

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**  

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**El efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre el crecimiento  
de la gónada de embriones de la tortuga marina  
*Lepidochelys olivacea***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ ANTÚNEZ REYES**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ**

**MÉXICO, 2014**



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.

# HOJA DE DATOS DEL JURADO

## 1. Datos del alumno

Antúnez  
Reyes  
José  
5290 6903  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
300190931

## 2. Datos del tutor

Dra.  
Verónica  
Díaz  
Hernández

## 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Horacio  
Merchant  
Larios

## 4. Datos del sinodal 2

M. en C.  
José Alejandro  
Marmolejo  
Valencia

## 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Blanca Estela  
Hernández  
Baños

## 6. Datos del sinodal 4

Biól.  
Mónica  
Salmerón  
Estrada

## 7. Datos del trabajo escrito

El efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre el crecimiento de la gónada de embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*  
46pp  
2014

*- Les gens ont des étoiles qui ne sont pas les mêmes.  
Pour les uns, qui voyagent, les étoiles sont des guides.  
Pour d'autres elles ne sont rien que de petites lumières...*

*Le Petite Prince,  
Antoine de Saint-Exupéry.*

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Verónica Díaz Hernández, en el Laboratorio de Desarrollo Gonadal y Disruptores Endócrinos del edificio "A" del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina. Así como en el Laboratorio del Dr. Horacio Merchant Larios del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**.

## **APOYOS FINANCIEROS Y PERMISOS DE COLECTA**

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento de los siguientes proyectos:

PAPIIT-UNAM IA202513 a cargo de la Dra. Verónica Díaz Hernández

PAPIIT-UNAM IN205213 a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios

La realización de este protocolo cuenta con el permiso de colecta de huevos de *Lepidochelys olivacea* otorgado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT con oficio número SGPA/DGVS/01945/13 y oficio número SGPA/DGVS/02133/14.

## AGRADECIMIENTOS

**A**gradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser pieza fundamental en mi formación académica, pues ha fomentado los valores que rigen mi vida profesional y que hacen de mí un ciudadano comprometido con su país. De igual forma, agradezco de manera muy especial a mi tutora, la Dra. Verónica Díaz Hernández, sus enseñanzas y disposición; a los integrantes del Comité Tutoral por el beneficio de sus críticas y comentarios, entre los que se encuentran: el Dr. Horacio Merchant Larios, el M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, la Dra. Blanca Estela Hernández Baños y la Biól. Mónica Salmerón Estrada. Así como también, las oportunas correcciones y sugerencias de la profesora Azucena G. Antúnez Reyes y de la profesora Marina Ruiz Boites.

A mis padres, hermanos y amigos por su apoyo incondicional, a quienes les dedico este trabajo.

A mis profesores y compañeros de la Facultad de Ciencias, que sin su ayuda esto no hubiera sido posible.

A aquellas personas que participaron, directa o indirectamente, ya sea leyendo, opinando, teniéndome paciencia o dándome ánimo.

A todas las personas que he conocido y que han dejado huella en mi pensamiento.

## AGRADECIMIENTOS POR APOYO TÉCNICO

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios, Investigador Emérito del Instituto de Investigaciones Biomédicas por mantenerse pendiente del desarrollo de trabajo de tesis y brindarme todas las facilidades académicas y administrativas para continuar con mi desarrollo académico.

Doy reconocimiento especial al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, por ser pieza fundamental en este trabajo, por haber coordinado la obtención del material biológico, el procesamiento de muestras para epon y congelación. Así como en la obtención de criosecciones y cortes semifinos.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, encargado de la Unidad de Microscopía del IIBm, UNAM por su ayuda en el análisis estadístico de las muestras, así como el apoyo brindado en la captura de imágenes en el microscopio Zeiss.

A la Dra. Luz María García Hernández, del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina por su apoyo técnico y su ayuda en la revisión de este manuscrito y la presentación de tesis de licenciatura.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo coordinado del Centro Mexicano de la Tortuga, bajo la Dirección del Ing. Manuel Rodríguez Gómez, en Mazunte, Oaxaca.

A la M. en C. Martha Harfush Meléndez, Investigadora del Centro Mexicano de la Tortuga, por coordinar y participar en la colecta, transporte y envío de huevos de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* desde la playa La Escobilla al laboratorio del IIBm, UNAM.

Biól. Cuauhtémoc Peñaflores Salazar, Jefe de Campamentos del CMT, por las facilidades otorgadas para la colecta en playa del material biológico.

Biól. Erika Peralta Buendía, por la colecta de huevo de tortuga golfina.

Biól. Teresa Luna Medina, por la colecta de huevo de tortuga golfina.

Técnico Alberto Jarquín Cruz, por el transporte de huevo de tortuga.

Técnico Anselmo Cervantes Rodríguez, por el transporte de huevo de tortuga.

A la M. en C. Yolanda Hornelas Orozco, responsable del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por su ayuda en el procesamiento de las muestras para microscopía de barrido y en la fotodocumentación de las mismas.



# ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
La tortuga golfina.....	2
Tipos de determinación sexual en vertebrados.....	4
Determinación y diferenciación sexual gonadal en reptiles.....	7
Síntesis de hormonas esteroideas .....	9
Ciclo celular y marcadores de proliferación celular .....	10
ANTECEDENTES .....	12
JUSTIFICACIÓN .....	17
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
RESULTADOS .....	25
El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol induce el desarrollo hipoplásico de las gónadas de los embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) .....	25
Descripción histológica de las gónadas de <i>Lepidochelys olivacea</i> tratadas con 17 $\beta$ -estradiol .....	28
La expresión de Sox9 disminuye en las gónadas de embriones tratados con 17 $\beta$ -estradiol ..	30
El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol induce un decremento de la proliferación celular de las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C).....	33
Conteo de células positivas a los marcadores de proliferación celular .....	35
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	38
LITERATURA CITADA.....	41
GLOSARIO.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.-** Características morfológicas de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* adulta. (Página: 2)

**Figura 2.-** Mapa de los principales sitios de desove de *Lepidochelys olivacea* en México. (Página: 3)

**Figura 3.-** Conductos genitales en etapa indiferenciada en el embrión masculino y en el femenino. Los conductos mesonéfricos y paramesonéfricos o de Müller se observan en ambos sexos. (Página: 7)

**Figura 4.-** Gráfica donde se observa la correlación entre la temperatura de incubación, los días de desarrollo y la determinación sexual gonadal en embriones de *Lepidochelys olivacea*. (Página: 14)

**Figura 5.-** Macrografías de los complejos urogenitales de embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 26°C (TM) y obtenidos en la etapa 26 de desarrollo. (Página: 26)

**Figura 6.-** Fotomicrografía de microscopía electrónica de barrido de los complejos urogenitales de los embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 26°C controles y tratados con 17β-estradiol y obtenidos en etapa 26. (Página: 27)

**Figura 7.-** Fotomicrografía de cortes semifinos de gónadas morfológicamente diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 26. (Página: 29)

**Figura 8.-** Inmunofluorescencia de Sox9 y citoqueratina en gónadas diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea*, etapa 26. (Página: 31)

**Figura 9.-** Inmunofluorescencia de Sox9 en gónadas de embriones controles y tratados con estradiol, incubados a temperatura masculinizante y obtenidos en etapa 26. (Página: 32)

**Figura 10.-** Fotomicrografías de un corte semifino y de la inmunofluorescencia de Sox9 y citoqueratina de la gónada de un embrión tratado con estradiol. (Página: 33)

**Figura 11.-** Inmunolocalización de células en proliferación (positivas a BrdU y Phospho H3 ser10) de las gónadas de los embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 26°C (TM) 7 días después del tratamiento. (Página: 34)

**Figura 12.-** Gráfica del promedio de las células positivas a BrdU y Phospho H3 ser10 en la región del epitelio superficial de las gónadas de los embriones tratados con estradiol comparados con sus controles tratados con el vehículo. (Página: 36)

**Figura 13.-** Gráfica del promedio de células positivas a BrdU y Phospho H3 ser10 en la región medular de las gónadas de los embriones tratados con estradiol comparados con sus controles tratados con el vehículo. (Página: 37)

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN.-** Ácido Desoxirribonucleico

**Acetil-CoA.-** Acetil coenzima A

**AMH.-** Por sus siglas en inglés: *anti-Müllerian hormone*

**BrdU.-** 5-Bromo-2'-deoxyuridina

**BSA.-** Por sus siglas en inglés: *Bovine serum albumin*

**C.-** Región Cortical

**°C.-** Grados centígrados

**CGP.-** Células germinales primordiales

**CITES.-** Por sus siglas en inglés: *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

**CONANP.-** Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas

**DHEA.-** Dehidroepiandrosterona

**DSG.-** Determinación sexual genética

**DSA.-** Determinación sexual ambiental

**ES.-** Epitelio superficial

**E2.-** 17 $\beta$ -estradiol

**FDT.-** Factor determinante testicular

**Fase S.-** Fase de Síntesis de ADN en el ciclo celular

**Fase G2/M.-** Transición entre la fase G2 (*Gap 2*) y la fase M (*Mitosis*)

**G.-** Gónada

**HCl.-** Ácido Clorhídrico

**IR.-** Glándulas interrenales

**IUCN.-** Por sus siglas en inglés: *International Union for Conservation of Nature*

**LDL.-** Por sus siglas en inglés: *Low density lipoproteins*

**M.-** Región medular

**MS.-** Mesonefros

**OCT.-** Por sus siglas en inglés: *Optimal Cutting Temperature*

**PBS.-** Buffer de fosfatos

**PD.-** Período determinado

**PFA.-** Paraformaldehído

**Phospho H3 ser 10.-** Por sus siglas en inglés: *Histone H3 (H3) phosphorylated at serine (10)*

**PI.-** Período indeterminado

**PTS.-** Período termosensible

**Rspo1.-** Por sus siglas en inglés: *R-spondin 1*

**SEMARNAT.-** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

**Sry.-** Por sus siglas en inglés: *Sex-Determining Region of the Y chromosome*

**SF1.-** Por sus siglas en inglés: *Splicing Factor 1*

**Sox9.-** Por sus siglas en inglés: *Sry-like HMG box 9*

**TF.-** Temperatura feminizante

**TM.-** Temperatura masculinizante

**TLN.-** Durante toda la noche

**VU.-** Vulnerable

**WNT4.-** Por sus siglas en inglés: *Wingless-type MMTV integration site family, member 4*

---

## RESUMEN

En algunos reptiles con determinación sexual por temperatura, la administración de estradiol en embriones mantenidos a temperatura masculinizante, revierte el efecto de ésta, dando como consecuencia el desarrollo de hembras. La tortuga marina, *Lepidochelys olivacea* es un buen modelo para estudiar los mecanismos que subyacen en torno a la reversión sexual a nivel del desarrollo gonadal embrionario. Ya que esta especie es susceptible al estradiol exógeno, revirtiendo el desarrollo de la gónada de testículo a ovario. Una de las características del ovario producto de la reversión sexual con estradiol exógeno es su reducido tamaño. Por ello el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del estradiol sobre el crecimiento de la gónada bipotencial.

Determinamos que el tratamiento con estradiol exógeno actúa tanto en territorio medular como en territorio cortical de la gónada indiferenciada. Encontramos que el  $17\beta$ -estradiol inhibe la proliferación de células que forman la gónada bipotencial en embriones incubados a temperatura masculinizante. La disminución del tamaño de la gónada es consecuencia de la disminución del número de células capaces de proliferar. Asimismo, los resultados aquí expuestos indican que a pesar de que la gónada se encuentra reducida de tamaño existe un pequeño dominio de expresión de Sox9 (gen involucrado en la diferenciación testicular) en la región medular, que es insuficiente para mantener la inhibición del engrosamiento de la región cortical en etapas posteriores, por lo que las gónadas de embriones tratados con estradiol, se desarrollan como pequeños ovotestis.

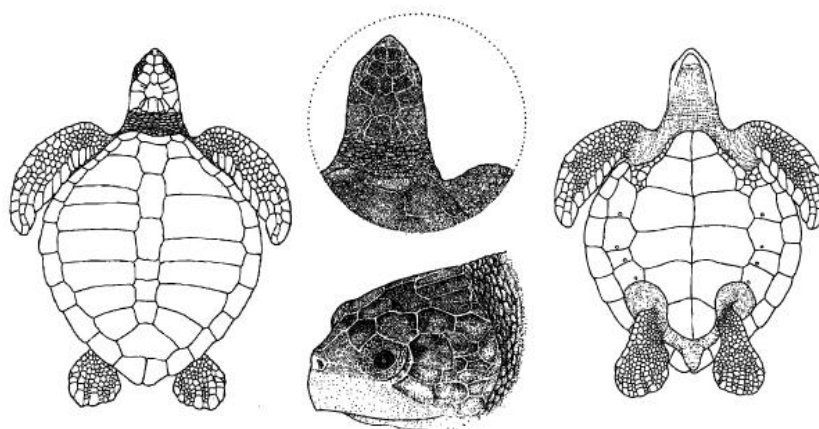


## INTRODUCCIÓN

### *La tortuga golfina*

*Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) es una especie marina que pertenece al Orden Testudines. Taxón caracterizado por presentar una estructura de huesos dérmicos denominada caparazón al cual están fusionadas las vértebras (excepto las del cuello y la cola), las costillas y las cinturas pélvica y pectoral. Es un organismo ectotérmico, con respiración de tipo pulmonar y perteneciente al grupo de los vertebrados amniotas con fecundación interna.

