). A partir del rf (distancia relativa) correspondiente a cada esteroide de referencia (Anexo 2) se raspó el área del esteroide a analizar y se colectó el sílice en pipetas Pasteur que en su cuello contenían fibra de vidrio. El esteroide adsorbido en el sílice se separó con 1.1 ml de éter:metanol (1:1 v/v), recuperándose en tubos de ensaye.

• **Radioinmunoanálisis.** De cada tubo conteniendo el esteroide separado del sílice se tomó una alícuota de 500 μ l (1/2) y se transfirió a un vial para valorar la recuperación; evaporándose la disolución éter:metanol (1:1 v/v) en estufa a 30°C con vacío. El porcentaje de recuperación de la radiactividad de cada esteroide tritado utilizados como trazadores, se estimó comparando la diferencia existente entre las cuentas por minuto (cpm) iniciales y las cpm finales; en promedio la recuperación fue mayor al 87%. Cada tubo que contenía la mitad complementaria, cada esteroide se cuantificó por RIA específico por procedimientos previamente descritos (Mendieta *et al.*, 1991). Brevemente, a cada tubo se le agregaron 500 μ l de solución amortiguadora de fosfatos (0.25 M pH 7.0 con azida de sodio y gelatina 1%) conteniendo el correspondiente antisuero en la dilución apropiada y el estándar radiactivo apropiado (\approx 5000 cpm) y cada tubo se incubó por 18 hrs a 4°C. Para separar el esteroide libre del unido al anticuerpo a cada tubo se le agregó 200 μ l de una mezcla de carbón-dextrán (625 mg% de carbón activado Norit A y 62.5 mg% dextrán T 70) y se centrifugó a 1500 x g durante

15 min a 4°C. El sobrenadante se decantó a un vial al que se le agregó 5 ml de Instagel (Packard); los viales se colocaron en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman modelo LS-7000, con una eficiencia máxima para tritio del 56%. El control de calidad de cada RIA fue realizado de acuerdo a especificaciones internacionales de exactitud, precisión y sensibilidad (Cekan, 1976); la exactitud y la sensibilidad de cada uno de los RIA se dan en el Anexo 3 y 4, respectivamente.

- **Biotransformación.** La capacidad de biotransformar *in vitro* precursores radiactivos en diferentes metabolitos de esteroides sexuales (DHA, P4, 17P4, A, T, E2, E1 y B) se determinó sobre gónadas, mesonefros, interrenales, así como en el cerebro, el telencéfalo y el diencefalo de un total de 216 embriones (108 para cada una de las dos TI). El par de gónadas, de mesonefros y de interrenales, así como el cerebro completo o sus regiones, el telencéfalo y el diencefalo, se colocaron por separado (Tabla 2) en un tubo Eppendorf que contenía 500 μ l de solución RR y se les agregó ^3H -P5 o ^3H -T (0.005 y 0.003 μ Ci, respectivamente) y sin cofactores ya que se quería evaluar la capacidad real ("fisiológica") de cada tejido para producir esteroides sexuales. El tiempo de incubación utilizado en este estudio se estimó tomando como base los resultados previamente obtenidos en la biosíntesis de T y E2 (Salame-Méndez, 1992) el cual fue de 2 hrs. Para lo cual, se realizaron dos series experimentales previas, una de 30 min y otra de 1 hr; resultando, que la incubación de 30 min con respecto a la de 1 hr y 2 hr en promedio fue 20% menor y la de 1 hr comparada con la de 2 hr el porcentaje de biotransformación en promedio fue similar (> 40%). Los tejidos se incubaron por 1 hr a la temperatura de procedencia; además, se corrieron paralelamente a cada uno de los experimentos dos controles, uno con un tejido no esteroideogénico (un trozo de miembro anterior) y otro sin tejido. Al término de la incubación cada tubo se colocó en un baño de hielo seco-acetona. Los tejidos en el medio de incubación se homogeneizaron y se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) utilizando ASB para la curva patrón. La extracción de los metabolitos, así como su separación fueron realizadas como se describió en los apartados de Extracción de los Esteroides (pp. 20-22) y Separación de los Esteroides Sexuales por Cromatografía en Capa Fina (pp. 22), respectivamente. Una vez separados los metabolitos por CCF la zona correspondiente se raspó y se colectó el sílice con el metabolito adsorbido en un vial al que se le agregó 5 ml de Instagel (Packard). Los

Tabla 2. Tejidos y total de embriones de *Lepidochelys olivacea* utilizados para valorar la biotransformación *in vitro* de precursores radiactivos en esteroides sexuales.

PRE	P	TI	DI	EDE	Go	Me	In	Ce	Te	Di
³ H-P5	PTS	27±0.5	20	20/21	2*(9)*	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-T	PTS	27±0.5	20	20/21	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-P5	PTS	32±0.1	20	23/24	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-T	PTS	32±0.1	20	23/24	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-P5	PGI	27±0.5	27	23/24	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-T	PGI	27±0.5	27	23/24	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-P5	PGI	32±0.1	27	26/27	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-T	PGI	32±0.1	27	26/27	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-P5	PGD	27±0.5	45	27/28	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-T	PGD	27±0.5	45	27/28	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-P5	PGD	32±0.1	33	27/28	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)
³ H-T	PGD	32±0.1	33	27/28	2(9)	2(9)	2(9)	1(9)	1(9)	1(9)

PRE, precursor radiactivo; ³H-P5, pregnenolona tritiada; ³H-T, testosterona tritiada; P, periodo: PTS, periodo termosensible; PGI, periodo de gónada indiferenciada; PGD, periodo de gónada diferenciada; TI, temperatura de incubación: 27±0.5, temperatura de incubación masculinizante; 32±0.1, temperatura de incubación feminizante; DI, días de incubación; EDE, estadio de desarrollo embrionario; Go, gónada; Me, mesonefros; In, interrenal; Ce, cerebro; Te, telencéfalo; Di, diencéfalo. ♦ este número que antecede al paréntesis se refiere al número de tejidos que se agruparon para cuantificar cada esteroide. † este número entre paréntesis indica el número total de embriones analizados.

viales se agitaron vigorosamente por 1 minuto y se colocaron en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman modelo LS-7000, con una eficiencia máxima para tritio del 56%. El porcentaje de recuperación de la radiactividad de cada uno de los precursores, se estimó al comparar la diferencia entre las cuentas por minuto (cpm) iniciales contenidas en el control sin tejido y con tejido no esteroideogénico con las cpm recuperadas después de la CCF en los tres sistemas cromatográficos. Las cifras obtenidas se compararon con la radiactividad evaluada de la alícuota utilizada del precursor (cpm totales), resultando el promedio de recuperación en los dos controles del $86\pm 4\%$. A partir de lo cual, el porcentaje de biotransformación de cada precursor (Anexos 5 y 6), así como el porcentaje de cada uno metabolitos se ajustaron considerando el 12% de pérdidas.

- **Análisis Estadísticos.** Para determinar la correspondencia entre los contenidos de cada esteroide tanto entre tejidos como entre los sexos, se realizaron análisis de varianza (ANOVAS) de dos vías, así como pruebas de t de Student con el paquete Statistical Analysis System (SAS Institute, 1985). Considerándose las desviaciones estándar estadísticamente significativas a una $p < 0.0001$.

RESULTADOS

Radioinmunoanálisis

VITULO

En el vitelo de los embriones masculinos y femeninos del periodo de gónada indiferenciada (PGI) y del periodo de gónada diferenciada (PGD) únicamente se detectó corticosterona (B). En el PGD, el contenido de este glucocorticoide fue mayor en el vitelo de los machos que de las hembras (Fig. 3).

SUERO

En el periodo termosensible (PTS), lapso en el que la TI determina el sexo, fue mayor el contenido de DHA en los embriones masculinizados por efecto de la TI masculinizante que en los embriones feminizados por la TI feminizante (Fig. 3). Por su parte, en el suero de los embriones feminizados fue mayor el contenido de P4 que en los masculinizados (Fig. 3). Al comparar los contenidos de P5, A y B, así como los de T y E2 no son diferentes en el suero de los embriones feminizados con los masculinizados (Fig. 3).

En el suero de las hembras del PGI el contenido de P5, DHA, P4, T y B fue mayor respectivamente, que en el suero de los machos del mismo periodo (Fig. 3), siendo similar el contenido de 17P4, A y E2 en el suero de las hembras con el de los machos (Fig. 3).

En el PGD, el contenido de P5 fue mayor en los machos que en las hembras (Fig. 3) y, en el suero de las hembras del mismo periodo, fue mayor el contenido de P4, T y E2 que en el suero de los machos (Fig. 3).

GÓNADAS

En el PTS, fue mayor el contenido de P5 y T en las gónadas de los embriones feminizados que los masculinizados (Fig. 4). Además, en las gónadas de los embriones masculinizados y feminizados fue mayor el contenido de P4 que DHA y de T que E2 (Fig. 4); sin embargo, no hubo diferencias en los contenidos de DHA, P4, 17P4, A, E2 y B.

En las gónadas indiferenciadas de los machos del PGI fue mayor el contenido de T que de E2, y en las gónadas de las hembras, fue mayor el contenido de DHA que P4 y

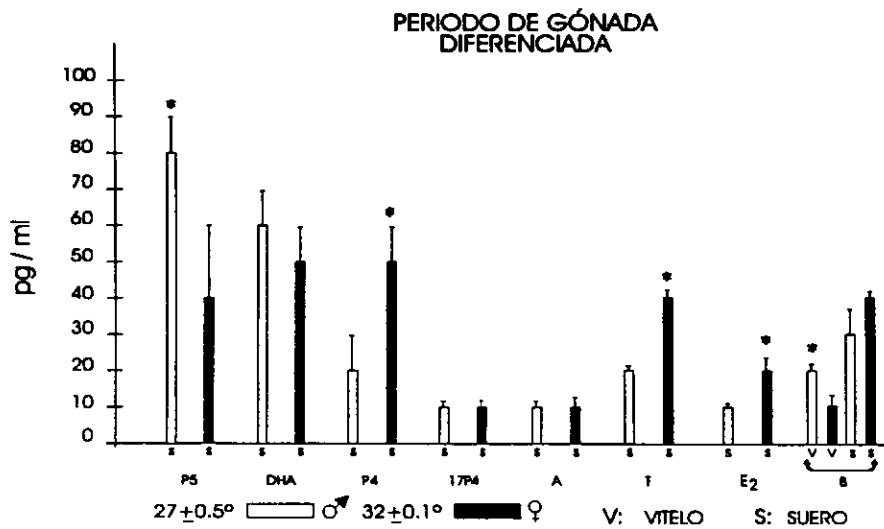
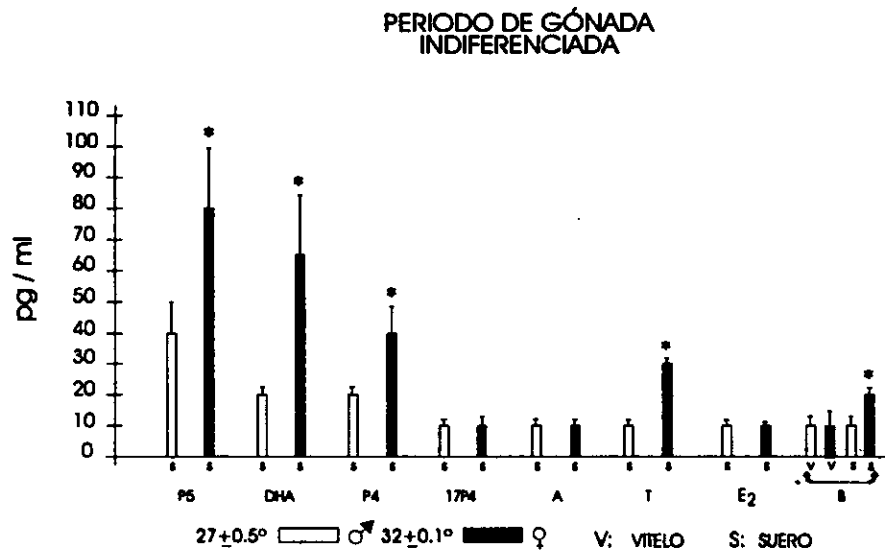
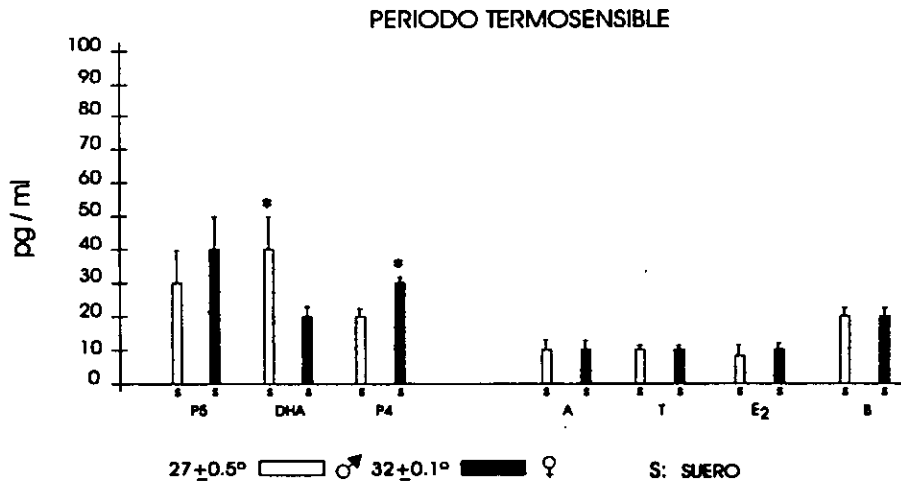


Fig 3. Contenido de esteroides sexuales en el vitelo y en el suero. Barra \pm desviación estándar de 9 determinaciones. *diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

T que E2 (Fig. 4). Por otro lado, el contenido de DHA y de T fue mayor en las gónadas indiferenciadas de las hembras que en las gónadas indiferenciadas de los machos (Fig. 4).

En el PGD, fue mayor en los testículos y en los ovarios el contenido de DHA que P4 y T que E2 (Fig. 4). Siendo en los ovarios mayor el contenido de DHA y T que en los testículos (Fig. 4).

MESONEFROS

En el PTS, el contenido de A fue mayor en los mesonefros de los embriones masculinizados que en los feminizados (Fig. 5). Tanto en el PGI como en el PGD, el contenido de P4 y 17P4 fue mayor en los mesonefros de los machos que de las hembras. Por otro lado, en el PGI fue mayor el contenido de B en los mesonefros de las hembras que de los machos (Fig. 5).

INTERRENALES

En este tejido, los contenidos de P5, DHA, P4, 17P4 (excepto en el PGI y PGD) y B estuvieron en el rango de los nanogramos (Fig. 5) sin importar el periodo o la TI; resaltando los muy bajos contenidos de T ($x 25.79 \pm 1.5$ pg/mg en los embriones bajo la TI masculinizante y $x 24.68 \pm 1.9$ pg/mg en los embriones bajo la TI feminizante) y de E2 ($x 5.23 \pm 1.6$ pg/mg para los embriones a TI masculinizante y $x 4.5 \pm 1.1$ pg/mg en los embriones de la TI feminizante) (Fig. 5).

En el PTS, el contenido de P5, DHA, P4 y 17P4 en las interrenales de los embriones incubados a la TI feminizante fue mayor que el de los embriones de la TI masculinizante (Fig. 5).

En las interrenales de los machos con respecto al de las hembras del PGI fue mayor el contenido de P5, P4, 17P4 y B (Fig. 5) y, en las interrenales de las hembras fue mayor el contenido de DHA que en las interrenales de los machos (Fig. 5).

En el PGD, fue mayor el contenido de DHA, P4 y B en las interrenales de los machos que de las hembras (Fig. 5).

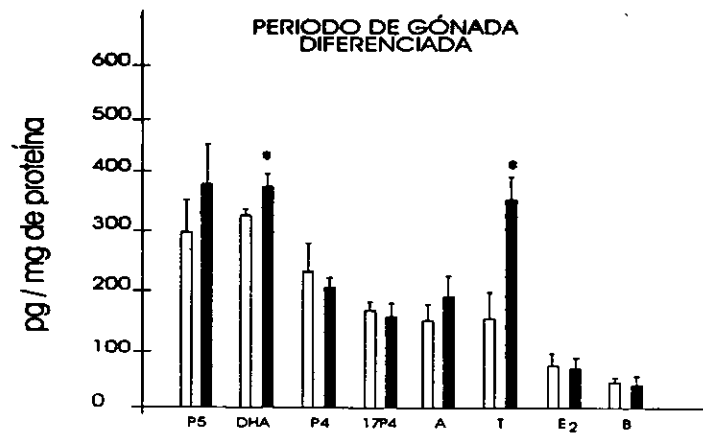
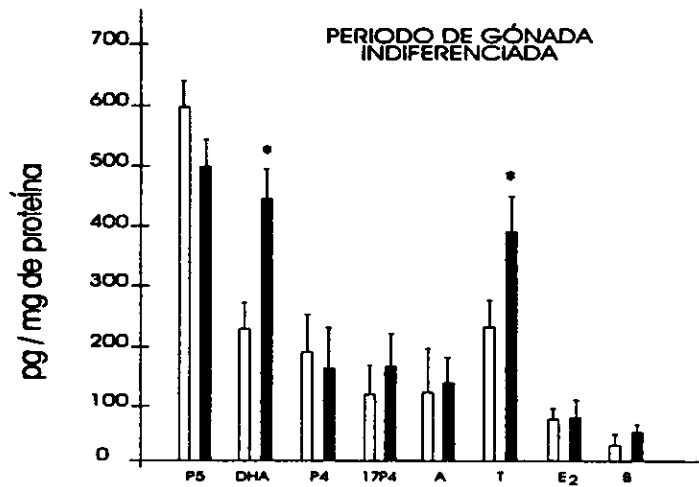
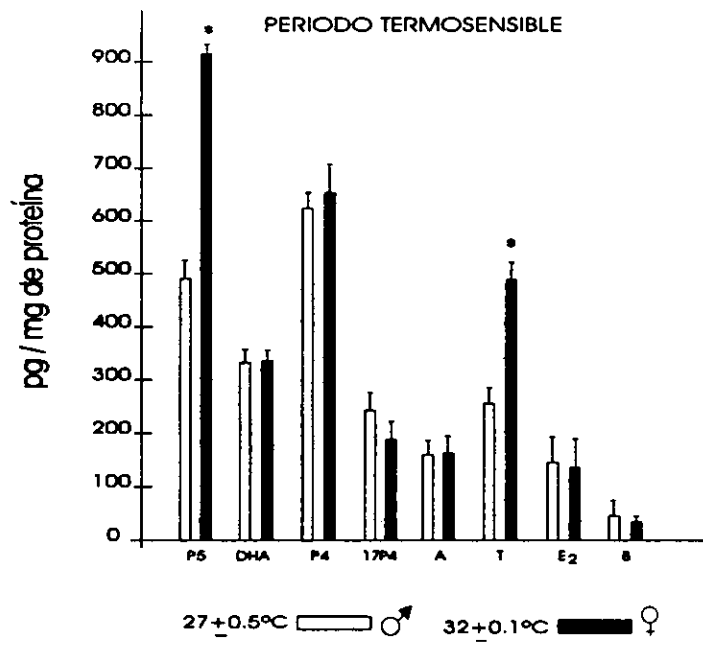


