



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**TÍTULO DEL PROYECTO:**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE EL MECANISMO DE  
DETERMINACIÓN SEXUAL GONADAL EN EL COCODRILO DE PANTANO,  
*Crocodylus moreletii*.**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**M. en C. ADRIANA MARTÍNEZ JUÁREZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CD. MX. FEBRERO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TÍTULO DEL PROYECTO:**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE EL MECANISMO DE  
DETERMINACIÓN SEXUAL GONADAL EN EL COCODRILO DE PANTANO,  
*Crocodylus moreletii*.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**M. en C. ADRIANA MARTÍNEZ JUÁREZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX. FEBRERO 2019**

OFICIO CPCB/135/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de noviembre del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARTÍNEZ JUÁREZ ADRIANA** con número de cuenta 301220899 con la tesis titulada "EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE EL MECANISMO DE DETERMINACIÓN SEXUAL GONADAL EN EL COCODRILO DE PANTANO, *Crocodylus moreletii*", realizada bajo la dirección de la **DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA**:

Presidente: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
Vocal: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO  
Secretario: DRA. MARICELA VILLAGRAN SANTA CRUZ  
Suplente: DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO  
Suplente: DRA. ALMA LILIA ÁLVAREZ GUERRERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 5 de febrero del 2019.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA

## **Agradecimientos Institucionales**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT), con número de proyecto UNAM-DGAPA-PAPIITIN205515.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca otorgada para estudios de posgrado a nivel doctorado con número de registro: 288797/254969.

### **A mi tutora principal:**

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **A mi comité tutor:**

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dr. Horacio Merchant Larios, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## **Agradecimientos personales**

A mi *alma mater* la **Universidad Nacional Autónoma de México** por mi formación académica desde bachillerato hasta los estudios de posgrado.

A mi tutora la **Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza** por aceptarme bajo su tutoría y brindarme la oportunidad de trabajar dentro de este proyecto. Además, por su orientación en el transcurso del doctorado, ya que gracias a ello he logrado un excelente trabajo.

Al **Instituto de Investigaciones Biomédicas** de la UNAM, en especial al laboratorio A005, pues en él se elaboraron todos los experimentos presentados en esta tesis.

A la **División Académica de Ciencias Biológicas** de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su colaboración en este proyecto.

Al **Maestro en Ciencias Marco Antonio López Luna**, Profesor – Investigador de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su gran colaboración dentro de esta investigación.

A la **Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)**, por los permisos otorgados para realizar esta investigación: SGPA/DGVS/05531/16, SGPA/DGVS/3315/17, SGPA/DGVS/003085/18.



**A mí jurado para la obtención de grado de Doctora:**

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano, Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Patricia Rivas Manzano, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Alma Lilia Álvarez Guerrero, Facultad de Ciencias, UNAM.

**A mi jurado de Candidatura a Doctora en Ciencias:**

Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Patricia Rivas Manzano, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Sandra Milena Guerrero Estévez, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Nivia Rocío Antonio Rubio, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, Facultad de Ciencias, UNAM.

**Por su asesoría en el ámbito experimental:**

A la Dra. Tania Janeth Porras Gómez Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (*Western blot*, Inmunohistoquímica).

Al Técnico Académico Titular A, Maestro en Ciencias Alejandro Marmolejo Valencia Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (Microscopia de campo claro, microscopia electrónica y manejo del ultramicrotomo).

A la Dra. Nivia Rocío Antonio Rubio, Facultad de Ciencias, UNAM (RT-PCR).

A la Maestra en Ciencias Eva Mendoza Cruz, Facultad de Ciencias, UNAM (Técnicas Histológicas).

**Por su apoyo en este proyecto:**

**Servicio Social, Universidad Autónoma Metropolitana:** Maestra Cindy Crycel Tapia Solís.

**Programa de Verano Científico, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, estancia corta:** Biol. Roberto Muñoz Zapata

**Proyecto de Residencias profesionales, Instituto Tecnológico de Tijuana, estancia corta:** Ing.BQ. Abril Anais Ruiz Ruiz

**Dirección General de Divulgación de la Ciencia UNAM, en el programa de Jóvenes hacia la Investigación, estancia corta:** Estudiante de la carrera de Biología, Facultad de Ciencias UNAM, Mariana Gutiérrez García.

**A mis compañeros de laboratorio:**

Dra. Tania Janeth Porras Gómez, Biol. Iván Cabrera Campos, Biol. Gladys Molina Salinas; Dra. Claudia Olivera Tlahuel, M. en C. Eva Mendoza Cruz, Mariana Gutiérrez García, Maestra Cindy Crycel Tapia Solís, Ing. BQ. Abril Anais Ruiz Ruiz, Ing. BQ. Margarita Estefanía Meza Castro, Dra. Alma Lilia Álvarez Guerrero, Dra. Nivia Rocío Antonio Rubio, Dr. Héctor Rodríguez Madagán, M. en C. Julio Israel Guerrero Hernández, Biol. Alberto Santos Vázquez, Dra. Bárbara Moguel, Manuel Otero, Biol. Roberto Muñoz Zapata, Biol. Jonathan Salazar Morales, Carolina, Melanie Trinidad.

*Dedicada a mis padres Rosa y Antonio.*

*A mis hermanos Carlos y Antonio.*

*A mis abuelos Enedina y Roberto,*

*Luciana y Espiridión.*

*A toda mi familia:*

*tíos, tías, primos, primas,*

*sobrinos y sobrinas,*

*qué siempre están*

*en mi corazón.*

*A Tania, Mariana e Iván*

*por estos años*

*de su valiosa amistad.*

# ÍNDICE

**Lista de figuras**

**Lista de tablas**

**Abreviaturas**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

<b>I. Introducción</b>	1
1. La determinación sexual en vertebrados desde la perspectiva de la “Eco-Evo-Devo”	1
1.1 Determinación sexual en peces	5
1.2 Determinación sexual en anfibios	6
1.3 Determinación sexual en aves y mamíferos	6
1.4 Determinación sexual en reptiles	7
1.4.1 Determinación sexual genética en reptiles	7
1.4.2 Determinación sexual por temperatura en reptiles	8
1.4.2.1 Patrones de determinación sexual por temperatura en reptiles	10
1.4.2.2 Determinación sexual por temperatura en cocodrilos	13
1.4.3 Genes importantes en la determinación sexual por temperatura	16
1.4.3.1 Red genética de determinación sexual masculina	16
1.4.3.2 Red genética de determinación sexual femenina	19
1.5 Morfogénesis gonadal y diferenciación ovárica y testicular de cocodrilos	21
1.5.1 Morfología de ovarios y testículos de cocodrilos adultos	22
<b>1.6 Justificación</b>	25
<b>1.7 Hipótesis</b>	25
<b>II. Objetivo general</b>	26
<b>2.1 Objetivos particulares</b>	26
<b>III. Antecedentes</b>	27
3.1 El cocodrilo de pantano, <i>Crocodylus moreletii</i> . Clasificación taxonómica, hábitat y distribución geográfica	27
3.2 Biología de la reproducción: anidación, ovoposición, desarrollo embrionario y eclosión	36

<b>IV. Materiales y Métodos</b>	<b>37</b>
4.1 Metodología para la descripción morfológica de los embriones de <i>C. moreletii</i>	37
4.1.1 Área de estudio	37
4.1.2 Trabajo de campo: Localización y colecta de nidos	37
4.1.3 Obtención de embriones	38
4.1.4 Análisis anatómico de embriones de <i>C. moreletii</i>	38
4.2 Metodología para la caracterización histológica y molecular del desarrollo gonadal de <i>C. moreletii</i>	38
4.2.1 Localización y colecta de nidos	38
4.2.2 Incubación y obtención de embriones	39
4.2.3 Experimentos de intercambios de temperatura	39
4.2.4 Microscopía de campo claro y electrónica	40
4.2.5 Inmunofluorescencia	40
4.3 Metodología para la caracterización histológica y molecular de ovarios y testículos de <i>C. moreletii</i> jóvenes de 5 años de edad	41
4.3.1 Obtención de tejidos	41
4.3.2 Microscopía óptica y electrónica	41
4.3.3 Inmunohistoquímica	42
4.3.4 Inmunofluorescencia	43
4.3.5 Detección de actividad $\Delta 5-3\beta$ HSD	43
4.3.6 Amplificación por RT-PCR	44
4.3.7 Análisis densitométrico	45
4.3.8 Secuenciación de productos RT-PCR	46
4.3.9 Análisis de <i>Western blot</i>	46
<b>V. Resultados</b>	<b>48</b>
5.1 PARTE 1. Descripción del desarrollo embrionario del cocodrilo de pantano: <i>Crocodylus moreletii</i>	48
5.1.1 Colecta de los nidos de <i>C. moreletii</i> e incubación de los huevos	50
5.1.2 Crecimiento y desarrollo de los embriones de <i>C. moreletii</i>	51
5.1.3 Descripción anatómica de los estadios de desarrollo embrionario	53
5.1.4 PARTE 1 Discusión	74
5.1.4.1 Efecto de la temperatura de incubación sobre el desarrollo embrionario de <i>C. moreletii</i>	74

5.1.4.2 Desarrollo general de <i>C. moreletii</i>	77
5.1.4.3 Comparación del desarrollo embrionario de <i>C. moreletii</i> con otras especies de cocodrilo	77
5.1.4.4 Desarrollo de los embriones en la Laguna de las Ilusiones	78
5.1.4.5 Importancia de la elaboración de una tabla de desarrollo de <i>C. moreletii</i>	79
5.1.5 PARTE 1 Conclusiones	80
5.2 PARTE 2. Efecto de la temperatura de incubación sobre el mecanismo de determinación sexual gonadal en <i>Crocodylus moreletii</i>	81
5.2.1 Temperatura feminizante, masculinizante y periodo sensible en <i>Crocodylus moreletii</i>	82
5.2.2 Correlación entre la morfogénesis gonadal y el desarrollo de las extremidades	84
5.2.3 Histología de la gónada indiferenciada y la expresión del factor de transcripción SOX9	90
5.2.4 Histología de la gónada en diferenciación morfológica y la expresión de factor de transcripción SOX9	92
5.2.5 Histología de la gónada diferenciada en un ovario o un testículo y la expresión del factor de transcripción SOX9	94
5.2.6 Histología de las células germinales en la gónada y la expresión de la RNA helicasa VASA	94
5.2.7 PARTE 2. Discusión	98
5.2.7.1 La temperatura de incubación y la determinación sexual por temperatura	98
5.2.7.2 Periodos indeterminado, sensible a la temperatura y de diferenciación sexual gonadal	101
5.2.7.3 Histología del desarrollo gonadal	103
5.2.7.4 Importancia de la correlación del estadio de desarrollo embrionario con el desarrollo gonadal	104
5.2.8 PARTE 2. Conclusiones	105
5.3 PARTE 3. Expresión de los genes <i>Sox9</i> , <i>Foxl2</i> , <i>Vasa</i> y <i>TRPV4</i> en ovarios y testículos del cocodrilo de pantano, <i>Crocodylus moreletii</i>	107
5.3.1 Estancia en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco	108
5.3.2 Obtención de muestras de sangre, ovarios y testículos	110

5.3.3 Histología del ovario de <i>Crocodylus moreletii</i> jóvenes de 5 años de edad	112
5.3.4 Expresión de los factores de transcripción SOX9, FOXL2, VASA y TRPV4 en el ovario de <i>Crocodylus moreletii</i> joven de 5 años de edad	113
5.3.5 Actividad de la $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD en el ovario de <i>C. moreletii</i>	116
5.3.6 Histología del testículo de machos de <i>Crocodylus moreletii</i> jóvenes de 5 años de edad	118
5.3.7 Expresión de los factores de transcripción SOX9, FOXL2, VASA y TRPV4 en el testículo de <i>C. moreletii</i> de 5 años de edad	119
5.3.8 Actividad de la $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD en el testículo de <i>C. moreletii</i>	120
5.3.9 Semicuantificación del mRNA para los genes <i>Foxl2</i> , <i>Sox9</i> , <i>Vasa</i> y <i>Trpv4</i> en hembras y machos de <i>Crocodylus moreletii</i>	120
5.3.10 Cuantificación de los niveles de proteína de los factores de transcripción SOX9, FOXL2, VASA y <i>TRPV4</i> en hembras y machos de <i>Crocodylus moreletii</i>	122
5.3.11 PARTE 3. Discusión	126
5.3.11.1 La madurez sexual de <i>Crocodylus moreletii</i>	126
5.3.11.2 Expresión de los genes <i>Sox9</i> , <i>Foxl2</i> y <i>Vasa</i>	126
5.3.11.3 Expresión del canal iónico TRPV4	130
5.3.11.4 Actividad de la $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD e histología de ovario y testículo	131
5.3.12 PARTE 3. Conclusión	133
<b>VI. Discusión general</b>	134
<b>VII. Conclusión general</b>	138
<b>VIII. Referencias</b>	139
<b>IX. Anexos</b>	158

## Lista de Figuras

Figura 1. Patrones de determinación sexual por temperatura en reptiles	12
Figura 2. Filograma de máxima verosimilitud (ML) para <i>Crocodylus</i> basado en secuencias de DNA mt	27
Figura 3. Cocodrilo de pantano o Morelet	28
Figura 4. Clasificación taxonómica del cocodrilo de pantano o Morelet, <i>Crocodylus moreletii</i>	29
Figura 5. Características morfológicas de <i>C. moreletii</i>	30
Figura 6. Registros recientes de <i>Crocodylus moreletii</i> en México	31
Figura 7. Área de mayor probabilidad de existencia para <i>Crocodylus moreletii</i> en México	33
Figura 8. Laguna de las Ilusiones Villahermosa, Tabasco	34
Figura 9. Temperatura feminizante (30°C) y masculinizante (33°C) de <i>Crocodylus moreletii</i>	49
Figura 10. Cuantificación del crecimiento de los embriones de <i>Crocodylus moreletii</i> en una temperatura feminizante 30°C y una masculinizante 33°C	51
Figura 11. Estadios de desarrollo embrionario 7 y 9 de <i>C. moreletii</i>	54
Figura 12. Estadios de desarrollo embrionario 10 y 11 de <i>C. moreletii</i>	56
Figura 13. Estadios de desarrollo embrionario 12 y 13 de <i>C. moreletii</i>	58
Figura 14. Estadios de desarrollo embrionario 14 y 15 de <i>C. moreletii</i>	59
Figura 15. Estadios de desarrollo embrionario 16 y 17 de <i>C. moreletii</i>	60
Figura 16. Estadios de desarrollo embrionario 18 y 19 de <i>C. moreletii</i>	63
Figura 17. Estadios de desarrollo embrionario 20 y 21 de <i>C. moreletii</i>	65
Figura 18. Estadios de desarrollo embrionario 22 y 23 de <i>C. moreletii</i>	66
Figura 19. Estadios de desarrollo embrionario 24 y 25 de <i>C. moreletii</i>	68
Figura 20. Estadios de desarrollo embrionario 26 y 27 de <i>C. moreletii</i>	69
Figura 21. Estadio de desarrollo embrionario 28 de <i>C. moreletii</i>	71
Figura 22. Estadio de desarrollo embrionario 26 de <i>C. moreletii</i>	73
Figura 23. Morfogénesis de la extremidad anterior derecha	83



Figura 24. Establecimiento de la cresta genital en <i>C. moreletii</i>	85
Figura 25. Blastema gonadal del estadio 14 al 17 en <i>C. moreletii</i>	86
Figura 26. Gónada indiferenciada en <i>C. moreletii</i>	87
Figura 27. Morfogénesis o diferenciación gonadal en <i>C. moreletii</i>	88
Figura 28. Ovario y testículo en <i>C. moreletii</i>	89
Figura 29. Morfogénesis gonadal y la expresión del factor de transcripción SOX9 de embriones de <i>C. moreletii</i> incubados en una temperatura de 30°C	91
Figura 30. Morfogénesis gonadal y la expresión del factor de transcripción SOX9 en embriones de <i>C. moreletii</i> incubados en una temperatura de 33°C	93
Figura 31. Morfogénesis gonadal y la expresión de la proteína VASA de embriones de <i>C. moreletii</i> incubados a temperatura de 30°C	95
Figura 32. Morfogénesis gonadal y la expresión de la proteína VASA de embriones de <i>C. moreletii</i> incubados a temperatura de 33°C	97
Figura 33. UMA del Centro de Investigaciones para la Conservación de Especies Amenazadas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco	104
Figura 34. Los cocodrilos que habitan en la UMA	110
Figura 35. Organismos donados por la UMA	111
Figura 36. Disección de testículos y ovarios de <i>C. moreletii</i>	112
Figura 37. Corte transversal del ovario de hembras de <i>C. moreletii</i> con 5 años de edad	114
Figura 38. Expresión del factor de transcripción SOX9 y VASA en hembras <i>C. moreletii</i> jóvenes con 5 años de edad	115
Figura 39. Expresión del factor de transcripción FOXL2 en el ovario y testículo de individuos jóvenes de <i>C. moreletii</i>	116
Figura 40. Expresión del canal iónico TRPV4 en el ovario de hembras de <i>C. moreletii</i> de cinco años de edad	117
Figura 41. Detección de la actividad de la $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD en ovarios y testículos de <i>C. moreletii</i> de 5 años de edad	118