La morfología externa de este quelonio está caracterizada por un caparazón con cinco a nueve pares de escudos costales, frecuentemente en configuración asimétrica, (Figura 1). El plastrón presenta cuatro escudos inframarginales con un poro pequeño en cada uno. Mientras que la cabeza es relativamente grande, ligeramente triangular y con dos pares de escamas prefrontales (Eckert *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Características morfológicas de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* adulta (Eckert *et al.*, 1999).

La tortuga golfina se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del Océano Pacífico, Océano Índico y sur del Océano Atlántico. Abarca un circuito migratorio que incluye ambientes tanto costeros como pelágicos. En México se distribuye a lo largo de



la costa del Pacífico (Márquez y Van Dissel, 1982), y actualmente las playas con los mayores registros en abundancia de hembras en temporada de anidación (Figura 2) pertenecen a los estados de Michoacán y Oaxaca.

La temporada de anidación abarca de junio a enero, no obstante puede suceder durante todo el año. El número de huevos por puesta es de 109 en promedio y su incubación transcurre en un período de 45 a 60 días.



**Figura 2.** Mapa de los principales sitios de desove de *Lepidochelys olivacea* en México: 1. Playa Escobilla, Oaxaca, 2. Playa Morro Ayuta, Oaxaca y 3. Playa Ixtapilla, Michoacán (CONANP, 2011).

*L. olivacea* es una especie clave para el mantenimiento de los ecosistemas marinos. Lleva a cabo diversos papeles en las redes tróficas (presa, consumidor, hospedero y competidor) transportando nutrientes y energía de los ecosistemas marinos hacia los ecosistemas terrestres (Bouchard y Bjorndal, 2000). A pesar de que es la tortuga marina más abundante en el mundo, se encuentra amenazada debido principalmente a la degradación de sus playas de anidación.

Por lo anterior, la categoría de riesgo: NOM-059-SEMARNAT-2010 clasifica a *L. olivacea* en peligro de extinción (P) SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2010. La IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) la califica como una especie vulnerable (VU) A2bd (IUCN, 2009). Y CITES



---

(Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres) la cataloga en el Apéndice I (Peligro de Extinción CITES, 2010).

### ***Tipos de determinación sexual en vertebrados***

En los vertebrados, al menos dos aspectos deben ser considerados para delinear el complejo proceso del desarrollo sexual: la determinación del sexo y la diferenciación sexual. La determinación sexual se refiere a factores genéticos o a los factores ambientales responsables del surgimiento de machos o hembras, los eventos moleculares que especifican el destino sexual y preceden la diferenciación morfológica y funcional de las gónadas (Shoemaker *et al.*, 2007; Díaz Hernández *et al.*, 2008). Una vez que la determinación del sexo se ha establecido a nivel molecular en la gónada morfológicamente indiferenciada, una compleja red de expresiones de genes conduce a la diferenciación de cualquiera, ovarios o testículos (Merchant-Larios *et al.*, 2010).

Estos organismos han desarrollado diversas estrategias de determinación sexual, que de manera general pueden agruparse en dos: la determinación sexual genética (DSG), en la cual los factores genéticos determinan el destino sexual de la gónada inicialmente bipotencial, y la determinación sexual ambiental (DSA). En esta última el sexo gonadal se ve influido por diversas variables del entorno por lo que el sexo de la progenie puede modularse después de la fertilización. Entre los factores ambientales que pueden influir se encuentran: el fotoperiodo, la nutrición, la humedad, la composición iónica del medio ambiente, el pH, pero el más importante y más estudiado habitualmente es la temperatura. Dentro de esta forma de determinación sexual se encuentra la mayoría de los linajes de reptiles: esfenodontes (tuátaras), cocodrilos así como algunas especies de tortugas y lagartijas (Bull, 1980; Pieau, 1996). En ellos el sexo es determinado por las condiciones térmicas experimentadas en el período termosensible (PTS) durante el desarrollo gonadal embrionario.





---

Respecto a la diferenciación sexual cabe señalar que se puede integrar en tres etapas que se dan en tiempos y espacios específicos: I) determinación, II) diferenciación y III) manifestación. En la primera se lleva a cabo el establecimiento del sexo genético en el momento de la fertilización. En la segunda se expresa el genoma que dirige la morfogénesis y diferenciación del primordio gonadal (precursor del testículo u ovario) y el desarrollo de los genitales internos y externos. Postnatalmente ocurrirá la diferenciación sexual del sistema nervioso central así como la adquisición de los caracteres sexuales secundarios. Por último, en la tercera etapa, se determina la expresión fisiológica y etológica del individuo que culmina con la actividad reproductora.

En los mamíferos placentados, el establecimiento del sexo cromosómico ocurre en el momento de la fertilización, inicia en el momento en que un espermatozoide con una carga cromosómica sexual X o Y fertiliza a un ovocito que siempre aporta un cromosoma sexual X. De esta manera se establece el dimorfismo sexual de los mamíferos que corresponde a un complemento cromosómico XX en la hembra y XY en el macho. Durante la vida fetal se establece el sexo gonadal a partir de la cresta gonadal indiferenciada, que en las hembras se diferenciará como ovario y en los machos como testículo (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008).

La gónada indiferenciada comienza a desarrollarse siguiendo una de las dos rutas en función de la presencia o ausencia del cromosoma Y en el embrión, en este cromosoma está localizado el gen SRY, gen maestro de la determinación sexual, cuya expresión inicia la ruta testicular. Activando la expresión de numerosos genes de la ruta masculina como son SF1, SOX9, AMH, entre otros, e inhibiendo otros de la femenina como WNT4 y RSPO1 (Berta *et al.*, 1990).

El desarrollo de la gónada comienza con la expresión del factor determinante testicular (FDT) codificado por el gen SRY (Sex-Determining Region of the Y chromosome). La evidencia que apoya a SRY como el FDT es su expresión en la cresta gonadal, la cual coincide con el inicio de la determinación testicular.



---

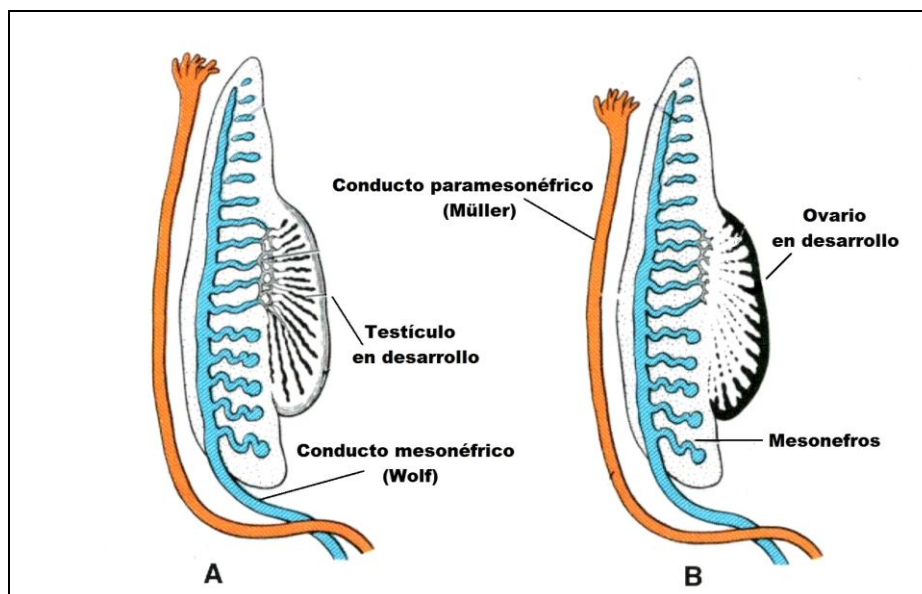
El gen SRY se considera como el gen conmutador del sexo, ya que dirige el camino del desarrollo testicular. El SRY a su vez actúa a través de una red de expresión génica, necesaria para el desarrollo testicular y el subsecuente desarrollo del tracto y genitales masculinos.

La acción de la testosterona fetal junto con la hormona antimülleriana (AMH) son las responsables de la permanencia y diferenciación del conducto de Wolff y la regresión de los conductos Müllerianos respectivamente (Figura 3).

En los fetos masculinos, la acción de la hormona antimülleriana producida por las células de Sertoli determina la involución del conducto de Müller, mientras que la acción de la testosterona sintetizada por las células de Leydig determina que el mesonefros continúe desarrollándose hasta convertirse en el epidídimo, y el conducto de Wolff se diferencie hacia el conducto deferente.

El sistema de conductos femeninos está representado por los conductos paramesonéfricos, a partir de los cuales se formarán las trompas de Falopio, el útero y el extremo cefálico de la vagina. La diferenciación del sistema de conductos femeninos depende de la ausencia del cromosoma Y, ya que sin su influencia no se producirá testosterona ni hormona antimülleriana. Lo que permite que los conductos mesonéfricos degeneren y se desarrollen los conductos paramesonéfricos. En ausencia de la AMH testicular fetal se produce el correspondiente desarrollo y fusión de los conductos de Müller.





**Figura 3.** Conductos genitales en etapa indiferenciada en el embrión masculino (A) y en el femenino (B). Los conductos mesonéfricos y paramesonéfricos o de Müller se observan en ambos sexos. (Modificado de Langman Embriología Médica 12ª ed).

Otro gen involucrado en la regulación sexual genética es el gen SOX9 (Sry-like HMG box 9), que pertenece a la familia del gen SRY, el cual regula la transcripción de la hormona antimülleriana. SOX9 también desempeña un papel fundamental en el desarrollo sexual masculino, el cual puede inducir la expresión de la hormona antimülleriana en las células de Sertoli para inhibir la diferenciación del sistema reproductor femenino (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008).

### ***Determinación y diferenciación sexual gonadal en reptiles***

El estudio sobre el papel de la temperatura como factor determinante del sexo se derivó a raíz de lo reportado por Charnier en 1976 (Citado en Nakamura, 2010), quien dio a conocer que la temperatura de incubación de los huevos de la lagartija *Agama agama* influía en la proporción de los sexos.



---

Posteriormente, una serie de experimentos conducidos por Pieau, 1976 (Citado en Nakamura, 2010) reveló que la temperatura es un factor crítico para la determinación sexual en algunos reptiles. La determinación gonadal resultó sensible a la temperatura en dos especies de tortugas: *Emys orbicularis* (tortuga de agua dulce) y *Testudo graeca* (tortuga del Mediterráneo). Los embriones de *E. orbicularis* fueron feminizados cuando los huevos fueron incubados a 30°C (Temperatura feminizante), mientras que los embriones de *Testudo graeca* fueron masculinizados a temperatura de 25°C (Temperatura masculinizante).

Una década más tarde Ferbuson y Joanen, 1982 (Citado en Nakamura, 2010) reportaron el primer cocodrilo con determinación sexual por temperatura (*Alligator mississippiensis*). Asimismo, en otras investigaciones, dicho fenómeno también fue observado en otras tortugas tanto de agua dulce como marinas, tal es el caso de *Lepidochelys olivacea*.

En *L. olivacea* la determinación sexual depende de la temperatura, es decir, los embriones que se incuban a 26 °C (temperatura masculinizante) se determinan como machos y los embriones que se incuban a 33 °C (temperatura feminizante) se determinan como hembras.

El efecto de la temperatura en la determinación del sexo se limita al tercio medio del desarrollo embrionario. Esto es, la temperatura afecta la determinación del sexo sólo en un período específico en la embriogénesis. Después de esta "ventana", la temperatura no tiene efecto sobre sexo gonadal (William *et al.*, 1988).

La temperatura de incubación puede regular la capacidad de la gónada indiferenciada para producir estrógenos derivados de la aromatización de la testosterona (Crews *et al.*, 1996). En embriones incubados a temperatura feminizante se provocaría la conversión local de testosterona hacia estrógenos, como resultado de la actividad de la enzima aromatasa P-450. De modo que los aumentos en la producción de estrógenos en la gónada pudieran ser el evento que active los programas de diferenciación ovárica (Wibbles *et al.*, 1993). Mientras que las temperaturas masculinizantes inhiben el gen de



---

aromatasa, por lo tanto habría una reducción de los estrógenos en la gónada, conduciendo así a la diferenciación testicular.

Asimismo, en estudios realizados mediante técnicas de inmunohistoquímica, se ha observado la expresión gonadal de la proteína SOX9, producto de un gen involucrado en la diferenciación testicular. La expresión de SOX9 se mantiene en gónadas incubadas a temperatura masculinizante, mientras que su expresión decrece o se apaga en aquellas incubadas a temperatura feminizante (Torres Maldonado *et al.*, 2001).