Fig 4. Contenido de esteroides sexuales en las gónadas.
 Barra ± desviación estándar de 9 determinaciones.
 * diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

PERIODO TERMOSENSIBLE

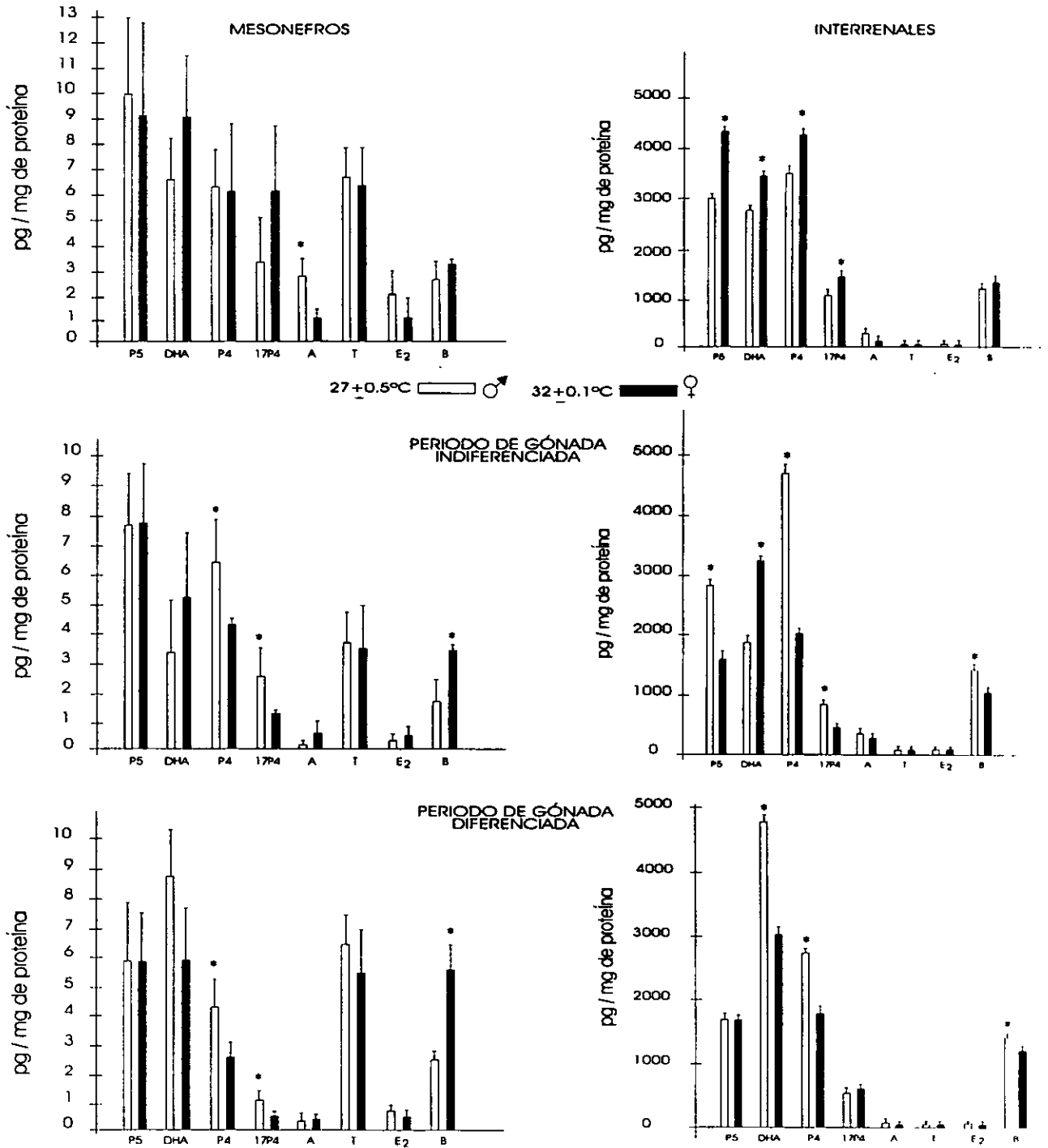


Fig 5. Contenido de esteroides sexuales en los mesonefros y en las interrenales.
 Barra ± desviación estándar de 9 determinaciones.
 *diferencia estadísticamente significativa p < 0.0001.

CEREBRO

En el PTS, los contenidos de E2, P4 y P5 respectivamente, en el cerebro de los embriones feminizados fueron mayores que los del cerebro de los embriones masculinizados (Fig. 6).

En el cerebro de las hembras del PGI el contenido de P5, DHA, P4, A, T y E2 fue mayor que en el cerebro de los machos (Fig. 6). Resaltando que en el cerebro de las hembras fue mayor el contenido de E2, P4 y T respectivamente, con respecto al cerebro de los machos (Fig. 6).

En el cerebro de las hembras del PGD el contenido de P5, P4 y E2 fue mayor que en el cerebro de los machos (Fig. 6); conteniendo más P4 y E2 el cerebro de las hembras que el de los machos (Fig. 6).

TELENCÉFALO y DIENCÉFALO

En la región del cerebro que comprende al diencéfalo y mesencéfalo (diencéfalo, Di) de los embriones desarrollados en la TI masculinizante como en la feminizante, en los tres periodos, fue mayor el contenido de P5, DHA, 17P4, A, T y E2 comparado con la región del cerebro que comprende al bulbo olfatorio y telencéfalo (telencéfalo, Te) (Fig. 7).

En el Di de los embriones feminizados del PTS los esteroides de mayor contenido fueron la T, E2 y P4, respectivamente (Fig. 7); resaltando, que el contenido de P4 en este tejido fue mayor que la DHA y la T mayor que el E2 (Fig. 7). En el caso de los embriones masculinizados, los esteroides con el mayor contenido fueron la P5 y T, respectivamente (Fig. 7). Al comparar los contenidos de esteroides entre el Di de los embriones masculinizados del PTS con el Di de los embriones feminizados, fueron mayores los de DHA, P4, A, T y E2 en el Di de los embriones feminizados (Fig. 7).

En el Di de los machos del PGI, el esteroide de mayor contenido fue la P4 (Fig. 7). Por su parte, en el Di de las hembras los esteroides con el mayor contenido fueron la T, el E2 y la P4, respectivamente; sin embargo, no hay diferencia en el contenido de T con el de E2 (Fig. 7). Siendo, el contenido de P4 mayor que la DHA (Fig. 7). Al comparar los contenidos de esteroides en el Di de los machos con el Di de las hembras, la 17P4, A, T y E2 fueron mayores en el Di de las hembras (Fig. 7).

En el PGD, el esteroide de mayor contenido en el Di de los machos fue la P4 (Fig. 7) y en el Di de las hembras fueron mayores los de P5, P4, T y E2, siendo su contenido

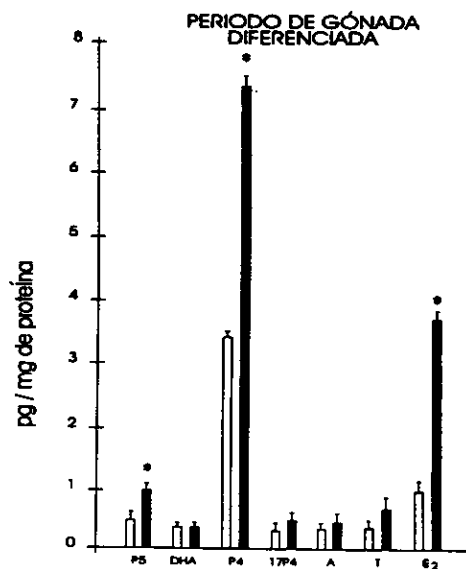
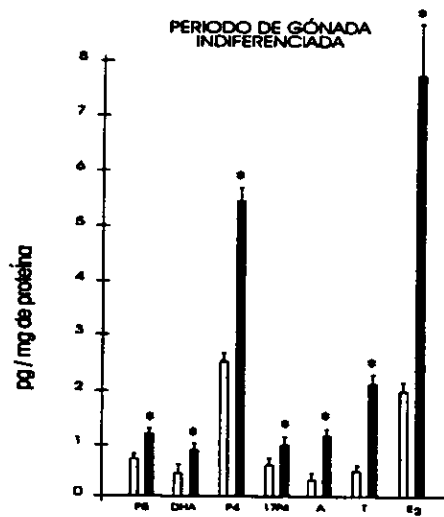
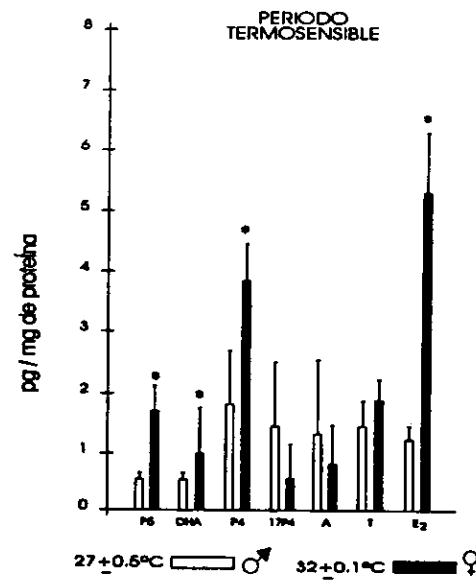


Fig 6. Contenido de esteroides sexuales en el cerebro.
 Barra ± desviación estándar de 9 determinaciones.
 *diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

mayor que en el Di de los machos (Fig. 7). Siendo similar el contenido de T y E2 en el Di de las hembras (Fig. 7).

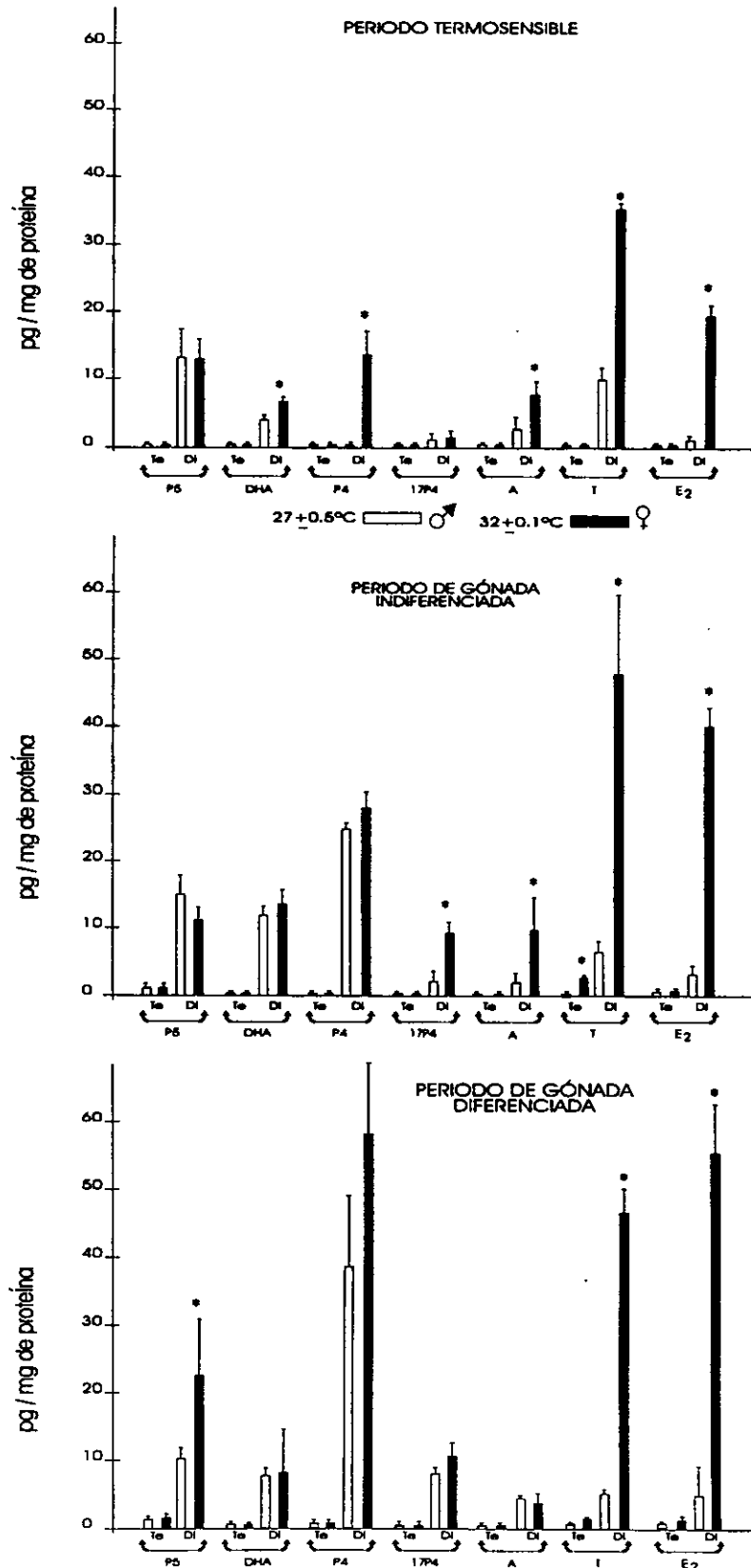


Fig 7. Contenido de esteroides sexuales en el telencéfalo (Te) y en el diencefalo (Di). Barra \pm desviación estándar de 9 determinaciones. *diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

Biotransformación

GÓNADAS

Biotransformación de $^3\text{H-P5}$

La biotransformación de la $^3\text{H-P5}$ fue realizada para evaluar la producción de esteroides sexuales intermediarios en la síntesis de T.

En las gónadas de todos los embriones al biotransformar el precursor $^3\text{H-P5}$, se detectaron DHA, P4, 17P4, A, T y E2, pero no B, sin importar la TI o el periodo (Fig. 8). Las gónadas de todos los embriones sin importar la TI como el periodo, fue mayor la producción de P4 que de DHA (Fig. 8). Al comparar los porcentajes de producción de la P4 entre las gónadas de los embriones de la temperatura masculinizante con los de la feminizante, así como los de DHA no se encontró que fueran significativamente diferentes ($p < 0.0001$). Las gónadas de las hembras del PGI como del PGD su producción de T fue mayor que las gónadas de los machos (Fig. 8).

Biotransformación de $^3\text{H-T}$

La biotransformación de la $^3\text{H-T}$ fue realizada para evaluar el proceso de aromatización por medio de valorar la producción de E2 y E1.

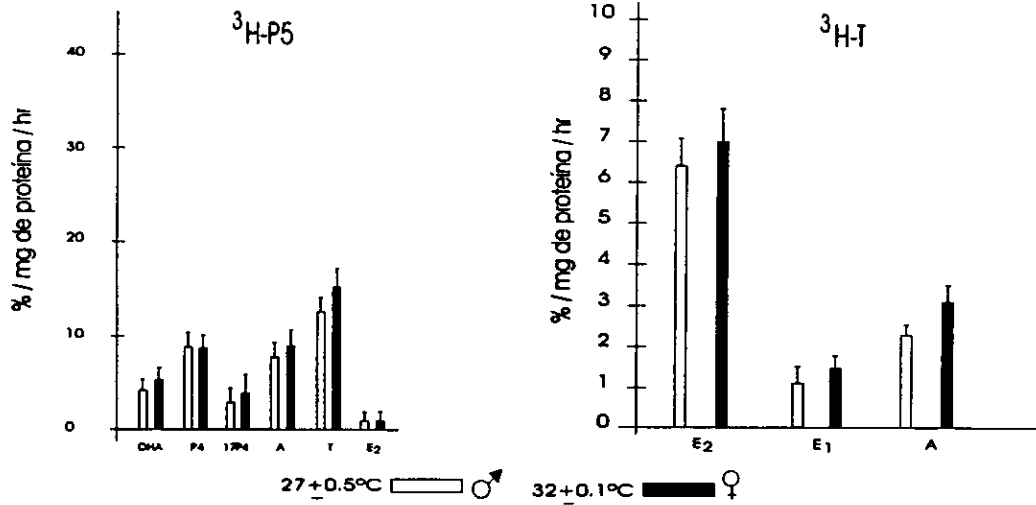
Las gónadas de todos los embriones produjeron E2 y E1 durante los tres periodos; detectándose además A (Fig. 8). Al comparar la producción de los dos estrógenos fue mayor la de E2 (Fig. 8); sin embargo, al comparar en los tres periodos la producción de E2 y de E1, no fueron significativamente diferentes ($p < 0.0001$) la de los embriones de la temperatura feminizante con los de la temperatura masculinizante (Fig. 8).

MESONEFROS

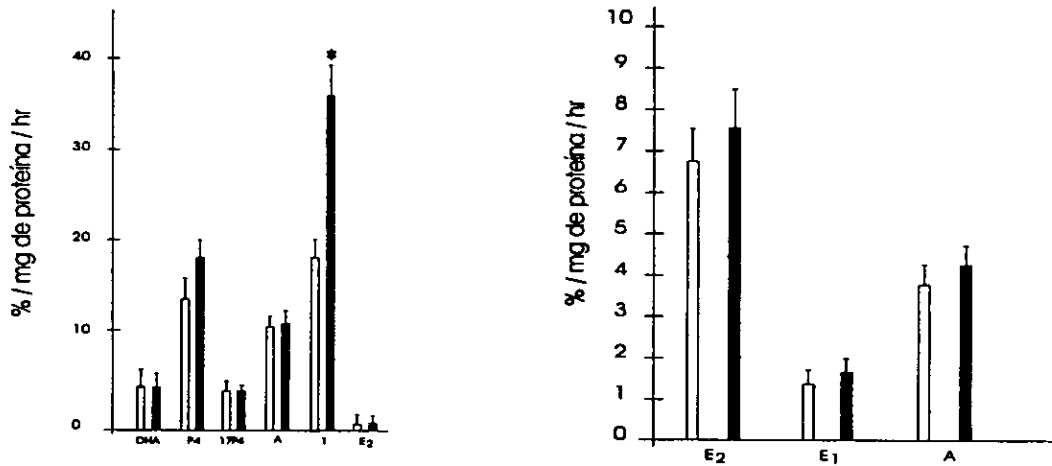
Biotransformación de $^3\text{H-P5}$

Sin importar el periodo, los mesonefros de todos los embriones biotransformaron el precursor en DHA, P4, 17P4, A, T y B (Fig. 9), no detectándose E2. Con la excepción de la DHA en el PTS y en el PGI, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la producción de cada uno de los esteroides entre los mesonefros de los embriones incubados a la temperatura masculinizante con los de la feminizante (Fig. 9).