Figura 42. Corte transversal del testículo de machos de <i>C. moreletii</i> de 5 años	119
Figura 43. Expresión del factor de transcripción SOX9 y VASA en machos de <i>C. moreletii</i> jóvenes con 5 años de edad	121
Figura 44. Expresión del canal iónico TRPV4 en el testículo de machos jóvenes de <i>C. moreletii</i>	123
Figura 45. Amplificación de los genes <i>Sox9</i> , <i>Vasa</i> , <i>Foxl2</i> y <i>TRPV4</i>	124
Figura 46. <i>Western blot</i> de la expresión de los factores de transcripción SOX9, VASA, FOXL2 y el canal iónico TRPV4 en el testículo y ovario de <i>C. moreletii</i>	128

## Lista de tablas

Tabla 1. Elementos regulatorios en la determinación sexual / compensación dosis	2
Tabla 2. Especies de cocodrilos estudiadas con determinación sexual por temperatura	14
Tabla 3. Localidades con presencia de <i>Crocodylus moreletii</i>	32
Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos y temperaturas de alineación usadas para el RT-PCR	45
Tabla 5. Total de huevos de todos los nidos de <i>Crocodylus moreletii</i> incubados a 30°C y 33°C	52
Tabla 6. Días de desarrollo embrionario de <i>Crocodylus moreletii</i>	89
Tabla 7. Sexo de <i>Crocodylus moreletii</i> con distintos tratamientos de incubación de huevos	84
Tabla 8. Longitud y peso de los cocodrilos <i>C. moreletii</i> jóvenes	111
Tabla 9. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas de la amplificación de <i>Sox9</i> , <i>Vasa</i> y <i>Foxl2</i> de <i>Crocodylus moreletii</i>	125

## Abreviaturas

**Amh**, Hormona Anti Mülleriana (Del inglés: *Anti-Müllerian hormone*).

**AR**, Receptor de andrógenos (Del inglés: *Androgen receptor*)

**cAMP**, Adenosina monofosfato cíclico (Del inglés: *Cyclic adenosine monophosphate*)

**Ca<sup>2+</sup>**, Calcio

**CamKIV**, Proteína moduladora de calcio KIV (Del inglés: *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV*)

**Cirbp**, Proteína de unión a RNA inducible por frío (Del inglés: *Cold-inducible RNA-binding protein*)

**CpG**, Guanina y Citosina separados por solo un fosfato en dirección 5' → 3' (Del inglés: *Guanine and cytosine separated by only one phosphate in the direction 5' → 3'*)

**CREB**, proteína de enlace y de respuesta a cAMP (Del inglés: *cAMP response element-binding protein*)

**Cyp191a**, Citocromo P450 191 Aromatasa (Del inglés: *Cytochrome P450 191 Aromatase*)

**DST**, Determinación sexual por temperatura

**DHT**, 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona (Del inglés: *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone*)

**Dmtr1**, Factor de transcripción relacionado con Doblesex and mab-3 (Del inglés: *Doblesex and mab-3 related transcription factor 1*)

**DSA**, Determinación Sexual Ambiental

**E2**, 17 $\beta$ -Estradiol (Del inglés: *17 $\beta$ - Estradiol*)

**Eco-Evo-Devo**, Ecología–Evolutiva-Desarrollo

**ER2 $\alpha$** , Receptor de estrógeno  $\alpha$  (Del inglés: *Estrogen receptors  $\alpha$* )

**Er $\beta$** , Receptor de estrógeno  $\beta$  (Del inglés: *Estrogen receptors  $\beta$* )

**ERE**, Elementos de respuesta a estrógenos (Del inglés: *estrogen response elements*)

**FoxI2**, Factor de transcripción Forkhead caja L2 (Del inglés: *Transcription factor Forkhead box L2*)

**G-A-M**, Complejo Gónada-Adrenal-Mesonéfricos

**DNA**, Ácido desoxirribonucleico (Del inglés: *Deoxyribonucleic acid*)

**cDNA**, Ácido desoxirribonucleico (Del inglés: *complementary DNA*)

**DSG**, Determinación sexual genética

**5-3-β-HSD**, Enzima 5-3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Del inglés: *5-3-β-hydroxysteroid dehydrogenase*)

**HMH**, Región Hipermetilada de Macho (Del inglés: *Male Hypermethylated Region*)

**KDM6B**, Demetilasa de lisina 6B (Del inglés: *Lysine demethylase 6B*)

**H3K27**, Histona H3 (Del inglés: *Histone H3*)

**HSP27**, Proteína de choque térmico P27 (Del inglés: *Heat shock protein 27*)

**HSP70A**, Proteína de choque térmico 70A (Del inglés: *Heat shock protein 70A*)

**HSP90α**, Proteína de choque térmico 90α (Del inglés: *Heat shock protein 90α*)

**ncEx1**, Exón no codificante 1 (Del inglés: *non-coding Exon 1*)

**PKC**, Proteína cinasa C (Del inglés: *Protein kinase C*)

**PKA**, Proteína cinasa A (Del inglés: *Protein kinase A*)

**PST**, Periodo sensible a la temperatura (Del inglés: *Temperature sensitive period*)

**RNA**, ácido ribonucleico (Del inglés: *Ribonucleic acid*)

**mRNA**, RNA mensajero (Del inglés: *Messenger RNA*)

**Rspo1**, gen *R-spondin-1* (Del inglés: *gene R-spondin-1*)

**Sf1**, Factor de empalme 1 (Del inglés: *Splicing-factor-1 transcription factor*)

**Sox9**, Región Y determinante del sexo caja 9 (Del inglés: *SRY (Sex determining region Y)-box 9*)

**Sox8**, Región Y determinante del sexo caja 8 (Del inglés: *SRY (Sex determining region Y)-box 8*)

**Sry**, Proteína de la Región Y determinante del sexo (Del inglés: *Sex-determining región Y proteína*)

**TF**, Temperatura feminizante

**TM**, Temperatura masculinizante

**TP**, Temperatura pivote

**TREK-1**, Canal iónico de dominio de dos poros de potasio (Del inglés: *Two pore domain potassium channel*)

**TRP**, Receptor canal de potencial transitorio (Del inglés: *Transient receptor potential channel*)

**TRPM5**, Receptor canal de potencial transitorio, melastatina 5; (Del inglés: *Transient receptor potential channel melastatina 5*)

**TRPV4**, Receptor canal catiónico de potencial transitorio, subfamilia V, miembro 4 (Del inglés: *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*)

**TSS**, Sitio de inicio de la transcripción (Del inglés: *Transcription start site*)

**Vasa**, RNA helicasa Vasa caja-DEAD 3, (Del inglés: *DEAD-box3 RNA helicase Vasa*)

**WNT**, Proteína *Wingless/ integrated* (Del inglés: *Wingless/ integrated protein*)

**Wt1**, Tumor de *Wilms-1* (Del inglés: *Wilms tumor-1*)

## RESUMEN

El cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii* es una especie de cocodrilo mexicana que habita principalmente en el golfo de México, al igual que todas las especies de cocodrilos que existen en el planeta presenta determinación sexual por temperatura. Hasta el momento se conoce muy poco sobre su biología de la reproducción, anidación y desarrollo embrionario de esta especie.

El generar información de este tipo es urgente porque es una especie cuyas poblaciones se han visto afectadas durante los últimos años en el estado de Tabasco. Es en Villahermosa, concretamente en la localidad de la Laguna de las Ilusiones, donde el sexo de las crías que nacen se sesgan hacia machos, además de que se está incrementando la mortalidad de las mismas y de embriones en desarrollo *in situ*, pues los nidos están expuestos a la depredación y destrucción; así como, a contaminantes ambientales. También debido a la reducción de sus hábitats naturales se están incrementando las poblaciones híbridas entre *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*.

Lo anterior es grave pues es una especie que estuvo en peligro de extinción en las décadas de los 50 y 60, pero a partir de los años 70's con el esfuerzo de los ecólogos se lograron reestablecer las poblaciones de *C. moreletii* en este estado y en la actualidad se encuentra sujeta a protección especial bajo la norma 059-SEMARNAT.

En esta tesis de doctorado se realizó un amplio estudio sobre muchos aspectos que se desconocen de esta especie y que son fundamentales para poder entender su biología reproductiva, madurez sexual, anidación y desarrollo. Los cuales se espera que puedan ser de utilidad a los ecólogos, para generar programas más completos para su conservación. Además, de ayudar en futuros estudios sobre la reproducción de esta especie y para conocer si los híbridos que se han generado naturalmente con la especie *Crocodylus acutus*, son fértiles y capaces de reproducirse, o en su caso, que sean estériles.

Esta tesis se divide en tres temas fundamentales y sus resultados. El primero de ellos trata sobre la descripción del desarrollo embrionario del cocodrilo de pantano, donde encontramos que los embriones incubados a 33°C se desarrollan más rápido que los incubados a 30°C, así mismo se describieron las características anatómicas de los embriones incubados en cada temperatura. El segundo tema habla sobre la determinación

sexual por temperatura de esta especie de cocodrilo, donde se caracterizó la temperatura feminizante que fue 30°C y la masculinizante 33°C, se realizó la descripción histológica del desarrollo gonadal de embriones incubados en cada temperatura (feminizante o masculinizante). Además, se demostró que la expresión del gen *Sox9* es dimórfica a partir del estadio 16 de desarrollo embrionario, porque su expresión es positiva a lo largo de la morfogénesis testicular durante la incubación en temperatura masculinizante, pero no se expresa en la morfogénesis ovárica. También se determinó el periodo sensible a la temperatura, correlacionándolo con todo el desarrollo embrionario del mismo. Finalmente, el último tema habla sobre la caracterización histológica del ovario y testículo de organismos jóvenes inmaduros sexualmente. Lo anterior se debe a que encontramos que los ovocitos estaban en previtelogénesis I, II y III, lo cual quiere decir que el ovario ya ha comenzado su preparación para alcanzar su madurez y capacidad reproductiva en un futuro. En el caso del testículo encontramos una morfología de cordones seminíferos similar a las crías, a pesar de que las muestras fueron colectadas en época reproductiva (mes de mayo). También encontramos la expresión del gen *Sox9* en machos en los núcleos de las células de Sertoli, sorprendentemente las hembras lo expresan en núcleos de las células foliculares. A su vez observamos la expresión del gen *Vasa* en espermatogonias, ovogonias y ovocitos de cocodrilos jóvenes. Como se esperaba, la expresión de *Foxl2* la encontramos únicamente en hembras. Por último, analizamos la expresión del canal iónico TRPV4 en la membrana de las células de Sertoli y de células foliculares.



## ABSTRACT

Morelet's crocodile *Crocodylus moreletii* is a species of Mexican crocodile that lives mainly in the Gulf of Mexico, just as all the crocodile species that exist on the planet present temperature-dependent sex determination. So far very little is known about their biology of reproduction, nesting and embryonic development of this species.

Generating information of this type is urgent because it is a species whose populations have been affected during the last years in the state of Tabasco. It is in Villahermosa, specifically in the locality of the Laguna de las Ilusiones, where the sex of the offspring that hatch are skewed towards males, in addition to the fact that the mortality of the same and of embryos in development *in situ* is increasing, since the nests are exposed to predation and destruction; as well as environmental contaminants. Also due to the reduction of their natural habitats hybrid populations between *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* are increasing.

The previous is serious because it is a species that was in danger of extinction in the decades of the 50s and 60s, but from the 70's with the effort of ecologists were able to reestablish the populations of *C. moreletii* in this state and currently it is subject to special protection under the 059-SEMARNAT standard.

In this PhD thesis, a wide-ranging study was carried out on many aspects that are unknown to this species and that are fundamental to understanding their reproductive biology, sexual maturity, nesting and development. Which is expected to be useful to ecologists, to generate more comprehensive programs for their conservation. In addition, to help in future studies on the reproduction of this species and to know if the hybrids that have been naturally generated with the species *Crocodylus acutus*, are fertile and capable of reproducing, or in their case, that they are sterile.

This thesis is divided into three fundamental themes and their results. The first of them deals with the description of the embryonic development of the Morelete's crocodile, where we find that the embryos incubated at 33°C develop faster than those incubated at 30°C, likewise we described the anatomical characteristics of the embryos incubated in every temperature. The second topic talks about the temperature-dependent sex determination of this crocodile species, where the feminizing temperature was characterized that was 30°C and the masculinizing 33°C, the histological description of the gonadal development of

embryos incubated in each temperature was made (feminizing or masculinizing). In addition, it was demonstrated that expression of the *Sox9* gene is dimorphic from stage 16 of embryonic development, because its expression is positive throughout the testicular morphogenesis during incubation in masculinizing temperature, but it is not expressed in ovarian morphogenesis. The period sensitive to temperature was also determined, correlating it with all the embryonic development of the crocodile. Finally, the last topic talks about the histological characterization of the ovary and testis of sexually immature young organisms. This is because we found that the oocytes were in previtellogenesis I, II and III, which means that the ovary has already begun its preparation to reach its maturity and reproductive capacity in the future. In the case of the testicle we found a morphology of seminiferous cords similar to the offspring, although the samples were collected during the reproductive season (month of May). We also found the expression of the *Sox9* gene in males in the nuclei of the Sertoli cells, surprisingly the females express it in nuclei of the follicular cells. In turn, we observed the expression of the *Vasa* gene in spermatogonias, oogonias and oocytes of young crocodiles. As expected, the expression of *Foxl2* is found only in females. Finally, we analyzed the expression of the ion channel *TRPV4* in the membrane of Sertoli cells and follicular cells.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. La determinación sexual en vertebrados desde la perspectiva de la “Eco-Evo-Devo”.

Uno de los principales y sorprendentes procesos de la historia de vida en el desarrollo de un individuo es la determinación sexual, la cual es un proceso muy antiguo en la evolución de los seres vivos, pues se reconocen machos y hembras en diversos organismos. Por ejemplo: dentro del Fila Animalia estos dos tipos de sexos se encuentran en las poblaciones de distintas especies y abarcan grupos que incluyen desde los invertebrados (corales, anélidos e insectos) hasta los vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) (Cutting *et al.* 2013; Gamble *et al.* 2012; Trukhina *et al.* 2013).

Algo muy interesante del Fila Animalia es que además de contar con dos sexos, existen una gran diversidad de estrategias y mecanismos para determinarlos y formarlos. Lo anterior es el resultado de la evolución biológica de los organismos a lo largo de millones de años, pues gracias a la plasticidad adaptativa de los individuos en las poblaciones, se fijó una red genética (de la cual se hablará más adelante), que puede ser encendida mediante diversos estímulos e incluso modificarse durante la morfogenésis de un ovario o de un testículo en el desarrollo un individuo (por ejemplo: reversión sexual) (Charnov and Bull 1977; Bull 1985, Aubin Horth y Renn 2009; Landry *et al.* 2014).

Que se seleccionaran todas estas estrategias involucró varios procesos muy complejos, pues este tipo de adaptaciones en los organismos son el reflejo de su estilo e historia de vida, de la colonización de distintos ambientes, así como de las diferentes tácticas de sobrevivencia y reproducción, que han jugado un papel fundamental en la adecuación y perpetuación de su especie a través del tiempo en el planeta. En pocas palabras, son el resultado de la estrecha interacción entre el ambiente y la expresión de genes, de la fisiología, de la morfología y la plasticidad del genotipo, durante el desarrollo de un individuo en una población. Es por ello que para comprender los mecanismos de este fenómeno, se requiere del punto de vista integrativo de la “ecología evolutiva del desarrollo” (Aubin Horth y Renn 2009; Matsumoto *et al.* 2012; Landry *et al.* 2014).