La correlación entre el período termosensible, la morfogénesis gonadal y la expresión de genes sugiere que la determinación sexual por temperatura es modulada en las células epiteliales tanto del epitelio superficial como de los cordones medulares. Siendo la clave para una hipótesis unificadora en la determinación del sexo dependiente de la temperatura.

### ***Síntesis de hormonas esteroideas***

Las hormonas son sustancias que inducen respuestas específicas en células blanco. Sus secreciones tienen respuestas lentas y prolongadas ya que se liberan directamente al torrente sanguíneo (comunicación endócrina). Los factores que inducen las características masculinas y femeninas son conocidos como andrógenos y estrógenos, respectivamente. Las hormonas esteroideas se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Los testículos son los encargados de secretar, principalmente, testosterona (andrógenos), la corteza adrenal produce la aldosterona, cortisol y la DHEA (dehidroepiandrosterona). Mientras que los ovarios producen los estrógenos que engloban el  $17\beta$ estradiol, 4-androsteno-3, 17-diona y la progesterona, y por último está la placenta que también secreta estradiol, progesterona y estriol.



Estas hormonas, junto con las producidas por la glándula adrenal y la placenta, se clasifican como las hormonas esteroides debido a su esqueleto molecular común derivado del colesterol. Se necesita solamente una cantidad mínima de secreción hormonal para provocar grandes cambios en las células e inclusive en todo el cuerpo.

Las hormonas esteroides están relacionadas estructuralmente y provienen bioquímicamente del colesterol, fundamentalmente de las lipoproteínas circulantes (LDL-colesterol), aunque su procedencia se realiza en el interior celular a partir de acetil-CoA. Además, juegan un papel a nivel fisiológico ya que están relacionadas con el embarazo, espermatogénesis, lactancia y parto, equilibrio mineral y metabolismo energético (aminoácidos, glúcidos y grasas).

La función principal de las hormonas sexuales esteroides son: el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y regulación del sistema reproductor. Son responsables, por tanto, del dimorfismo sexual, tanto en la estructura corporal como en los órganos. Su acción tiene como finalidad ejercer efectos organizadores y de activación de los órganos sexuales internos, los genitales y los caracteres sexuales secundarios (Devlin *et al.*, 2004).

### ***Ciclo celular y marcadores de proliferación celular***

El ciclo celular es una serie ordenada de pasos durante los cuales la célula aumenta de tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide. El ciclo se divide en dos grandes fases: interfase y mitosis (M).

La interfase consta de la fase G1 (gap, o growth) donde la célula está muy activa metabólicamente, replica su organelos y en consecuencia aumenta su tamaño, una fase de síntesis (S), etapa en que la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa de su genoma a las células hijas. Y la fase G2 durante la cual, la



---

célula ensambla las estructuras necesarias para la mitosis. La mitosis es por su parte una fase propiamente nuclear en la cual el material genético duplicado se reparte a las células hijas a través de la segregación de los cromosomas.

Los procesos que ocurren dentro del ciclo celular guardan un orden y control estrictos. La clave para el avance del ciclo celular, son los cambios estructurales del ADN necesarios para la replicación, transcripción, reparación y la segregación.

Asimismo, la detección de proteínas y otras moléculas orgánicas presentes durante el ciclo celular es un método comúnmente utilizado en biología molecular y consiste en unir un anticuerpo con su epítipo específico. Después de identificar determinado antígeno con un anticuerpo primario, es agregado un anticuerpo secundario el cual se encarga de reconocer al anticuerpo primario y de amplificar su señal.

Algunos de los marcadores (antígenos) comúnmente utilizados para la identificación de la fase de síntesis y la transición de la fase G2/M del ciclo celular son los siguientes:

La 5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se incorpora fácilmente al ADN de las células en fase S (Gratzner, 1982). Por lo que es comúnmente utilizado como un marcador de proliferación celular en tejidos vivos. Dicha molécula viaja vía sanguínea y penetra en los tejidos, quedando disponible para todas las células. Los nucleótidos análogos compiten con los nucleótidos endógenos para ser seleccionados e incorporados a la nueva cadena de ADN. De modo que mediante el uso de anticuerpos específicos para BrdU, este nos provee un medio para la detección de ADN recién sintetizado.

Las histonas son las principales proteínas que constituyen la cromatina en los eucariontes. La histona 3 fosforilada en serina 10 (Phospho H3 ser 10) es una proteína presente en los nucleosomas que conforman a la heterocromatina, característica de células en fase G2/M (Goto *et al.*, 1999; Strahl y Allis, 2000).

De modo que la ubicación de antígenos mediante técnicas de inmunodetección, nos permiten identificar ciertas fases del ciclo celular y a su vez relacionarlas con los procesos de división y proliferación celular.



---

## ANTECEDENTES

Los primeros estudios fisiológicos en torno a la determinación del sexo en vertebrados se enfocaron en el papel de las hormonas esteroideas durante la gonadogénesis. Se descubrió que en los embriones o larvas tratadas con estrógenos sintéticos revertía el desarrollo de fenotipos masculinos hacia fenotipos femeninos en aves, reptiles, anfibios y peces (Nakamura, 2010).

Los primeros pasos en la diferenciación del sexo gonadal dependen de la temperatura de incubación de los huevos. Estudios previos realizados por Pieau y Dorizzi (2004) han demostrado la participación de los estrógenos en la diferenciación ovárica, haciendo mención sobre la feminización de las gónadas por estrógenos exógenos a una temperatura masculinizante. Así como sobre la masculinización de las gónadas por antiestrógenos e inhibidores de la aromatasa a una temperatura feminizante.

Dentro de este mecanismo se encuentra la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. Los embriones eclosionan predominantemente hembras si se incuban a una temperatura feminizante (TF, 33°C) y machos si lo hacen a temperatura masculinizante (TM, 26°C). A temperatura feminizante (TF) el desarrollo embrionario completo dura alrededor de 45 días, mientras que los embriones incubados a temperatura masculinizante (TM) el desarrollo dura alrededor de los 75 días de incubación (Merchant-Larios *et al.*, 2010).

En reptiles con determinación sexual dependiente de temperatura el período termosensible (PTS) es el intervalo en el que el sexo se define durante la morfogénesis gonadal y corresponde a las etapas de desarrollo durante el cual un dado grupo de embriones responde a la temperatura en la cual son incubados, situado este período para la tortuga golfina entre las etapas 22 y 23 de desarrollo (Merchant-Larios *et al.*, 2010).

Merchant-Larios y colaboradores en 1997, realizaron una serie de experimentos que consistieron en incubar grupos de embriones a temperatura masculinizante y otros grupos a temperatura feminizante. En dichos experimentos, se procedió a realizar





intercambios de temperatura de incubación (de masculinizante a feminizante y viceversa) en las diferentes etapas del desarrollo embrionario y se registró su respuesta al cambio, como se puede apreciar en la siguiente tabla.

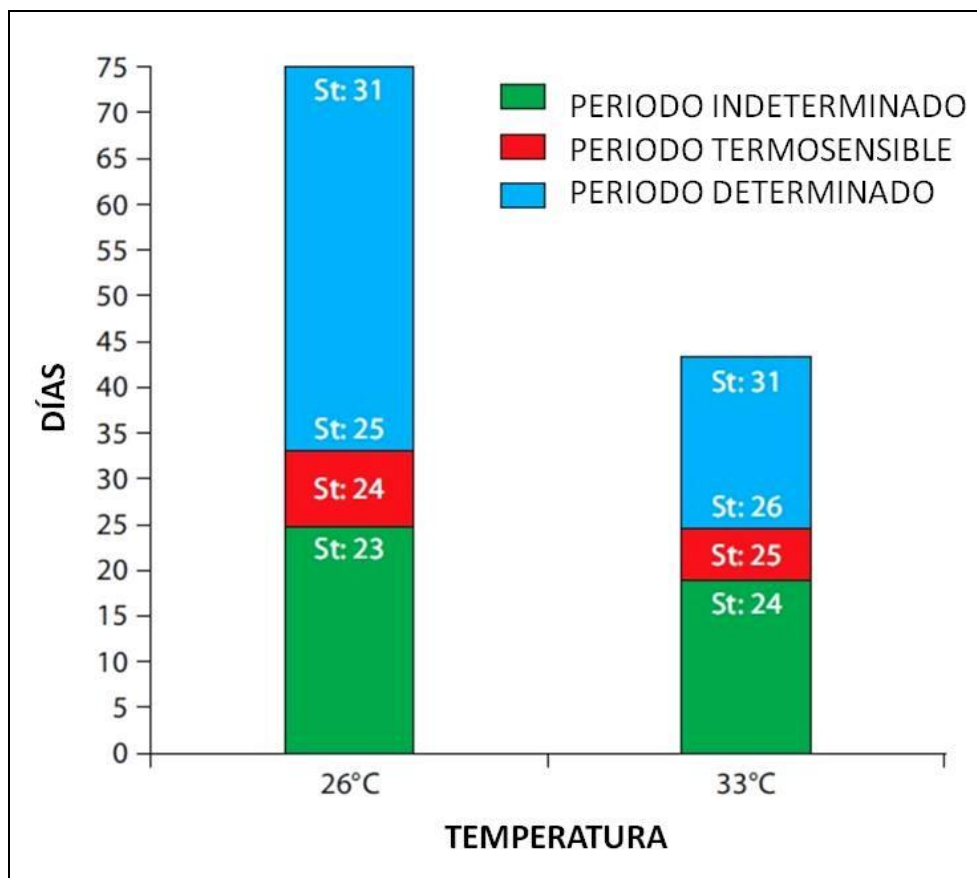
INTERCAMBIOS DE TEMPERATURA	ETAPA DE DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA QUE SE REALIZÓ EL INTERCAMBIO	PORCENTAJE EMBRIONES QUE RESPONDIÓ AL INTERCAMBIO
De TF a TM	24	100% machos
De TF a TM	25	30% machos
De TF a TM	26	0 machos
De TM a TF	23	100% hembras
De TM a TF	24	35% hembras
De TM a TF	25	0 hembras

**Tabla 1.** Intercambios de temperatura en diferentes etapas del desarrollo embrionario y su respuesta al cambio. Datos obtenidos de (Merchant-Larios *et al.*, 1997).

Tras analizar las etapas de desarrollo embrionario en función de su respuesta a la temperatura de incubación se pueden establecer tres períodos (Figura 4):

- a) Período indeterminado (PI), compuesto por aquellas etapas de desarrollo al cual los embriones sujetos a un intercambio de temperatura responden invariablemente al cambio.
- b) Período termosensible (PTS), el cual corresponde a una etapa en la que los embriones pueden o no responder al intercambio de temperatura, tal periodo es una etapa crítica pues dentro de ésta los embriones adquieren el compromiso para determinarse como hembras o machos dependiendo de su temperatura de incubación.
- c) Período determinado (PD), delimitado por las etapas de desarrollo durante el que los embriones sujetos a un intercambio de temperatura no responden a ningún intercambio.





**Figura 4.** Gráfica donde se observa la correlación entre la temperatura de incubación, los días de desarrollo y la determinación sexual gonadal en embriones de *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 2010).

Por otra parte, la expresión del Sox9, gen involucrado en la determinación sexual de la tortuga *Lepidochelys olivacea*, ha sido detectado tanto en embriones incubados a TM (26°C) como en los incubados a TF (33°C) durante las etapas 22 a 24 (Período indeterminado), en las células de la gónada la señal se observa en los núcleos de algunas células de la región medular.

En la etapa 25 hay diferencias de expresión de Sox9 entre ambas temperaturas, a 33°C solo algunos núcleos se encuentran marcados y en etapa 26 ya no se observa tal señal; mientras que en los embriones incubados a 26°C la señal continúa visible en la región medular (Merchant-Larios *et al.*, 2010).



---

Las células que expresan Sox9 corresponden a las células pre-Sertoli de los cordones sexuales en desarrollo. En *Lepidochelys olivacea*, la regulación de Sox9 se produce durante el período termosensible. Por lo tanto, en esta especie, la expresión de Sox9 es un criterio útil que puede ser correlacionado con la determinación del sexo. La temperatura es la encargada de regular la expresión de Sox9, por lo tanto la inhibición de las células de Sertoli se afecta directamente en el período termosensible, dando como resultado a la formación de un ovario (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999).

Para investigar la participación del estradiol en especies con determinación sexual dependiente de temperatura, Dorizzi *et al.*, (1991) administró estradiol a huevos de la tortuga *Emys orbicularis* incubados a una temperatura masculinizante (25°C) en el comienzo del período termosensible, y observó que las gónadas se diferenciaban como ovarios en lugar de testículos. Esto confirma que los estrógenos actúan en el proceso de diferenciación ovárica estimulando el desarrollo de la corteza e inhibiendo el desarrollo de los cordones testiculares en todos los embriones tratados con estradiol. El suministro de estradiol redujo considerablemente el volumen de las gónadas dando lugar a la ausencia de cordones seminíferos en la parte medular. Al inyectarse el benzoato de estradiol se inhibió el desarrollo de los túbulos seminíferos y se estimuló la formación de la corteza gonadal característica de un ovario.