PERIODO TERMOSENSIBLE



PERIODO DE GÓNADA INDIFERENCIADA



PERIODO DE GÓNADA DIFERENCIADA

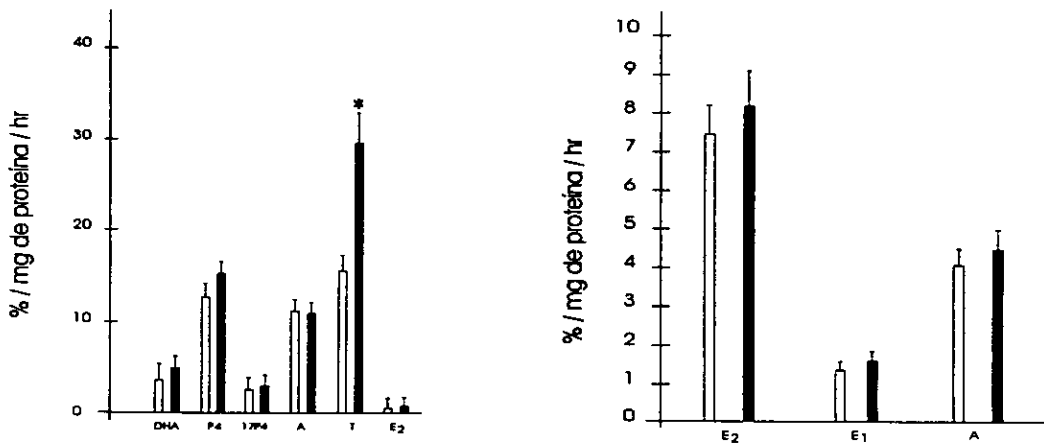


Fig 8. Porcentaje de esteroides sexuales producidos en las gónadas a partir de biotransformar pregnenolona tritiada (³H-P5) y testosterona tritiada (³H-T). Barra ± desviación estándar de 9 determinaciones. * diferencia estadísticamente significativa p < 0.0001.

Biotransformación de $^3\text{H-T}$

En los tres periodos, los mesonefros de todos los embriones biotransformaron la $^3\text{H-T}$ en A y E2; no detectándose E1 (Fig. 9). No hubieron en los tres periodos diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la producción de los dos esteroides entre los tejidos incubados en la temperatura masculinizante con los incubados en la feminizante (Fig. 9).

INTERRENALES

Biotransformación de $^3\text{H-T}$

En los tres periodos las interrenales de los embriones incubados a cualquiera de la dos temperaturas, biotransformaron el precursor en DHA, P4, 17P4, A, T y B (Fig. 10); no detectándose E2. Además, fue mayor la producción de DHA que de P4, siendo la producción de DHA similar entre las interrenales incubadas a la temperatura masculinizante con las de la temperatura feminizante (Fig. 10). Por su parte, la producción de B en el PGI y PGD fue mayor en los tejidos incubados en la temperatura feminizante que en la masculinizante (Fig. 10).

Biotransformación de $^3\text{H-T}$

En los tres periodos, las interrenales incubadas en la temperatura masculinizante como en la feminizante únicamente biotransformaron este precursor en A (Fig. 10), siendo mayor la producción de éste en los tejidos incubados en la temperatura feminizante que en la masculinizante (Fig. 10).

CEREBRO

Biotransformación de $^3\text{H-P5}$

En el cerebro, todos los embriones de los tres periodos biotransformaron la $^3\text{H-P5}$ en DHA, P4, 17P4, A y T (Fig. 11); no detectándose E2.

En todos los embriones los esteroides más producidos fueron la T y la P4, respectivamente (Fig. 11), así como de A en el PGI y PGD y de 17P4 en el PGD (Fig. 11), siendo mayores en el cerebro de los embriones de la TI feminizante con respecto a los de la TI masculinizante (Fig. 11).

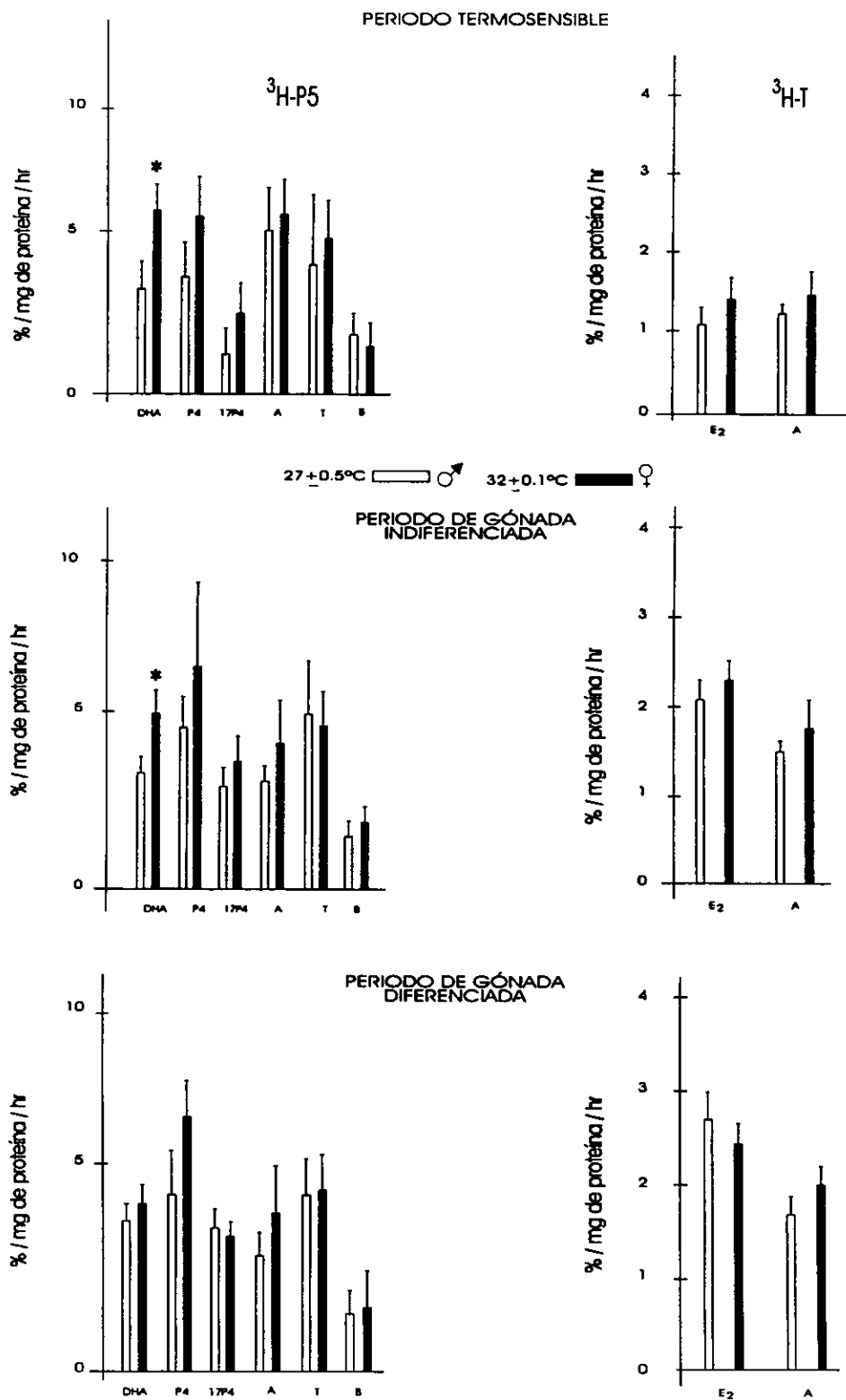


Fig 9. Porcentaje de esteroides sexuales producidos en los mesonefros a partir de biotransformar pregnenolona tritiada (³H-P5) y testosterona tritiada (³H-T). Barra ± desviación estándar de 9 determinaciones. * diferencia estadísticamente significativa p < 0.0001.

PERIODO TERMOSENSIBLE

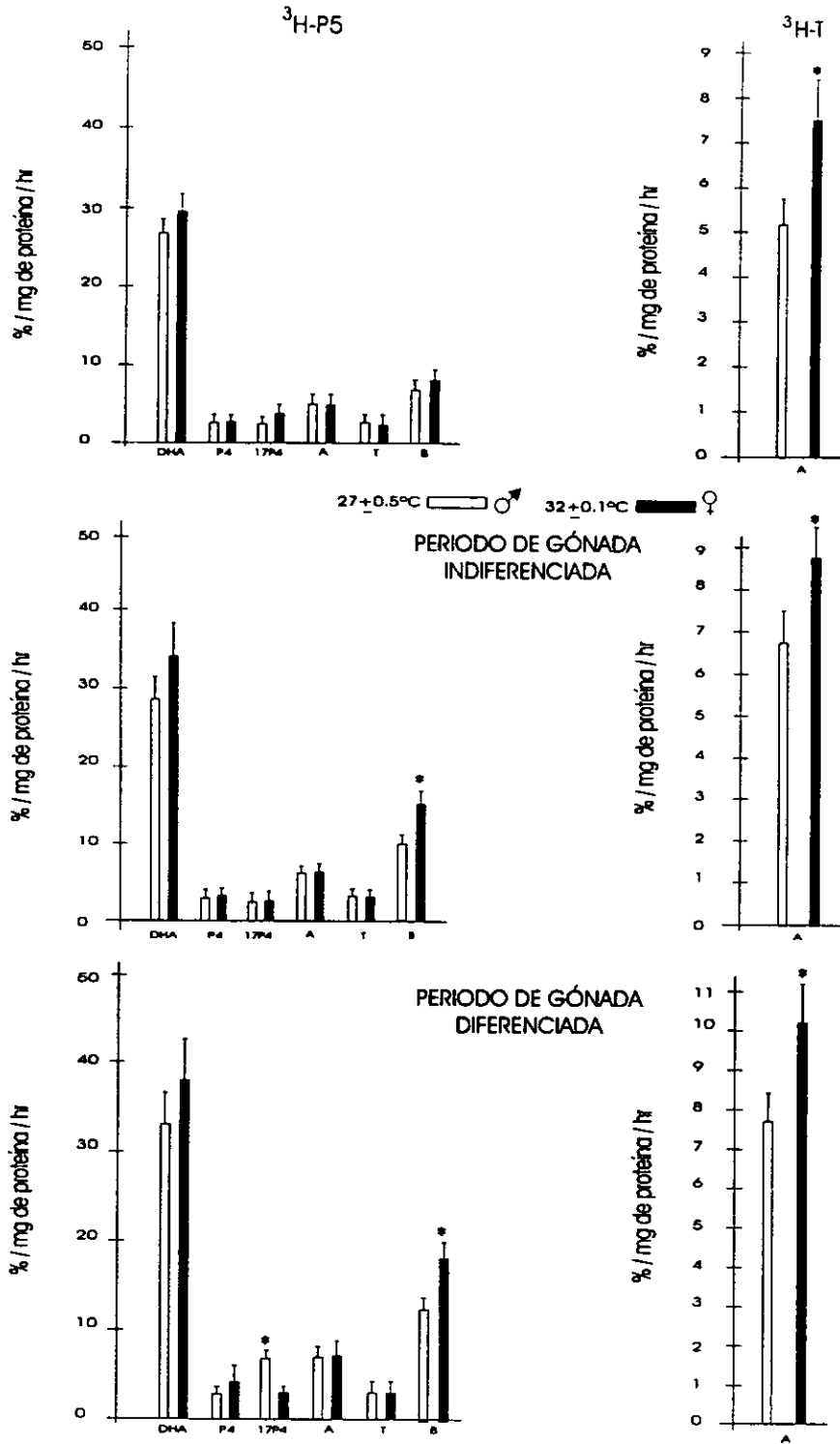


Fig 10. Porcentaje de esteroides sexuales producidos en las interrenales a partir de biotransformar pregnenolona tritiada ($^3\text{H-P5}$) y testosterona tritiada ($^3\text{H-T}$). Barra \pm desviación estándar de 9 determinaciones. *diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

Biotransformación de $^3\text{H-T}$

Únicamente se biotransformó el precursor en E2 (Fig. 11), siendo en los tres periodos mayor su producción en el cerebro incubado en la temperatura feminizante que en la masculinizante (Fig. 11).

TELENCÉFALO y DIENCÉFALO

Biotransformación de $^3\text{H-P5}$

Los esteroides determinados después de las incubaciones con $^3\text{H-P5}$ en el Te como en el Di fueron DHA, P4, 17P4, A y T (Fig. 12); no detectándose E2.

En los embriones masculinizados del PTS, no fue diferente la producción de cada uno de los esteroides en el Te con respecto al Di (Fig. 12). Por su parte, el Te con respecto al Di de los embriones masculinizados de los tres periodos fue mayor la producción de DHA, P4 (excepto en el PTS y el PGI) y T (Fig. 12) y de DHA y 17P4 en el Te con respecto al Di (Fig. 12). En el Di de las hembras del PGI, la producción de DHA y de T fue mayor que en el Te (Fig. 12) y en el PGD fue mayor la producción de P4, A y T en el Di que en el Te (Fig. 12).

En el PTS, la producción de cada uno de los esteroides (excepto 17P4 en el Di) fue mayor tanto en el Te como en el Di de los embriones feminizados que en los masculinizados (Fig. 12).

En el PGI, la producción de cada uno de los esteroides (excepto 17P4 en el Te y Di) fue mayor en el Te y el Di de las hembras que de los machos (Fig. 12) y en el PGD la producción de DHA, P4 y T, así como de A en el Di fue mayor en el Te y Di de las hembras que de los machos (Fig. 12).

Al comparar la producción de DHA con la de P4 el Te de los embriones feminizados del PTS produce más DHA que P4, invirtiéndose este patrón en el PGI y en el PGD (Fig. 12). La producción de T siempre fue mayor en el Te y Di de los embriones de la TI feminizante que en los de la masculinizante (Fig. 12). Al comparar la producción de T, esta fue similar en el Te y el Di de los embriones feminizados del PTS (Fig. 12), mientras que en el Di más que el Te de las hembras del PGI y del PGD (Fig. 12).

Biotransformación de $^3\text{H-T}$

El Te y el Di aromatizaron el precursor en E2 (Fig. 12); no detectándose E1 ni A. En los tres periodos fue mayor la producción del estrógeno en el Di que en el Te de todos los embriones (Fig. 12). Independientemente del periodo y de la TI, no fue

significativamente diferente la producción de E2 entre el Di y el Te. Sin embargo, la producción del estrógeno en los tres periodos, su tendencia fue a ser mayor en el Di de los embriones de la TI feminizante (Fig. 12).

PERIODO TERMOSENSIBLE

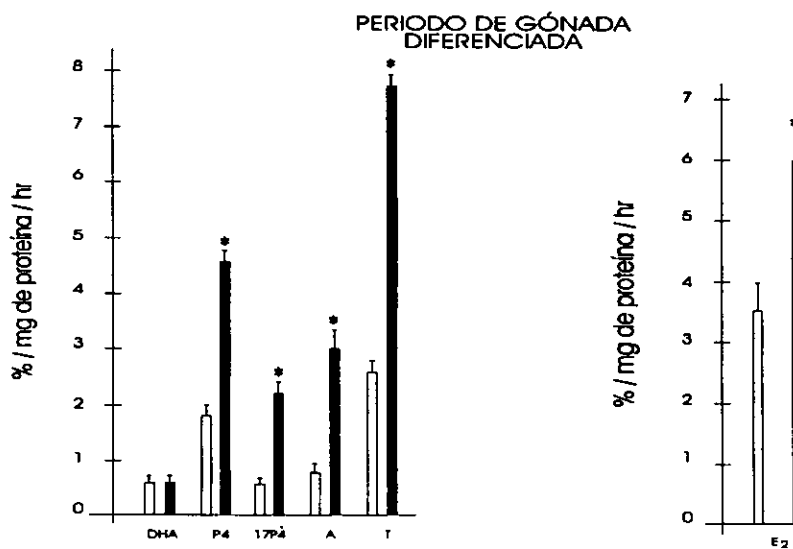
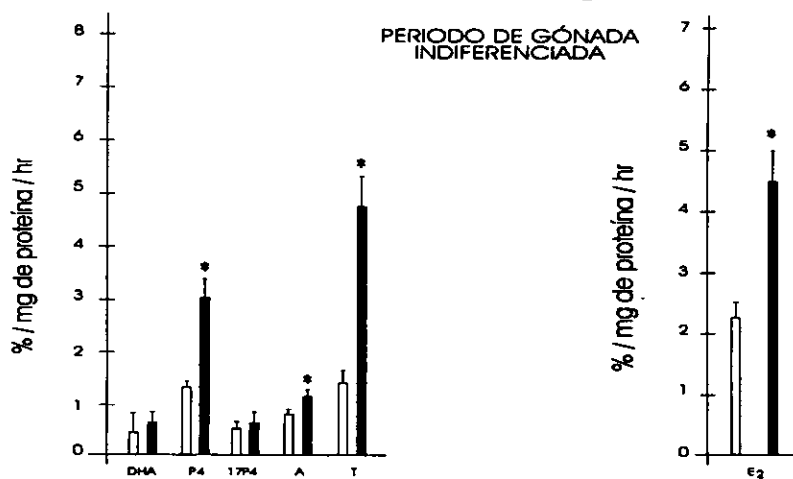
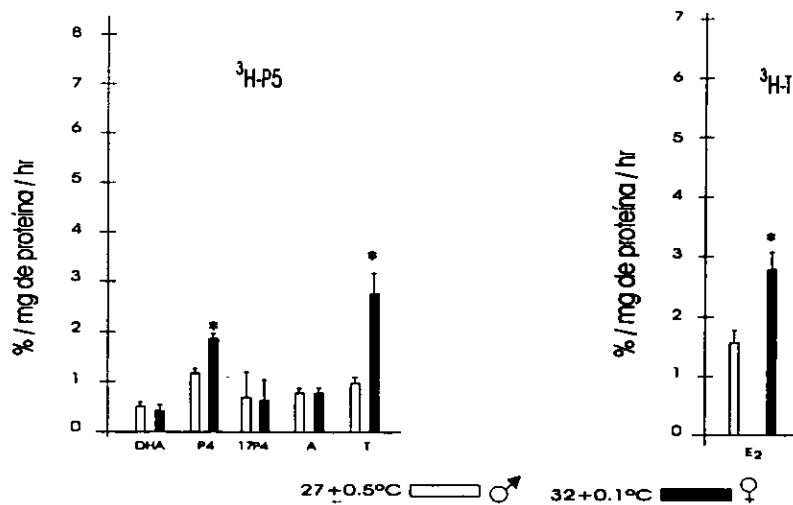