Entrando ya de manera formal al tema de la determinación sexual, se define la existencia de dos grandes vertientes: la determinación sexual genética dada por

cromosomas sexuales (DSG) y la determinación sexual ambiental (DSA), donde factores ambientales influyen en el fenotipo del sexo de un individuo (Shoemaker *et al.* 2009; Trukhina *et al.* 2013). Esta última será en la que profundizaremos más adelante, pues los cocodrilos presentan este mecanismo.

Otro punto interesante dentro de la determinación sexual, es que se han descrito los estados de la formación del sexo de un individuo. En el caso de la determinación sexual genética (DSG) son tres: primero ocurre la predeterminación cromosomal, donde cromosomas sexuales heterogámicos determinan el sexo justo al momento de la fecundación. Después ocurre la determinación sexual, donde un factor heredado, es decir un gen, inicia su expresión para de esta forma comprometer el desarrollo y la diferenciación hacia un ovario o un testículo, según sea el caso del gen que determina el sexo (Tabla 1). Finalmente, ocurre la diferenciación sexual, donde procesos celulares altamente organizados realizan la morfogénesis de la gónada bipotencial hacia un ovario o un testículo, lo cual va de acuerdo a la expresión de los genes del cromosoma sexual (Angelopoulou *et al.* 2012; Trukhina *et al.* 2013; Capel *et al.* 2017).

**Tabla 1. Elementos regulatorios en la determinación sexual / compensación dosis.**

Especies	Anélidos	Insectos	Reptiles	Anfibios	Peces	Aves	Mamíferos
<b>Epigenética</b>	Desconocido	Splicing alternativo	KDM68, <i>Dmtr1</i> , <i>Sox9</i> , <i>Foxl2</i>	Splicing alternativo	<i>Sry</i>	Región hipermetilada HMH	Hipermetilación de <i>Sry</i>
<b>Determinación sexual primaria</b>	Celular	Todos los tejidos	Gónada	Gónada	Gónada	Todos los tejidos	Gónada
<b>Papel de los esteroides</b>	No claro	No claro	Determinación sexual	Diferenciación sexual	Diferenciación sexual	Diferenciación sexual	Diferenciación sexual
<b>Papel de la temperatura</b>	No claro	DST (raro)	DST	DST	DST	Ninguno	Ninguno
<b>Cromosomas sexuales</b>	XW	XY ZZ/ZW	XX/XY ZZ/ZW Ninguno	ZZ/ZW	XX/XY ZZ/ZW	ZZ/ZW	XX/XY
<b>Genes que determinan el sexo</b>	<i>her-1</i> , <i>fem</i> , <i>tra</i>	<i>Sxl</i>	Desconocidos* <i>Dmtr1</i> ( <i>Trachemys scripta elegans</i> )	<i>Dm-w</i>	<i>Dm-y</i>	<i>Dmtr1</i>	<i>Sry</i>

La mayoría de los elementos de los mecanismos de determinación sexual a través del reino animal, donde grandes similitudes son registradas entre especies distantes. DST (determinación sexual por temperatura). \* Desconocidos para los otros reptiles que tienen un patrón de DST distinto al de las tortugas, ya que puede ser un gen diferente o el mismo. Modificado de: Angelopoulou *et al.* 2012.

En el caso de la determinación sexual ambiental, se reconocen dos estados en la formación del sexo de un individuo. En el primero la gónada bipotencial es estimulada por un factor ambiental, ya sea biótico o abiótico, dando inicio a la determinación sexual del individuo, gracias a que se enciende al gen maestro que compromete el desarrollo de la gónada bipotencial hacia un ovario o un testículo. El segundo se lleva a cabo después de que se enciende este gen, conduciendo a que ocurran todos los procesos celulares involucrados en la diferenciación sexual y morfogénesis gonadal (Shoemaker *et al.* 2009; Trukhina *et al.* 2013; Capel *et al.* 2017).

De tal forma dentro de los grupos taxonómicos de los vertebrados: los peces, anfibios, aves y mamíferos, así como algunos reptiles, presentan la determinación sexual genética y los dos sistemas que se han descrito son el de macho heterogamético XY (mamíferos) y hembra heterogamética ZW (serpientes, aves). De manera interesante ambos sistemas genéticos se encuentran en peces, anfibios y en reptiles como las lagartijas, Tabla 1 (Warner 2011; Angelopoulou *et al.* 2012; Trukhina *et al.* 2013; Capel *et al.* 2017).

Por otro lado los mecanismos de determinación sexual ambiental están presentes en los peces, anfibios y reptiles. Estos involucran distintos factores abióticos como la temperatura y el pH; o sociales como la cantidad de hembras o machos en una población (Trukhina *et al.* 2013).

Por lo que de estas dos vertientes que existen en la determinación sexual, la DSG y la DSA, surgen varias interrogantes sobre este tema, pues los biólogos se preguntan principalmente sobre cómo fue que surgieron en el transcurso de la evolución estos mecanismos en el desarrollo (Charnov and Bull 1977; Bull 1985; Pezaro *et al.* 2017). Seguramente es una de las preguntas más difíciles y apasionantes de contestar, por diversas razones, pues existen varios genes, transcritos, proteínas, hormonas, que en conjunto están involucrados en vías de señalización celular endocrina, que brindan a la gónada indiferenciada la posibilidad de regular las decisiones en el desarrollo, es decir, su determinación y destino, hacia un ovario o un testículo. Además, todo este proceso no se puede separar de la influencia que tiene el ambiente interno y externo de un embrión, pues la plasticidad surge de la compleja interacción entre el ambiente y el genoma (Gilbert 2001; Landry *et al.* 2014).

En este sentido en la DST encontramos una forma particular de plasticidad denominada polifenismo (Abouheif *et al.* 2002), que es la habilidad del mismo genoma para producir dos o más fenotipos alternativos (ovario o testículo), en una sola población en respuesta a un estímulo ambiental, tal como la temperatura o nutrición (Abouheif *et al.* 2002;

Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012). Además de igual manera que la DSG, la DST es un fenómeno en el que se pueden observar ejemplos claros de cómo influyen en el desarrollo de un fenotipo los mecanismos de plasticidad y su relación entre ellos, en lo que se denomina la jerarquía de plasticidades, es decir: la plasticidad genética, la plasticidad epigenética, la arquitectura genética, la plasticidad en los niveles expresión de RNA y proteínas, la plasticidad endocrina, la plasticidad fisiológica y la plasticidad en el desarrollo (Landry *et al.* 2014).

De modo que durante la evolución de las estrategias de la determinación sexual, la plasticidad en el desarrollo embrionario, específicamente en la gónada bipotencial, ha jugado un papel sumamente importante pues cambios evolutivos o mutaciones en los componentes que regulan la plasticidad, seguramente han facilitado la diversidad de estrategias para la expresión de dos fenotipos alternativos (ovario o testículo) y ante esta gran diversidad de vías estratégicas y factores que determinan el sexo de los individuos, se seleccionaron positivamente ciertos mecanismos que favorecen la adecuación y sobrevivencia de los embriones, mediante selección natural o por algún otro mecanismo de alguna fuerza evolutiva (Bull 1985; Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012; Landry *et al.* 2014).

De tal forma el ambiente al que están expuestos los organismos durante el desarrollo, resulta ser una fuente inductora del genotipo y de variación fenotípica, pero lo anterior no es específico únicamente de la morfogénesis de un ovario o un testículo, sino también se puede observar en múltiples niveles de organización biológica; por ejemplo, la adaptación de una misma especie a distintos entornos ecológicos (Matzkin *et al.* 2014) o el efecto de la contaminación en la sobrevivencia de los individuos de una población (Shapiro *et al.* 2014). Además el desarrollo actúa como un regulador que puede enmascarar, liberar o crear nuevas combinaciones de variación, que en el caso de la determinación sexual, tiene que ver con los distintos sistemas cromosomales para determinar machos y hembras, o bien, con los distintos factores o genes que fueron seleccionados en el trascurso de la evolución y de los cuales derivan los distintos mecanismos de determinación sexual primaria (Bull 1985; Landry *et al.* 2014; Pezaro *et al.* 2017).

A continuación se describirá de manera breve los puntos más importantes en la determinación sexual de los grupos de los vertebrados.

## 1.1 Determinación sexual en peces

Los peces teleósteos cuentan con aproximadamente cerca de 30, 000 especies y en ellos se ha caracterizado gonocorismo sincrónico, hermafroditismo secuencial o reproducción unisexual y el sexo como se mencionó anteriormente es determinado genéticamente o por factores ambientales (Trukhina et al. 2013).

Se conoce la excepción de algunas especies unisexuales como los mollies (*Poecilia formosa*). En 7 órdenes incluidos en 27 familias de las 448 familias de peces, se ha encontrado hermafroditismo secuencial (cambio de sexo) principalmente en los organismos que habitan nichos como arrecifes de coral. En estos peces, la rediferenciación de la gónada se observó durante los cambios que ocurren en la edad adulta (Trukhina et al. 2013).

La familia de peces lábridos (Labridae) son el mayor grupo de especies con cambio de sexo, los individuos de estas especies inicialmente maduran como machos o hembras temprano en el desarrollo. Posteriormente ocurre el cambio de sexo de protándrico a protogineo o viceversa. Estos cambios de sexo pasan una vez en el ciclo de vida. También hay determinación sexual genética o mediante los cromosomas sexuales. Tales como el sistema XX/XY y ZZ/ZW, además presentan un inusual sistema de determinación sexual WXZ descrito en el pez espada (Trukhina et al. 2013).

Dentro de este grupo existe una gran plasticidad en los mecanismos de determinación sexual, sobre todo cuando el ambiente influye en los mismos. Lo anterior ocurre gracias a la gran plasticidad que conservan las células germinales y somáticas, durante toda la vida de un individuo. Específicamente muchos de los cambios de sexo (reversión sexual), tienen que ver con el control de la actividad de la enzima *Cyp191a* aromatasa, pues la señalización por hormonas esteroideas como los estrógenos y testosterona, regulan procesos morfogenéticos durante el desarrollo. Además, resulta muy interesante que existen muchas formas de regular estas vías de señalización (Trukhina et al. 2013). Por ejemplo, en la especie de pez hermafrodita *Gobiodon erythrospilus* han demostrado que la manipulación experimental de los niveles de estrógenos a través de la vía de la aromatasa induce el cambio de sexo en adultos. Por lo tanto, la enzima aromatasa participa en una vía enzimática que regula la diferenciación sexual tanto femenina como masculina, y puede ser la enzima clave que transduce las señales ambientales, incluidas las sociales, en la diferenciación funcional del sexo en especies con determinación sexual ambiental (Kroon et al. 2005).

## 1.2 Determinación sexual en anfibios

Los anfibios tienen dos sistemas de cromosomas sexuales: uno con machos heterogaméticos (XX/XY) y otro con hembras heterogaméticas (ZZ/ZW). La mayoría de los urodelos (Caudata, salamandras) tienen el sistema XX/XY. Para 63 especies de las 1500 especies con determinación sexual, sólo 20 del número total tienen cromosomas sexuales diferentes. Hay machos heterogaméticos en las especies ancestrales de sapos *Leippelma hamiltoni* y *L. hochstertteri* (Trukhina *et al.* 2013).

Los modelos de diferenciación sexual en anfibios pueden ser divididos en tres tipos: 1) el desarrollo directo de una gónada indiferenciada en un testículo o en un ovario, 2) desarrollo de la gónada en ovario o testículo mediante la aparición posterior del ovario. 3) semidiferenciación la cual es una fase en el desarrollo en los testículos de intersexos. La mayoría de los anfibios no exhiben cromosomas sexuales morfológicamente distinguibles. En la rana rugosa, el cromosoma X y W y también los cromosomas Y y Z son casi idénticos entre sí, según su morfología así como sus patrones de replicación y bandeo respectivamente. Durante un largo tiempo los genes de determinación sexual en anfibios no habían sido descritos. Sin embargo, ahora proponen al gen *Dm-w* como el gen candidato en *Xenopus leavis* aunque el gen blanco río abajo aún se desconoce. Lo anterior deriva de observaciones de cuando *Dm-w* es introducido en ovocitos ZZ sin fertilizar induciendo la generación de machos transgénicos con polos en el testículo que forman ovarios (Trukhina *et al.* 2013).

## 1.3 Determinación sexual en aves y mamíferos

Se sugiere que hay alrededor de unas 18000 especies de aves aunque se han descrito unas 9100 especies y de mamíferos existen cerca de 5487 especies. Estos grupos de vertebrados tienen un mecanismo de determinación sexual genético mediante cromosomas sexuales heterogaméticos; el sistema ZZ/ZW en aves y el sistema XX/XY para los mamíferos. En aves el gen *Dmtr1* determina el sexo y se piensa que zonas específicas en el cromosoma Z de *Gallus gallus* (pollo), como la región MHM, exhiben una compensación de dosis regional en la determinación sexual de un macho (Melamed *et al.* 2007; Wolf *et al.* 2011; Adolfsson *et al.* 2013) y es regulada mediante un mecanismo epigenético de hipermetilación (Teranishi *et al.* 2001).

En caso de los mamíferos el gen *Sry* es el que determina el sexo, este gen se encuentra en una región específica del cromosoma Y (el brazo corto) y evolucionó a partir del gen *Sox3* (Graves 2013). Codifica una proteína maestra que inicia la diferenciación de los



testículos y su expresión está restringida a células somáticas gonadales a los 10.5-12.5 días después del coito (dpc) en el ratón. En un estudio sobre la región 5' del gen *Sry* encontraron que estaba hipermetilada en embriones de 8.5 dpc que no expresan este gen, pero estaba hipometilada en la gónada a los 11.5 dpc en embriones que si expresan este gen. Por lo tanto, recientemente se ha propuesto que la expresión del gen *Sry*, está bajo el control de un mecanismo epigenético mediado por la metilación del DNA (Nishino *et al.* 2004).

## **1.4 Determinación sexual en reptiles**

Los reptiles son clasificados comúnmente en dos categorías: la primera se refiere a las especies que se determinan sexualmente mediante factores genéticos y la otra manera hace mención de las especies que presentan determinación sexual por temperatura. Por lo que este grupo al igual que otros vertebrados como peces y anfibios (mencionados anteriormente), cuentan con las dos grandes categorías de determinación sexual (DSG y DSA) que se definieron previamente. A continuación se describirá brevemente la DSG en reptiles, pero también se hablará de la DST como una forma de DSA y se profundizará en el tema.

### **1.4.1 Determinación sexual genética en reptiles**

Este tipo de mecanismo depende de factores genéticos que se encuentran en los cromosomas sexuales, estos últimos son diferentes a los cromosomas autosómicos en forma, talla y lo más importante en el contenido genético. Algo interesante sobre los cromosomas sexuales de reptiles, es que en ocasiones los cariotipos de las distintas especies no muestran evidencia de la existencia de una morfología heteromorfa, esto posiblemente tiene que ver con que han tenido muy pocos cambios de su forma ancestral a través de la evolución. Además, el grado de diferenciación de los cromosomas sexuales de los reptiles, presenta diferentes estados entre las transiciones evolutivas entre los sistemas homomorficos y heteromorficos (Warner 2011).

Pero lo anterior no es definitivo pues en la evolución de la determinación sexual, parece que han tenido más importancia los factores que desencadenan este proceso, pues los cromosomas sexuales tienen una morfología diferente en la mayoría de las especies. En el caso de los reptiles puede ocurrir que presenten determinación sexual genética, aunque carezcan de cromosomas heteromorficos o de alguna diferencia genética y los

principales sistemas cromosomales que se han reconocido en las especies son el ZZ/ZW y el XX/XY (Warner 2011).

#### 1.4.2 Determinación sexual por temperatura en reptiles

La determinación sexual por temperatura (DST) es un mecanismo de determinación sexual ambiental, que depende de un factor físico para determinar el sexo gonadal de un individuo durante el desarrollo (Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012), es decir la temperatura de incubación en la que se encuentra el nido (Mitchell *et al.* 2013). Dentro de este grupo de vertebrados se ha observado en: tortugas (Pieau 1971; Pieau 1972; Yntema 1976; McCoy *et al.* 1983), lagartijas (Charnier 1966; Viets *et al.* 1994; Warner 2011), tuátaras (Mitchel *et al.* 2006), gekos (Tokunaga 1985; Flores *et al.* 1994) y nuestro grupo de interés los cocodrilos (Ferguson *et al.* 1982; Lang *et al.* 1987, 1989).