Por el caso contrario, en todos los embriones de control procedentes de huevos inyectados únicamente con aceite de oliva, se observaron estructuras como cordones epiteliales con lo cual se comprobó que las gónadas fueron testículos con estructuras típicas correspondientes a las etapas del desarrollo.

Los datos preliminares sobre el contenido de esteroides en las gónadas indican que durante las etapas tempranas del período termosensible el nivel de estrógenos es mayor a 30°C que a 25°C. De este modo, el autor propone que las especies muestran sensibilidad a la temperatura para la diferenciación sexual de las gónadas. La temperatura actúa sobre los procesos que regulan la síntesis o la actividad de la aromatasa, enzima encargada de transformar los andrógenos en estrógenos.



Con el fin de demostrar su hipótesis, Dorizzi *et al.*, (1991), administró inyecciones de E2 (17 $\beta$ -estradiol) inmediatamente después del período termosensible, lo cual no inhibió el desarrollo testicular.

Estos resultados sugieren fuertemente que los estrógenos están implicados en la diferenciación gonadal y que su producción podría ser dependiente de la temperatura, ya que niveles más altos se alcanzaron en temperaturas feminizantes a diferencia que en las masculinizantes (Dorizzi *et al.*, 1991).

Por otra parte, estudios previos realizados por Barske y Capel (2010) en la tortuga *Trachemys scripta*, donde se administró estradiol (5 $\mu$ g en 10 $\mu$ l de etanol al 95%) a temperatura masculinizante así como Letrozol (10 $\mu$ g en 10 $\mu$ l de etanol al 95%), un inhibidor no esteroideo que puede inducir el desarrollo masculino completo en temperaturas feminizantes, demostraron que con la administración de tales fármacos se observó una gama de fenotipos de cambio de sexo en las crías: ovarios normales, ovotestis de proporciones variables, y testículos normales. Destacando que la estructura de estos ovotestis como resultado de la inhibición de la aromatasa indica que la expansión de la región cortical no requiere una médula feminizada, y que el mantenimiento de la vía de testículo no se ve afectada por la presencia de una corteza ovárica.



## JUSTIFICACIÓN

El desarrollo gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* es susceptible al estradiol exógeno revirtiendo la gónada de testículo a ovario (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Sin embargo, el mecanismo por el cual se induce dicha reversión aún no ha sido determinado.

El análisis del desarrollo gonadal de los embriones tratados con estradiol mediante técnicas histológicas presenta cierta limitación ya que solo nos permite la descripción de su estructura interna. Por ello, también es conveniente realizar un análisis mediante el uso de técnicas como la inmunomarcación, para así poder identificar la expresión de ciertos tipos de marcadores de proliferación celular presentes durante dicho desarrollo. De este modo se puede sugerir la respuesta del mecanismo que subyace en torno a la inducción de la reversión sexual provocada por el estradiol exógeno, además de complementar la información sobre este tema.



## **HIPÓTESIS**

El  $17\beta$ -estradiol inhibe la proliferación de las células que forman la gónada bipotencial en embriones incubados a temperatura masculinizante.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del  $17\beta$ -estradiol exógeno sobre la proliferación celular de las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante ( $26^{\circ}\text{C}$ ) suministrado durante el período de gónada bipotencial.



---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ***Material biológico***

El desarrollo de este protocolo contó con el permiso de SEMARNAT con oficios número: SGPA/DGVS/01945/13 y SGPA/DGVS/02133/14. Este protocolo se llevó a cabo bajo la aprobación del Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los huevos de *Lepidochelys olivacea* fueron colectados en la playa de Escobilla, en el estado de Oaxaca, en el Pacífico mexicano, situada en el Km 182 de la carretera federal 200 (15°43" latitud Norte y 96° 44" longitud oeste). La orientación original de los huevos fue mantenida tanto en su transporte hacia el Instituto de Investigaciones Biomédicas como durante su incubación, con el fin de evitar el desprendimiento de las membranas extraembrionarias. Una vez en el laboratorio, los huevos se colocaron en recipientes con vermiculita húmeda y se distribuyeron al azar en dos grupos: uno incubado a 26°C (TM) y otro a 33°C (TF), respectivamente. La humedad fue verificada periódicamente mientras que la temperatura fue registrada mediante termómetros automáticos.

### ***Tratamiento con 17β-Estradiol y administración de 5-Bromo-2'-deoxyuridina***

Para este estudio se utilizaron exclusivamente los embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) a los 27 días de incubación correspondientes a la etapa 23 de desarrollo, período en el que se considera que la determinación sexual gonadal está aún indeterminada. Mientras que los incubados a temperatura feminizante (33°C) fueron procesados en etapa 26 para ser utilizados en el análisis comparativo de las gónadas en etapa diferenciada.

De los huevos incubados a 26°C, cuarenta fueron tratados con una dosis única de 12µg de 17β-estradiol disuelto en 60µl de etanol al 75% (experimentales), y a otros



cuarenta huevos se les suministró únicamente el vehículo, etanol al 75%, (controles). El tratamiento se colocó sobre el cascarón de cada huevo mediante cápsulas de Beem (Catálogo, #70020-B Electron Microscopy Science) fijadas con parafina, de acuerdo con lo descrito previamente por el método utilizado por Merchant-Larios *et al.*, (1997). Luego fueron colocados nuevamente en incubación a temperatura masculinizante durante siete días, después de los cuales se alcanzó la etapa 24, es decir, la etapa de gónada bipotencial. Tras haber suministrado el tratamiento respectivo, en la albúmina de cada uno de los huevos se inyectó 100µg/g de peso del embrión de 5-Bromo-2'-deoxyuridina (Sigma-Aldrich) disuelto en solución salina. Una vez terminada la operación, fueron colocados en incubación por un lapso de dos horas.

### ***Obtención de los complejos urogenitales y procesamiento de tejidos***

Pasadas las dos horas se tomaron 10 huevos controles y 10 huevos experimentales, con unas tijeras se cortó la superficie de cada cascarón para retirar al embrión de sus membranas extraembrionarias con el fin de sacrificarlo mediante decapitación y así poder diseccionar los complejos urogenitales de cada uno. En seguida, dichos complejos se fijaron en 4% de PFA (paraformaldehído)/PBS (solución salina-fosfatos) y se colocaron a 4°C toda la noche (TLN), al día siguiente se colocaron en PBS 1X para ser procesadas por congelación.

Las muestras se lavaron con PBS 1X, luego se deshidrataron con series ascendentes de sacarosa al 10%, 20% y 30% preparada en PBS y enseguida se pusieron en una solución 1:1 OCT-sacarosa 30%. Posteriormente, fueron incluidas en OCT (Optimal Cutting Temperature) (Tissue Tek) puro en cápsulas Beem y se congelaron en hexano enfriado con hielo seco; se obtuvieron criosecciones de 25 µm de grosor (Criostato Kedeo Modelo KD-2850). Las criosecciones se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente (Superfrost Plus, Catálogo #71869-50 Electron Microscopy Science), se sometieron a alto vacío y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento para inmunofluorescencia.





---

La inmunofluorescencia de las muestras en etapa 24, consistió en una triple inmunofluorescencia con el propósito de detectar la incorporación de BrdU (células en fase S), Phospho H3 ser 10 (células en fase G2/M) y citoqueratina para identificar los compartimentos epiteliales de las gónadas.

-----

Los huevos restantes permanecieron incubados hasta la etapa 26, período en el cual las gónadas se encuentran morfológicamente diferenciadas.

En este momento se extrajeron los embriones (experimentales, controles y los de temperatura feminizante) y se disecaron sus complejos urogenitales. Un complejo urogenital de cada embrión fue fijado en 4% de PFA/PBS TLN, posteriormente fue procesado por congelación para la obtención de los cortes y ser tratado mediante una doble inmunofluorescencia con el fin de corroborar el sexo gonadal por medio de la expresión de Sox9. Mientras que el complejo urogenital colateral fue fijado en solución de Karnovsky a 4°C TLN.

Por otra parte, la mitad de las muestras fijadas en solución de Karnovsky se colocaron en 1% de OsO<sub>4</sub> en buffer de Zetterqvist y se procesaron para su inclusión en Epon 812, se realizaron cortes semifinos (1-2 µm), se montaron sobre portaobjetos, se tiñeron con azul de toluidina, fueron observados por microscopía de luz y se fotodocumentaron. Mientras que la otra mitad de las muestras se colocaron en 1% de OsO<sub>4</sub> en buffer de Zetterqvist, se deshidrataron en series ascendentes de etanol (50%, 70%, 90% y 100%), posteriormente se recubrieron con oro 200 Å y se observaron por microscopía electrónica de barrido con el propósito de realizar el análisis de la morfología externa de las gónadas en etapa 26.



## ***Inmunomarcación***

### *Triple inmunofluorescencia: Phospho H3 ser 10, BrdU & Citoqueratina*

Las laminillas con las criosecciones de las gónadas de los embriones en etapa 24 que estaban a  $-70^{\circ}\text{C}$  se llevaron a temperatura ambiente (TA), y fueron lavadas con PBS. Los cortes se deslipidizaron gradualmente en etanol a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) en agitación constante. La exposición del antígeno se realizó incubando las muestras en 10 mM de citrato de sodio, pH 6, a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 45 min. Los cortes fueron lavados con PBS para luego permeabilizarlos con 0.5% de Tritón 100X/PBS por 10 min. Las muestras fueron bloqueadas con una solución de 10% de suero de caballo y 2% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBT (Tritón 100X/PBS). Y los cortes se incubaron con el anticuerpo generado en conejo Phospho H3 ser 10 (ABCAM, Catálogo ab 5176) (dilución 1:1500) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario generado en cabra anti-conejo acoplado a CY3 (dilución 1:500) durante 15 minutos a TA.

Después, los cortes fueron incubados con la solución de bloqueo durante 30 min, y luego, las secciones fueron inmersas en una solución de HCl (ácido clorhídrico) 2N a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, para desnaturalizar el ADN e incubados con 10 mM con buffer de Borato a pH 8.5 a TA por 15 min para neutralizar el HCl. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo generado en rata anti-BrdU (SEROTEC, Catálogo MCA 2060) (dilución 1:100) a  $4^{\circ}\text{C}$ , TLN. Al siguiente día las laminillas se lavaron con PBS y se les colocó 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo secundario generado en burro anti-rata FITC (dilución 1:350), se dejó incubar 20 min a TA.

Finalmente, a los cortes se les aplicó el anticuerpo generado en ratón anti-pan citoqueratinas (AE1/AE3+8/18) (Biocare Medical, Catálogo CM162C) (dilución 1:50) y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , TLN. Luego, se les puso el anticuerpo secundario generado en burro anti-ratón Alexa 647 (dilución 1:300) y su incubación duró 20 min a TA.



---

### *Doble inmunofluorescencia: Sox9 & Citoqueratina*

Las laminillas con las criosecciones de las gónadas de los embriones en etapa 26 que estaban a  $-70^{\circ}\text{C}$  se llevaron a TA, se lavaron con PBS, se deslipidizaron y se les expuso el antígeno mediante el proceso descrito anteriormente. Las muestras fueron bloqueadas con 5% de suero de caballo en PBT (0.5% Triton 100X/PBS) e incubadas con anticuerpo generado en conejo anti-Sox9 (dilución 1:150) a  $4^{\circ}\text{C}$ , TLN. Al siguiente día, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario generado en cabra anti-conejo acoplado a CY3 (Chemicon International, Inc.) (dilución 1:100) durante 1 h a TA. Luego, las muestras fueron bloqueadas con una solución de 1% de suero de caballo en PBS durante 1 hora e incubadas con anticuerpo generado en ratón anti-pan citoqueratinas (AE1/AE3+8/18), (Biocare Medical, Catálogo CM162C) (dilución 1:50) a  $4^{\circ}\text{C}$ , TLN. En seguida se incubaron durante 1 h a TA utilizando el anticuerpo secundario generado en burro anti-ratón Alexa647 (Molecular Probes, Invitrogen) (dilución 1:100). Posteriormente, fueron teñidas con TOTO-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen).

Finalmente, las muestras -doble y triple inmunofluorescencias- se montaron con Dako® y se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Pascal-LSM5).

### ***Conteo de células en fase de síntesis y fase G2/M del ciclo celular***

Las laminillas con las criosecciones de las gónadas de los embriones tratadas con estradiol y controles (triple inmunofluorescencia), se procesaron mediante cortes ópticos captados en el microscopio confocal Zeiss Pascal-LSM5 con el objetivo 40X, bajo un mismo campo y proyectados con el programa LSMIX.

El conteo de las células en fase de síntesis (BrdU) y G2/M (Phospho H3 ser 10) se realizó en las reconstrucciones de los cortes ópticos de al menos 5 criosecciones alternadas (una laminilla de cada cinco) en 4 gónadas de cada grupo.



Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba de t de Student para muestras independientes y fueron procesados en el programa SPSS versión 18. Finalmente, se realizó el análisis comparativo de los niveles de proliferación celular considerando los mismos parámetros tanto de las muestras controles como de las muestras tratadas con estradiol.

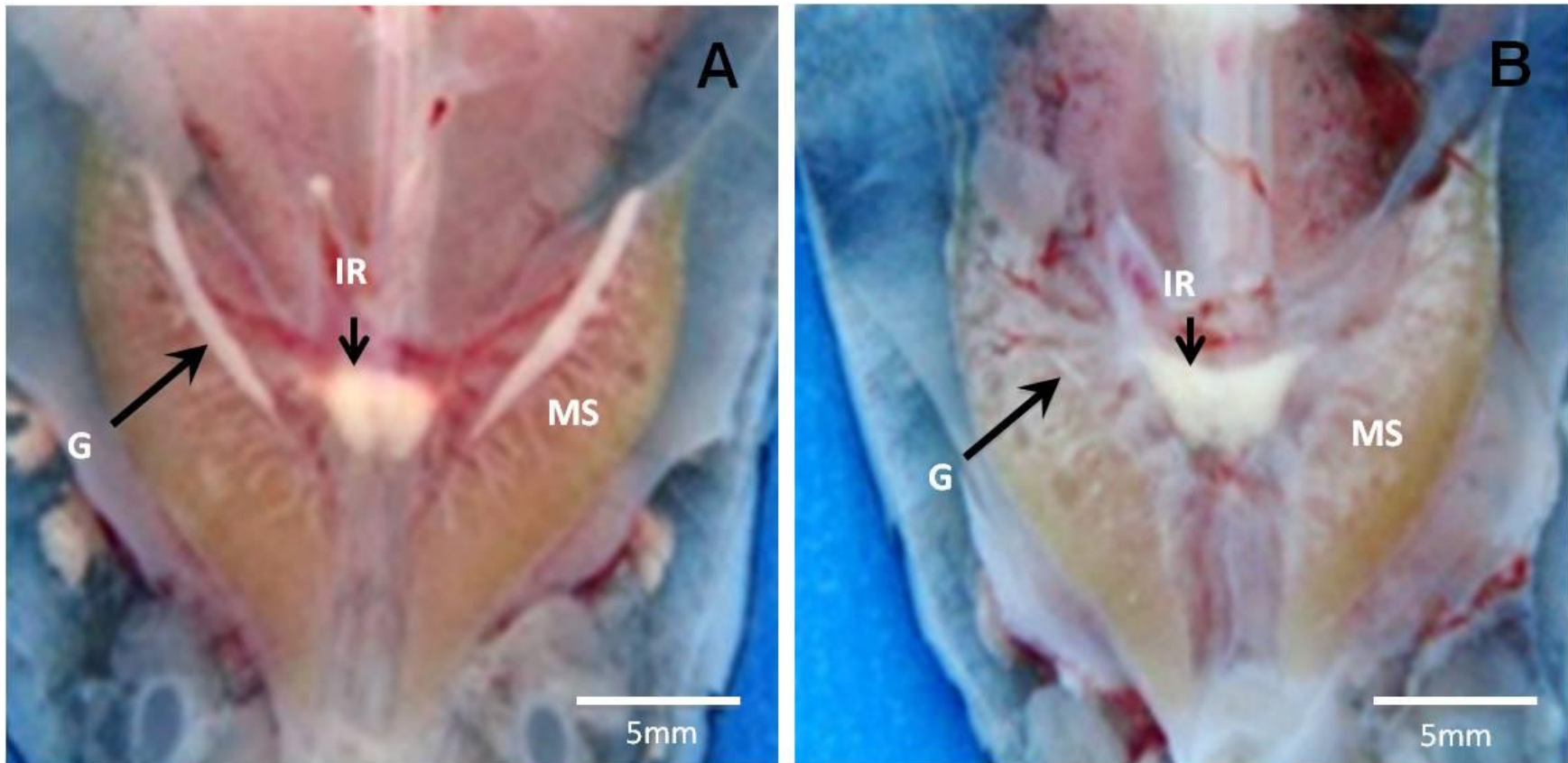


## RESULTADOS

### ***El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol induce el desarrollo hipoplásico de las gónadas de los embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C)***

El análisis macroscópico de los complejos urogenitales de las tortugas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 26 se describe a continuación: Los complejos urogenitales de los embriones incubados a TM y tratados únicamente con el vehículo muestran un desarrollo normal de la gónada caracterizado por un engrosamiento y elongación de la cresta gonadal correspondiendo a lo previamente reportado por Merchant-Larios y colaboradores (1997) (Figura 5A). Mientras que los complejos urogenitales de los embriones tratados con 17 $\beta$ -estradiol e incubados a TM, que fueron obtenidos a etapa 26, muestran una cresta gonadal adelgazada y muy poco evidente (Figura 5B).

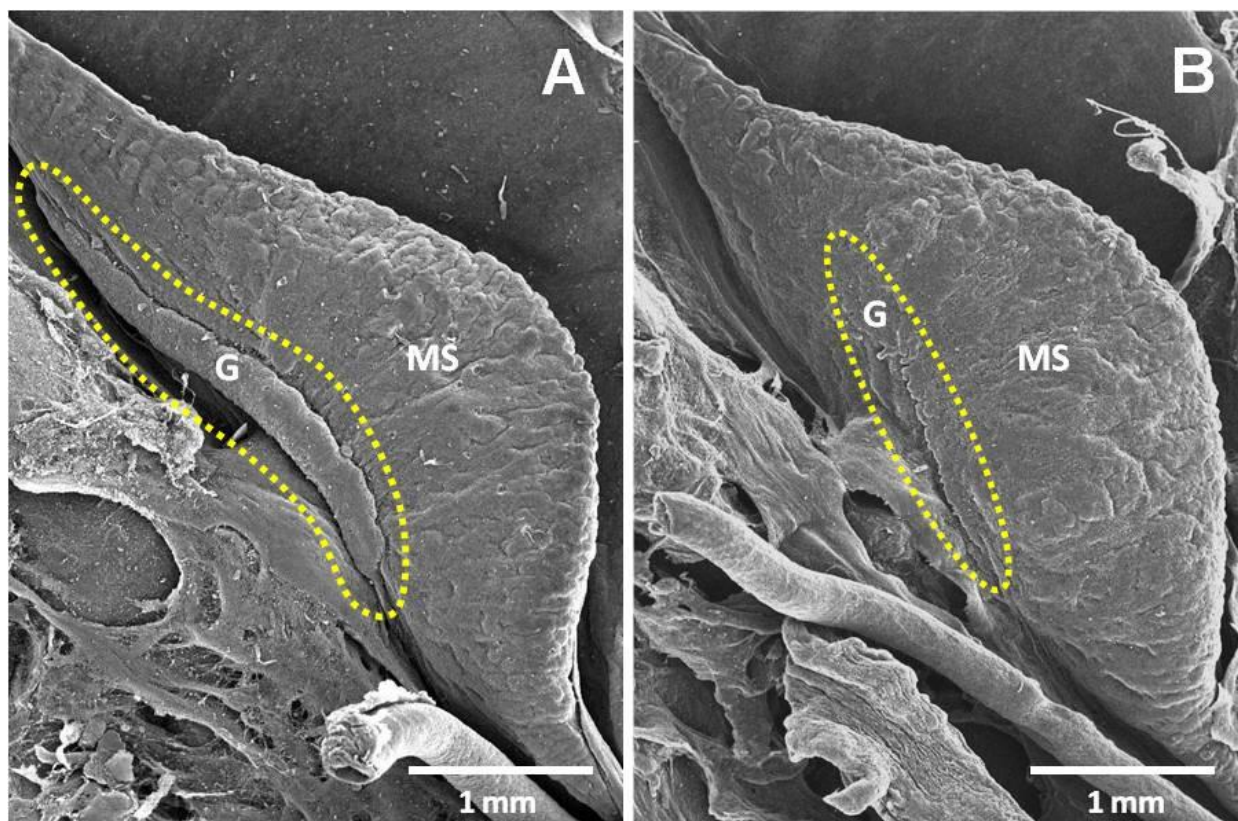




**Figura 5.** Macrografías de los complejos urogenitales de embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 26°C (TM) y obtenidos en la etapa 26 de desarrollo. **A)** Gónadas (G), mesonefros (MS) adyacentes y glándulas interrenales (IR) de embrión tratado con vehículo (etanol), presentando un desarrollo normal de la cresta gonadal. **B)** Complejos urogenitales de un embrión tratado con 17 $\beta$ -estradiol. El desarrollo de los mesonefros y de las glándulas interrenales, no muestran diferencias evidentes con respecto a sus controles. Sin embargo, las gónadas desarrolladas son muy pequeñas y delgadas.



El análisis de los complejos urogenitales mediante microscopía electrónica de barrido denota el desarrollo de los mesonefros y las gónadas en los embriones tratados con el vehículo (Figura 6A). En tanto que las gónadas de los embriones tratados con  $17\beta$ -estradiol muestran un desarrollo gonadal hipoplásico, donde la cresta gonadal es muy delgada y con abundantes pliegues irregulares (Figura 6B).



**Figura 6.** Fotomicrografía de microscopía electrónica de barrido de los complejos urogenitales de los embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 26°C controles y tratados con  $17\beta$ -estradiol y obtenidos en etapa 26. Gónadas (G) (línea punteada amarilla) y mesonefros (MS). **A)** Complejo urogenital de un embrión tratado con vehículo (etanol), en que se observa una cresta gonadal con un desarrollo normal. **B)** Complejo urogenital de un embrión tratado con  $17\beta$ -estradiol, donde se observa una pequeña y delgada cresta gonadal.



---

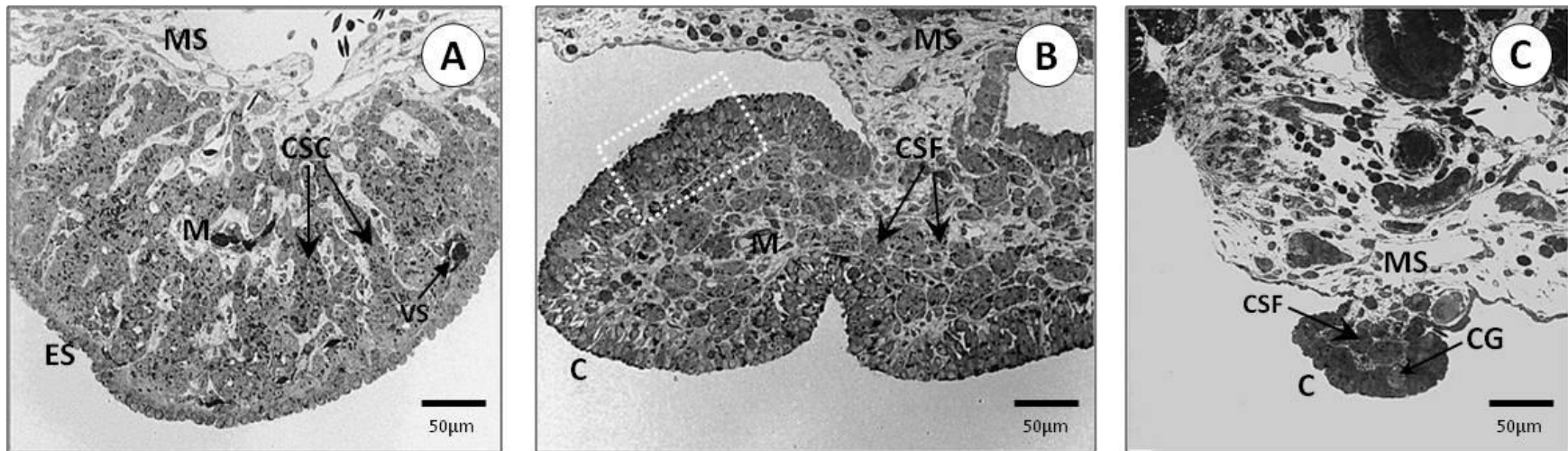
### ***Descripción histológica de las gónadas de *Lepidochelys olivacea* tratadas con $17\beta$ -estradiol***

Las descripciones que se detallan a continuación se obtuvieron de cortes semifinos de muestras procesadas en epon. Las gónadas de los embriones incubados a temperatura masculinizante ( $26^{\circ}\text{C}$ ) en etapa 26 muestran una diferenciación testicular, se observa un epitelio superficial compuesto por células cúbicas y en la zona cercana al mesenterio se aprecian células aplanadas (Figura 7A). En la región medular se observan los cordones sexuales continuos, así como tejido estromático donde pueden observarse vasos sanguíneos (Figura 7A). En el caso de las gónadas de los embriones incubados a temperatura feminizante ( $33^{\circ}\text{C}$ ), etapa 26 presentan una corteza engrosada característica de la diferenciación de un ovario, compuesta por células columnares y en proceso de pseudoestratificación. En la región medular se observan los cordones sexuales fragmentados (es decir, que no muestran una continuidad) acompañados de tejido estromático (Figura 7B).