Fig 11. Porcentaje de esteroides sexuales producidos en el cerebro a partir de biotransformar pregnenolona tritiada ($^3\text{H-P5}$) y testosterona tritiada ($^3\text{H-T}$). Barra \pm desviación estándar de 9 determinaciones. * diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

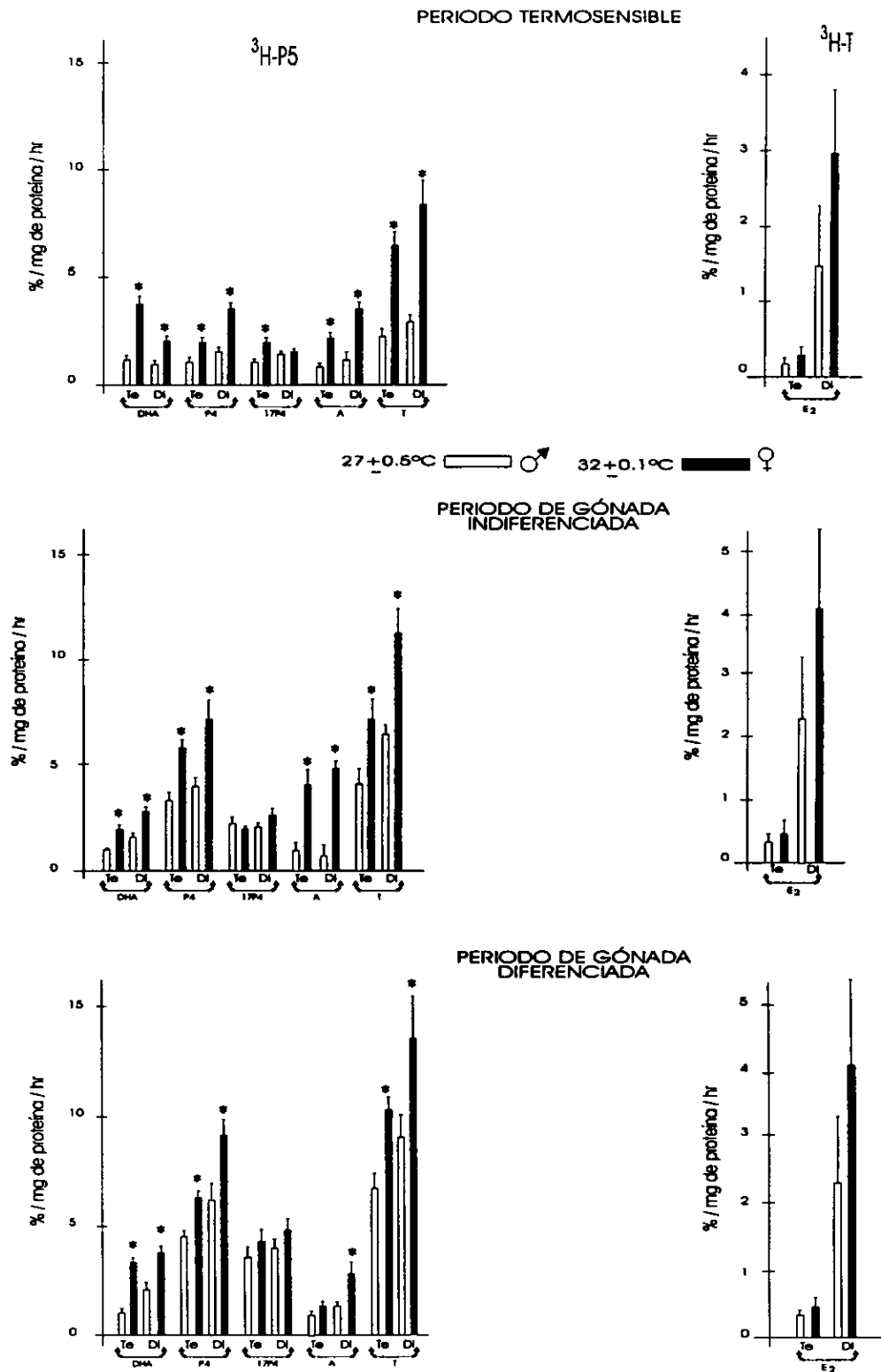


Fig 12. Porcentaje de esteroides sexuales producidos en el telencéfalo (Te) y en el diencéfalo (Di) a partir de biotransformar pregnenolona tritiada (³H-P5) y testosterona tritiada (³H-T).
 Barra ± desviación estándar de 9 determinaciones.
 *diferencia estadísticamente significativa p < 0.0001.

DISCUSIÓN

TEJIDOS UROGENITALES

En los tres periodos, las gónadas, mesonefros e interrenales de los embriones desarrollados en la TI masculinizante y en la feminizante, contienen y producen los esteroides intermediarios para la síntesis de progestágenos, andrógenos, estrógenos y corticosteroides. En las gónadas y en menor capacidad en los mesonefros, es mayor la producción de andrógenos (v. gr., T) y estrógenos (v. gr., E2), mientras que en las interrenales es de glucocorticoides (v. gr., B). De tal manera, se constata que en los embriones de *L. olivacea* durante la determinación de su sexo y durante la diferenciación gonadal hay una producción de esteroides sexuales específica de cada tejido urogenital.

El hecho de que en las interrenales los contenidos de P5, DHA y P4 estén en el rango de los nanogramos y ser un tejido eficiente en la biotransformación de la ^3H -P5, explicaría por que razón durante la diferenciación gonadal de *L. olivacea* (Merchant *et al.*, 1989) y de *T. scripta* (Thomas *et al.*, 1992) únicamente en este tejido urogenital se detectó la actividad de la 3β -HED. Además, de sugerir que la P4 y la DHA producidas por el complejo adrenal-riñón durante la diferenciación gonadal femenina de *T. escripta* (White y Thomas, 1992a, b) son producidas por las adrenales.

Los resultados demuestran que en el PTS, que es el tiempo de incubación donde se da el mecanismo molecular a partir del cual el sexo de algunos embriones se determina, las gónadas de todos los embriones contienen T y tanto el contenido como la producción de P4 son mayores que los de DHA. Esto permite sugerir que en el PTS ya hay una vía esteroidogénica determinada para la síntesis de T. Por su parte, al utilizar DHA como precursor para la síntesis de T se detectó A y no androstendiol en las gónadas de embriones masculinos y femeninos de *L. olivacea* durante su PGI (Salame-Méndez, 1992). En este mismo periodo y en el PGD, debido a que las gónadas producen más P4 que DHA, así como haber determinado los contenidos y producción de 17P4 y A, esteroides intermediarios en la producción de T, se propone que durante el PTS y la diferenciación gonadal de *L. olivacea* la síntesis de testosterona se lleva al cabo por la vía $\Delta 4$.

En embriones de *Alligator mississippiensis* (Ferguson y Joanen, 1983) y en los embriones desarrollados en la TI masculinizante de *L. olivacea* (Merchant-Larios *et al.*,

1997) tanto el PTS como la determinación del sexo se dan antes de la formación del primordio gonadal y la diferenciación de sus testículos, respectivamente. Estas evidencias indican que la determinación del sexo antecede a la diferenciación histológica de la gónada. Durante el PTS tanto la producción como el contenido de esteroides, tales como la P4, T y E2, sugieren en general que las diferencias en la esteroidogénesis bajo la TI masculinizante o feminizante son el reflejo de un proceso que puede ser una expresión bioquímica de la determinación del sexo. Por lo tanto, las diferencias detectadas en el contenido y producción de T en las dos TI durante el PTS, las cuales se mantienen e incrementan durante el PGI y PGD, respectivamente, sugieren que el patrón de la producción de andrógenos en *L. olivacea* precede a la diferenciación de las gónadas (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

En *Dermodochelys coriacea* la producción de esteroides la explican Desvages *et al.* (1993) a partir del tamaño de las gónadas. En el caso de *L. olivacea* por ejemplo en el PTS, los embriones tienen 20 días de edad pero los incubados a la temperatura masculinizante están entre los estadios 21-22 de su desarrollo y los incubados en la temperatura feminizante están entre los estadios 23-24 (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Por lo anterior se podría argüir que el mayor contenido y producción de T, así como de los otros esteroides determinados en esta especie, se debiera al mayor tamaño de las gónadas de los embriones desarrollados en la TI feminizante. Sin embargo, el tamaño de los tejidos no explica las capacidades reales de la esteroidogénesis, de tal manera que para tener un parámetro de comparación homogéneo de ésta actividad, tanto los resultados de los contenidos como la capacidad de producir los esteroides sexuales se corrigieron con base en el contenido de proteínas de cada uno de los tejidos estudiados.

En *Trachemys scripta* Crews y Bergeron (1994) proponen que la determinación de su sexo se debe a la regulación de la 5α -reductasa que biotransforma la T en 5α -dihidro-testosterona (DHT). En *L. olivacea* al no haber diferencia en el contenido y en la producción de A en las gónadas de los embriones masculinizados y feminizados en los tres periodos y al ser mayor tanto el contenido como la producción de T en las gónadas de los embriones feminizados que en los masculinizados en el PTS y el PGI, la enzima termo-regulable en las gónadas sería la 17β -HED, que biotransforma la A en T. Evidencias que dejan ver la importancia de las hidroxilasas en la diferenciación sexual en tortugas sexo-termodependientes.

Por otro lado, en las gónadas de los embriones desarrollados tanto en la TI masculinizante como en la feminizante, es mayor el contenido y producción de T que de E2 en los tres periodos, siendo significativamente mayor en las gónadas y en el suero de las hembras del PGI y PGD. Por su parte, las gónadas de los embriones de la TI feminizante en los tres periodos, a pesar de ser mayor el contenido y la producción de T, tanto el contenido como la producción de E2 son significativamente menores. Resaltando este resultado en el PTS, por lo tanto, las gónadas de este periodo al sentir la TI feminizante no se estimula la mayor producción de E2. En consecuencia, los resultados obtenidos permiten sugerir que en el tejido gonadal de *L. olivacea* la TI al regular la acción de la 17β -HED y no las aromatasas, como lo proponen Pieau *et al.* (1994), podría ser uno de los procesos moleculares a partir del cual se modularía la determinación del sexo y/o la diferenciación histológica de las gónadas.

Los resultados obtenidos en los tejidos urogenitales de embriones de *L. olivacea* en diferentes etapas de su diferenciación sexual, demuestran que estos producen esteroides intermediarios en la síntesis de hormonas esteroides (v. gr., P4, T y E2). La producción de esteroides en las interrenales es principalmente para corticosteroides y en las gónadas es para progestágenos, andrógenos y estrógenos. Tanto las gónadas de embriones masculinos como femeninos producen T a partir de esteroides intermediarios de la vía $\Delta 4$. La producción de esteroides sexuales precede a la diferenciación histológica de las gónadas. En las gónadas de embriones desarrollados en la TI feminizante tanto en el PTS como durante la diferenciación de los ovarios se produce más T que E2, por lo que la hipótesis de la diferenciación sexual gonadal mediada por la TI a partir de favorecer la biosíntesis de estrógenos en las gónadas indiferenciadas no se sostiene. Si nos basamos en la suposición de que la determinación del sexo por la TI y la subsecuente diferenciación histológica de las gónadas se diera de manera directa sobre el tejido gonadal, en *L. olivacea* la TI regulará la síntesis de T y no la de E2.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: CEREBRO

En el cerebro se aprecian diferencias significativas tanto en el contenido como en la producción de esteroides sexuales dependiente de la TI. Durante los tres periodos los contenidos y la producción de P4, T y E2, son significativamente mayores en el cerebro de los embriones desarrollados en la TI feminizante.

Debido al hecho de que en las gónadas de *L. olivacea* los contenidos de los esteroides analizados tienen un orden de magnitud mayor al del cerebro, así como al de de sus dos regiones analizadas, podría interpretarse que los contenidos de esteroides, como por ejemplo, P4, T y E2 pudiesen provenir del torrente circulatorio y ser el reflejo de los esteroides producidos por tejidos predominantemente esteroideogénicos como son las gónadas e interrenales o provenir de los liberados del vitelo como lo proponen Crews *et al.* (1989) para tortugas o por Conley *et al.* (1997) para cocodrilos. No provienen del vitelo, ya que el único esteroide que contiene es B, por su parte los resultados de biotransformación demuestran que el cerebro, así como la región del cerebro que comprende al telencéfalo-bulbo olfatorio y la del diencefalo-mesencefalo aunque tienen una baja capacidad esteroideogénica con respecto a las gónadas, poseen las enzimas necesarias para sintetizar esteroides sexuales (v. gr., P4, T y E2). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las hormonas esteroides provenientes de las gónadas en diferenciación tengan un efecto sobre el tejido neural.

Al regionalizar el cerebro en telencéfalo (Te) que comprende al telencéfalo y al bulbo olfatorio y en diencefalo (Di) que comprende al diencefalo y al mesencefalo, permitieron tener la posibilidad de descartar una respuesta inespecífica del tejido neural a la TI. Hay una evidente diferencia tanto en el contenido como en la producción de esteroides sexuales entre las dos regiones del cerebro analizadas. En el Di con respecto al Te fue mayor el contenido y la producción de esteroides sexuales, como por ejemplo, los de P4 y T. Cabe resaltar que en los tres periodos, en el Di de los embriones desarrollados en la TI feminizante con respecto al Di de los embriones de la TI masculinizante es mayor el contenido de P4 (excepto en el PGI y PGD), T y E2. Lo anterior correlaciona con la producción de cada uno de los tres esteroides: es mayor la biotransformación de la $^3\text{H-P5}$ en P4 y T, así como ser mayor la tendencia en la biotransformación de $^3\text{H-T}$ en E2. Estos resultados al ser muy evidentes en el PTS, que es cuando se determina el sexo de algunos embriones, se demuestra que el diencefalo-mesencefalo al sentir la TI se regula principalmente la producción de P4 y T.

En *L. olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1997) y en otras especies de quelonios con determinación del sexo por efecto de la TI, el E2 (Wibbels y Crews, 1995; Wibbels *et al.*, 1992, 1991a; Crews *et al.*, 1994, 1989; Dorizzi *et al.*, 1991; Bull *et al.*, 1988b; Pieau, 1970, 1969), así como la E1 (Crews *et al.*, 1995) contrarrestan el efecto tanto de la TI masculinizante como de la feminización de las gónadas. Así que es probable que el E2 exógeno modifique las concentraciones endógenas de esta hormona tanto en las gónadas como en el Di.

A partir del hecho de que bajo el efecto de la TI feminizante más que en la masculinizante, en las gónadas no se favorece la producción de E2 y por lo tanto ser similares, apoya la sugerencia que el efecto feminizador del E2 exógeno puede ocurrir a nivel del cerebro (Salame-Méndez *et al.*, 1998). En este contexto, los resultados obtenidos de los experimentos llevados al cabo en embriones de quelonios sexotermodependientes al administrarles inhibidores de las aromatasas (Crews y Bergeron 1994; Dorizzi *et al.*, 1994; Pieau *et al.*, 1994b; Rhen y Lang, 1994; Wibbels y Crews, 1994), esteroides aromatizables (Crews *et al.*, 1995; Wibbels y Crews, 1992; Crews *et al.*, 1989; Gutzke y Bull, 1986; Pieau, 1974; Pieau *et al.*, 1994a, b), esteroides no aromatizables (Wibbels y Crews, 1995, 1992; Wibbels *et al.*, 1991b), bloquear el receptor de estrógenos (Wibbels y Crews, 1995; Crews *et al.*, 1994; Pieau *et al.*, 1994b; Dorizzi *et al.*, 1991, 1987), así como administrar otros compuestos (Wibbels y Crews, 1995; Crews *et al.*, 1989), los resultados obtenidos también pueden ser interpretados considerando su efecto sobre el cerebro.

Por otra parte, la hipótesis de Bogart (1987) sobre la relación local de andrógenos o estrógenos es válida tanto a nivel gonadal como del cerebro. Así, por un lado, se observa la expresión del ARNm de la aromatasa (CYP19) en el cerebro de embriones de *Malaclemys terrapin* desarrollados tanto a temperatura masculinizante como feminizante, antes de que se determine su sexo (Jeyasuria y Place, 1997). Mientras que, por otro lado, en *L. olivacea*, tanto los contenidos como la capacidad de producir P4, T y E2, al ser mayores en el diencéfalo-mesencéfalo de las hembras durante las etapas de su diferenciación sexual gonadal, permiten sugerir que la regulación de la esteroidogénesis sería independiente de que se lleve a cabo directa o indirectamente sobre las células gonadales (Salame-Méndez, en prensa). La interpretación de ambas evidencias, apoyan la hipótesis de Merchant y Villalpando (1990), quienes proponen que el sensor primario de la TI es el SNC y que la

diferenciación gonadal se da a partir de la producción de factores neurohormonales, los cuales podrían ser regulados por la acción de las HES producidas por el Di. Especulando que las neurohormonas fuesen las mismas hormonas esteroides, como por ejemplo, la P5 y/o P4. Se ha demostrado que la P5 y la P4 y sus metabolitos 5α -reducidos regulan tanto la neurotransmisión como la mielinización, por lo que a nivel del SNC se consideran neuroesteroides (Koenig *et. al.*, 1995). Por lo anterior la P5 y/o P4, así como la T y el E2 actuarían parácrinamente a nivel del SNC regulando la secreción de neurohormonas. A nivel gonadal las neurohormonas regularían directa o indirectamente la producción y/o la actividad de los andrógenos o estrógenos, a partir de lo cual se llevaría al cabo la diferenciación morfogénica de los testículos u ovarios (Salame-Méndez, en prensa).