El primero en describir el efecto de la temperatura en la proporción de sexos fue Charnier en 1966, quién buscando la temperatura ideal para incubar los huevos de la lagartija *Agama agama*, utilizó distintas temperaturas de incubación y encontró que cada una producía una proporción distinta de sexos (Charnier 1966; Warner 2011).

En la actualidad de las 7803 especies de reptiles existentes, se han analizado 186 para la DST y de ellas sólo la presentan 121 especies (Warner 2011). Las demás presentan algún otro mecanismo de determinación sexual, como el genético (Warner 2011; Capel 2017). Un fenómeno sorprendente dentro del grupo de los reptiles, es que pueden presentar ambos tipos de determinación sexual, DSG con termo-sensibilidad, este último observado principalmente en lagartijas como el lagarto montano, *Bassiana duperreyi* (Shine *et al.* 2002) y en tortugas como la especie *Clemmys guttata* (Ewert *et al.* 1991).

Entrando de manera formal al tema de la DST retomaremos el término polifenismo, ya antes mencionado (Abouheif *et al.* 2002; Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012). Este término se refiere a una parte muy interesante dentro de la DST, pues los individuos que tienen este mecanismo de determinación sexual, poseen una carga genética idéntica desde el momento en que ocurre la fertilización, hasta el momento justo donde el estímulo ambiental (la temperatura), desencadena la expresión de genes que determinan el sexo y dependiendo de que si se trata de la temperatura feminizante (TF) o temperatura masculizante (TM), se llevará a cabo la diferenciación y morfogénesis gonadal de un ovario o de un testículo respectivamente (Pieu *et al.* 1999; Shoemaker *et*

al. 2009; Matsumoto *et al.* 2012). La temperatura que induce genes que regulan la diferenciación morfológica de un ovario se denomina TF y la que regula la expresión de genes que dirigen la diferenciación de un testículo es la TM (Pieu *et al.* 1999; Shoemaker *et al.* 2009; Warner 2011).

Las especies con DST son sensibles a la acción de la temperatura durante un periodo específico del desarrollo embrionario, conocido como periodo sensible a la temperatura (PST), en donde la gónada bipotencial es capaz de responder a este factor ambiental e iniciar su diferenciación (Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012).

Además, los factores abióticos en este tipo de determinación sexual son muy importantes pues existe una temperatura donde la proporción sexual es 1:1, 50% hembras y 50% machos, la cual ha sido definida como temperatura pivote (TP) (Deeming y Ferguson 1989 a; Wibbels *et al.* 1991; Shoemaker *et al.* 2009; Warner 2011). El determinar esta temperatura resulta muy complicado, pues en estudios ecológicos sobre proporción de sexos y temperaturas de anidación, muchas veces la TP cambia de un nido a otro como ocurre en la tortuga (Dodd *et al.* 2006) o depende de la región geográfica (Ewert *et al.* 2005). Lo anterior tal vez puede deberse a factores maternos heredados o a que naturalmente un nido está expuesto a diferentes condiciones ambientales, donde las oscilaciones de temperatura de incubación son drásticas y por lo mismo se observan efectos diferentes en cuanto a la proporción de sexos y TP (Rhen *et al.* 1995; Ewert *et al.* 2005; Lopez-Luna 2014). Un ejemplo es la tortuga *Chelydra serpentina*, a la que se le han determinado distintas temperaturas pivote, una cuando es incubada en condiciones de laboratorio y otra cuando los nidos se incuban de manera natural, donde se ha observado claramente la influencia de la región geográfica (Ewert *et al.* 2005). Otro ejemplo es la tortuga *Trachemys scripta*, donde la temperatura pivote varía de nido a nido (Dodd *et al.* 2006).

En el caso de todas las especies de cocodrilos que presentan el patrón de DST II, ha resultado difícil esclarecer la temperatura pivote, pues se sugiere que estos tienen dos temperaturas pivote (Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009). Aunque en estudios realizados en *A. mississippiensis* en los que se han incubado huevos de 29-36°C aún no se ha observado claramente (Ferguson *et al.* 1982; Deeming *et al.* 1989; Smith *et al.* 1993). También la temperatura pivote así como las TM y TF pueden verse afectadas por la presencia de contaminantes ambientales o por el calentamiento global, pues existen estudios de anidación de *Crocodylus moreletii in situ* donde durante su incubación están cercanos a lo que se piensa sería una temperatura pivote en cocodrilos; sin embargo, eclosionan una mayor cantidad de machos posiblemente debido a disruptores

hormonales o al efecto térmico de las zonas urbanizadas (Lopez-Luna *et al.* 2015; Escobedo-Galván *et al.* 2016).

Debido a estas observaciones en las proporciones de sexos, se ha sugerido que los genes que determinan el sexo durante la determinación sexual por temperatura pueden ser uno o varios, que se han segregado y fijado en los individuos de las poblaciones de una manera muy compleja, pues la interacción del ambiente y la plasticidad genética del embrión durante el desarrollo son fundamentales en este proceso (Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012; Landry *et al.* 2014).

Es decir, se han descrito diversos patrones de DST dentro del grupo de los reptiles, de acuerdo a las proporciones de hembras y machos eclosionados. Y estos patrones son consecuencia de la compleja y estrecha interacción del ambiente y la plasticidad genética, como se comentó en el párrafo anterior (Bull 1985; Pieu 1995; Matsumoto *et al.* 2012). Esto posiblemente se debe a que los genes que encienden las vías de señalización en la determinación sexual por temperatura, en el pasado de los vertebrados pudieron ser varios, como consecuencia derivó en una gran plasticidad en la variación adaptativa y dependiendo de la estrategia o de las estrategias utilizadas por una especie para determinar sexualmente a un embrión, fueron fijadas en la población; por ejemplo, pudieron existir varios mecanismos de reversión sexual y posteriormente ser seleccionados como una manera de encender una vía en la DST de algunas especies. A continuación se hablará un poco sobre estos patrones pues resultan sumamente interesantes dentro de este campo (Bull 1985; Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009; Landry *et al.* 2014).

#### **1.4.2.1 Patrones de determinación sexual por temperatura en reptiles**

Los distintos patrones de la DST que existen en los reptiles estudiados hasta el momento, surgieron de la compleja evolución ocurrida por las interacciones ecológicas, el ambiente y la genética, que favorecieron las distintas estrategias para la DST, es por ello que los biólogos han generalizado 4 patrones de determinación sexual por temperatura (Figura 1), a partir de experimentos de incubación de huevos en condiciones de laboratorio (Bull 1980; Bull 1985; Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009).

El primer patrón 1a (MH) produce a baja temperatura 100% machos y en una alta temperatura 100% de hembras y lo presentan lagartijas y tortugas (Figura1A). En el patrón 1b (HM) se producen a baja temperatura el 100% de hembras y en alta temperatura el 100% de machos y está presente en tuataras y lagartijas (Figura1B).

Ambos patrones que se mencionaron anteriormente presentan una sola temperatura pivote (rectángulo sombreado) y posiblemente en la evolución sólo se favoreció un alelo que determina el sexo (monofactorial) (Bull 1980; Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009).

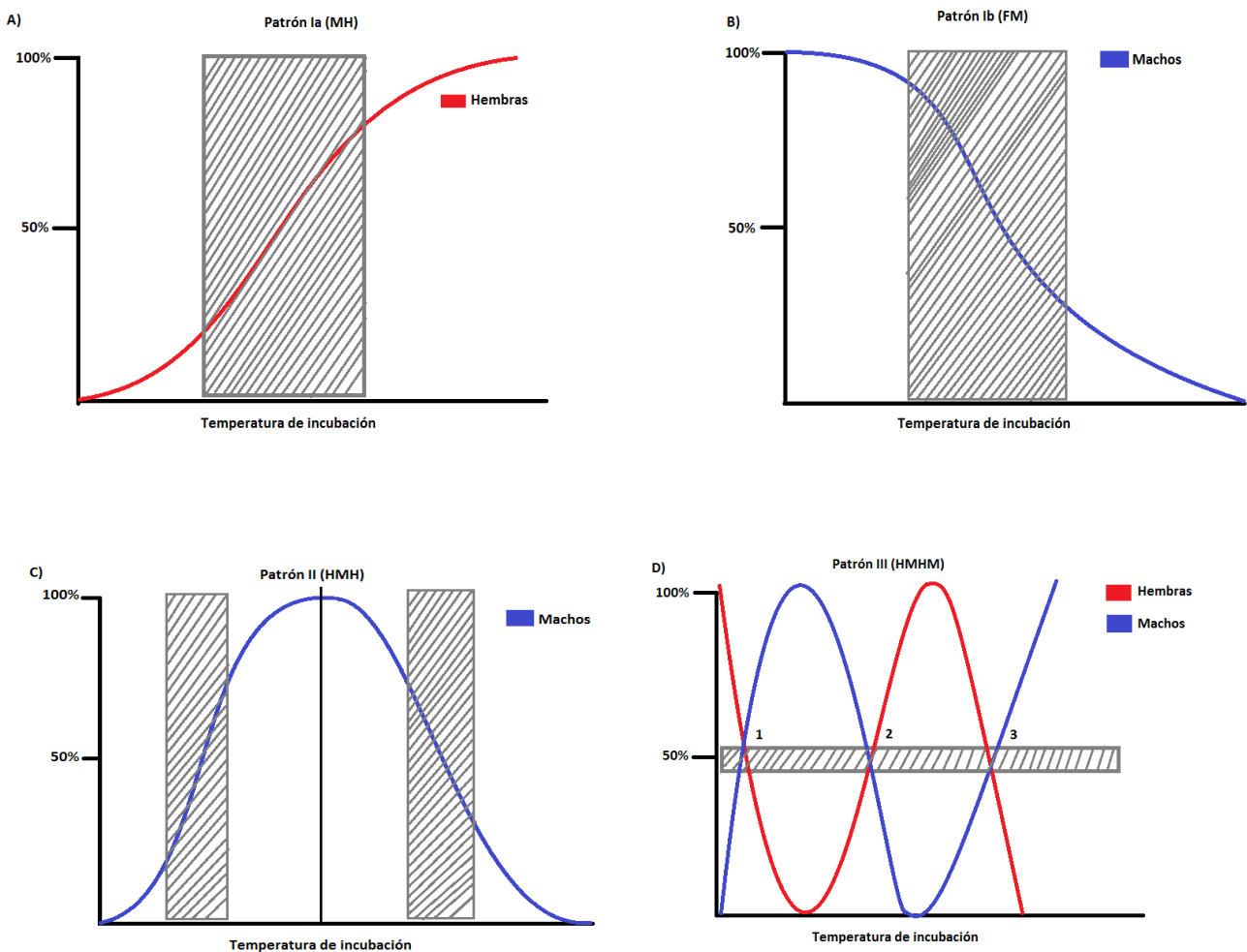
En el patrón II (HMH) se obtienen en una baja y alta temperatura hembras y en temperatura intermedia machos. Tiene 2 temperaturas pivote (rectángulos sombreados). Este parece ser el patrón de DST más ancestral, ya que algunos autores sugieren que los otros pudieron haber surgido del mismo (Pieu 1995). En parte se apoyan en que las temperaturas extremas durante la incubación, hacen que se presente una mayor mortandad en algunas especies, lo cual pudo ser favorecido mediante selección natural, obligando a desaparecer esas temperaturas en las mismas. Lo presentan tortugas, cocodrilos y lagartijas (Bull 1980; Bull 1985; Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009; Warner 2011) (Figura 1C).

En el patrón III (FMFM) se obtienen 100% hembras y 100% machos en altas y bajas temperaturas; así como poseen 3 temperaturas pivote (rectángulo sombreado los números 1, 2 y 3). Lo presentan lagartijas y es una evidencia de la gran plasticidad evolutiva en la DST y del gran potencial adaptativo ante eventos de cambio climático (Figura 1D). Muy posiblemente estos dos últimos patrones derivaron de eventos evolutivos donde los sistemas sexuales son determinados por varios genes distribuidos en el genoma (polifactoriales) (Inamdar *et al.* 2012).

Cabe preguntar por qué monofactorial y polifactorial, bueno pues esta idea surgió a partir de lo propuesto por Charnov y Bull en 1977 y Bull en 1985, quienes intrigados por la gran diversidad de formas en las que se determinan sexualmente los individuos de varias especies, propusieron la existencia de un factor o varios factores que fueron favorecidos evolutivamente y se fijaron en las poblaciones. Es decir, el gen que determina el sexo en los patrones 1a y 1b puede haber tenido únicamente una sola copia en un solo cromosoma, o bien, haberse favorecido en la evolución como un único factor a partir de varios, lo que generó solamente una copia en un cromosoma sexual. Además se piensa que los patrones 1a y 1b fueron restringidos y seleccionados con un solo factor debido a la mortandad embrionaria en temperaturas extremas (Bull 1985; Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009; Pezaro *et al.* 2017).

En cambio para los patrones II y III, pudieron haber existido varias copias de factores que determinan el sexo de los individuos en un cromosoma o en varios cromosomas, que posiblemente pudieron funcionar como factores que participan en el entrecruzamiento de vías de señalización, de ahí que varios tipos de temperaturas puedan originar el mismo sexo. En estos dos últimos patrones, muy posiblemente

surgieron de la gran variación adaptativa que existió dentro de las distintas estrategias de determinación sexual y reversión sexual, derivando en varios factores o por lo menos dos que den como resultado el mismo sexo bajo distintas temperaturas (Charnov y Bull 1977; Bull 1980; Bull 1985; Pieu 1995; Shoemaker *et al.* 2009; Pezaro *et al.* 2017). A continuación, se hablara sobre el patrón de DST observado en cocodrilos hasta el momento.



**Figura 1. Patrones de determinación sexual por temperatura en reptiles.** En A) el patrón 1a presente en tortugas y lagartijas. En B) el patrón 1b presente en tuátaras y lagartijas. En C) el patrón II presente en cocodrilo. En D) el patrón III presente en lagartijas. Los recuadros grises representan la temperatura pivote.

#### 1.4.2.2 Determinación sexual por temperatura en cocodrilos

De las 24 especies de cocodrilos que existen en el planeta, en todas ha sido observada la DST sin excepción (Tabla 2) (Deeming *et al.* 1989 a). La especie más estudiada es *Alligator mississippiensis*, donde las temperaturas de 30°C y 35°C son feminizantes y 33°C es masculinizante que corresponde al patrón de DST II (Ferguson *et al.* 1982; Deeming *et al.* 1989). Los cocodrilos exhiben distintos patrones de determinación sexual por temperatura, uno de ellos es el observado en la especie *Crocodylus siamensis*, el cual posee una temperatura feminizante de 31°C y una masculinizante de 33°C que corresponde al patrón de DST 1b (Lang *et al.* 1987; Deeming *et al.* 1989). Otro cocodrilo que posee el patrón de DST II es *Crocodylus johnstoni*, donde se inducen hembras tanto a bajas temperaturas (26°C) como altas temperaturas (34°C) y los machos se desarrollan a temperaturas intermedias (31°-32°C). Otros cocodrilos clasificados dentro de este patrón de DST, como *Crocodylus porosus* y *Crocodylus palustris*, se obtienen machos entre 32°C-33°C y 32.5°C, respectivamente y las hembras se desarrollan en altas y bajas temperaturas, 28 y 34°C (Webb *et al.* 1987; Lang, *et al.* 1989; Deeming *et al.* 1989 a).

Resulta interesante que dentro del grupo de los cocodrilos, existan distintos patrones de DST, aunque aún falta esclarecer con mayor detalle como son estos patrones en varias especies, pues en algunas de ellas únicamente se han estudiado dos temperaturas de incubación (Tabla 2) (Lang *et al.* 1994; Miyagawa *et al.* 2018). En el caso particular de *Crocodylus moreletii* que es la especie de interés para esta tesis, no existen estudios al respecto y en parte es una de las razones por las que nos interesó investigar a este cocodrilo mexicano tan importante y se detallará más adelante más al respecto.

A continuación hablaremos sobre los genes que se encienden durante la DST en reptiles, pues son de relevancia para discutir cómo es que ocurre este fenómeno biológico que tiene distintos patrones de DST y cómo han surgido en la evolución. Además, son sumamente importantes para comprender e integrar los resultados de esta tesis de doctorado que se detallaran en los siguientes capítulos.