Con respecto a las gónadas de los embriones incubados a temperatura masculinizante ( $26^{\circ}\text{C}$ ) tratados con  $17\beta$ -estradiol éstas presentan una reducción general de tamaño. La región medular manifiesta un área reducida con poca cantidad de estroma y conformada por cordones sexuales fragmentados. Mientras que el epitelio superficial está engrosado y conformado por células cúbicas pseudoestratificadas, y se pueden apreciar algunas células germinales (Figura 7C).







**Figura 7.** Fotomicrografía de cortes semifinos de gónadas morfológicamente diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 26. **A)** Testículo de embrión incubado a 26°C donde se muestra el epitelio superficial (ES) y la región medular (M) con cordones sexuales continuos (CSC). **B)** Ovario de embrión incubado a 33° C mostrando la corteza (C) engrosada compuesta por células columnares y en proceso de pseudoestratificación (línea punteada) y la región medular (M) con cordones sexuales fragmentados (CSF). **C)** Gónada de un embrión incubado a 26°C y tratado con 17β-estradiol, la cual muestra características de un ovario miniatura con un engrosamiento de la región cortical (C) y con cordones sexuales fragmentados (CSF) en la región medular. Vasos sanguíneos (VS), células germinales (CG) y mesonefros (MS).



---

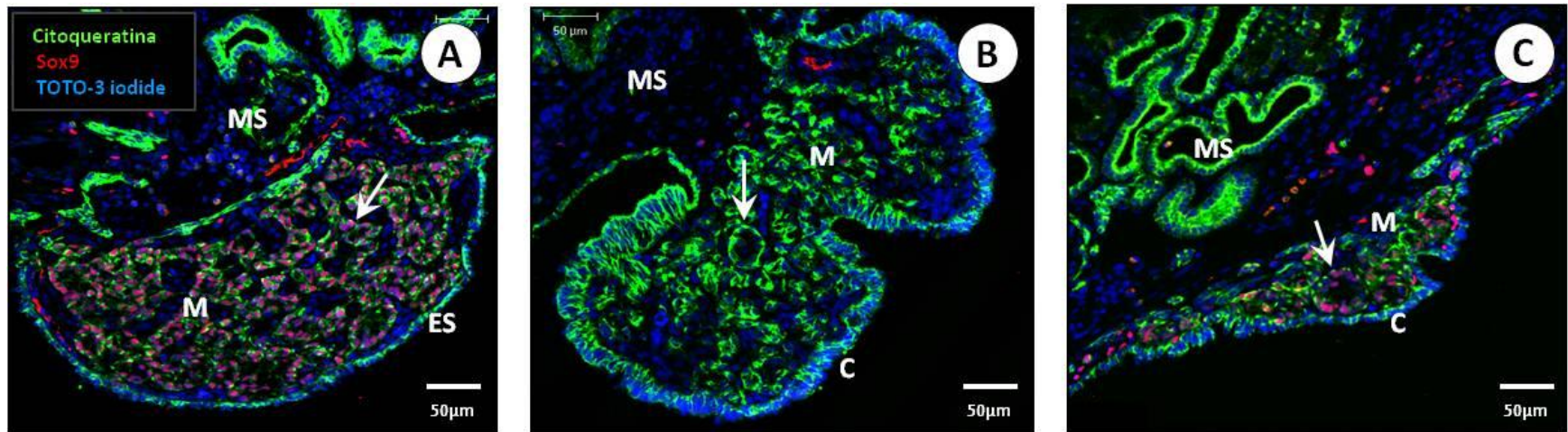
### ***La expresión de Sox9 disminuye en las gónadas de embriones tratados con 17 $\beta$ -estradiol***

La expresión del gen Sox9 se estudió en las gónadas tanto de los embriones incubados a temperatura masculinizante (26°C) como de los incubados a temperatura feminizante (33°C) en etapa 26. Tales gónadas fueron comparadas con la expresión del mismo marcador presente en las gónadas de los embriones tratados con estradiol e incubados a temperatura masculinizante (26°C).

Las gónadas de los embriones incubados a 26°C (TM) en etapa 26, correspondientes a un testículo recién diferenciado, expresan positivamente el marcador Sox9 (Figura 8A), mientras que las gónadas de los embriones incubados a 33°C (TF) en etapa 26, propias de un ovario recién diferenciado, no expresan dicha proteína lo cual corresponde a lo previamente reportado por Moreno-Mendoza *et al.*, (2001) (Figura 8B).

Por otro lado, las gónadas de los embriones incubados 26°C (TM) y sometidos al tratamiento con estradiol expresan positivamente un pequeño dominio de Sox9 en la región medular (Figura 8C) así como la formación de estructuras lagunares que son propias del territorio medular en los ovarios diferenciados.

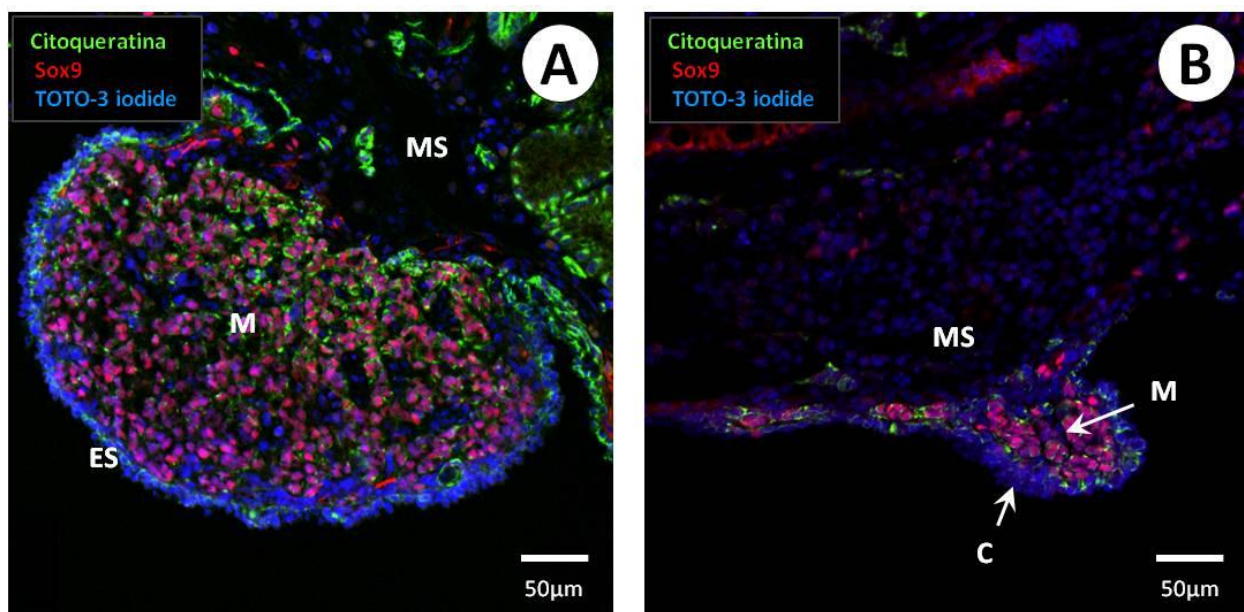




**Figura 8.** Inmunofluorescencia de Sox9 y citoqueratina en gónadas diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea*, etapa 26. **A)** Testículo de un embrión incubado a 26°C mostrando el epitelio superficial (ES) y la región medular (M) con cordones testiculares (flecha) positivos a Sox9 (rosa). **B)** Ovario de un embrión incubado a 33°C mostrando el engrosamiento de la corteza (C), la región medular (M) con la formación de estructuras lagunares (flecha) compuesta por células epiteliales negativas a Sox9. **C)** Gónada de un embrión incubado a 26°C y tratado con 17 $\beta$ -estradiol exhibiendo la región cortical engrosada (C) y la zona medular (M) con cordones sexuales en cavitación (flecha) con células positivas a Sox9.



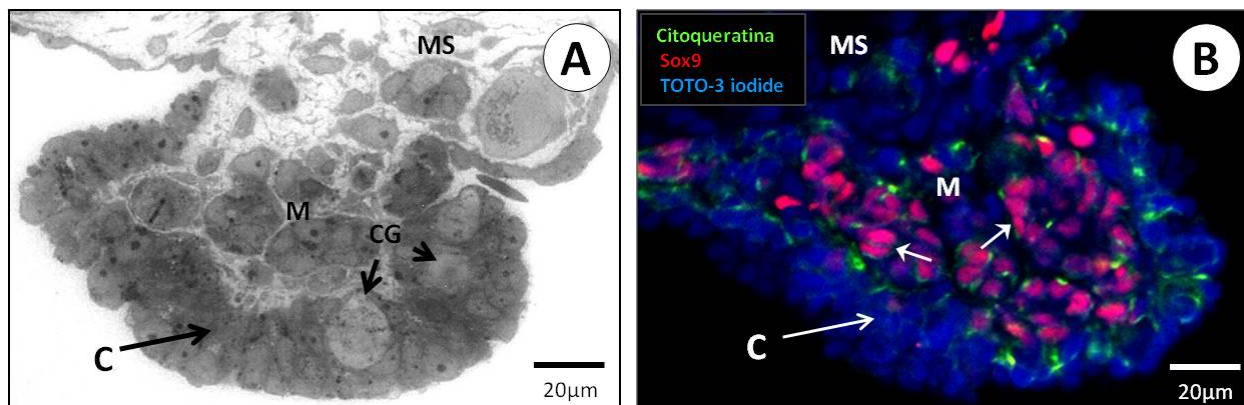
Tras comparar por medio de una doble inmunofluorescencia (Sox9-citoqueratina) a las gónadas de los embriones incubados a 26°C (TM) y tratados con estradiol, así como a sus respectivos controles, se observa que, la gónada tratada con el vehículo exhibe un dominio total de la expresión de Sox9 en la región medular y refleja el mantenimiento de la diferenciación testicular correspondiente con su etapa desarrollo (Figura 9A). Por otro lado la gónada tratada con estradiol tiene un dominio positivo de Sox9 dentro de la pequeña región medular (Figura 9B).



**Figura 9.** Inmunofluorescencia de Sox9 en gónadas de embriones controles y tratados con estradiol, incubados a temperatura masculinizante y obtenidos en etapa 26. **A)** Gónada de un embrión tratado con vehículo (etanol) cuya expresión es positiva a Sox9 (rosa), citoqueratina (verde) y núcleos teñidos con TOTO-3 iodide (azul). **B)** Gónada de un embrión tratado con 17 $\beta$ -estradiol, que confirma la expresión positiva de Sox9 y manifiesta positivamente los otros dos marcadores. Región medular (M), epitelio superficial (ES), corteza (C) y mesonefros (MS).

La comparación entre el análisis histológico y la inmunofluorescencia revela la presencia de células germinales en la región cortical así como la fragmentación de los cordones sexuales en la región medular (Figura 10A). Por otra parte, se puede observar que pese a que la gónada de un embrión tratado con estradiol se encuentra reducida de tamaño existe una clara expresión de Sox9 en la región medular (Figura 10B).





**Figura 10.** Fotomicrografías de un corte semifino y de la inmunofluorescencia de Sox9 y citoqueratina de la gónada de un embrión tratado con estradiol. **A)** Corte semifino de la gónada de un embrión tratado con  $17\beta$ -estradiol. Territorio medular (M) reducido y con cordones sexuales fragmentados; y, territorio cortical (C) engrosado y con presencia de células germinales (CG). **B)** Detalle de la gónada de un embrión tratado con  $17\beta$ -estradiol. Territorio medular, señalado por las células positivas a Sox9 (rosa), citoqueratina (verde) y, territorio cortical (C) engrosado y con los núcleos marcados con TOTO-3 iodide (azul).