Por su parte, Merchant-Larios propone que la participación del cerebro en la diferenciación sexual de la gónada puede ser indirecto o directo (en Salame-Méndez *et al.*, 1998). El control indirecto, implica la mediación de la glándula pituitaria a partir de factores de liberación del hipotálamo que estimularían la secreción de gonadotropinas que modularían la diferenciación gonadal y su esteroidogénesis. Esta proposición tiene algunos argumentos a su favor. En *A. mississippiensis* Deeming y Ferguson (1989) sugieren que el sistema neuroendócrino puede jugar un papel importante en la determinación del sexo por la temperatura; sin embargo, no dan pruebas experimentales que apoye su hipótesis. White y Thomas (1992a, b) establecen que en la tortuga *T. scripta*, el complejo adrenal-riñón (AR) responde sexo-específicamente a las gonadotropinas y a otras hormonas de la pituitaria. Aunque las diferencias fueron evaluadas en la capacidad esteroidogénica del AR *in vitro*, estos resultados apoyan la posibilidad de que, *in vivo*, el cerebro pueda controlar directamente la secreción de neurohormonas de la pituitaria que a su vez regulen la esteroidogénesis del complejo AR.

El control directo del cerebro sobre la diferenciación gonadal implica la liberación de factores neurosecretorios *in situ*. La presencia de terminales nerviosas en las gónadas indiferenciadas durante el PTS de *L. olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989), permite especular sobre esta posibilidad. De tal manera, que un factor neuroendócrino parácrinamente podría actuar como un morfógeno en la gónada indiferenciada e inducir la diferenciación de un testículo o de un ovario. Para lo cual, algunas neuronas del cerebro por un proceso termosensible (¿receptor?) pudiese controlar la expresión del

gen de las aromatasas y una concentración crítica del estrógeno al inhibir un producto de un gen masculinizador, factores neurales pudiesen directa (o indirectamente) controlar la diferenciación histológica de la gónada. Sin embargo, el origen de los nervios cercanos a las gónadas, el tipo de las terminales nerviosas, la naturaleza de las neurosecreciones, aún no se conocen por lo que su estudio permitirá apoyar o refutar esta hipótesis (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos a nivel del SNC no son prueba evidente para apoyar alguno de los dos mecanismos que pudiesen influir sobre la diferenciación gonadal por medio del cerebro: el directo o el indirecto. Pero sí se demuestra que en *L. olivacea* una región del cerebro que comprende al diencefalo-mesencefalo al sentir la TI durante la determinación del sexo se regula la producción de P4 y T.

Integrando las evidencias de esta tesis con las anteriormente obtenidas en esta especie y en otras tortugas sexo-termodependientes, se propone un modelo a partir de cual se llevaría a cabo la diferenciación sexual gonadal de *L. olivacea*. i) la TI masculinizante en el periodo de determinación del sexo (PDS) a nivel del diencefalo (¿hipotálamo?) inhibe la secreción de neurohormonas. ii) A nivel de la región medular (estroma gonadal) se favorece la producción de T a partir de que se regula la expresión del gen y/o actividad de la enzima 17β -HED. iii) La T producida por las células esteroidogénicas de las gónadas de manera parácrina, inhibe la acción del E2, lo que favorece tanto el desarrollo de los cordones medulares (testiculares) como del estroma gonadal, dando lugar al desarrollo de los testículos. Por su parte, i) la TI feminizante durante el PDS a nivel del diencefalo (¿hipotálamo?) se favorece el metabolismo de HES. ii) La P5 y/o P4 (neuroesteroides) o la T y el E2 de manera parácrina, regularán la secreción de neurohormonas. iii) Las neurohormonas por medio de las terminaciones nerviosas a nivel gonadal inhiben la acción inactivadora de la T sobre el E2. iv) El E2, secretado por las células esteroidogénicas de la región medular o estroma gonadal, llevará al cabo la muerte celular de los cordones medulares, así como la de estimular el crecimiento y diferenciación del epitelio somático que conforma la región de la corteza, dando como resultado la formación de los ovarios.

CONCLUSIONES

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* cuyo sexo se determina por la TI:

1. El diencéfalo-mesencéfalo al sensor la TI durante la determinación del sexo, así como durante la diferenciación gonadal hay una producción diferencial de progesterona, testosterona y estradiol.
2. El tejido gonadal al sensor la TI durante la determinación del sexo, así como durante su diferenciación histológica hay una producción diferencial de testosterona.

PERSPECTIVAS

Las evidencias aportadas en esta tesis dan pauta para que el estudio sobre la determinación del sexo por la TI se encamine a demostrar, si en efecto el Di es el sensor de la TI profundizar, por ejemplo, si la TI *per se* o por medio de hormonas esteroides (neuroesteroides) se regula la producción de neurohormonas durante el PTS y cual sería su efecto sobre las gónadas antes y durante su diferenciación histológica. Por último, cabe destacar que el problema multifacético de la diferenciación sexual en vertebrados tiene ahora en los reptiles (Lance, 1997), peces (Conover y Heins, 1987) y anfibios (Dourmon *et al.*, 1990; Chardard *et al.*, 1995) sexo-termodependientes, un modelo experimental que coadyuvará a enriquecer las evidencias obtenidas a partir de los modelos clásicos de estudio (anfibios, Witschi, 1967; aves, Wolff y Wolff, 1951 y mamíferos, Byskov, 1986).

CONCLUSIONES

En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* cuyo sexo se determina por la TI:

1. El diencéfalo-mesencéfalo al sensor la TI durante la determinación del sexo, así como durante la diferenciación gonadal hay una producción diferencial de progesterona, testosterona y estradiol.
2. El tejido gonadal al sensor la TI durante la determinación del sexo, así como durante su diferenciación histológica hay una producción diferencial de testosterona.

PERSPECTIVAS

Las evidencias aportadas en esta tesis dan pauta para que el estudio sobre la determinación del sexo por la TI se encamine a demostrar, si en efecto el Di es el sensor de la TI profundizar, por ejemplo, si la TI *per se* o por medio de hormonas esteroides (neuroesteroides) se regula la producción de neurohormonas durante el PTS y cual sería su efecto sobre las gónadas antes y durante su diferenciación histológica. Por último, cabe destacar que el problema multifacético de la diferenciación sexual en vertebrados tiene ahora en los reptiles (Lance, 1997), peces (Conover y Heins, 1987) y anfibios (Dournon *et al.*, 1990; Chardard *et al.*, 1995) sexo-termodependientes, un modelo experimental que coadyuvará a enriquecer las evidencias obtenidas a partir de los modelos clásicos de estudio (anfibios, Witschi, 1967; aves, Wolff y Wolff, 1951 y mamíferos, Byskov, 1986).

LITERATURA CITADA

- BERMÚDEZ, J. A., CORONADO, V., MIJARES, A., LEÓN, C., VELÁZQUEZ, A., and MATEOS, J. L. 1975.** Stereochemical approach to increase the specificity of steroid antibodies. *J. Steroid Biochem.*, 6:283-290.
- BOGART, M. H. 1987.** Sex determination: A hypothesis based on steroid ratios. *J. Theoret. Bio.*, 128:349-357.
- BRADFORD, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- BULL, J. J. 1983.** *Evolution of Sex Determining Mechanisms.* Benjamin-Cummings, Menlo Park, C A.
- BULL, J. J., D. M., HILLIS, and S. O'STEEN. 1988a.** Mammalian ZFY sequences exist in reptiles of sex-determining mechanism. *Science*, 242:567-569.
- BULL, J. J., W. H. N. GUTZKE, and D. CREWS. 1988b.** Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70:425-428.
- BURNS, K. R. 1961.** Role of hormones in the differentiation of sex. Pp. 76-158 *in Sex and Internal Secretions* (E. Allen, ed.). 1st ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- BYSKOV, A. G. 1986.** Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev.*, 66(1):71-117.
- CEKAN, S. Z. 1976.** Reability of Steroid Radioimmunoassays. pp. 1-48. *Acta Universitatis Upsaliensis.* No. 14. Swedish Medical Research Council Reproductive Endocrinology Research Unit, Stockholm. Uppsala, Sweden.
- CONLEY, A. S., ELF, P., CORBIN, C. J., DUBOWSKY, S., FIVIZZANI, A., and J. W. LANG. 1997.** Yolk steroid decline during sexual differentiation in the Alligator. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107:191-200.

- CONOVER, D. O., and S. W. HEINS. 1987.** Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in fish. *Nature*, 326:496-498.
- CORIAT, A. E., VALLELEY, M. W. J. FERGUSON, and P. T. SHARPE. 1994.** Chromosomal and temperature dependent sex determination, the search for the conserved mechanism. *J. Exp. Zool.*, 270:112-116.
- CREWS, D., and J. M. BERGERON. 1994.** Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.*, 143:279-289.
- CREWS, D., T. WIBBELS, and W. H. N. GUTZQUE. 1989.** Action of sex steroids hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76:159-166.
- CREWS, D., J. J. BULL, and T. WIBBELS. 1991.** Estrogen and sex reversal in turtles: A dose-dependent phenomenon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81:357-364.
- CREWS, D., A. R. CANTÚ, J. M. BERGERON, and T. RHEN. 1995.** The relative effectiveness of androstenedione, testosterone, and estrone, precursors to estradiol, in sex reversal in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 100:119-127.
- CREWS, D., J. M. BERGERON, J. J. BULL, D. FLORES, A. TOUSIGNANT, J. K. SKIPPER, and T. WIBBELS. 1994.** Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev. Genet.*, 15:297-312.
- CHARDARD, D., G. DESVAGES, C. PIEAU., and C. DOURNON 1995.** Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltii* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *G. Comp. Endo.*, 99:100-107.
- CHARNIER, M. 1966.** Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae Lacertilien). *Comp. Rend. Sean. Soc. Biol.*, 160:620-622

- DEMAS, S., and S. WACHTEL 1990. DNA fingerprinting in reptiles: Bkm hybridization patterns Crocodilia and Chelonia. *Genome*, 34:472-476.
- DEMAS, S., M. DURONSLET, S. WACHTEL, C. CAILLOUET, and D. NAKAMURA. 1990. Sex-specific DNA in reptiles with temperature sex determination. *J. Exp. Zool.*, 253: 319-324.
- DEEMING, C., and M. FERGUSON. 1989. The mechanism of temperature dependent sex determination in crocodylians: an hypothesis. *Amer. Zool.*, 29:973-985.
- DESVAGES, G., and C. PIEAU. 1991. Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of he eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 39:203-213.
- DESVAGES, G., and C. PIEAU. 1992a. Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41:851-853.
- _____. 1992b. Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. *Differentiation*, 47:9-17.
- DESVAGES, G., M. GIRONDOT, and C. PIEAU. 1993. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen Comp. Endocrinol.*, 92:54-61
- DORIZZI, M., DESVAGES, G. et PIEAU, C. 1987. Effets de la temperature, de l'oestradiol et du tamoxifène sur la differenciation sexuelle des gonades chez les tortues. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 73(3):204 (resumen).
- DORIZZI, M., T. M. MIGNOT, A. GUICHARD, G. DESVAGES, and C. PIEAU. 1991. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation*, 47:9-18.
- DORIZZI, M., N. RICHARD-MERCIER, G. DESVAGES, M. GIRONDOT, and C. PIEAU. 1994. Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 58:1-8.

- DOURNON, C., C. HOUILLON, and C. PIEAU. 1990.** Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.*, 34:81-92.
- ENGEL, W., B. KLEMME, and M. SCHMID. 1981.** H-Y antigen and sex-determination in turtles. *Differentiation*, 20:152-156.
- FERGUSON, M. W. J., and T. JOANEN. 1983.** Temperature dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *J. Zool.*, 200:143-177.
- GAHR, M., T. WIBBELS, and D. CREWS. 1992.** Sites of estrogen uptake in embryonic *Trachemys scripta*, a turtle with temperature-dependent sex determination. *Biol. Reprod.*, 46:458-463.
- GALLIEN, L. 1973.** Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires. *Maitreses de Biologie*, 250 pp. Masson et. C, editores. Paris.
- GUTZKE, W. H. N., and J. J. BULL. 1986.** Steroid hormones reverse sex in turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 64:368-372.
- GUTZKE, W. H. N., and D. B. CHYMIY. 1988.** Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71:265-267.
- HARRINGTON, R. W., Jr. 1967.** Environmental controlled induction of primary male gonochoris from eggs of the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *P. Boll. Bull.*, 132:179-199.
- HOLMES, R. L. 1968.** *Reproduction and Environment*. Oliver and Boyd, London-Edinburgh.
- HUNTER, G. A., and E. M. DONALDSON. 1983.** Hormonal sex control and its application to fish culture. Vol.9B: 223-303 *in Fish Physiology* (W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. Donaldson, eds.). Academic Press, New York/London.
- JANZEN, F. J., and G. L. PAUKSTIS. 1991.** Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *Quart. Rev. Biol.*, 66(2):149-179.

- JEYASURIA, P., and A. R. PLACE. 1997.** Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) embryos. *J. Steroid. Molec. Biol.*, 61(3-6):415-425.
- JEYASURIA, P., ROSENBERG, W. M., and A. R. PLACE. 1994.** Role of P-450 aromatase in sex determination of the diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *J. Exp. Zool.*, 270:95-111.
- KIME, D. E. 1995.** Steroid nomenclature. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 98:119-120.
- KOENING, H. L., M. SCHUMACHER, B. FERZAZ, A. N. DO-THI, A. RESSOUCHES, R. GUENNOUN, Y. JUNG-TESTAS, P. ROBEL, Y. AKAWA, and E. M. BAULIEAU. 1995.** Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268:1500-1503.
- LAGOMARSINO, Y. V., and D. O. CONOVER. 1993.** Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evolution*, 47:487-494.
- LANCE, V. A. 1997.** Sex determination in Reptiles: an update. *Amer. Zool.*, 37:504-513.
- LANCE, V. A., and BOGART, M. H. 1994.** Studies on sex determination in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.*, 270:79-85.
- LUO, X., Y. IKEDA, and K. L. PARKER. 1994.** A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77:481-490.
- MENDIETA, E., A. SALAME, J. HERRERA, and F. ANTÓN-TAY. 1991.** Melatonin inhibition of androgen biosynthetic pathway in Leydig cell-enriched cell fractions from normal adult rat. *Mol. Androl.*, 3:319-329.
- MERCHANT-LARIOS, H., and I. VILLALPANDO-FIERRO. 1990.** Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *J. Exp. Zool.*, 254:327-331.

- MERCHANT-LARIOS, H., I. VILLALPANDO-FIERRO, and B. CENTENO-URRUIZA. 1989.** Gonadal morphogenesis under controlled temperature in sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3:43-61.
- MERCHANT-LARIOS, H., RUIZ-RAMIREZ, S., MENDOZA-MORENO, N., and A. MARMOLEJO-VALENCIA. 1997.** Correlation among thermosensitive period, estradiol response and gonadal differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107:373-385.
- McLAREN, A., E. SIMPSON, K. TOMONARI, P. CHANDLER, and H. HOGG. 1984.** Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312:552-555.
- MROSOVSKY, N., and C. L. YNTEMA. 1980.** Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implication for conservation practices. *Biol. Conserv.*, 18:271-280.
- NAKAMURA, D. 1989.** Evolutionary aspects of vertebrate sex determination. Pp. 3-14 in *Evolutionary mechanisms in sex determination*. (S. S. Wachtel, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- NAKAMURA, D., S. S. WACHTEL, V. LANCE, and W. BECAB. 1987.** On the evolution of sex determination. *Proc. R. Soc. Lond. (B)*, 232:259-180.
- NEW, D. A. T. 1966.** The culture of vertebrate embryos. pp 99-116. Logos Press, Academic Press. New York.
- O'MALLEY, B. O. 1989.** Did eucaryotic steroid receptors evolve from intracrine gene regulators? *Endocrinology* 125:1119-1120.
- PEARSON, K. A., Z. G. WURST, and E. J. CADLE. 1983.** Ontogeny and immunocytochemical differentiation of pituitary gland in a sea turtle, *Caretta caretta*. *Anat. Embryol.*, 167:13-37.
- PIEAU, C. 1969.** Sur une anomalie des conduits génitaux observée chez les embryon de tortue grecque (*Testudo graeca* L.) traités par le benzoate d'oestradiol. *C. R. hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences et des belles-lettres de Paris*, 268:364-367.

- _____. 1970. Effets de l'oestradiol sur l'appareil génital de l'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). Arch. Anat. micros. Morph. exp., 59:295-318.
- _____. 1972. Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. C.R. Acad. Sci. (Paris) 274:719-722.
- _____. 1973. Variation de l'activité enzymatique $\Delta 5-3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les glandes génitales d'embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien), en fonction de la température d'incubation. C.R. Acad. Sci. (Paris) 276:197-200.
- _____. 1974. Differentiation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chelonian); effets des hormones sexuelles. Ann. Embryol. Morph., 7:365-394.
- _____. 1975. Temperature and sex differentiation in embryos of two chelonians, *Emys orbicularis* L. and *Testudo graeca* L. Pp. 332-339 in *Intersexuality in the Animal Kingdom* (R. Reinboth, ed.) Sprin-Verlag, Berlin, Heilderberg.
- _____. 1978. Effets de températures d'incubation basses et élevées sur la différenciation sexuelle chez des embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). C. r. hebd. Séanc Acad. Sci., Paris, Série D, 286:121-124.
- PIEAU, C., DORIZZI, M. et DESVAGES, G. 1987. Une hypothèse sur l'implication des hormones oestrogènes dans la différenciation sexuelle des gonades chez les amphibiens, les reptiles et les oiseaux. J. Physiol., 30A.
- PIEAU, C. Th. M. MIGNOT, M. DORIZZI., and A. GUICHARD. 1982. Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L.: A preliminary study in embryos, hatchling, and young as a function of the incubation temperature of eggs. Ge. Comp. Endocrinol., 47:392-398.