**Tabla 2. Especies de cocodrilos estudiadas con determinación sexual por temperatura.**

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>	<b>DST</b>	<b>Periodo sensible a la temperatura</b>	<b>Referencia</b>
<i>Alligatoridae</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>	Aligátor americano	F 30 y 35°C M 32.5-33°C	F28-35d M14-21d	(Ferguson and Deming, 1989)
	<i>Alligator sinensis</i>	Aligátor chino	F 28°C M 33-34°C	No descrito	(Lang and Andrews 1994)
	<i>Caiman crocodilus</i>	Caimán de anteojos	F 31°C M 32-32.5°C	No descrito	(Lang et. al 1989)
	<i>Caiman latirostris</i>	Caimán enano	F 29°C M 33°C	F19-46d M14-38d	(Piña et. al 2003 y 2007)
	<i>Caiman yacare</i>	Caimán jacaré	F, T< 30.5°C M, T>31.5°C	No descrito	(Campos, 1993)
	<i>Melanosuchus niger</i>	Caimán negro	No descrito	No descrito	
	<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	Caimán enano de Cuvier	No descrito	No descrito	
	<i>Paleosuchus trigonatus</i>	Caimán enano de Schneider	F 31°C M 32°C	No descrito	(Lang and Adrews, 1994)
<i>Crocodylidae</i>	<i>Crocodylus acutus</i>	Cocodrilo americano o narigudo	No descrito	No descrito	
	<i>Crocodylus cataphractus</i>	Cocodrilo de anteojos	No descrito	No descrito	
	<i>Crocodylus intermedius</i>	Cocodrilo ornitorinco	No descrito	No descrito	
	<i>Crocodylus johnstoni</i>	Cocodrilo australiano de agua dulce	F29-31°C M33°C	27-46d	(Webb et al 1987)
	<i>Crocodylus mindorensis</i>	Cocodrilo filipino	F30°C M33°C	No descrito	(Lang et. al. 1989)



	<i>Crocodylus moreletii</i>	Cocodrilo Morelet o de pantano	No descrito	No descrito	(Lang and Adrews, 1994)
	<i>Crocodylus niloticus</i>	Cocodrilo del nilo	F31°C M32.5°C	No descrito	(Hutton et al 1987)
	<i>Crocodylus novaeguineae</i>	Cocodrilo de Nueva Guinea	F28-30°C M32°C	No descrito	
	<i>Crocodylus palustris</i>	Mugger	F31°C M32.5°C	F30-45d M 21-35d	(Lang 1989)
	<i>Crocodylus porosus</i>	Cocodrilo estuarino	F29°C M32°C	24-46d	(Webb et al 1987)
	<i>Crocodylus rhombifer</i>	Cocodrilo cubano	No descrito	No descrito	
	<i>Crocodylus siamensis</i>	Cocodrilo siamés o chino	No descrito	No descrito	
	<i>Osteolaemus tetraspis</i>	Cocodrilo enano africano	No descrito	No descrito	
	<i>Tomistoma schlegelii</i>	Falso Gavial	No descrito	No descrito	
Gavialidae	<i>Gavialis gangeticus</i>	Gavial indio	F31.5-32°C M33-33.5°C	No descrito	(Lang and Adrews, 1994)

#### Abreviaturas

F = feminizante

M= masculinizante

T= temperatura

> Mayor

< Menor

d= días

DTS = determinación sexual por temperatura

### 1.4.3 Genes importantes en la determinación sexual por temperatura

Los genes que determinan el sexo en los vertebrados están altamente conservados en la evolución (She *et al.* 2014). Muchos de ellos también se han caracterizado dentro del grupo de los reptiles; sin embargo, al ser tan complejos los mecanismos de DST ha resultado sumamente difícil esclarecer la vía de señalización que regula la determinación sexual y que dirige la diferenciación de un testículo o un ovario (Shoemaker *et al.* 2009). A continuación, se describirán aspectos interesantes de estas redes genéticas para la determinación sexual en reptiles y que son de mucho interés pues parte de este trabajo lo hemos dedicado a caracterizar este tipo de genes en el desarrollo de *C. moreletii*.

#### 1.4.3.1 Red genética de determinación sexual masculina

De los genes involucrados en redes genéticas de determinación sexual en mamíferos y otros vertebrados, se ha encontrado su expresión en algunos reptiles. Se sabe que el gen *Sry* involucrado en el inicio de la determinación del sexo masculino en mamíferos (Berta *et al.* 1990; She *et al.* 2014), no se encuentra en ningún reptil estudiado hasta la fecha (Spotila *et al.* 1994). Pero a pesar de esta ausencia, el gen *Sox9* se expresa durante la determinación sexual por temperatura en varios modelos de reptiles (Kent *et al.* 1996; Moreno-Mendoza, *et al.* 1999; Valleley *et al.* 2001; Shoemaker *et al.* 2010). Este gen se encuentra involucrado en la diferenciación de las células de Sertoli, las cuales son fundamentales para la diferenciación testicular y el mantenimiento de un ambiente masculinizante durante la etapa adulta (Kent *et al.* 1996; Martínez-Juárez *et al.* 2018). *Dmrt1* es un gen que se encuentra río arriba de *Sox9* en modelos como: medaka, anfibios, pollo y mamíferos, incluyendo reptiles (Murdock y Wibbels 2003; Lutfalla *et al.* 2003; Yoshimoto *et al.* 2006; Smith *et al.* 2009; Kohni *et al.* 2014; Picard *et al.* 2015). En el desarrollo testicular del ratón *Dmrt1* reprime directamente al gen *Foxl2* restringiendo la actividad del receptor para ácido retinoico  $\alpha$ , inhibiendo así la formación de un ovario y también como el complejo *Sox9/Sox8*, *Dmtr1* participa en la prevención de la transdiferenciación de las células de Sertoli a granulosa en testículos posnatales y adultos (Matson *et al.* 2011; Minkina *et al.* 2014; Barrionuevo *et al.* 2016). En *Gallus gallus* también se ha descrito su participación en la diferenciación del testículo durante el desarrollo embrionario (Smith *et al.* 2009) y en *Trachemys scripta* se sabe que tiene una expresión dimorfica durante el periodo sensible a la temperatura, expresándose en la TM (Murdock *et al.* 2003). Además el grupo de Chutian Ge en 2017 demostró *in ovo* e *in vitro* que *Dmtr1* participa regulando la

DST, pues se encuentra río arriba del gen *Sox9* y de la *Amh* (hormona anti-mülleriana) durante el inicio de la diferenciación testicular. Expresándose en el desarrollo del testículo, específicamente en los núcleos de las células de Sertoli junto con el gen *Sox9*, cuando se incubaba la gónada o el embrión en TM (Ge *et al.* 2017).

De manera interesante en vertebrados *Dmtr1* posee dos funciones que dependen de la regulación a nivel transcripcional del mRNA. Una de ellas es la masculinización de células somáticas durante el desarrollo testicular y en testículos posnatales, donde dos isoformas de *Dmtr1* del tipo 2 y *Dmtr1 S* se expresan en este tipo celular exclusivamente en machos y sus promotores del mRNA nombrados CNS2 o CNS3, contienen secuencias consenso para los factores de transcripción *Foxl2* y *Sox9* a los que regula negativamente y positivamente, respectivamente. La otra función tiene que ver con el desarrollo de las células germinales, donde la isoforma de *Dmtr1 L* tipo 1 se expresa en células germinales de gónadas, tanto de hembras como de machos, y su promotor nombrado CN1 contiene secuencias consenso para el factor de transcripción *Nanog*, que es requerido en la pluripotencia de células germinales (Mawaribuchi *et al.* 2017).

Lo anterior se debe a que el promotor de *Dmtr1* evolutivamente perdió un exón no codificante (ncEx1) el cual está presente en lampreas (*Lethenteron reissneri*), anfibios (*Xenopus laevis*, *Silurana tropicalis*) y ausente en reptiles geckos (*Eublepharis macularius*), aves (*Gallus gallus*) y mamíferos (*Mus musculus*). Dando como resultado distintas variedades del mRNA que adquirieron funciones diferentes en la evolución de los vertebrados (Mawaribuchi *et al.* 2017).

Recientemente, se ha propuesto que el gen *Sox9* también posee dos isoformas en reptiles, pues se encontró su expresión en machos y en hembras inmaduros sexualmente de *Crocodylus moreletii* (Martínez-Juárez *et al.* 2018). Este factor de transcripción se expresa en el núcleo de las células de Sertoli del testículo y en el núcleo de las células de la granulosa de ovocitos en previtelogénesis, donde al parecer podría jugar un papel importante durante la foliculogénesis. En el desarrollo embrionario el gen *Sox9* se expresa exclusivamente en gónadas de embriones incubados en TM, pero en incubados a TF no, esto puede deberse a que en el desarrollo de un testículo se expresa un tipo isoforma de *Sox9 a* y otro tipo de isoforma *Sox9 b* que participa en la foliculogénesis, esta última no se observaría durante la determinación sexual y la morfogénesis gonadal, porque la formación de los folículos primarios en un ovario de una cría de cocodrilo es post-eclosión, lo que separaría temporalmente la expresión de estas isoformas en el desarrollo (Martínez-Juárez *et al.* 2018). Por lo tanto, estos genes son pleiotrópicos pues tienen una función en la determinación sexual por temperatura y en otros procesos del desarrollo (Landry *et al.* 2014).

Otro gen importante en la diferenciación testicular es la hormona anti-mülleriana (*Amh*), la cual es un regulador clave en la diferenciación de las células de Sertoli, la producción de testosterona y en el desarrollo de los conductos de Wolff (Oreal *et al.* 1998; She *et al.* 2014). La expresión de la *Amh* en mamíferos precede a la de *Sox9* (She *et al.* 2014). Sin embargo, en reptiles este patrón de expresión no está conservado (Kohni *et al.* 2014), pues en *Alligator mississippiensis* primero se expresa la *Amh* y después ocurre la expresión del gen *Sox9* (Western *et al.* 1999), este patrón de expresión también se encuentra en *Gallus gallus* (Oreal *et al.* 1998; Western *et al.* 1999; Shoemaker *et al.* 2007). Sin embargo, en tortuga *Trachemys scripta* la expresión de *Amh* es similar a lo que ocurre en mamíferos (Shoemaker *et al.* 2007; Shoemaker *et al.* 2009). Los genes *Wt1* y *Sf1* son de gran importancia para la diferenciación testicular, ya que se encargan de mantener la expresión de los genes involucrados en la masculinización durante el desarrollo embrionario. También, se encargan de mantener la morfología del testículo en cuanto a la constitución de los túbulos seminíferos, células de Sertoli y células germinales, pues *Wt1* regula la expresión de *Sf1*, este último participa en el mantenimiento de la expresión de *Sox9* y en la proliferación de las células somáticas en el testículo, además en ratón también modulan la expresión de la *Amh* (Spotila *et al.* 1998; She *et al.* 2014), a su vez en especies con DST el factor de transcripción *Sf1* presenta una expresión exclusiva durante el periodo sensible a la temperatura en la TM, aunque en otras especies de vertebrados (mamíferos y peces) se sabe que regula la expresión de la enzima aromatasa (Ramsey *et al.* 2007), ya que el promotor de esta enzima contiene secuencias a las que se puede unir el factor de transcripción *Sf1*, pues se propone que favorece la transcripción de su promotor (Pannetier *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007). Pero también es capaz de interaccionar con el gen *Sox9* durante la morfogénesis del testículo, lo que hace a *Sf1* un factor importante en el desarrollo de la gónada tanto de hembras como de machos (She *et al.* 2014). Es interesante destacar que en reptiles con DST, parece tener un papel importante en la masculinización de la gónada, por lo que putativamente podría interaccionar con algún otro factor de transcripción y de esa manera se favorecería la metilación del promotor de la enzima aromatasa inhibiendo su expresión (Parrott *et al.* 2014).

Lo anterior nos hace pensar que el gen maestro para la diferenciación testicular es *Sox9*, pues se encuentra altamente conservado en la evolución de todos los vertebrados y este gen se enciende por distintas señales (*Dmtr1* o *Sry*) (She *et al.* 2014; Ge *et al.* 2017). Los demás genes a pesar de que son importantes para el inicio y para mantener la diferenciación en el desarrollo del testículo, se han diversificado en los distintos grupos de vertebrados, dando como resultado distintos contextos de redes genéticas para la determinación sexual, las

cuales tienen como objetivo iniciar la expresión de *Sox9* o reprimirlo (Kohni *et al.* 2014; She *et al.* 2014; Capel 2017).

Evolutivamente estos mecanismos que se han seleccionado para encender a *Sox9*, son el resultado de la plasticidad genética del desarrollo embrionario, dada por cada componente necesario que facilita la sensibilidad con la que se expresa este gen en respuesta a la temperatura de incubación, es decir, la variabilidad en los transcritos, proteínas, lípidos, hormonas y modificaciones epigenéticas, generan la plasticidad molecular que dirige al genotipo a desencadenar el fenotipo, que en este caso es un testículo. Es por ello que adaptativamente se favorecieran distintos mecanismos o redes genéticas en la determinación sexual por temperatura de reptiles, dando como resultado los distintos patrones de DST que se han descrito. Y a su vez explicaría la razón del porque la *Amh* se expresa en tortugas de manera similar a los mamíferos, pero no en los cocodrilos y aves. Pues muy posiblemente estamos buscando más de una vía de señalización que dispara la DST en reptiles. Todo lo anterior tiene relación con la idea de Bull-Charnov (1977) y de Bull (1985), donde mencionaban que podría existir un efecto genético polifactorial dado por la combinación de varios genes distribuidos en el genoma, los cuales cuando eran favorecidos evolutivamente, incrementaban rápidamente sus alelos en una población, cambiando las formas de determinación sexual de las especies (Bull 1985; Oreal *et al.* 1998; Mendoza *et al.* 1999; Sultan 2007; Landry *et al.* 2014; Ge *et al.* 2017).

#### **1.4.3.2 Red genética de determinación sexual femenina**

Por otro lado, la diferenciación del ovario en mamíferos se ha propuesto que ocurre por la expresión de genes como *Foxl2* (She *et al.* 2014; Capel 2017). En el caso de reptiles con DST como *Trachemys scripta*, la expresión de *Foxl2* se ha observado durante el PST, cuando la gónada del embrión es incubada en TF (Shoemaker *et al.* 2009; Shoemaker *et al.* 2010) de igual manera los cocodrilos expresan este factor de transcripción en los núcleos de las células foliculares de hembras jóvenes (Martínez-Juárez *et al.* 2018). Este gen participa en el balance de la esteriodogénesis del ovario, así como en la diferenciación de las células de la granulosa y folículos primarios (Uda *et al.* 2004; Ottolenghi *et al.* 2005; Bertho *et al.* 2016; Nicol *et al.* 2018). En estudios con cultivos celulares murinos el factor de transcripción *Foxl2* se une directamente al receptor para estrógenos 2 o  $\beta$  (ER2 o ER $\beta$ ), regulando la producción de estrógenos vía enzima aromatasa en las células de la granulosa, además este factor de transcripción junto con el ER1 o ER $\alpha$ , sinérgiza la represión de *Sox9* regulando negativamente el *enhancer* o elemento de la unidad potenciadora específica de testículo TESCO en el

promotor de *Sox9* (Kim *et al.* 2009; Jakob 2010; She *et al.* 2014; Georges *et al.* 2014). También su expresión coincide con la de la enzima aromatasa, que es la encargada de la producción de estrógenos mediante la catálisis irreversible de los andrógenos a estrógenos, además de participar en el balance en la producción de las hormonas esteroideas (Yamaguchi *et al.* 2007). En la tortuga *Chelydra serpentina* se sabe que esta enzima incrementa su actividad durante el desarrollo en el estadio 16 y continua hasta el estadio 24, donde el incremento más dramático es el estadio 20, cuando ocurre la regresión de los cordones medulares (Place *et al.* 2001; Rhen *et al.* 2007; Ramsey *et al.* 2009). En el aligátor *Alligator mississippiensis* su actividad inicia después de la determinación sexual (estadio 24) y continúa hasta después de la eclosión (Smith *et al.* 1995; Ramsey *et al.* 2009). También se ha investigado la plasticidad transcripcional de este gen, en el sentido de que los polimorfismos de esta enzima pueden ser un factor fundamental para regular los niveles de las hormonas esteroideas y favorecer un ambiente en la gónada bipotencial, para la diferenciación de un sexo. Lo que se ha encontrado es que la enzima aromatasa tiene 22 poliformismos exónicos y 1268 intrónicos, de los cuales 12 fueron exclusivos de la especie de *Trachemys scripta*, 10 fueron cambios sinónimos y 2 no sinónimos. Sin embargo, en este estudio no se encontró evidencia de que exista una diferencia que sea consecuencia de los polimorfismos entre machos y hembras, incubados en una temperatura, que restrinja la diferenciación de la gónada (Matsumoto *et al.* 2017). *Rspo1* es otro gen que se expresa en reptiles con DST específicamente durante el PST de la tortuga *Mauremys reevesii*, cuando son incubadas en temperatura feminizante. En mamíferos se sabe que tiene una función importante para la diferenciación del ovario durante el desarrollo embrionario temprano, regulando la señalización de la vía de WNT/ $\beta$ -catenina, la cual está involucrada con la determinación y diferenciación de los progenitores de las células foliculares, además regulan la meiosis y sobrevivencia de las células germinales (Vainio *et al.* 1999; Liu *et al.* 2010; Chassot *et al.* 2008 y 2014; Tang *et al.* 2017).