### ***El tratamiento con $17\beta$ -estradiol induce un decremento de la proliferación celular de las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante ( $26^{\circ}\text{C}$ )***

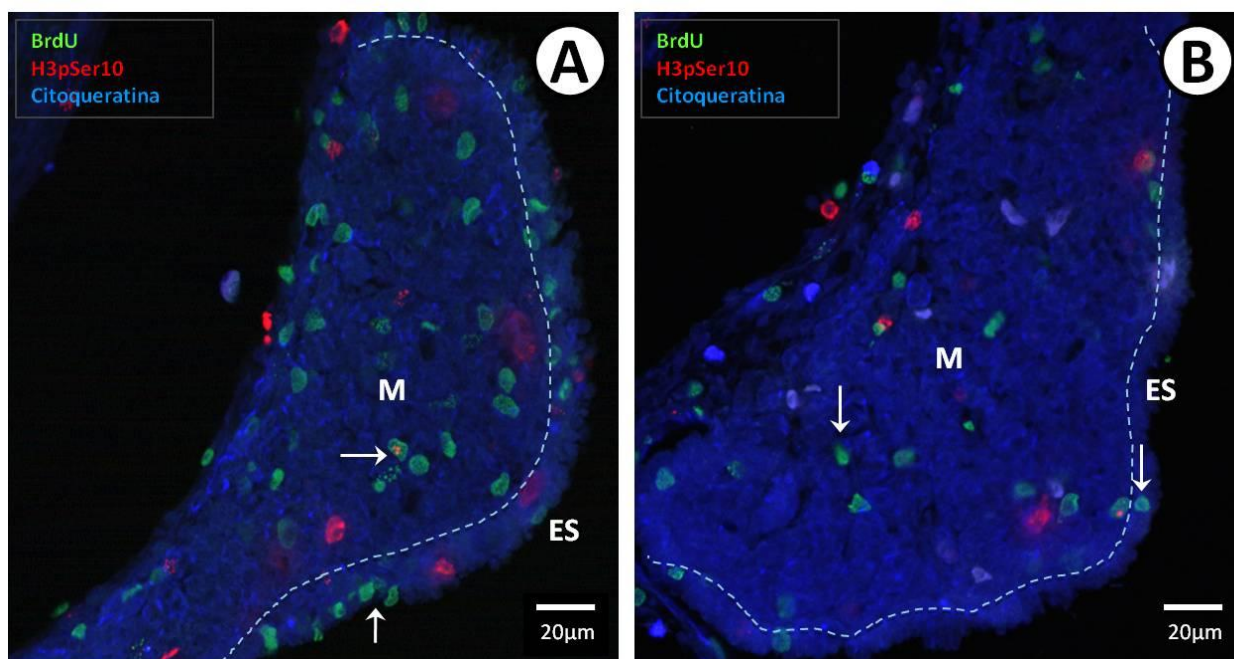
Con el fin de determinar el efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre el crecimiento gonadal, decidimos analizar el perfil proliferativo de las gónadas de los embriones tratados con estradiol, para ello los embriones fueron inyectados con 5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) para identificar a las células en fase S del ciclo celular y utilizamos un anticuerpo policlonal para detectar la expresión de la histona H3 fosforilada en serina 10 (Phospho H3 ser 10) para identificar a la transición G2/M del ciclo celular. Cuando observamos a la gónada de los embriones tratados con estradiol en la etapa 26, transcurrieron 26 días desde el día de tratamiento con estradiol, es evidente una gónada hipotrófica donde existe un menor número de células que forman a la gónada. Como nuestra finalidad fue determinar el impacto del tratamiento del estradiol sobre la proliferación celular de la gónada en desarrollo, decidimos analizar el efecto tan sólo 7 días después del tratamiento con estradiol.





Mediante inmunofluorescencia, identificamos a las células BrdU y Phospho H3 ser10 positivas. En cuanto a las gónadas controles de embriones incubados a temperatura masculinizante observamos una intensa actividad proliferativa tanto en el epitelio superficial de la gónada así como en su región medular. Una imagen representativa se muestra en la figura 11A.

Con respecto a las células que proliferan en la gónada de embriones incubados a TM y tratados con estradiol se observa un menor número de células en proliferación detectadas con ambos marcadores (Figura 11B).



**Figura 11.** Inmunolocalización de células en proliferación (positivas a BrdU y Phospho H3 ser10) de las gónadas de los embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 26°C (TM) 7 días después del tratamiento. **A)** Gónada de embrión tratado con vehículo mostrando las células positivas a BrdU (verde) y a Phospho H3 ser 10 (rojo). **B)** Gónada de embrión tratado con 17β-estradiol manifestando una disminución de células positivas a ambos marcadores. Señalando las células en proliferación (flechas) y el límite (línea punteada) entre la región medular (M) y el epitelio superficial (ES).

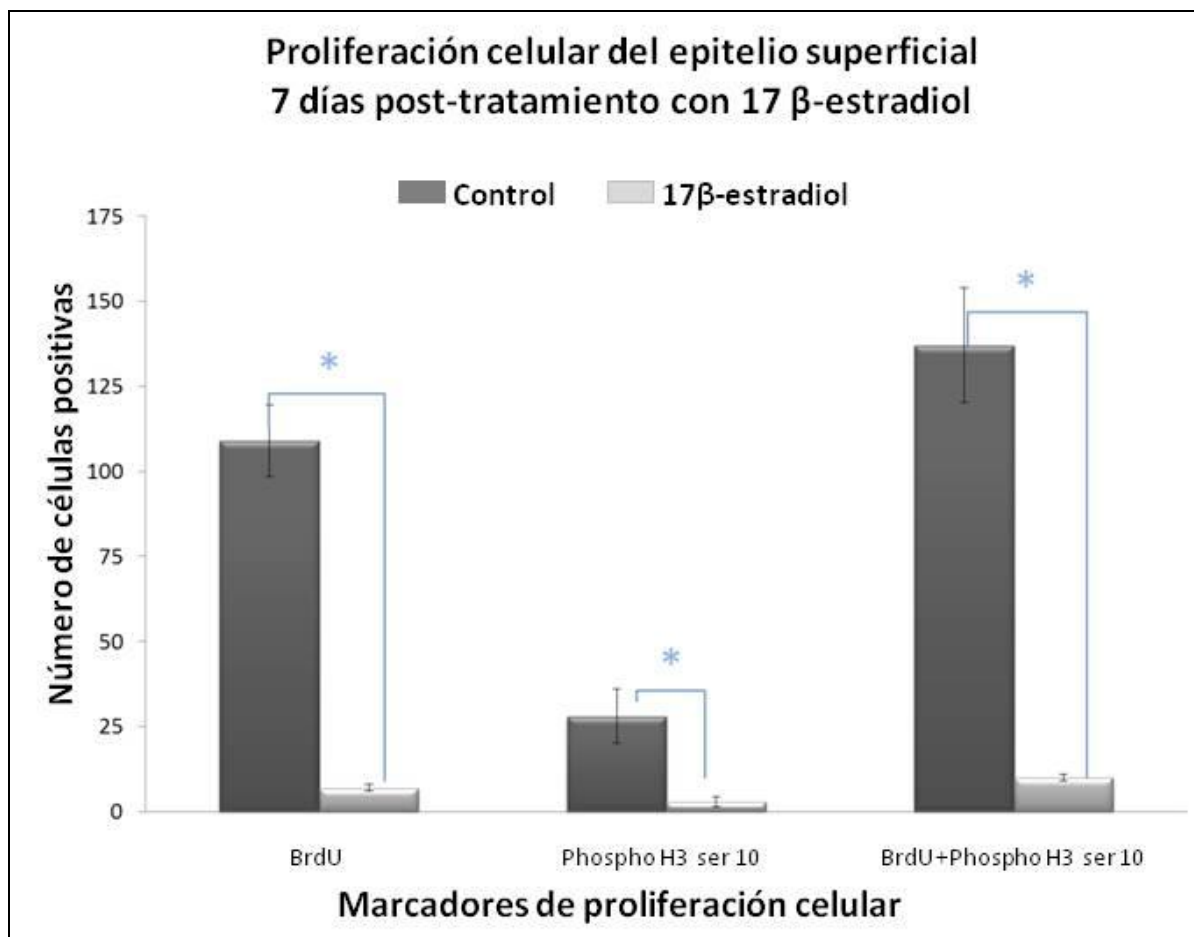


### ***Conteo de células positivas a los marcadores de proliferación celular***

Con el fin de evaluar la disminución de células que proliferan en las gónadas de embriones incubados a TM y tratados con estradiol, se obtuvieron criosecciones para inmunolocalizar a las células en proliferación y se realizó un conteo de dichas células.

En la gráfica de la figura 12 se muestran los valores promedio de las células positivas a BrdU, Phospho H3 ser10 y la suma de ambos, correspondientes al epitelio superficial. Los resultados muestran un abrupto decremento de las células que proliferan en las gónadas de los embriones incubados a TM tratados con estradiol. Este efecto es también observado en la región medular, cuyos valores se encuentran representados en la figura 13. Los valores se indican como la media  $\pm$  la desviación estándar de cuatro gónadas tanto en el grupo control como en el grupo experimental y con un valor de  $*p < 0.005$ .

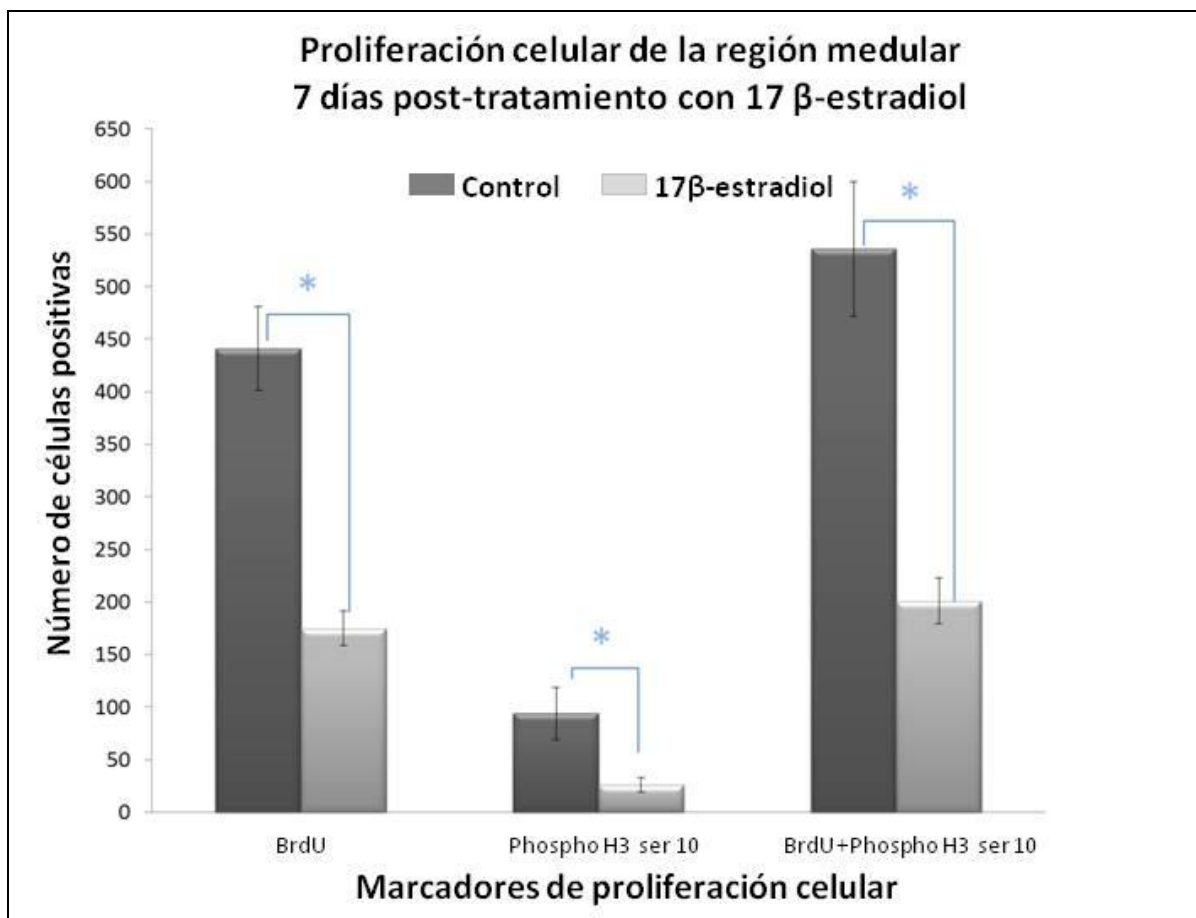




**Figura 12.** Gráfica del promedio de las células positivas a BrdU y Phospho H3 ser 10 en la región del epitelio superficial de las gónadas de los embriones tratados con estradiol comparados con sus controles tratados con el vehículo. Así como los promedios de la suma de ambos marcadores.







**Figura 13.** Gráfica del promedio de células positivas a BrdU y Phospho H3 ser 10 en la región medular de las gónadas de los embriones tratados con estradiol comparados con sus controles tratados con el vehículo. Así como los promedios de la suma de ambos marcadores.



---

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Reciente al descubrimiento de la determinación sexual por temperatura en tortugas, y con el fin de estudiar el posible papel de los estrógenos en el fenómeno de la reversión sexual en tortugas con determinación sexual por temperatura, embriones de *Testudo graeca* y *Emys orbicularis* fueron tratados con estradiol por Pieau y Dorizzi (2004). En *T. graeca*, los tratamientos se realizaron cuando las gónadas se encontraban histológicamente indiferenciadas. El estradiol inhibió el desarrollo de los cordones testiculares. En *E. orbicularis*, los tratamientos se llevaron a cabo en el período termosensible con diferentes dosis de estradiol. En general, se observó que cuanto mayor sea la dosis de estradiol, mayor es la inhibición del desarrollo testicular. En todos los casos, las gónadas de los embriones tratados desarrollaron ovarios u ovotestis, de menor tamaño que los controles (Pieau y Dorizzi, 2004). Nuestros resultados en *L. olivacea* coinciden con lo reportado en otras especies cuya determinación sexual es termosensible e influenciada por el estradiol. En todos los casos, se observó una reducción del tamaño de la gónada con características semejantes a ovario a pesar de que los embriones fueron incubados a TM. Es bien conocido que las hormonas esteroides regulan la proliferación celular y el crecimiento de diferentes órganos por ello consideramos que era importante determinar el efecto del estradiol sobre el tamaño de la gónada.