- PIEAU, C., M. GIRONDOT., N. RICHARD-MERCIER, G. DESVAGES, M. DORIZZI, and P. ZABORSKI. 1994a. Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: hormonal involvement. *J. Exp. Zool.*, 270:86-94.
- PIEAU, C., M. GIRONDOT., M. DORIZZI, N. RICHARD-MERCIER, and P. ZABORSKI. 1994. Environmental control of gonadal Differentiation. Pp 433-448 *in* The Differentiation Between the Sexes (Short, R. V. and Balabou, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- RAYNAUD, A., and C. PIEAU. 1985. Embryonic development of the genital system. Pp. 149-299 *In* Biology of the Reptilia (S. Gans. and F. Billeu, eds.). John Wiley and Sons, New York.
- READER, J. 1991. The rise of life: the first 3.5 billion years. Crescent Books. New York.
- RHEN, T., and J. W. LANG. 1994. Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: Manipulation of the embryonic sex steroid environment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96:243-254.
- RISLEY, P. L. 1933. Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). *Z. zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 18:459-543
- RUIZ-RAMÍREZ, S. 1995. Diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea*: Período sensible a la temperatura, efecto de la temperatura y el estradiol en la gónada. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 97 pp.
- SADLEIR, R.M.F.S. 1969. The ecology of reproduction in wild and domestic mammals. Methuen. Londres.
- SALAME-MÉNDEZ, A. 1992. La temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroideas sexuales y su relación en el establecimiento gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 208 pp.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- SALAME-MÉNDEZ, A.** en prensa. Influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en queleionios. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*
- SALAME-MÉNDEZ, A. y VILLALPANDO-FIERRO, I.** en prensa. La diferenciación sexual en los vertebrados: Hipótesis y Teorías. *Acta Zool. Méx.* (n.s.).
- SALAME-MÉNDEZ, A., J. HERRERA-MUÑOZ, N. MENDOZA-MORENO, and H. MERCHANT-LARIOS.** 1998. Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Exp. Zool.*, 280:304-313.
- SAS INSTITUTE.** 1985. SAS guide for personal computer. 6^a edition. SAS Institute Inc.; Cary, North Carolina, USA.
- SCHEIB, D.** 1983. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation*, 23 (Suppl.):587-592.
- SCHLESINGER, M. J.** 1989. Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell. Biol.*, 1103:321-325.
- SIMPSON, E., P. CHANDLER, E. GOULNY, C. M. DITECHE, M. A. FERGUSON-SMITH, and D. C. PAGE.** 1987. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on the human Y chromosome. *Nature* 336:780-783.
- SPOTILA, J. R., SPOTILA, L. D., and KAUFER, N. F.** 1994. Molecular mechanisms of TDS in Reptiles: A search for the magic bullet. *J. Exp. Zool.*, 270:117-127.
- TIERSCH, T. R., M. J. MITCHEL, and S. S. WACHTEL.** 1991. Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Human. Genet.*, 87:571-573.
- THOMAS, E. O., P. LICHT, T. WIBBELS., and D. CREWS.** 1992. Hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with sexual differentiation in embryos of the turtle *Trachemys scripta*. *Biol. Reprod.*, 46:140-145.
- UCHIDA, T.** 1937. Studies on the sexuality of Amphibia. III. Sex transformation in *Hynobius retardatus* by high temperature. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. 6* 6:35-58.

- VAN TIENHOVEN, A. 1983.** Reproductive physiology of vertebrates. Custom Publishing Associates, Cornell University Press. 2 ed.
- VILLALPANDO, I., and H. MERCHANT-LARIOS. 1990.** Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *Int. J. Dev. Biol.*, 34:281-285.
- VOGT, R. C., and J. J. BULL. 1982.** Temperature controlled sex-determination in turtles: ecological and behavioral aspects. *Herpetologica*, 38:156-164.
- VOGT, R. C. y O. A. FLORES-VILLELA. 1986.** Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. *Ciencia*, 37:21-32.
- WACHTEL, S. S., and G. C. KOO. 1981.** H-Y antigen in gonadal differentiation. Pp. 255-299 *in* Mechanisms of Sex Differentiation in Animals and Man (C. R. Austin and R.G. Edwards, eds). Academic Press, New York.
- WHITE, R. B., and P. THOMAS. 1992a.** Adrenal-kidney and gonadal steroidogenesis during sexual differentiation of a reptile with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp. Endocrinol.*, 88:10-19.
- _____. **1992b.** Whole-body and plasma concentrations of steroid in the turtle, *Trachemys scripta*, before, during, and after temperature-sensitive period for sex determination. *J. Exp. Zool.*, 264:159-166.
- _____. **1992c.** Stimulation of *in vitro* steroidogenesis by pituitary hormones in a turtle (*Trachemys scripta*) within the temperature-sensitive period for sex determination. *Biol. Reprod.*, 47:952-959.
- WITSCHI, E. 1914a.** Experimentelle untersuchungen ueber die untersuchungen der keimdruesen von *Rana temporaria*. *Arch. Mikr. Anat. Entw.*, 85:9-113.
- _____. **1914b.** Studie ueber die geschlechtsbestimmung bei freschen. *Arch. Mikr. Anat. Entw.*, 86:1-50.

- _____. 1929. Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. II. Sex reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. Exp. Zool.*, 52:267-292.
- _____. 1967. Biochemistry of sex differentiation in vertebrates embryos. Vol. II:139-225 in *Biochemistry of Animal Development* (R. Weber, ed.). Academic Press, New York and London.
- WIBBELS, T., and D. CREWS. 1992.** Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *J. Endocrinol.*, 133:121-129.
- _____. 1994. Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.*, 141:295-299.
- _____. 1995. Steroid-induced sex determination at incubation temperatures producing mixed sex ratios in a turtle with TSD. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 100:53-60.
- WIBBELS, T., J. J. BULL, and D. CREWS. 1991a.** Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination?. *J. Exp. Zool.*, 260:130-134.
- _____. 1991b. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool.*, 260:371-381.
- _____. 1992. Steroid hormone induced male sex determination in an amniotic vertebrate. *J. Exp. Zool.*, 262:454-457.
- WOLFF, Et., and Em. WOLFF. 1951.** The effects of castration on bird embryos. *J. Exp. Zool.*, 116:59-97.
- YOSHIKURA, M. 1959.** The action of the pituitary in sex differentiation and sex reversal in Amphibians. II. Effects of high temperature on the gonadas of hypophysectomized frog larvae. *Kunamoto J. Sci., Ser. B, Sect. 2* 4:69-101.
- ZABORSKI, P., M. DORIZZI, and C. PIEAU. 1988.** Temperature-dependent gonadal sex differentiation in the turtle *Emys orbicularis*: concordance between sexual

genotype and serological H-Y antigen expression at threshold temperature.

Differentiation, 38:17-20.

ANEXO 1

ESPECIFICIDAD DE LOS ANTISUEROS UTILIZADOS

DT	P5 1:7500	17P5 1:5000	DHA 1:5000	P4 1:1000	17P4 1:7500	B 1:7500	A 1:1000	T 1:1000	E2 1:1000
EP	% DE REACCION CRUZADA								
C27*	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
P5	100.00	23.12	1.25	5.30	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
17P5*	11.30	100.00	0.50	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
DHA	0.50	1.25	100.00	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
P4	1.25	1.10	<0.01	100.00	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
17P4	<0.01	5.12	9.50	1.25	100.00	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	100.00	<0.01	<0.01	<0.01
C	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	7.25	<0.01	<0.01	<0.01
A	<0.01	<0.01	3.80	<0.01	<0.01	<0.01	100.00	3.25	<0.01
T	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	100.00	<0.01
DHT*	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.10	<0.01
E1*	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	23.5
E2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	100.00
E3*	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	5.25

DT, dilución de trabajo; EP, esteroide probado. P5, pregnenolona; 17P5, 17 α -hidroxi-pregnenolona; DHA, dehidroepiandrosterona; 17P4, 17 α -hidroxi-progesterona; B, corticosterona; A, androstendiona; T, testosterona; E2, estradiol; C27, colesterol; DHT, 5 α -dihidro-testosterona; E1, estrona; E3, estriol.

*esteroides no determinados en el estudio pero se evaluaron para la especificidad.

Para todos los antisueros se determinó la reacción cruzada y se expresó como la relación porcentual del cociente de la cantidad de esteroide requerido para desplazar el 50% del correspondiente esteroide marcado y la cantidad del esteroide prueba requerido para generar el mismo 50% de desplazamiento del esteroide marcado; todos los ensayos fueron realizados en la dilución del suero útil para la curva patrón.

ANEXO 2

Distancias relativas (rf) de los esteroides sexuales evaluados presentes en las cromatoplasmas de gel de sílice (F254, Merck) después de realizar la cromatografía utilizando tres sistemas cromatográficos: i) benceno; ii) benceno:acetato de etilo (7:3 v/v) y iii) benceno:metanol (95:5 v/v).

ESTEROIDE	rf	cm
Estrona	0.915	16.5
Progesterona	0.876	15.8
Androstendiona	0.858	15.4
Pregnenolona	0.754	13.6
Dehidroepiandrosterona	0.732	13.2
Estradiol	0.668	12.0
17-progesterona	0.623	11.2
Testosterona	0.471	8.5
Corticosterona	0.267	4.8

El desarrollo de cada cromatografía en su respectivo sistema cromatográfico se llevó en un tiempo de ≈ 70 minutos a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; cm, es la distancia en centímetros tomando como base el punto de aplicación de la muestra (1.5 cm de altura a partir del extremo inferior de la cromatoplasma).

ANEXO 3

EXACTITUD DE LOS SISTEMAS UTILIZADOS EN LOS RADIOINMUNOANÁLISIS

PARAMETRO	ESTEROIDES									
	P5	DHA	P4	17P4	B	A	T	E2		
Recuperación de masa 5 pg	4.98±0.06	5.01±0.07	5.01±0.02	4.99±0.04	4.99±0.04	5.01±0.02	5.00±0.05	4.98±0.08		
50 pg	49.6±0.28	50.2±0.65	50.3±0.21	50.7±0.39	51.0±0.85	49.9±0.31	50.4±0.22	50.1±0.21		
500 pg	501±1.59	498±2.16	502±2.46	502±1.59	506±1.89	502±1.89	501±1.26	498±2.11		
Variación máxima de la curva (c.v.)	2.11	1.85	0.98	1.35	2.16	1.01	0.95	1.58		
Variación intraensayo de una muestra de suero (c.v.) (n=10)	3.26	2.75	1.87	2.11	3.59	1.29	1.32	1.45		

P5, pregnenolona; DHA, dehidroepiandrosterona; P4, progesterona; 17P4, 17 α -hidroxi-progesterona; B, corticosterona; A, androstendiona; T, testosterona; E2, estradiol.

ANEXO 4

SENSIBILIDAD DE LOS SISTEMAS UTILIZADOS EN LOS RADIOINMUNOANÁLISIS

PARAMETRO	ESTEROIDES									
	P5	DHA	P4	17P4	B	A	T	E2		
Dilución de Trabajo	1:7500	1:5000	1:1000	1:7500	1:7500	1:1000	1:1000	1:1000		
Intervalo de la Curva en pg	1-1000	1-1000	1-1000	1-1000	1-1000	1-1000	1-1000	1-1000		
% de Variación del cero	1.25	1.25	1.54	1.20	1.84	1.35	1.25	1.51		
Unión de Blancos de Agua (n=10)	100±1.28	99±1.34	100±1.45	99±1.28	100±1.53	101±1.25	100±1.10	101±1.38		
Unión de Blancos de Suero (n=10)	99±1.35	100±1.25	99±1.54	100±1.53	100±1.86	99±1.37	99±1.26	100±1.43		
Dosis mínima detectable en pg	1.42	1.64	2.11	1.98	1.54	1.97	1.85	1.25		

P5, pregnenolona; DHA, dehidroepiandrosterona; P4, progesterona; 17P4, 17 α -hidroxi-progesterona; B, corticosterona; A, androstendiona; T, testosterona; E2, estradiol.

ANEXO 5

PORCENTAJE DE BIOTRANSFORMACIÓN DE PREGNENOLONA TRITIADA
%/ μ g de proteína / hr

TEJIDO	PERIODO	27 \pm 0.5°C	32 \pm 0.1°C
GONADAS	PTS	37 \pm 5	44 \pm 5
	PGI	49 \pm 6	69 \pm 8
	PGD	47 \pm 6	65 \pm 7
MESONEFROS	PTS	17 \pm 5	23 \pm 5
	PGI	23 \pm 5	29 \pm 7
	PGD	24 \pm 5	29 \pm 5
INTERRENALES	PTS	46 \pm 4	51 \pm 4
	PGI	54 \pm 6	65 \pm 7
	PGD	65 \pm 7	74 \pm 9
CEREBRO	PTS	5 \pm 1	7 \pm 2
	PGI	5 \pm 1	10 \pm 2
	PGD	7 \pm 2	19 \pm 6
TELENCEFALO	PTS	6 \pm 2	8 \pm 3
	PGI	12 \pm 4	15 \pm 5
	PGD	17 \pm 5	23 \pm 8
DIENCEFALO	PTS	17 \pm 4	19 \pm 2
	PGI	22 \pm 6	29 \pm 3
	PGD	25 \pm 4	34 \pm 9

27 \pm 0.5°C = temperatura de incubación masculinizante.

32 \pm 0.1°C = temperatura de incubación feminizante.

\pm = desviación estándar de 9 determinaciones de tres series experimentales independientes.

ANEXO 6

PORCENTAJE DE BIOTRANSFORMACIÓN DE TESTOSTERONA TRITIADA
%/ μ g de proteína / hr

TEJIDO	PERIODO	27 \pm 0.5°C	32 \pm 0.1°C
GONADAS	PTS	10 \pm 2	12 \pm 2
	PGI	13 \pm 3	14 \pm 2
	PGD	14 \pm 2	15 \pm 2
MESONEFROS	PTS	3 \pm 1	4 \pm 1
	PGI	5 \pm 1	5 \pm 1
	PGD	5 \pm 2	5 \pm 1
INTERRENALES	PTS	5 \pm 1	8 \pm 1
	PGI	7 \pm 2	9 \pm 2
	PGD	8 \pm 2	11 \pm 4
CEREBRO	PTS	2 \pm 1	3 \pm 1
	PGI	3 \pm 1	5 \pm 2
	PGD	4 \pm 1	6 \pm 1
TELENCEFALO	PTS	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
	PGI	0.5 \pm 0.1	1.0 \pm 0.5
	PGD	1.0 \pm 0.5	1.0 \pm 0.5
DIENCEFALO	PTS	1.5 \pm 0.6	3.0 \pm 1.0
	PGI	2.5 \pm 1.0	4.0 \pm 1.0
	PGD	3.5 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0

27 \pm 0.5°C = temperatura de incubación masculinizante.

32 \pm 0.1°C = temperatura de incubación feminizante.

\pm = desviación estándar de 9 determinaciones de tres series experimentales independientes.

ANEXO 7

Artículo

Response of Diencephalon But Not the Gonad to Female-Promoting Temperature With Elevated Estradiol Levels in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*

ARTURO SALAME-MENDEZ,¹ JOAQUIN HERRERA-MUNOZ,² NORMA MORENO-MENDOZA,³ AND HORACIO MERCHANT-LARIOS^{3*}

¹Department of Biology of Reproduction, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F. México 09340

²Andrology Laboratory, Hospital L. Castelazo Ayala, IMSS, México, D.F. México 01090

³Department of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México, D.F. México 04510

ABSTRACT Although temperature sex determination is well known in several reptile species, the physiological mechanism underlying this process remains to be elucidated. In the current work, we analyzed the levels of testosterone (T) and estradiol (E2) in the gonads; two brain regions—telencephalon (Te) and diencephalon/mesencephalon (Di)—and the serum of developing embryos of the olive ridley *Lepidochelys olivacea* incubated at male- or female-promoting temperatures. Conversion of pregnenolone (P5) to T and T to E2 were studied in the gonads and brain. The analyses were performed during three periods: the thermosensitive period (TSP), histologically undifferentiated gonads (UDG), and differentiated gonads (DG). In the gonads, serum, and brain, T concentrations were higher at the female-promoting temperature during the three periods, whereas in the gonads and serum, E2 levels were similar at the female and male-promoting temperature. In Di, the concentration of E2 was significantly higher at the female-promoting temperature. Biotransformation of P5 to T in gonadal tissues were slightly higher at the female-promoting temperature in TSP and increased during UDG and DG. Conversion of T to E2, however, was similar at the two temperatures during the three periods. In the brain, the Di showed a higher efficiency for transforming T to E2 at the female-promoting temperature. Our present results do not allow us to decide whether the diencephalon is the cause or the effect, but they conclusively demonstrate that, in *L. olivacea*, this region of the brain senses temperature during sex determination. *J. Exp. Zool.* 280:304-313, 1998. © 1998 Wiley-Liss, Inc.

Incubation temperature is well known to be sex determinant in various reptile species (Bull, '80; Janzen and Paukstis, '91). By analogy to mammals (Jost, '47) sex differentiation in thermodependent species is thought to begin in the undifferentiated gonad, where a chain of events leading to the differentiation of ovaries or testes takes place. In eutherian mammalian species, the *Sry* gene is the testis-determining factor first expressed in the undifferentiated gonad (Koopman et al., '91). In nonmammalian species, however, the role of the *Sry* gene in sex determination is not clear (Tiersch et al., '91; Coriat et al., '94; Spotila et al., '94).

Efforts to elucidate the molecular mechanisms of sex determination and differentiation in temperature-sex-determined (TSD) reptiles have fo-

cused on steroid hormones. Raynaud and Pieau ('85) were the first to suggest the key role of estrogen synthesis in sex determination and gonad differentiation. In a review of their work with the freshwater turtle *Emys orbicularis*, Pieau et al. ('94a) postulated that temperature could act directly or indirectly on the regulation of aromatase

Abbreviations used: DG, differentiated gonad; Di, diencephalon/mesencephalon; E2, estradiol; Go, gonads; P5, pregnenolone; RIA, radioimmunoanalysis; Ser, serum; T, testosterone; Te, telencephalon; TSD, temperature sex determined; TSP, thermosensitive period; UDG, undifferentiated gonad.

Grant Sponsors: CONACYT-Mexico (4037N) and PAPIIT-UNAM (IN209694).

*Correspondence to: Horacio Merchant-Larios, Department of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70228, México, D.F. México 04510. E-mail: merchant@servidor.unam.mx

Received 2 July 1997; Accepted 28 October 1997

gene expression in the gonad. Contrary to data from *E. orbicularis* (Dorizzi et al., '91), male embryos of *Trachemys scripta*, another TSD turtle, secreted higher estradiol (E2) levels than females (White and Thomas, '92a). Therefore, it seems that, in some species, there is no direct correlation between higher E2 in the gonad at female-promoting temperature and sex determination.

We have proposed that the neuroendocrine system may be important for sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. In a high-resolution study of gonad development in *L. olivacea*, we found that the undifferentiated gonad showed nerve terminals, which are not present in mammals (Merchant-Larios et al., '89). Furthermore, we found that, when isolated undifferentiated gonads were cultured, they differentiated according to the temperature at which the donor organism was incubated. The contralateral gonad did not respond to the shifted temperature (Merchant-Larios and Villalpando-Fierro, '90). Although in these experiments, only embryos at female-promoting temperature were at the TSP (recently determined; Merchant-Larios et al., '97), our general conclusion remains valid. Moreover, in a preliminary study of steroid hormone contents in gonads of *L. olivacea*, no significant differences in E2 were found in embryos incubated in male- or female-promoting temperatures (Salame-Méndez, '92). Finally, White and Thomas ('92b,c) found that adrenal-kidney complexes responded sex-specifically to gonadotropins in embryos of *T. scripta*.