Estos genes que se han descrito hasta el momento juegan un papel importante en la arquitectura genética de la determinación sexual por temperatura, durante la formación de un fenotipo (un testículo o un ovario) (Rice *et al.* 2017). Sin embargo, aún se desconocen diversos aspectos de las señales que disparan la expresión de toda esta red genética y que dirigen los eventos de diferenciación gonadal de reptiles. Por lo tanto, a continuación se hablará sobre estos eventos morfogenéticos que ocurren gracias a la expresión de estos genes y que dan las instrucciones necesarias para que la gónada bipotencial se desarrolle como un ovario o un testículo.

## 1.5 Morfogénesis gonadal y diferenciación ovárica y testicular en cocodrilos

La gónada bipotencial de los reptiles está formada por dos tipos celulares: las células somáticas y las células germinales. De estudios histológicos realizados en *A. mississippiensis* sobre su morfología gonadal, se sabe que las células germinales (CG) se encuentran en el epitelio de la corteza de la gónada, durante el inicio del desarrollo de la misma (Smith *et al.* 1993). Este tipo celular se caracteriza por poseer un gran núcleo y la presencia de gotas lipídicas de diferentes diámetros (Merchant-Larios *et al.* 1989). Las células germinales expresan el gen *Vasa*, el cual codifica para una RNA helicasa que se expresa sólo en este tipo celular y se ha utilizado como un marcador molecular de la presencia de las mismas (Linder *et al.* 2006). En reptiles aún se desconocen muchos aspectos celulares, moleculares y fisiológicos relacionados con la conducta de las CG (Kohno *et al.* 2014).

En cocodrilos, existen algunos estudios morfológicos sobre la diferenciación de la gónada durante el desarrollo embrionario (Forbes 1940; Smith *et al.* 1993) y se han descrito los siguientes estadios: Primero es el establecimiento de la cresta genital, que se caracteriza porque la superficie del epitelio celómico está formado por una sola capa de células somáticas, donde se incrustan las células germinales (Merchant-Larios *et al.* 1989; Pieu 1995). En la tortuga *Lepidochelys olivacea* se sabe que es importante la expresión del gen *Sox9* para el establecimiento de la cresta genital y posteriormente para el desarrollo del testículo; sin embargo en cocodrilos y otros reptiles se desconoce totalmente al respecto (Moreno-Mendoza *et al.* 1999; Merchant-Larios *et al.* 2010; Díaz-Hernández *et al.* 2012). Posteriormente se forma el blastema gonadal pues los cordones medulares se forman a partir de la condensación progresiva de las células mesenquimales y estos se encuentran subyacentes al epitelio celómico (Merchant-Larios *et al.* 1989; Smith *et al.* 1993; Pieu 1995).

A continuación ocurre el desarrollo de la gónada bipotencial, la cual está formada por una corteza y un componente medular, en donde si se va a diferenciar hacia un ovario, tienen lugar el engrosamiento de las capas epiteliales de la corteza y la regresión de los cordones medulares. O bien, si se va a diferenciar hacia la formación de un testículo, se inicia la formación de los cordones testiculares en la porción medular mediante el incremento de las células pre-sertoli, que se condensan formando estas estructuras (Merchant-Larios *et al.* 1989; Smith *et al.* 1993; Pieu 1995). En otros modelos de vertebrados como en ratón se sabe que el gen *Sox9* se expresa en los núcleos de las células de Sertoli (She *et al.* 2014) durante la formación de un testículo y como ya se había mencionado anteriormente *Sox9* puede ser regulado negativamente mediante dos vías independientes, que actúan sinérgicamente sobre

el mismo: RSPO1 / WNT4 y el factor de transcripción FOXL2, permitiendo el desarrollo de un ovario durante la embriogénesis (Vainio *et al.* 1999; Chassot *et al.* 2014; She *et al.* 2014).

Finalmente sucede el desarrollo del estadio de gónada diferenciada, donde ya se pueden distinguir morfológicamente un ovario de un testículo, en el primero las ovogonias se encuentran en la corteza del ovario y en la médula hay presencia de lagunas; en el segundo se observan cordones testiculares (formados por células de Sertoli, mioides y células germinales). Conforme progresa el desarrollo de la gónada, las CGP se diferencian en ovogonias localizadas en la corteza del ovario, o espermatogonias dentro de tubos seminíferos (Smith *et al.* 1993; Uribe *et al.* 2001; Moore *et al.* 2010).

Pero esta información no es suficiente, aún faltan por integrar muchos aspectos moleculares, fisiológicos y morfológicos durante la DST de los reptiles y sobre todo en cocodrilos, pues son escasos los estudios que abordan este tema. Esto es muy importante debido a que existen varios patrones de DST, los cuales seguramente cuentan con sus propias vías de señalización que dirigen la morfogénesis gonadal y que muy posiblemente son diferentes para cada uno de los mismos. Es por ello, que en parte para nosotros ha resultado sumamente importante estudiar la morfología del desarrollo gonadal de *C. moreletii*, pues se necesita generar toda la información posible, para comprender la determinación sexual en las distintas especies de reptiles desde la perspectiva integrativa de la “eco-evo-devo”, pues seguramente los eventos morfogenéticos podrían variar entre especies de acuerdo a los distintos patrones de DST y siendo una consecuencia más de la evolución sexual de los vertebrados.

A continuación se continuará hablando sobre los pocos estudios que existen de la morfología de ovarios y testículos de reptiles, específicamente en cocodrilos adultos, pues es fundamental para comprender la historia de vida del desarrollo sexual de los individuos de *C. moreletii* dentro de las poblaciones, ya que esta tesis doctoral ha pretendido generar la mayor cantidad de información al respecto para esta especie de cocodrilo.

### **1.5.1 Morfología de ovarios y testículos de cocodrilos adultos**

En cuanto a la morfología de los ovarios y testículos de adultos también existen pocos estudios sobre su morfología y la mayoría se han realizado para *A. mississippiensis*. Los testículos de los cocodrilos adultos fueron descritos por primera vez por Hans Sloane en 1725 en aligátors adultos colectados en Louisiana (Lance 1989; Moore *et al.* 2010). Durante el periodo de reproducción se ha observado que la masa testicular incrementa su tamaño, así



como la presencia de espermatozoides vivos en el surco del pene, esto ocurre en un periodo de 43 días en los meses de mayo a junio (Lance 1989; Gribbins *et al.* 2010).

Los testículos se ubican en la parte superior de la cavidad abdominal y se encuentran recubiertos por la túnica albugínea. En el parénquima de los mismos están los túbulos seminíferos delimitados por su lámina basal. En el interior de estos se pueden observar células germinales en distintos estadios, tales como: espermatogonias, espermocitos, espermátidas y espermatozoides (Lance 1989; Moore *et al.* 2010; Gribbins *et al.* 2010). En *M. musculus* y otros vertebrados se sabe que estos tipos celulares expresan la RNA helicasa Vasa dependiente de ATP (Fujiwara *et al.* 1994; Tanaka *et al.* 2000). Esta proteína es utilizada como un marcador específico de la línea germinal en etapa fetal y adulta (Tanaka *et al.* 2000; Linder *et al.* 2006). Estos tipos celulares están presentes o no de acuerdo al estadio reproductivo del animal y a su madurez sexual (Lance 1989).

Adyacente a las células germinales se encuentran las células de Sertolí quienes les brindan soporte celular y metabólico a las mismas en la espermatocitogénesis y espermiogénesis. Las células de Sertoli expresan el gen *Sox9* que es muy importante en las vías de determinación sexual (como ya se mencionó), pues regula la expresión de la hormona antimülleriana (*Mis*) durante la masculinización en mamíferos (De Santa Barbara 1998; Harley *et al.* 2003; Qin *et al.* 2005; França *et al.* 2016), aunque parece ocurrir al revés en cocodrilos (Western *et al.* 1999). Estos túbulos seminíferos están circundados por tejido conectivo y en su intersticio se ubican las células de Leydig encargadas de la producción de testosterona (Lance 1989; Shoemaker *et al.* 2007).

En cuanto al ovario Dutta en 1949 fue de los pioneros en describir su morfología en *C. palustris*, posteriormente Joanen y McNease en 1980 lo describieron en *A. mississippiensis* (Lance 1989). Éste se encuentra anclado a la pared dorsal del peritoneo, e histológicamente se compone de dos regiones: la corteza ovárica y la médula. La corteza ovárica contiene nidos de ovogonias y folículos en diferentes etapas: previtelogénicos, vitelogénicos, cuerpos lúteos y folículos atresicos, clasificados con base a características morfológicas y citoplasmáticas (Uribe *et al.* 2000). Se ha reportado la expresión de la proteína VASA en todas las etapas de la ovogénesis en especies como: *Xenopus leavis* y *Danio reiro* (Komiya *et al.* 1994; Braat *et al.* 1999). En el caso de *M. musculus* el gen *Vasa* se expresa en células germinales y en células troncales que se sugiere pueden diferenciarse en ovocitos (De Felicci 2010).

En cocodrilos el desarrollo folicular implica la maduración y diferenciación de células especializadas, las células de la granulosa, y en mamíferos se sabe que el proceso de

mantenimiento y diferenciación de las mismas se encuentra involucrado el gen *Foxl2* (Uhlenhaut *et al.* 2006 y 2009). La médula está formada por tejido conectivo con tipos celulares como: fibroblastos y adipocitos. Además de numerosos vasos sanguíneos y lagunas que rodean a los folículos y también se ubican en la región medular (Uribe *et al.* 2000).

A pesar de la poca información generada en *A. mississippiensis*, al igual que en el desarrollo embrionario no existen estudios que relacionen la histología y mecanismos moleculares sobre la fisiología de la reproducción de cocodrilos, de tal manera nos resultó de interés realizar estudios de este tipo en *C. moreletii* para corroborar todos nuestros resultados obtenidos en los embriones (PARTE 2), y a su vez estudiar la morfología y expresión de genes y proteínas involucrados en el mantenimiento del ovario y testículo de cocodrilos jóvenes (PARTE 3). Esta información se detalla más adelante en las siguientes secciones de la tesis. A continuación se plantea la justificación de nuestro trabajo y en los antecedentes hablaremos sobre la biología de la especie de *Crocodylus moreletii*, de tal manera esto nos ayudará a comprender mejor porque es tan importante para nosotros el estudiarla.

## 1.6 Justificación

Como se mencionó anteriormente existen pocos estudios morfológicos y moleculares sobre el mecanismo de la determinación sexual por temperatura (DST) y en el caso de cocodrilos sólo se han realizado para el Aligátor americano (*Alligator mississippiensis*). Sin embargo en México, contamos con dos especies de cocodrilos: *Crocodylus acutus* (cocodrilo americano) y *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano), donde este tipo de estudios no se han llevado a cabo.

Lo anterior es de nuestro interés debido a que en *C. moreletii* se ha reportado que el 100% de los individuos nacidos, en condiciones naturales, entre los años 2007 y 2008 en la Laguna de las Ilusiones en Villahermosa, Tabasco se determinaron como machos. Recientemente, entre los años 2011 y 2013 se ha observado la eclosión de individuos de ambos sexos, pero el sexo masculino continua siendo el que predomina hasta en un 80%. Es por ello que nos interesa estudiar los mecanismos que determinan el sexo en esta especie, así como las temperaturas que influyen sobre el sexo de los individuos, para que nos ayuden a entender por qué está ocurriendo el nacimiento de esta gran proporción de machos.

Porque siendo esta especie de reptil de gran importancia ecológica y evolutiva, es importante realizar estudios que favorezcan la conservación de la especie; es decir, conocer los mecanismos de determinación y diferenciación sexual de estos individuos, permitiría establecer estrategias de manejo ecológico para lograr mantener una proporción de sexos estable para que la población se autorregule por sí misma.

## 1.7. Hipótesis

En *Crocodylus moreletii* a temperaturas controladas de 33°C +/- 1°C se obtendrán 100% de machos, mientras que a temperaturas de 29°C +/-1°C se obtendrán 100% de hembras. Bajo estas condiciones experimentales, en el segundo cuarto del desarrollo embrionario se iniciará el período sensible a la temperatura.

## II. OBJETIVO GENERAL

Establecer las etapas críticas de determinación y diferenciación sexual gonadal en el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*).

### 2.1 Objetivos particulares

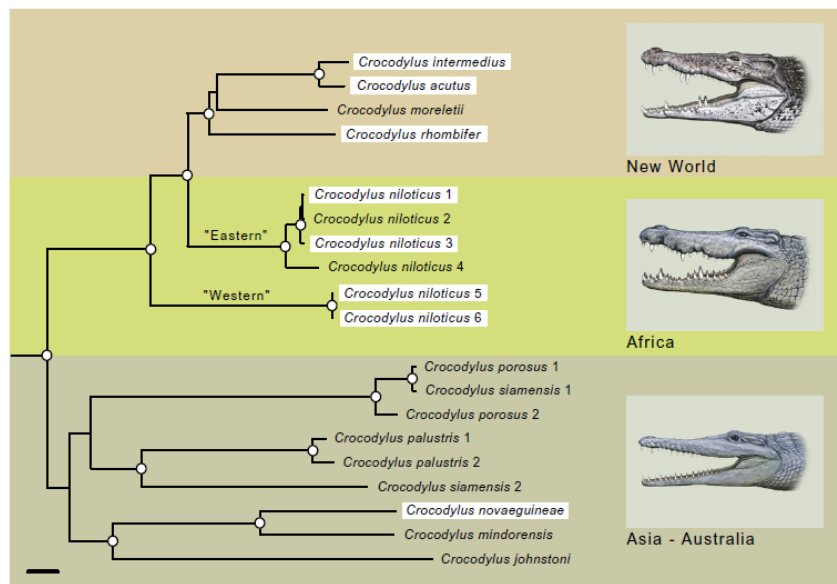
1. Determinar la temperatura de incubación necesaria para generar 100% de machos y 100% de hembras.
2. Describir las etapas del desarrollo embrionario y correlacionarlas con el desarrollo gonadal.
3. Establecer los periodos: indeterminado, sensible a la temperatura y de diferenciación sexual gonadal.
4. Estudiar el patrón de expresión de los genes *Sox9* y *Vasa* durante la diferenciación morfológica de la gónada.
5. Caracterizar a nivel celular y molecular los testículos y ovarios de *C. moreletii* en etapas jóvenes.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 El cocodrilo de pantano, *Crocodylus moreletii*: Clasificación taxonómica, hábitat y distribución geográfica

Los cocodrilos se ubican en la escala evolutiva desde el cretácico, y a lo largo de su evolución se han diversificado considerablemente (Brochu *et al.* 2001; Ross *et al.* 2007). La clasificación taxonómica por arriba de especie en los Eusuchia es un tema sujeto a discusión, pero estudios morfológicos y moleculares han propuesto organizar a los 9 géneros existentes en tres subfamilias distintas: los gaviálidos (Gavialinae), los aligátore y caimanes (Alligatorinae) y los cocodrilos propiamente dichos (Crocodylinae) (McAliley *et al.* 2006; Ross *et al.* 2007; Sánchez Herrera *et al.* 2011).

En el continente Americano existen representantes de las subfamilias Alligatorinae y Crocodylinae. Dentro de las especies americanas más reconocidas se encuentra el aligátor americano (*Alligator mississippiensis*) que habita en el sur de los Estados Unidos (Kushlan 1974). Particularmente, en las zonas tropicales de México se encuentra el caimán (*Caiman crocodylus*) y dos especies de cocodrilos: el cocodrilo americano o narigudo (*Crocodylus acutus*) y el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) (Álvarez del Toro 1974; Sánchez Herrera *et al.* 2011).