El modelo clásico de Witschi sobre el desarrollo gonadal en vertebrados establece que la gónada bipotencial en desarrollo se encuentra formada por dos territorios: la médula y la corteza, que crecen y se diferencian de manera mutuamente excluyente. De manera que si el dominio medular se desarrolla, éste llevará al desarrollo de un testículo e inhibirá el desarrollo del ovario. Mientras que el crecimiento de la región cortical conducirá a la inhibición del desarrollo testicular (Witschi, 1951).



---

Nuestro trabajo pone en evidencia una estrecha relación entre la proliferación celular con la determinación sexual. El tratamiento de los embriones con E2 a TM disminuye el número de células en proliferación, lo que podría modificar el patrón de expresión de genes involucrados en la diferenciación de la gónada incubada a TM. Como resultado de la disminución de células que inician la diferenciación testicular, se da paso a la activación de la vía feminizante.

En los mamíferos se ha reportado una menor tasa de proliferación de las células del ovario, evidenciando un rápido desarrollo de los testículos con respecto a los ovarios (Mittwoch, 2013). En el caso de los mamíferos se considera que un doble cromosoma sexual X con un mayor número de genes que un cromosoma Y aumenta la duración del ciclo celular de las células XX con respecto a las células XY, lo que reduce la tasa proliferativa de los ovarios (Mittwoch, 2013). Nuestros resultados muestran que el papel del estradiol en la diferenciación sexual del ovario podría estar relacionado con el control de la proliferación entre los diferentes compartimentos que forman a la gónada en desarrollo y de esta manera “encaminarla” hacia la diferenciación ovárica.

En nuestro estudio a pesar de que la gónada se encuentra reducida de tamaño existe un pequeño dominio de expresión de Sox9 en la región medular, sin embargo esta pequeña estructura medular no es suficiente para mantener la inhibición del engrosamiento de la región cortical en etapas posteriores. Deducimos que la disminución de la región que expresa Sox9 resulta incapaz de inhibir el desarrollo cortical de la gónada y por ello se desarrollan estructuras que mantienen tanto el dominio cortical como medular.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis propuesta en este trabajo por lo tanto, el estradiol inhibe la proliferación de las células de gónadas de embriones tratados con estradiol incubados a temperatura masculinizante.



## PERSPECTIVAS

Proponemos analizar la expresión de genes implicados en la determinación y diferenciación sexual por temperatura. Esto con el fin de determinar si la reducción del tamaño gonadal lleva a una desregulación espacio-temporal de los genes *Foxl2*, *aromatasa Sox9* y *Dmrt1*, los cuales son clave en el desarrollo gonadal de los vertebrados.



---

## LITERATURA CITADA

- Bull, J.J. 1980. Sex Determination in Reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. 55: 3-21.
- Barske, L., Capel, B. 2010. Estrogen Represses SOX9 During Sex Determination in The Red-Eared Slider Turtle *Trachemys scripta*. *Developmental Biology*. 341: 305-314.
- Berta, P., Hawkins, J., Sinclair Andrew, H., Taylor, Anne., Griffiths, B., Goodfellow, P., Fellous, M. 1990. Genetic Evidence Equating SRY and The Testis-Determining Factor. *Nature*. 348: 448-450.
- Bouchard, S., Bjorndal, K. 2000. Sea Turtles as Biological Transporters of Nutrients and Energy from Marine to Terrestrial Ecosystems. *Ecology*. 81: 2305-2313.
- CONANP. 2011. Programa Nacional para la Conservación de Tortugas Marinas. Ficha de identificación de la especie. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 7p.
- Crews, D. 1996. Temperature Dependent-Sex determination: The Interplay of Steroid Hormones and Temperature. *Zoological Science*. 13: 1-13.
- Díaz-Hernández, V., Merchant-Larios, H. 2008. Bases Moleculares de la Determinación Sexual en Mamíferos. *Ciencia Ergo Sum*. 15-3: 287-296.
- Devlin, T., Canals, F., Cuchillo, C., Segura, S., Suau, P. 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª Edición. Barcelona España: Reverte. 1248 p.
- Dorizzi, M., Mignot, T., Guichard, A., Desvages, G., Pieau, C. 1991. Involvement of Oestrogens in Sexual Differentiation of Gonads as a Function of Temperature in Turtles. *Differentiation*. 47: 917.
- Eckert, K., Bjorndal, K., Abreu-Grobois, F., Donnelly, M. 1999. *Research and Management Techniques of the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group. 248 p.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T., Inagaki, M. 1999. Identification of a Novel Phosphorylation Site on Histone H3 Coupled with Mitotic Chromosome Condensation. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 25543-25549.
- Gratzner, H.G. 1982. Monoclonal Antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science*. 218: 474-475.
- IUCN. 2008. Red List of Threatened species. Revisado el 4 abril de 2014 en [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).



- Márquez, R. y Van Dissel, G. 1982. A Method for Evaluating the Number of Massed Nesting Olive Ridley Sea Turtles, *Lepidochelys olivacea*, During an Arribazón, with Comments on Arribazón Behavior. *Netherlands Journal of Zoology*. 32: 419-425.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramírez, S., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A. 1997. Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in The sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*. 107: 373-385.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A. 2010. Gonadal Morphogenesis and Gene Expression in Reptiles with Temperature-Dependent Sex Determination. *Sexual Development*. 4: 50-61.
- Mittwoch, U. 2013. Sex Determination. *European Molecular Biology Organization Reports*. 14: 588-592.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H. 1999. Differential Expression of SOX9 in Gonads of The Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* at Male- or Female-Promoting Temperatures. *Journal of Experimental Zoology*. 284: 705–710.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant-Larios, H. 2001. Temperature Regulates SOX9 Expression in Cultured Gonads of *Lepidochelys olivacea*, a Species with Temperature Sex Determination. *Developmental Biology*. 229: 319-326.
- Nakamura, M. 2010. The Mechanism of Sex Determination in Vertebrates –Are Sex Steroids The Key-Factor? *Journal of Experimental Zoology*. 313A: 381-398.
- Pieau, C. 1996. Temperature Variation and Sex Determination in Reptiles. *BioEssays*. 18: 19-26.
- Pieau, C., Dorizzi, M. 2004. Oestrogens and Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles: All is in The Gonads. *Journal of Endocrinology* 181: 367-377.
- Sadler, TW. 2012. *Langman Embriología Médica*. 12ª Edición. Lippincott Williams & Wilkins. Pág: 246.
- Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., Crews, D. 2007. Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in The Gonad of a Species with Temperature-Dependent Sex Determination. *Developmental Dynamics* 236: 1055–1063.
- Strahl Brian, D., y Allis, C. David. 2000. The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature*. 403: 41-45.
- Torres-Maldonado, L., Moreno-Mendoza, N., Landa, A., Merchant-Larios, H. 2001. Timing of Sox9 Downregulation and Female Sex Determination in Gonads of The Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of experimental Zoology*. 290: 298-503.
- Wibbels, T., Gideon, P., Bull, J.J., Crews, D. 1993. Estrogen and Temperature Induced Medullary Cord Regression During Gonadal Differentiation in a Turtle. *Differentiation*. 53: 149-54.



William, H., Gutzke, N., Dale, B. 1988. Sensitive Periods During Embryogeny for Hormonally Induced Sex Determination in Turtles. *General and comparative Endocrinology* 71: 265-267.

Wischi, E. 1951. Gonad Development and Function Embryogenesis of the Adrenal and the Reproductive Glands. *Recent Progres in Hormone Research*. 6: 1-27.



---

## GLOSARIO

**Anticuerpo:** Proteína que interactúa en un sitio particular (epítopo) sobre un antígeno y que facilita la eliminación de éste a través de diversos mecanismos.

**Antígeno:** Cualquier sustancia que induce la producción de un anticuerpo al que se une de forma específica.

**Aromatasa:** Enzima que cataliza reacciones de oxidación de esteroides, aromatizando andrógenos y produciendo estrógenos. Se localiza en las células productoras de estrógenos presentes en la glándula adrenal, ovario, placenta, testículos, tejidos grasos y cerebro.

**5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU):** Nucleósido sintético, análogo de la timidina. Comúnmente utilizado para la detección de proliferación celular en tejidos vivos, ya que es capaz de incorporarse al Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de las células en fase de síntesis.

**Cápsula de Beem:** Molde de plástico utilizado en la inclusión de pequeñas muestras de tejidos biológicos para su posterior procesamiento de corte.

**Células de Sertoli:** Células localizadas en los túbulos seminíferos, encargadas del mantenimiento de la barrera hematotesticular, la coordinación de la espermatogénesis y la fagocitosis de los cuerpos residuales de las células espermáticas. Así como de la secreción del líquido tubular, estrógenos, inhibina y otras proteínas.

**Ciclo celular:** Serie ordenada de pasos durante los cuales la célula aumenta de tamaño, incrementa su número de componentes celulares, duplica su material genético y finalmente se divide. El ciclo se divide en dos fases: interfase ( $G_1$ , S y  $G_2$ ) y mitosis.

**Citoqueratina:** Proteína fibrosa que forma parte del grupo de los filamentos intermedios del citoesqueleto, de las células epiteliales. Su función es la organización de la estructura tridimensional de la célula.

**Colesterol:** Esterol presente en el plasma sanguíneo unido a proteínas y esterificado con ácidos grasos. Componente esencial para el mantenimiento de la integridad estructural y la fluidez de la membrana celular así como precursor de las hormonas esteroides, los ácidos biliares y la vitamina D.

**Crecimiento:** Aumento irreversible y permanente de la masa de un organismo, órgano o célula.

**Desarrollo:** Construcción progresiva y dinámica de la actividad bioquímica y fisiológica de un organismo a través del tiempo.

**Determinación sexual:** Mecanismo que involucra el conjunto de eventos moleculares que especifican el destino sexual de un organismo.

**Diferenciación sexual:** Proceso que implica la expresión de genes que conducen hacia la diferenciación morfológica y funcional de un organismo.

**Embrión:** Ser vivo en las primeras etapas de su desarrollo, posteriores a la segmentación del cigoto y anteriores al nacimiento o eclosión.





**Endócrino:** Mecanismo de señalización por el cual células secretoras especializadas, liberan una hormona hacia la sangre, alcanzan células diana que se encuentran a distancia y producen una respuesta en éstas.

**Epon:** Resina epóxica comúnmente utilizada en la inclusión de tejidos para microscopía de ultraestructura.

**Estradiol:** Hormona esteroide del grupo de los estrógenos encargada del desarrollo y mantenimiento de las características sexuales femeninas.

**Estroma:** Tejido conectivo de las glándulas.

**Gónada:** Órgano productor de células sexuales (gametos) masculinas o femeninas. En los vertebrados desempeña también una función hormonal.

**Gónada bipotencial:** Órgano reproductor morfológicamente indiferenciado y facultado para desarrollarse hacia testículo u ovario.

**Hipoplasia:** Desarrollo incompleto de un tejido u órgano.

**Histona 3 fosforilada en serina 10 (Phospho H3 ser 10):** Histona característica de los nucleosomas que conforman a la heterocromatina.

**Hormona:** Cualquier sustancia que se sintetiza y secreta por células especializadas, y que induce una respuesta específica en células diana.

**Incubación:** Período de tiempo dependiente de la temperatura en el que los huevos fecundados se desarrollan hasta el momento de la eclosión.

**Inmunofluorescencia:** Técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de determinada molécula.

**Karnovsky:** Fijador de alta osmolaridad utilizado en el procesamiento de muestras biológicas para su observación bajo microscopía electrónica.

**Mesenterio:** Bicapa de peritoneo que conecta a las vísceras con la pared del cuerpo o entre sí. Proporciona las vías para los nervios, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos además de contribuir a sostener los órganos en el abdomen.

**Ovario:** Órgano del aparato reproductor femenino productor de óvulos y secretor de estrógenos y progesterona.

**Período termosensible:** Lapso de tiempo durante el desarrollo embrionario fuera del cual la manipulación de la temperatura ya no ejerce influencia sobre el fenotipo sexual.

**Proliferación celular:** Incremento en el número de células por división celular, fundamental en la regeneración de tejidos y el correcto funcionamiento del organismo. Es un proceso característico de cada tipo celular por lo que es controlada de forma muy específica.

**Sox9:** Gen que regula la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la diferenciación testicular así como en la regulación de la transcripción de la hormona antimülleriana (AMH).



**Sry:** Gen que desencadena la vía de expresión de genes involucrados en el proceso de determinación testicular en mamíferos. Relacionado con la diferenciación de las células de Sertoli y con la proliferación de las células en las crestas genitales.

**Temperatura:** Propiedad que mide la energía cinética de las moléculas de un cuerpo.

**Temperatura pivote:** Temperatura de incubación a la cual la proporción sexual resultante en una nidada es 1:1.

**Testículo:** Órgano del aparato reproductor masculino productor de espermatozoides y testosterona.