In *Alligator mississippiensis*, the thermosensitive period occurs in embryos during the genital ridge formation stages, and sex is determined well before the histological differentiation of the gonads (Ferguson and Joanen, '83). In *L. olivacea*, we found that, at the male-promoting temperature, sex determination also occurs before histological differentiation of the gonad (Merchant-Larios et al., '97). Although irreversible molecular events controlled by temperature in genital ridges cannot be discounted, primary sex determination (sexual fate) may occur in a thermosensitive extragonadal organ. If primary sex determination occurs at the gonadal level, it must be assumed that thermoreceptors emit signals for the establishment of irreversible molecular processes that will lead to morphological differentiation of the gonad. If thermoreceptors were present in the brain, however, primary sex determination might take place in this organ, and differentiation of the gonad would then be a secondary event.

In the current study, we postulate the following

working hypothesis: Since exogenous E2 counteracts the effect of the male-promoting temperature, at the female-promoting temperature, a higher concentration of E2 may be detected in the sensor organ during the thermosensitive period. To verify this hypothesis, we performed two experiments. The first experiment was a high-sensitivity radioimmunoanalysis (RIA) performed to measure concentrations of testosterone (T) and estradiol (E2) in the gonads, serum, and two brain regions (telencephalon, Te, and diencephalon/mesencephalon, Di). The second experiment was a biotransformation of steroid hormones in gonads and brains of *L. olivacea* during three periods of development: (1) during the TSP; (2) after TSP but before morphological differentiation of the gonad (UDG); and (3) after the gonads can be histologically differentiated (DG).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Lepidochelys olivacea eggs were obtained from La Escobilla beach (96° 27'16"W, 15° 40'36"N), Oaxaca, Mexico, on the night they were laid, and transported to Mexico City within 12 h by ground transportation. This study used eggs from five clutches obtained between 1993 and 1995. After arrival, eggs were placed in covered plastic trays filled with moistened vermiculite. Containers of eggs from the same clutch were placed in incubators at either 27 ± 0.5°C (male-promoting temperature) or 32 ± 0.1°C (female-promoting temperature) for different experiments.

Experimental design for steroid determination

Three distinct periods during embryogenesis were sampled. The first period corresponds to the thermosensitive period (TSP) when the embryos responded to the altered temperature (Merchant-Larios et al., '97). The second period was when the gonads were still undifferentiated (undifferentiated gonad or UDG), and the third was after the gonads were differentiated histologically (DG).

Evaluation of endogenous steroids

Radioimmunoassays (RIAs) were performed in gonads (Go), serum (Ser), and two brain regions, telencephalon (Te) and diencephalon/mesencephalon (Di), taken from embryos under the six experimental series shown in Table 1. A total of 432 assays were performed.

TABLE 1. Radioimmunoassays of different embryonic tissues of *Lepidochelys olivacea* incubated at male- or female-promoting temperatures

Period ¹	Temp. (°C)	Days	Stage	Go	Te	Di	Se
TSP	27 ± 0.5	20	20/21	6(27)	2(18) ²	2(18) ²	6(54) ²
TSP	32 ± 0.1	20	23/24	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
UDG	27 ± 0.5	27	23/24	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
UDG	32 ± 0.1	27	26/27	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
DG	27 ± 0.5	45	27/28	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)
DG	32 ± 0.1	33	27/28	2(9)	2(18)	2(18)	2(18)

¹TSP, thermosensitive period; UDG, undifferentiated gonad; DG, differentiated gonad; Go, gonads; Te, telencephalon; Di, diencephalon/mesencephalon; Se, serum.

²Number of tissues pooled. We used three pools by assay and each assay was repeated three times. Number in parentheses indicates total number of embryos.

Radiolabeled steroids

[7-3H] Pregnenolone (sp. act. 27 Ci/mmol), [2,4,6,7,16,17-3H] testosterone (sp. act. 139 Ci/mmol), and [2,4,6,7,16,17-3H] estradiol (sp. act. 140 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA) and purified before use by thin-layer chromatography with toluene:ethyl acetate (2:1, v/v).

Unlabeled steroids and solvents

Steroid nomenclature according to Kime ('95) is as follows: 3 β -Hydroxy-5-pregnen-20-one (pregnenolone, P5); 17 β -hydroxy-4-androsten-3-one (testosterone, T); and 1,3,5(10)-estratriene-3, 17 β -diol (estradiol, E2). These reference steroids were obtained from Steraloids (Pawling, NY), and the purity of each steroid was checked by TLC. All organic solvents were of analytic grade.

Steroid extractions

Pooled tissues were sonicated for 20 to 30 sec in 100 μ l of Ringer solution for reptiles (New, '66) in Eppendorf tubes. Blood was centrifuged (3,000g/4°C/10 min) to separate serum. An aliquot of each sample was taken to determine the protein content using bovine serum albumin as standard (Bradford, '76). The remaining sample was stored at -20°C until steroid contents were determined. For steroid extraction, samples of sonicated tissues and sera were transferred to conical tubes, each with \approx 1,000 cpm of labeled steroids as tracers to evaluate recovery. Then, 5 ml of diethyl ether were added to each tube and mixed in a vortex for 60 sec; each extraction was repeated twice. The aqueous phase was removed after freezing in dry ice-acetone, and the organic phase was decanted into a conical tube and evaporated until dry. Average extraction efficiency ranged from 93.5 \pm 7%. Results for any given steroid and all steroid assays were corrected for recovery.

Steroid purification

Each sample extract in the conical tubes was mixed with diethyl ether:methanol (2:1, v/v) and placed on chromatoplates (20 \times 20 cm) covered with 0.25 mm of silica gel and an absorption indicator of UV light of 254 nm (Merck, México, D.F. México). Two lanes of the chromatoplate were loaded with 5 μ l of a standard solution of nonradioactive steroids as references. Each sexual steroid was separated using three chromatographic systems (A: benzene; B: benzene:ethyl acetate, 7:3 v/v; C: benzene:methanol, 95:5 v/v). Each chromatogram was visualized with UV (254 and 366 nm) and Oertel reagent (sulfuric acid:ethanol, 2:1 v/v) in the corresponding zones of the spots for specific reference steroids. Each sample area with a single spot in the appropriate position together with its respective rf (running factor), was separated and eluted with 1.1 ml of diethyl ether:methanol (1:1, v/v). Two aliquots of 500 μ l were obtained from each eluate; one was transferred to tubes for RIA as described below, and the other was poured into a glass vial to evaluate the percentage of recovery. The solvent was evaporated under vacuum in an oven (30°C), and radioactivity was measured with a liquid-scintillation spectrometer (Beckman, LS-7000).

Radioimmunoassay (RIA)

An aliquot was quantified by specific RIA for testosterone and estradiol as previously reported (Mendieta et al., '91). Briefly, 500 μ l of phosphate-buffer (0.25 M, pH 7, with sodium azide and 1% gelatin), the corresponding antiserum in an appropriate dilution, and the specific radiolabeled steroid with its respective tracer (\approx 5000 cpm) were added to each tube, and the tubes were incubated at 4°C overnight. Bound steroid was separated from unbound steroid by adding to each tube 500 μ l of a mixture of dextran-coated charcoal (6.25:

62.5% Dextran T-70:Norit A, w/w in bidistilled water) and centrifuging (3,000g/4°C/15 min). The supernatant was decanted into a glass vial, and 5 ml of Instagel (Packard) was added. Radioactivity in the vial was determined in a liquid-scintillation spectrometer (Beckman, LS-7000) with a maximum efficiency of 56% for tritium. The RIA methods were validated by confirming that serial dilutions gave a linear standard curve. The intra-assay coefficient of variation for all assays were less than 4%. Antisera were raised in rabbits as previously described by Bermúdez et al. ('75), and antibodies are available with one of the authors (J.H.).

Biotransformation assay

To determine the in vitro capacity of the gonads (Go), telencephalon (Te), and diencephalon/mesencephalon (Di) to biotransform radiolabeled steroid precursors into T and E2 during TSP, UDG, and DG, three experimental series were run in triplicate, using each pair of a Go, a Te, and a Di of individual embryos at each stage and temperature. To evaluate testosterone and estradiol either [³H]P5 (0.005 μ Ci) or [³H]T (0.003 μ Ci) respectively were diluted in 500 μ l reptile Ringer (New, '66). Tissues were incubated at male- or female-promoting temperature for 1 h without cofactors. Two controls were used for each experiment: one with a non-steroidogenic tissue (forelimb) and one without tissue. At the end of the incubation period, samples were frozen and stored until evaluation of the conversion of both precursors. Methods for extraction and purification of steroids and determination of total protein concentration were the same as described for the RIA. The percentage biotransformation to T and E2 was calculated for each incubation.

Statistical analyses

To determine significant differences in steroid contents and metabolism between embryos incubated at male- or female-promoting temperatures, all data were subjected to two-way analysis of variance, as well as to Student's *t*-tests, using the Statistical Analysis System package (SAS Institute, '85).

RESULTS

Steroid contents in gonads, brain, and serum

Figure 1 shows T and E2 concentration in gonads detected at TSP, UDG, and DG. During the

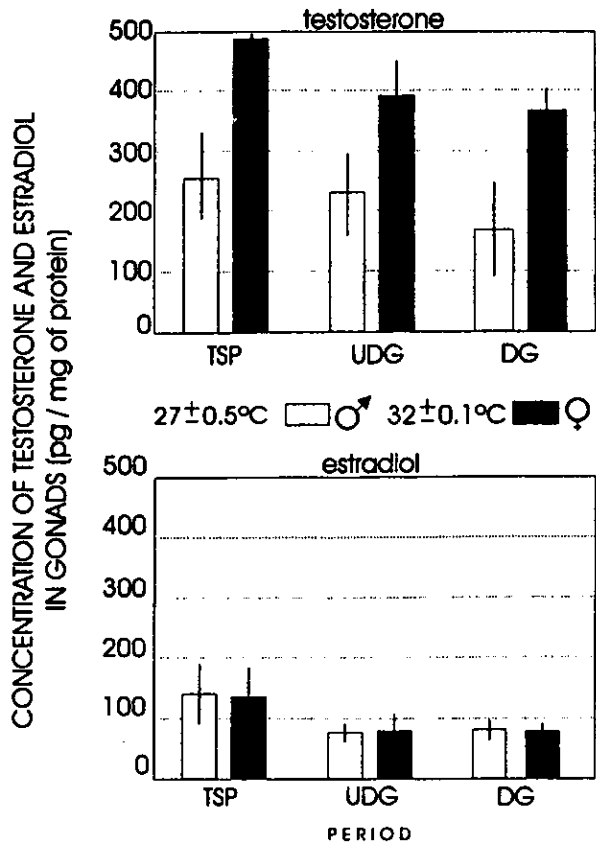


Fig. 1. Testosterone (T) and estradiol (E2) concentration in gonads of *Lepidochelys olivacea*. The differences in concentration of T between male-promoting ($27 \pm 0.5^\circ\text{C}$) and female-promoting ($32 \pm 0.1^\circ\text{C}$) temperatures during the thermosensitive period (TSP), undifferentiated gonad (UDG), and differentiated gonad (DG) are significant ($P < 0.0001$). No differences ($P = 90$) are found in concentration of E2 at either temperature during TSP, UDG, and DG.

three periods, the T content was significantly higher in gonads from embryos incubated at female-promoting temperature than in gonads from embryos incubated at male-promoting temperature. However, no significant differences were found in E2 contents between the gonads of embryos incubated at the different temperatures.

In the brain, the contents of both T and E2 were higher in embryos from the female-promoting temperature compared to embryos at male-promoting temperature during TSP, UDG, and DG (Fig. 2). Comparing the concentrations of T and E2 in the two regions of the brain, the diencephalon/mesencephalon (Di) had significantly higher concentrations of T and E2 than the telencephalon (Te) during the three critical periods of development analyzed.

Serum samples taken from embryos incubated at female- and male-promoting temperatures had similar concentrations of T and E2 during TSP (Fig. 3). Later, during the UDG and DG stages, T concentration was higher in serum from embryos incubated at female-promoting temperature. On the other hand, E2 concentration was similar in serum from embryos incubated at female-promoting temperature during TSP and UDG. In stages of morphologically differentiated gonads (DG), E2 concentrations were higher in the serum of embryos at the female-promoting temperature.

Steroid conversion in gonads and brains

Figures 4 and 5 show the results of steroid conversion in gonads (Go) and two brain regions (Te and Di) at three periods: TSP, UDG, and DG from

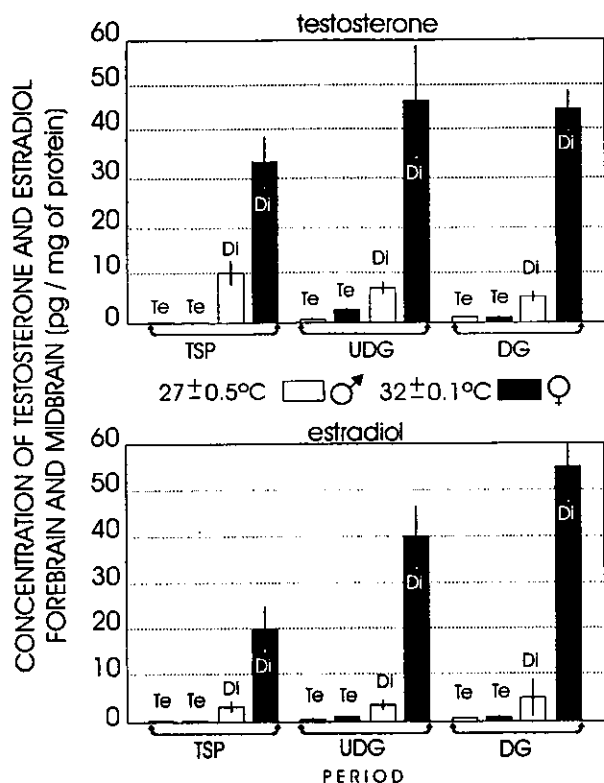


Fig. 2. Testosterone (T) and estradiol (E2) concentration in Telencephalon (Te) and Diencephalon/Mesencephalon (Di) of *Lepidochelys olivacea*. The differences in concentration of T and E2 in Di between male-promoting ($27 \pm 0.5^\circ\text{C}$) and female-promoting ($32 \pm 0.1^\circ\text{C}$) temperatures during the thermosensitive period (TSP), undifferentiated gonad (UDG), and differentiated gonad (DG) are significant ($P < 0.0001$). There are significant differences ($P < 0.001$) between Te and Di in concentration of T and E2 during the three periods at both temperatures.

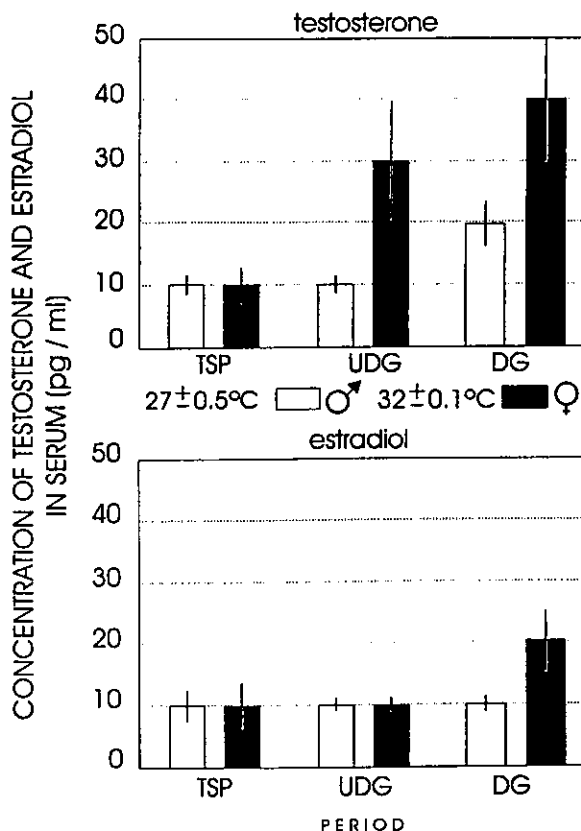


Fig. 3. Testosterone (T) and estradiol (E2) concentration in serum. The differences in concentration of T between male-promoting ($27 \pm 0.5^\circ\text{C}$) and female-promoting ($32 \pm 0.1^\circ\text{C}$) temperatures during undifferentiated gonad (UDG) and differentiated gonad (DG) are significant ($P < 0.0001$). No difference was detected ($P = 0.85$) in the thermosensitive period (TSP). The concentration of E2 is different ($P < 0.001$) only in the differentiated gonad (DG). No differences were registered ($P = 0.85$) at TSP and UDG at the two temperatures.

embryos of *L. olivacea* incubated at male- or female-promoting temperatures.

Biotransformation of P5 into T in Go was significantly higher at female-promoting than at male-promoting temperatures during UDG and DG. During TSP, differences were not significant (Fig. 4). In the two brain regions (Te and Di), the percentage of biotransformation of P5 into T was lower than in Go. Although Di showed a tendency to higher conversion than Te during the three periods, no significant differences between Te and Di were found (Fig. 4).

Conversion of T to E2 was higher in Go than in Te and Di, but no significant differences were found between the male-promoting and female-promoting temperatures during the three periods (Fig. 5). In the brain, percentage of T biotransfor-

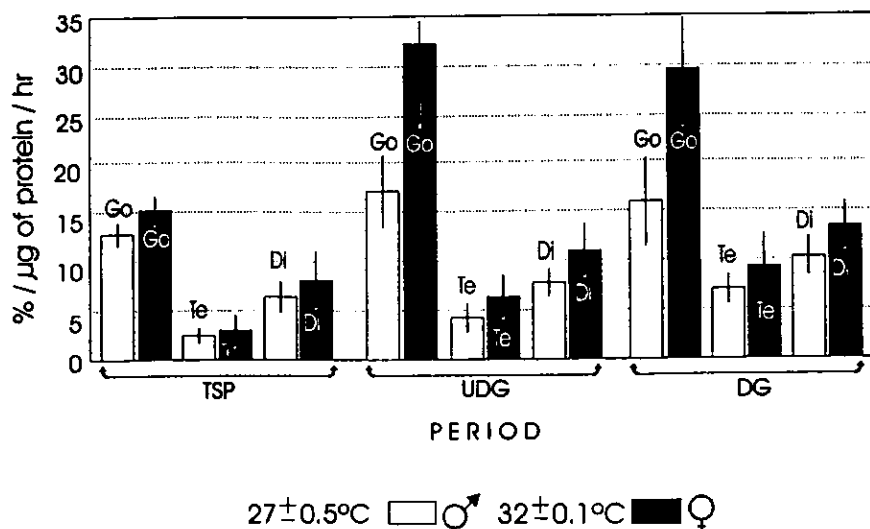


Fig. 4. Percentage of tritiated pregnenolone biotransformed into testosterone in *Lepidochelys olivacea*. Significant differences ($P < 0.001$) were present in gonads (Go) at male-

or female-promoting temperatures during undifferentiated (UDG) and differentiated gonad (DG) periods. Significant differences were detected ($P = 0.85$) between Te and Di at TSP.

mation was smaller in Te than in Di. The latter tissue showed a higher tendency for transforming T to E2 at the female-promoting temperature, particularly during TSP. Thus, these results are consistent with the steroid content determinations in which the E2 concentration found in Di incubated at the female-promoting temperature was

higher than that in Di incubated at the male-promoting temperature.