**Figura 2. Filograma de máxima verosimilitud (ML) para *Crocodylus* basado en secuencias de DNA mt.** La topología es idéntica a la soportada por el análisis bayesiano. Las especies de *Crocodylus* del continente Americano forman un grupo monofilético, al igual que las especies de *Crocodylus* asiáticas más australianas, pero *C. niloticus* es parafilético. De acuerdo con los resultados del DNA mt, los "cocodrilos del Nilo" orientales están más estrechamente relacionados con las cuatro especies americanas que los cocodrilos del Nilo "occidentales".

Recientemente en un análisis filogenético de la subfamilia Crocodylinae utilizando genomas mitocondriales (mt) casi completos (16,200 pares de bases) (Figura 2), se ha propuesto una hipótesis filogenética bien apoyada para cada género. Esta agrupa en un grupo monofilético a las especies asiáticas y australianas y en un grupo parafilético a *Crocodylus niloticus* (cocodrilo del Nilo) junto con un clado monofilético integrado por las especies americanas, donde se incluye a *C. moreletii* (Meredith *et al.* 2011).

El cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) fue descrito por el naturalista francés Pierre Marie Arthur Morelet en 1850 en México (Figura 3), pero su clasificación taxonómica fue realizada por los zoólogos franceses Duméril y Bibron en 1851 en la localidad de Las Flores en Yucatán, México (Figura 4), quienes reconocieron el descubrimiento de la especie a Arthur Morelet (Morelet 1845 y 1860; Roos 1987).



**Figura 3. Cocodrilo de pantano o Morelet.** A la izquierda la fotografía del naturalista francés Pierre Marie Arthur Morelet (Fotografía Chesnay Chesnay, Emile 1884), nació el 26 de agosto de 1809 en Lays, Doubs y murió el 9 de octubre de 1892, en Velars, Dijon. Fue un naturalista francés miembro de la comisión de Argelia donde realizaba ilustraciones principalmente de historia natural. Sus principales trabajos fueron sobre moluscos de África. En 1892 recibió instrucciones de la "Academia de la Ciencias de Francia", para realizar un viaje por América Central. Las instrucciones eran describir todas las especies originarias e incluso las importadas por Europa. De los animales reportados por Morelet, se cita al cocodrilo de pantano o cocodrilo Morelet (Morelet 1845 y 1860). A la derecha el cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii* en su hábitat natural, la fotografía fue tomada en la reserva ecológica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. **Fotografía:** Adriana Martínez Juárez, miembro del laboratorio A005 del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, bajo la dirección de Norma Angélica Moreno Mendoza.



#### **Clasificación taxonómica del cocodrilo de pantano.**

**Reino:** Animalia, **Fila:** Chordata, **Clase:** Sauropsida, **Orden:** Crocodylia,

**Familia:** Crocodylidae, **Subfamilia:** Crocodylinae, **Género:** *Crocodylus*,

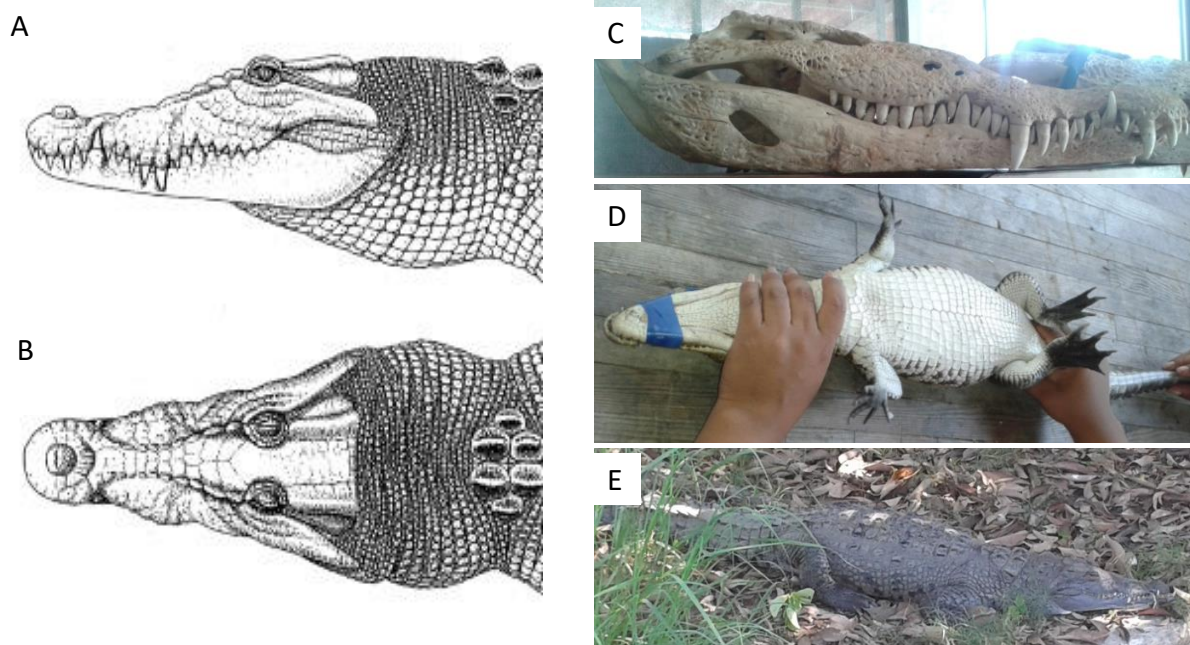
**Especie:** *Crocodylus moreletii*.

**Figura 4. Clasificación taxonómica del cocodrilo de pantano o Morelet, *Crocodylus moreletii*.** Fotografía de un ejemplar de *Crocodylus moreletii* en la Laguna de la Ilusiones Villahermosa, Tabasco (**Fotografía:** Adriana Martínez Juárez); al pie de la fotografía su clasificación taxonómica realizada por Duméril & Bibron en 1851. En la historia de la clasificación de esta especie de cocodrilo Duméril (1852) y Bocourt (1873) colectaron los dos primeros ejemplares de *Crocodylus moreletii* en la laguna de Petón, uno de los cuales aún se encuentra en el museo de Dijon. Duméril y Bibron (1851), Duméril (1852) y Morelet (1871) describieron sólo holotipos. Smith y Smith (1977) seguido de Duméril (1852) y Bocourt (1873) reconocieron sintipos y nombraron MNHN7520, el holotipo, como lectotipo para el taxón (ver Roos 1987). A la izquierda el retrato de Auguste Henri André Duméril (1812-1870) fue un médico, zoólogo francés, profesor de Herpetología e Ictiología en el Museo Nacional de Historia Natural de Francia, París de 1857 (ver Duméril, A. (1812–70) en Kraig 1989). Su obra más importante la realizó luego de la *Mission scientifique au Mexique dans l'Amérique Centrale* (1870-1909), aunque Duméril no termina su manuscrito porque muere durante el sitio de París (1870-1871), donde se desencadenaron pestes. Bocourt, ayudado de François Mocquart (1834-1917), Léon Vaillant (1834-1914) y de Fernand Angel (1881-1950) terminan su texto (ver Kraig 1989). El otro retrato corresponde a Gabriel Bibron (1806-1848) un zoólogo francés que junto con André Marie Constant Duméril clasificó varias especies de reptiles. Él se dedicaba principalmente a la construcción de especies y Duméril a la de géneros. Cuando contrae tuberculosis abandona su trabajo en 1845 y se retira a Saint-Alban, falleciendo a los 42 años de edad (ver Beolens *et al.* 2011).

Esta especie se caracteriza morfológicamente porque es un cocodrilo palustrino que se observa como una especie de tamaño mediano que llega a medir de 3 a 3.5 metros de longitud en organismos adultos y de 20 a 30 cm al nacer. Aunque se tienen algunos registros que los machos adultos que pueden alcanzar hasta los 4.5 metros de longitud (Ross *et al.* 1987; Grigg *et al.* 1993; Platt 2005 y 2010; Sánchez-Herrera *et al.* 2011).

Se caracteriza por tener osteodermos débilmente aquillados en el dorso y grupos de escamas irregulares en la superficie ventral y lateroventral de la cola (Ross 1987; Grigg *et al.* 1993;

Platt 2005 y 2010; Sánchez Herrera *et al.* 2011). La longitud de la cabeza es 1.5 a 1.7 veces el ancho basal y es de forma aplanada, ancha y triangular. El hocico es ancho, corto y redondeado en la punta. (Grigg *et al.* 1993; Aguilar-Miguel 2005; Platt 2005 y 2010). Tiene dientes de tipo tecodonto, 5 dientes premaxilares, 13 o 14 maxilares y 15 mandibulares (Platt 2005 y 2010; Sánchez-Herrera *et al.* 2011; Rivera-Téllez 2017; Barrios 2018) (Figura 5).



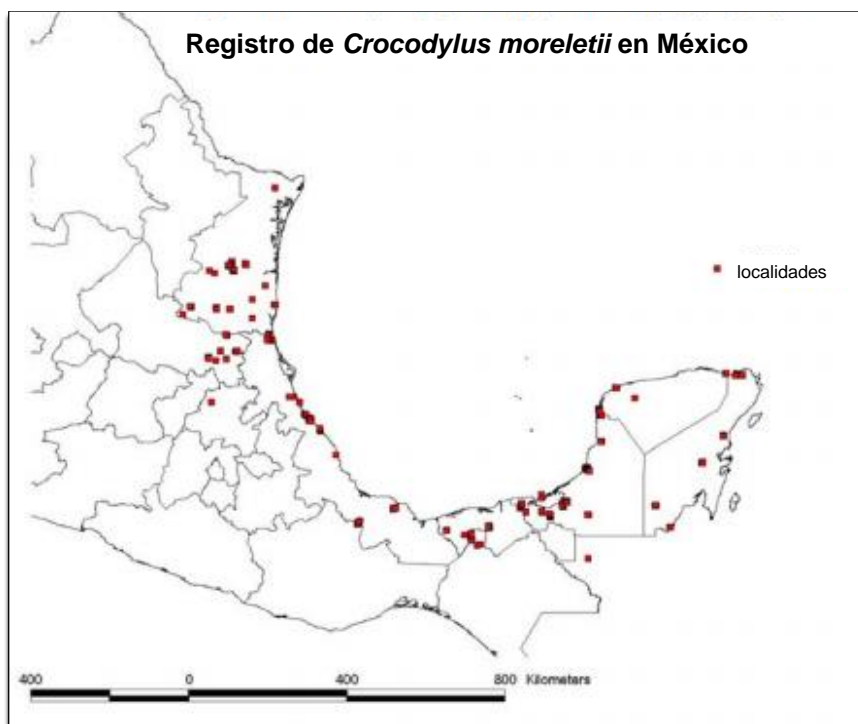
**Figura 5. Características morfológicas de *C. moreletii*.** En A) morfología en vista lateral. En B) dorsal (Grigg *et al.* 1993). En C) cráneo mostrando sus dientes. En D) escamas ventrales y en E) vista completa. Fotografías: Adriana Martínez Juárez.

Su coloración es amarillo ocre, negro y con manchas en la cola y los costados, siendo por lo general más oscuros los machos. Su cola es gruesa y se comprime en la parte distal; tiene dos crestas que se unen en la punta. Este es un órgano muy importante en el cocodrilo, ya que junto con las cuatro patas le proveen la propulsión en el agua, además de darle dirección al movimiento (Grigg *et al.* 1993; Sánchez-Herrera *et al.* 2011; Rivera-Téllez 2017; Barrios 2018). Los dedos de las patas, tanto anteriores como posteriores, poseen un 1/3 de membrana interdigital y los ojos poseen la membrana nictitante que sirve para proteger el ojo (Tista 1999; Grigg *et al.* 1993).

Esta especie se distribuye geográficamente en el Golfo de México, Guatemala y Belice. Habita principalmente áreas de agua dulce tales como: pantanos, humedales, estanques, ríos, lagunas y cuerpos de agua artificiales, aunque también ocasionalmente se encuentra en



aguas salobres o hábitats salinos (Álvarez del Toro y Sigler 2001; Sigler *et al.* 2002; Platt *et al.* 2008; Sánchez-Herrera *et al.* 2011). Se ha registrado a esta especie en un total de 63 localidades, en el mapa se ubica a la especie de *C. moreletii* como puntos rojos (Figura 6) (CONABIO 2005). Lo anterior fue el resultado del proyecto COPAN realizado de 2002 hasta 2004, un trabajo que tuvo como finalidad monitorear a esta especie de cocodrilo y se muestran las localidades que habita ordenadas alfabéticamente en la Tabla 3 (Domínguez-Laso 2006).



**Figura 6. Registros recientes de *Crocodylus moreletii* en México.** Tomado de: Domínguez-Laso *et al.* 2004.

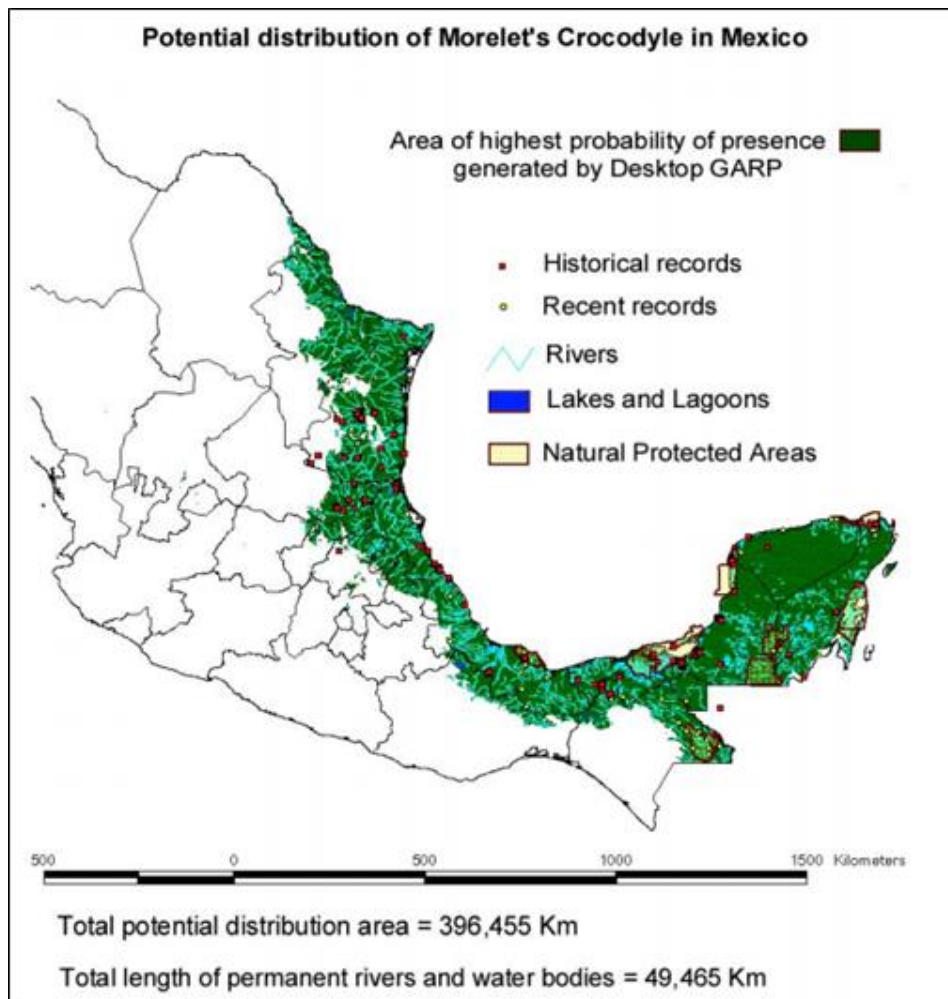
También se muestra un mapa con las áreas en donde es altamente probable encontrar presente *C. moreletii*, que es un total de alrededor de 396,455 km<sup>2</sup> (Figura 7), esta predicción la realizaron mediante el uso del software GARP (por sus siglas en inglés Genetic Algorithm for Rule-set Prediction) en los programas de monitoreo realizados por la CONABIO 2005 en México.

De todas las localidades donde es posible encontrar a esta especie de cocodrilo, particularmente nos interesa la localidad 36, que se trata de la Laguna de las Ilusiones en Villahermosa, Tabasco (Figura 8); pues de ella ha provenido el material biológico que hemos utilizado en nuestras investigaciones realizadas en esta tesis de doctorado, debido a la problemática de ese lugar, que se planteará más adelante.