DISCUSSION

In the present study, three periods were used for analysis of steroid hormones in *L. olivacea*. The first was based on the thermosensitive pe-

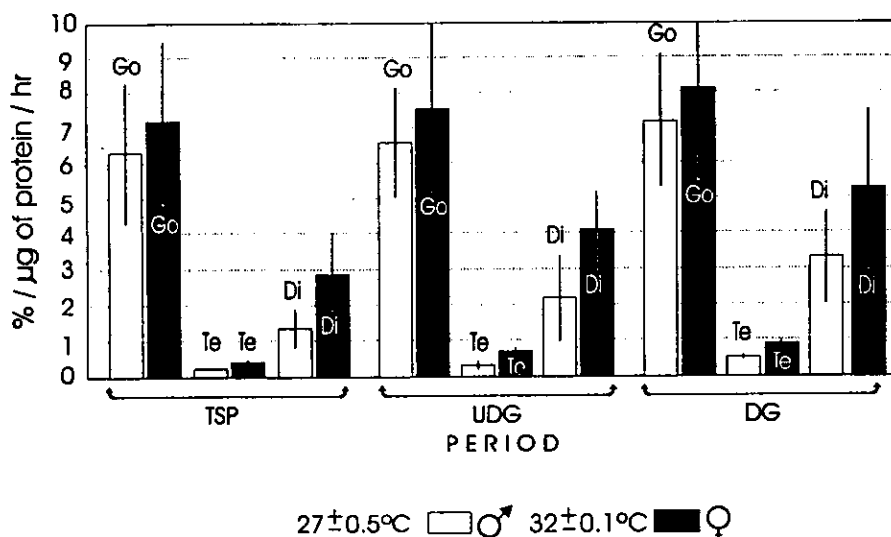


Fig. 5. Percentage of tritiated testosterone biotransformed into estradiol. Values show no significant differences in gonads (Go) ($P = 0.90$) at male-promoting ($27 \pm 0.5^\circ\text{C}$) or female-promoting ($32 \pm 0.1^\circ\text{C}$) temperatures during TSP, UDG,

and DG. Te and Di show significant differences ($P = 0.80$) during the three periods. No significant differences ($P = 0.90$) are present in Di between male- and female-promoting temperatures during the thermosensitive period (TSP).

riod (TSP) (Merchant-Larios et al., '97). The other two periods referred to the histological appearance of the gonad. In the "undifferentiated gonad" (UDG) ovaries or testes cannot be distinguished and in the "differentiated gonad" (DG), ovaries and testes can be distinguished. Steroid hormone analysis was performed in TSP, UDG, and DG.

Results on the contents and production of T and E2 were interpreted as follows. During TSP, the molecular mechanism that determines the fate of gonadal sex is established. The differences in steroidogenesis at female- or male-promoting temperatures reflect a temperature-sensitive process that may be a biochemical expression of sex determination. Differences detected at both temperatures during TSP were preserved and increased during UDG and DG. This suggests that the steroidogenic pattern established during TSP is stable and precedes the histological differentiation of the gonad.

The present study of *L. olivacea* revealed significant differences in T concentrations in gonads, depending on the incubation temperature. Gonads of the embryos incubated at the female-promoting temperature produced greater amounts of T than those incubated at the male-promoting temperature. The most important difference was found at 20 days of incubation in TSP. Embryos of this age incubated at male-promoting temperature were at stages 20–21, whereas those incubated at the female-promoting temperature had reached stages 23–24. It could be argued that the detected differences depended on the size of the gonads reached at the two temperatures. However, the difference in T production was also maintained when gonads of stage 23 incubated at the female-promoting temperature were compared with gonads of similar size and histological appearance at the same stage incubated at the male-promoting temperature (see Fig. 1; Merchant-Larios et al., '97).

On the other hand, the capacity of biotransformation from P5 to T in gonads tended to be higher in embryos incubated at the female-promoting temperature during UDG and DG. In TSP however, T biosynthesis showed no differences at the two temperatures. This result contrasts with the higher concentration of T detected in gonads at female-promoting temperature during the three periods. One possible explanation is that, during TSP, the gonads of embryos incubated at the female-promoting temperature had a greater capacity to retain T.

Important differences exist between species with

respect to steroid hormone metabolism and the production of estrogens. Greater activity of the P450 aromatase at the female-promoting temperature was reported during TSP in gonads of *E. orbicularis* (Dorizzi et al., '91; Desvages and Pieau, '92a,b), *Dermochelys coriacea* (Desvages et al., '93), and *Malaclemys terrapin* (Jeyasuria et al., '94). In contrast, in *Trachemys scripta*, the male-promoting temperature favours greater production of T and E2 (White and Thomas, '92a), and Lance and Bogart ('94) did not detect differences in E2 production in the urogenital ridges of *Alligator mississippiensis* incubated at female- or male-promoting temperatures during TSP. Furthermore, Smith et al. ('95) reported that higher activity of aromatase follows ovary development in the alligator. In the present study, gonads of *L. olivacea* did not reveal significant differences between the two incubation temperatures either in estradiol content or in its conversion from T. Although T content was higher at the female-promoting temperature, aromatase activity was similar at both temperatures.

No consistent gonadal development patterns exist among reptiles with TSD (reviewed by Smith and Joss, '94). Embryonic growth and development are significantly influenced by incubation temperature. Steroidogenesis in the gonad may be influenced by genetic factors and the rate of development. In *L. olivacea*, embryos develop more rapidly at the higher incubation temperature. Fast-developing gonads and Di produced more T than slow-developing gonads and Di at the male-promoting temperature. Interestingly, T concentration in serum was similar at both temperatures during TSP.

In the brain, on the other hand, our results in *L. olivacea* revealed significant differences in E2 contents, depending on the incubation temperature. Initially, we analyzed the steroid contents in whole brains (data not shown) and observed differences that led us to examine brain regions. Comparison of the Te and Di responses caused us to reject the possibility of a nonspecific response of neural tissues to temperature. In the Te, T and E2 contents did not show significant differences during TSP, but their concentrations increased slightly during the UDG and DG. On the other hand, in the Di, significant differences in T and E2 contents were observed in the three analyzed periods.

The gonad had T and E2 concentrations almost one order of magnitude higher than the brain. Thus, T and E2 in the brain could have been taken

up from the blood stream, thereby reflecting the steroids produced by the gonad. However, E2 concentrations detected in the serum of embryos incubated at female- or male-promoting temperatures did not show significant differences during TSP and UDG. In addition, the differences in E2 concentrations in the two brain regions make non-specific tissue retention from the serum unlikely. Moreover, the biotransformation results demonstrated that, although the brain tissue has lower steroidogenic capacity than the gonad, it does possess steroidogenic enzymes. The presence of these enzymes in the brain makes it unlikely that the detected steroids represent a retention of hormones produced in another organ.

During the three periods, the Di showed a tendency to convert higher percentages of T into E2 at the female-promoting than at the male-promoting temperature. This correlated positively with the higher contents of E2 detected by RIA in Di. Furthermore, a positive correlation was also found between the higher E2 contents in Di than in Te and the higher tendency of Di to convert T into E2 than Te. Collectively, however, the data did not show a significant difference in the capacity for biotransformation between the tissues incubated at the male- or the female-promoting temperature. An explanation may be that, in the current experiments, only 1 h was allowed for the biotransformation of a low concentration of radioactive precursors by isolated organs *in vitro*, which compares to the days taken *in vivo* for accumulation of steroid hormones detected by RIA. It was assumed that the use of higher concentrations of radioactive precursors and/or longer incubation times would seriously disturb the physiological conditions.

In *L. olivacea*, we found that, as in other TSD species (Crews et al., '89; Dorizzi et al., '91; Wibbels et al., '92), E2 overrode the effect of the male-promoting temperature and feminized the gonad (Merchant-Larios et al., '97). It is probable that exogenous E2 alters the endogenous concentrations of this hormone in both gonad and Di. The female-promoting temperature favours greater production of E2 in Di than does the male-promoting temperature, and E2 production is similar in gonads at both temperatures, suggesting that the feminizing effect of exogenous E2 may occur at the brain level. Because experiments with aromatase inhibitors, aromatizable or non-aromatizable steroids, and other compounds (Crews et al., '89; Lance and Bogart, '92; Rhen and Lang, '94; Pieau et al., '94a, b; Wibbels and Crews, '92, '94) were administered

to whole embryos, the results could also be interpreted by their effect on the brain.

The participation of the brain in sexual differentiation of the gonad can be indirect or direct. The indirect control would imply a mediation of the pituitary gland. Thus, factors released by the hypothalamus would stimulate gonadotropin secretion, which would in turn modulate gonadal differentiation and steroidogenesis. Unfortunately, to the best of our knowledge, no systematic studies are available on the ontogeny of the hypothalamus-pituitary-gonad (HPG) axis in reptiles. In the sea turtle *Caretta caretta*, Pearson et al. ('83) studied the ontogeny of the pituitary gland. Using immunohistochemistry, they found that cells containing ACTH, PRL, GH, LH, and TSH were present at the pouch stage of development of the pituitary gland. This stage occurred between days 20 and 30 in embryos incubated at 28–31°C. In *L. olivacea*, we have found that the TSP occurs between days 20 and 27 at both the male-promoting and the female-promoting temperature (Merchant-Larios et al., '97). Although species differences may exist, adenohypophyseal hormones can probably be produced in *L. olivacea* during TSP.

In *A. mississippiensis*, Deeming and Ferguson ('89) suggested that the neuroendocrine system could play an important role in sex determination by temperature. However, they did not provide experimental data to support their hypothesis. White and Thomas ('92b,c) found that in the turtle *T. scripta*, adrenal-kidney complexes (AKGs) respond sex-specifically to gonadotropins and other pituitary hormones. Although differences were evaluated in the steroidogenic capacity of AKGs *in vitro*, these results support the possibility that the brain could directly control the secretion of pituitary hormones *in vivo*, which would in turn regulate the steroidogenesis of AKGs.

Direct control of the brain over gonad differentiation implies the release of neurosecretory factors *in situ*. The presence of nerve terminals in the undifferentiated gonad of *L. olivacea* (Merchant-Larios et al., '89) allowed us to speculate on this possibility. Although in our previous report, the thermosensitive period had not been determined, recent observations confirm that nerve terminals can be found during this period (Merchant-Larios et al., unpubl. obs.). A paracrine effect of a neuroendocrine factor would be to act as morphogen in the undifferentiated gonad to induce differentiation into the ovaries or testicles. We hypothesized that in some neurons of the brain, a thermosensitive process may control the

expression of the aromatase gene. At a critical concentration of estrogen, a male-determining gene product is inhibited, and neural factors may directly or indirectly control the histological differentiation of the gonad. However, the origin of gonadal nerves, the kind of nerve terminals, and the nature of neurosecretions must be studied to support this hypothesis, and these questions are currently being explored in our laboratory. Our present results do not allow us to determine whether the diencephalon is the cause or the effect, but they conclusively demonstrate that this region of the brain senses temperature during sex determination *L. olivacea*.

ACKNOWLEDGMENTS

The Secretaría de Pesca and Instituto Mexicano de la Pesca, gave permission (180895-214-03) to collect eggs in La Escobilla, Oaxaca, a Mexican faunal preserve. We thank Mr. José G. Baltazar, Héctor Macias and Mr. Alejandro Marmolejo for technical assistance in the laboratory and Mr. Javier Vasconcelos, Director of the Centro Mexicano de la Tortuga, Mazunte, Oax. and Mr. Cuahutémoc Villanueva for assistance in field work. Dr. Teruko Taketo offered valuable advice for the preparation of the manuscript. Mrs. Isabel Pérez-Montfort helped with the English. This study was partially supported by the Mexican CONACYT (4037-N) and PAPIID-UNAM.

LITERATURE CITED

- Bermúdez, J.A., V. Coronado, A. Mijares, C. León, A. Velázquez, and J.L. Mateos (1975) Stereochemical approach to increase the specificity of steroid antibodies. *J. Steroid Biochem.*, 6:283-290.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Bull, J.J. (1980) Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.*, 55:3-21.
- Coriat, A.M., E. Valleley, M.W.J. Ferguson, and P.T. Sharpe (1994) Chromosomal and temperature dependent sex determination, the search for the conserved mechanism. *J. Exp. Zool.*, 270:112-116.
- Crews, D., T. Wibbels, and W.H.N. Gutzke (1989) Action of sex steroids hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76:159-166.
- Deeming, C., and M. Ferguson (1989) The mechanism of temperature dependent sex determination in crocodilians: an hypothesis. *Am. Zool.*, 29:973-985.
- Desvages, G., M. Girondot, and C. Pieau (1993) Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92:54-61.
- Desvages, G., and C. Pieau (1992a) Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41:851-853.
- Desvages, G., and C. Pieau (1992b) Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. *Differentiation*, 47:9-17.
- Dorizzi, M., Th. M. Mignot, A. Guichard, G. Desvages, and C. Pieau (1991) Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation*, 47:9-18.
- Ferguson, M.W.J., and T. Joanen (1983) Temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *J. Zool. (Lond.)*, 200:143-177.
- Janzen, F.J., and G.L. Paukstis (1991) Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. *Q. Rev. Biol.*, 66:149-179.
- Jeyasuria, P., W.M. Roosenburg, and A.R. Place (1994) Role of P-450 aromatase in sex determination of the diamond-back terrapin, *Malaclemys terrapin*. *J. Exp. Zool.*, 270:95-111.
- Jost, A. (1947) Sur les effets de castration precoce de l'embryon male du lapin. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 141:126-129.
- Kime, D.E. (1995) Steroid nomenclature. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 98:119-120.
- Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 351:117-121.
- Lance, V.A., and M.H. Bogart (1992) Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 86:59-71.
- Lance, V.A., and M.H. Bogart (1994) Studies on sex determination in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.*, 270:79-85.
- Mendieta, E., A. Salame, J. Herrera, and F. Antón-Tay (1991) Melatonin inhibition of androgen biosynthetic pathway in Leydig cell-enriched cell fractions from normal adult rat. *Mol. Androl.*, 3:319-329.
- Merchant-Larios, H., and I. Villalpando (1990) Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *J. Exp. Zool.*, 254:327-331.
- Merchant-Larios, H., I. Villalpando-Fierro, and B. Centeno-Urruiza (1989) Gonadal morphogenesis under controlled temperature in sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetol. Monogr.*, 3:43-61.
- Merchant-Larios, H., S. Ruiz-Rámirez, N. Moreno-Mendoza, and A. Marmolejo-Valencia (1997) Correlation among thermosensitive period, estradiol response and gonadal differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107:373-385.
- New, D.A.T. (1966) *The Culture of Vertebrate Embryos*. Logos Press, Academic Press, New York, pp. 99-116.
- Pearson, K.A., Z.G. Wurst, and E.J. Cadle (1983) Ontogeny and immunocytochemical differentiation of the pituitary gland in a sea turtle, *Caretta caretta*. *Anat. Embryol.*, 167:13-37.
- Pieau, C., M. Girondot, N. Richard-Mercier, G. Desvages, M. Dorizzi, and P. Zaborski (1994a) Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: Hormonal involvement. *J. Exp. Zool.*, 270:86-94.
- Pieau, C., M. Girondot, M. Dorizzi, N. Richard-Mercier, and P. Zaborski (1994b) Environmental control of gonadal differentiation. In: *The Differences Between the Sexes*. R.V.

- Short and E. Balabou, eds. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 433-448.
- Raynaud, A., and C. Pieau (1985) Embryonic development of the genital system. In: *Biology of the Reptilia*. S. Gans and F. Billeu, eds. John Wiley and Sons, New York, pp. 149-299.
- Rhen, T., and J.W. Lang (1994) Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: Manipulation of the embryonic sex steroid environment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *96*:243-254.
- Salame-Méndez, A. (1992) La temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroides sexuales y su relación en el establecimiento gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). M. S. Thesis. Sciences Faculty, UNAM.
- SAS Institute (1985) SAS guide for personal computer. 6a edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Smith, C.A., and J.M.P. Joss (1994) Sertoli cell differentiation and gonadogenesis in *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.*, *270*:57-70.
- Smith, C.A., P.K. Elf, J.W. Lang, and J.M.P. Joss (1995) Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation*, *58*:281-290.
- Spotila, J.R., L.D. Spotila, and N.F. Kaufer (1994) Molecular mechanisms of TSD in Reptiles: A search for the magic bullet. *J. Exp. Zool.*, *270*:117-127.
- Tiersch, T.R., M.J. Mitchel, and S.S. Wachtel (1991) Studies on the phylogenetic conservation of the *SRY* gene. *Hum. Genet.*, *87*:571-573.
- White, R.B., and P. Thomas (1992a) Whole-body and plasma concentrations of steroid in turtle, *Trachemys scripta*, before, during, and after temperature-sensitive period for sex determination. *J. Exp. Zool.*, *264*:159-166.
- White, R.B., and P. Thomas (1992b) Adrenal-kidney and gonadal steroidogenesis during sexual differentiation of a reptile with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *88*:10-19.
- White, R.B., and P. Thomas (1992c) Stimulation of in vitro steroidogenesis by pituitary hormones in a turtle (*Trachemys scripta*) within the temperature-sensitive period for sex determination. *Biol. Reprod.*, *47*:952-959.
- Wibbels, T., J.J. Bull, and D. Crews (1992) Steroid hormone induced male sex determination in an amniotic vertebrate. *J. Exp. Zool.*, *262*:454-457.
- Wibbels, T., and D. Crews (1992) Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *J. Endocrinol.*, *133*:121-129.
- Wibbels, T., and D. Crews (1994) Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.*, *141*:295-299.