**Tabla 3. Localidades con presencia de *Crocodylus moreletii*.**

#	Localidad	Estado	#	Localidad	Estado
1	Arroyo el Mango, El Manguito	Camp.	16	Lago Chunchuruk, A.P.F.F. Metzabok	Chis.
2	Arroyo el Zapote, Nueva Rosita	Camp.	17	Lago El Aguacate, Allende, Juárez	Chis.
3	Carretera Isla Arena, El Remate	Camp.	18	Lago El Caracol, Reforma	Chis.
4	Arroyo, C.I.V.S. Hampolol	Camp.	19	Laguna Amarilla A.P.F.F. Nahá	Chis.
5	Ducto PEMEX, Lagunas Pom y Atasta	Camp.	20	Rancho Casa Blanca, Estación Juárez	Chis.
6	Río Candelaria, Bella Palizada	Camp.	21	Río Tzendales, R.B. Montes Azules	Chis.
7	Río Caribe, Pablo Torres Burgos	Camp.	22	Lago Santa Virginia, Rancho El Resorte, Loma Bonita	Oax.
8	Río Champotón, Champotón	Camp.	23	Laguna de San Felipe Bacalar	Q.Roo
9	Río Chuman, El Aguacatál	Camp.	24	Laguna Muyil, R.B. YumBalám	Q.Roo
10	Río del Este, Laguna del Este	Camp.	25	Laguna Nueva España, Tres Garantías	Q.Roo
11	Arroyo Las Palomas, Pablo Torres Burgos	Camp.	26	Laguna Tablas, Ejido Calderón, Otón P. Blanco	Q.Roo
12	Río Mamantel, Pital Viejo	Camp.	27	Río Yalikín, R.B. YumBalám	Q.Roo
13	Río Palizada, Ejido Sta. Isabel	Camp.	28	Sistema Lagunar Balam-Nha, Ocoom, Felipe Carrillo Puerto	Q.Roo
14	Sistema Pargo, Fénix, Sandobal	Camp.	29	Río Santa María, San Antonio Tancoyol	Qro.
15	Arroyo San Vicente, Rancho Alejandría, Juárez	Chis.	30	Ciénega de Cabezas, Tamasopo	SLP
31	Jagüyes del Ejido El Lobo, Cd. Valles	SLP	48	Río Tamesí, San Antonio Rayón	Tamps.
32	Jagüeyes del Ejido la Morena, Aquismon, Cd. Valles	SLP	49	Bahía de Cochinos, Tuxpan	Ver.
33	Arroyo La Cañada-Tanchachín, Aquismon, Cd. Valles	SLP	50	Boca de Lima, Tecolutla	Ver.
34	Río Tantoan, San Antonio Rayón	SLP	51	Estero de la Cruz, Tecolutla	Ver.
35	Charcas del Parque Mueso La Venta, Villahermosa	Tab.	52	Estero La Victoria, Tecolutla	Ver.
36	<b>Laguna de las Ilusiones, Villahermosa</b>	<b>Tab.</b>	53	Estero Lagartos, Tecolutla	Ver.
37	Río Zanapa, Tres Bocas	Tab.	54	Estero Larios	Ver.
38	Arroyo Paxtle, San Fernando	Tamps.	55	Lago de Catemaco	Ver.
39	Río Delicias, Abasolo	Tamps.	56	Lago de Nixtamalapan	Ver.
40	Dique El Tecolote, Presa Emilio Portes Gil	Tamps.	57	Laguna La Mancha	Ver.
41	Estanques rústicos, Rancho El Huasteco, Gómez Farías	Tamps.	58	Pánuco, Moralillo	Ver.
42	Laguna de Champayán, Altamira	Tamps.	59	Estanquería Rústica, Rancho la Fe, Tuxpan	Ver.
43	Laguna El Carpintero	Tamps.	60	Río Tamesí, Panuco	Ver.
44	Río Corona, Presa Vicente Guerrero	Tamps.	61	(Ría) Río Angosto, R.B. Dzilam de Bravo	Yuc.
45	Arroyo Grande, Villa de Casas, Presa Vicente Guerrero	Tamps.	62	(Ría) Río Chipté, R.B. Ría Lagartos	Yuc.
46	Río Carrizales, Barra del Tordo, Aldama	Tamps.	63	Laguna Sisal, R.E. El Palmar	Yuc.
47	Río Lajas, Barra del Tordo, Aldama	Tamps.			

A grandes rasgos esta localidad se decretó en 1995 como Área Natural Protegida, clasificada como Reserva Ecológica, publicado en el Periódico Oficial del Estado N° 5470 del 8 de febrero de ese año. Consta de 259.27 hectáreas, incluyendo la zona federal destinada a la protección, conservación y restauración del cuerpo lagunar, y 229 hectáreas de cuerpo de agua (Secretaría de Energía, Recursos Naturales y Protección Ambiental, SERNAPAM). Tiene un clima tropical cálido húmedo con lluvia abundante todo el año y con un pico en la precipitación en verano, la temperatura media anual es de 27 °C (López-Luna 2011).



**Figura 7. Área de mayor probabilidad de existencia para *Crocodylus moreletii* en México.**  
Tomada del proyecto COPAN (Domínguez-Laso *et al.* 2004).

Esta reserva cumple ecológicamente con un papel importante pues es receptor de aguas pluviales y regula el microclima de la ciudad. También es el hábitat de una gran número de especies como: manatíes, tlacuache, peces como el peje lagarto; reptiles como el pochitoque, chiquigauo, hicotéa y la iguana verde. De aves que utilizan esta zona como lugar de anidación, reproducción, alimentación, protección y reposo de especies nativas o migratorias como la garza morena, los halcones guaco, el caracolero y el Martín pescador. También tiene muchas especies vegetales como el zapote de agua, la ceiba, macayo, bellota, arbustos, entre otros. (SERNAPAM). Además lo más importante para nosotros es que encontramos en este hábitat a especies de cocodrilos como el narigudo o americano *C. acutus* y el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*), que es la especie que se estudió en el presente trabajo, como ya se había mencionado anteriormente (Platt *et al.* 2002, 2006 y 2007; Barrios 2018).



**Figura 8. Laguna de las Ilusiones Villahermosa, Tabasco.** Foto: Iván Sánchez el Heraldo de Tabasco.

Algo que resulta interesante sobre estas especies de cocodrilos es que *C. moreletii* se distribuye de manera simpátrica con la especie *C. acutus* y las relaciones dentro de su hábitat entre estas dos especies comienzan a ser estudiadas (Merediz 1999; Platt y Thorbjarnarson 2000; Platt y Rainwater 2008; Cedeño *et al.* 2006), pues un fenómeno que se ha observado en los últimos años es la hibridación en la naturaleza entre *C. moreletii* y *C. acutus*, de la cual se tiene informes en las regiones costeras de Belice (Hekkala *et al.* 2015) y en México (Cedeño 2008; Rodríguez *et al.* 2008). En la laguna de las Ilusiones también se han reportado híbridos y su frecuencia comienza a ser mayor, pero aún se desconocen varias de las causas

que están provocando este fenómeno, aunque parece darse naturalmente (Pacheco-Sierra *et al.* 2016), pero se cree que podría también deberse a la reducción de los hábitats de estos animales, lo que está provocando que disminuya el aislamiento reproductivo teniendo así contacto genético entre estas dos especies (Cedeño Vázquez *et al.* 2008; Hekkala *et al.* 2015).

También al cocodrilo de pantano se considera una especie de suma importancia ecológica (Platt *et al.* 2000 y 2010; Sánchez *et al.* 2006), ya que es un depredador altamente eficiente que regula la trayectoria de las poblaciones de otras especies; por ejemplo se ha observado que las crías se alimentan de insectos, caracoles, babosas y moluscos, lo que cambia progresivamente cuando crecen. Por otro lado, la dieta del cocodrilo adulto consiste principalmente en caracoles manzana (acuáticos), peces, crustáceos, algunas aves y en menor cantidad mamíferos, cuyo tamaño depende de la talla del cocodrilo. También Platt (2007) habla de necrofagia (incluyendo cadáveres de ganado y otros animales domésticos) y de cleptoparasitismo (que consiste en robar comida de otros individuos).

Además esta especie de cocodrilo por sus actividades diarias modela la estructura del paisaje y de los flujos hídricos locales, lo que es de suma importancia para otras especies dentro del hábitat que comparten (Kushlan 1974; Bondavalli *et al.* 1999). Sin embargo, pese a la importancia de esta especie aún no ha sido bien estudiada, ya que se desconocen varios aspectos de su historia de vida, en especial sobre su reproducción, anidación y desarrollo (Platt *et al.* 2008).

En la naturaleza las hembras de *C. moreletii* alcanzan la madurez sexual alrededor 7-8 años de edad (1.5 m), pero en cautiverio la madurez puede ser alcanzada tempranamente a los 4-5 años (1.3 m). Por otro lado, los machos alcanzan su madurez sexual a los 8 años de edad o 1.8-2.7m de longitud (Casas-Andreu *et al.* 2011). En la temporada de cortejo los machos son más territoriales y agresivos. El cortejo dura alrededor de media hora y se caracteriza por golpes en el agua que el macho provoca con su mandíbula y cola, seguidos de inmersiones en el agua donde expulsa un chorro de agua. Si la hembra esta receptiva, responde levantando la cabeza verticalmente fuera del agua, a lo que el macho reacciona con ronquidos, soplidos y burbujas para culminar con la monta de la hembra; la cópula dura de cinco a diez minutos (Barrios 2018).

### **3.2 Biología de la reproducción: anidación, ovoposición, desarrollo embrionario y eclosión**

La reproducción de esta especie ocurre en los meses de abril a septiembre y en un estudio realizado por López-Luna y colaboradores (2011) observaron que la anidación ocurre en la temporada de lluvias entre los meses de mayo y julio. Las hembras construyen un nido de montículos de vegetación fresca y en descomposición sobre el suelo en el cual ovopositan de 30 a 50 huevos, al final de la estación seca (generalmente desde mediados de mayo hasta finales de junio o a inicios de julio). La eclosión ocurre en agosto y septiembre, cuando la estación húmeda está en su apogeo, presentando un periodo de incubación de mínimo 63 días y máximo de 81 días, aunque se han llegado a registrar 85 días de desarrollo embrionario (Platt *et al.* 2008; Casas-Andreu *et al.* 2011).

Se han realizado algunos estudios sobre la anidación y eclosión de *C. moreletii* de manera silvestre y en cautiverio (Casas-Andreu *et al.* 2011; Platt *et al.* 2010). En particular muchos de estos trabajos son de interés, sobre todo dos que fueron realizados en la Laguna de la Ilusiones, pues en ellos se encontró que la población de las crías que nacen se está sesgando el sexo hacia machos (López- Luna *et al.* 2011y 2015), lo cual es un problema grave.

Lo anterior es preocupante pues se desconocen muchos aspectos de cómo es que se determinan sexualmente los cocodrilos, además de cómo ocurren las fluctuaciones de temperatura en un nido, pues estas últimas juegan un papel importante en la proporción de sexos. Además también desconocemos las actividades humanas que perturban los hábitats de esta especie de cocodrilo y que afectan su desarrollo y determinación sexual. Es por ello que decidimos estudiar a esta especie y a continuación se describe la metodología que se empleo para caracterizar aspectos morfológicos del desarrollo embrionario y de la determinación sexual por temperatura. Así como aspectos histológicos de cocodrilos jóvenes de 5 años de edad.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Metodología para la descripción morfológica de los embriones de *C. moreletii*.

#### 4.1.1 Área de estudio

La laguna de las Ilusiones es un cuerpo de agua urbano, localizado en el municipio del Centro de la cabecera municipal de Villahermosa, Tabasco, que constituye un área de gran valor ecológico y cultural. Fue decretada el 8 de febrero de 1995 en la categoría de Reserva Ecológica. La superficie comprendida en esta Reserva está destinada a la protección, conservación y restauración de los ecosistemas del Estado de Tabasco, con la finalidad de brindar espacios para la recreación, educación, aprovechamiento e investigación ecológica. Se encuentra localizada entre las coordenadas 17° 59'39.9" de latitud Norte, 92°56'14.7" de longitud Oeste y cuenta con una superficie de 259,773 ha. Su clima es cálido húmedo con lluvias en verano y su temperatura anual promedio es de 49°C. La precipitación anual promedio es de 5.26 mm y la evaporización es cercana a 4.38 mm anuales (López-Luna *et al.* 2015).

#### 4.1.2 Trabajo de campo: Localización y colecta de nidos

En colaboración con personal de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se realizaron búsquedas diurnas al inicio de la temporada de anidación del cocodrilo de pantano en la Laguna de la Ilusiones. Consistió en un recorrido por tierra, haciendo énfasis en aquellas zonas en donde hay rastros visibles de la presencia de nidos.

Se colectaron 220 huevos de 11 nidos en riesgo de depredación durante la época de anidación de *C. moreletii* con los permisos de SEMARNAT SGPA/DGVS/04879/13, SGPA/DGVS/05531/16, SGPA/DGVS/3315/17, SGPA/DGVS/003085/18, los cuales nos especificaron el número de huevos que podíamos colectar. Estos fueron transportados en una cama compuesta del mismo sustrato natural que compone al nido, en cajas de plástico individuales de 25X18X12cm, al laboratorio A005 de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Durante la primera etapa experimental, los huevos se colocaron en incubadoras para ave HovaBator 1602N (GQF Manufacturing Company Inc. en Savannah, Ga) que contenían vermiculita húmeda y se incubaron a temperaturas controladas

de 33°C (110 huevos) y 30°C (110 huevos). La temperatura fue monitoreada empleando *dataloggers* colocados en cada caja y en cada incubadora y los datos fueron procesados con ayuda del software HOBOWarePro.

#### **4.1.3 Obtención de embriones**

Se emplearán 75 huevos para caracterizar el estadio de desarrollo embrionario. Para ello la metodología consistió en realizar un pequeño orificio en la cáscara del huevo con una aguja de disección, posteriormente se abrió con ayuda de unas tijeras y unas pinzas de disección, vaciando el contenido del huevo en una caja Petri. A continuación, el embrión se localizó y se cortó el área con una pequeña tijera separándolo del resto del contenido con una pinza sin dientes; enseguida se trasladó a otra caja Petri con solución PBS 1X para limpiar el exceso de vitelo.

#### **4.1.4 Análisis anatómico de embriones de *C. moreletii***

Posteriormente con el uso de un microscopio estereoscópico Zeiss temi 2000-C (Artisan Technology Group, Champaign, IL), los embriones fueron observados. Para estimar el estadio de desarrollo embrionario se tomó como referencia la descripción de Ferguson (1985) para *Alligator mississippiensis*, considerándose para la clasificación los datos morfológicos más notables, como: las características de las extremidades, la cabeza (desarrollo de la mandíbula), de las escamas y de la pigmentación, haciendo un examen visual minucioso, pues en la PARTE 2 estos resultados se correlacionaron con el análisis histológico del desarrollo gonadal. Finalmente se capturaron imágenes de cada estadio de desarrollo embrionario con una cámara Sony CibershotDSC-S75, acoplada al mismo microscopio para la elaboración de la tabla de desarrollo de *C. moreletii*.

### **4.2 Metodología para la caracterización histológica y molecular del desarrollo gonadal de *C. moreletii*.**

#### **4.2.1 Localización y colecta de nidos.**



En la Laguna de las Ilusiones de Villahermosa Tabasco, México se colectaron un total de 220 huevos de 11 nidos de *Crocodylus moreletii* durante la temporada de anidación en los meses de mayo y junio del 2012, 2013, 2015, 2016, 2017 y 2018 bajo los permisos de la SEMARNAT SGPA/DGVS/04879/13, SGPA/DGVS/05531/16, SGPA/DGVS/3315/17, SGPA/DGVS/003085/18. Los huevos fueron transportados al laboratorio de biología del desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas A005 de la Universidad Nacional Autónoma de México en cajas de plástico individuales con el mismo sustrato del nido.

#### **4.2.2 Incubación y obtención de embriones**

Los huevos fueron mantenidos en contenedores con vermiculita e incubados a una temperatura de 30°C (110 huevos) y de 33°C (110 huevos). Posteriormente se realizaron muestreos en el transcurso del desarrollo embrionario cada 3 o 5 días, los cuales consistieron en la disección de los huevos y la obtención del embrión. Para ello se realizó un orificio en el huevo, se localizaba al embrión y se cortaba el área, enseguida se trasladaba a una caja Petri con una solución de PBS 1X pH7.1 para limpiar el exceso de vitelo. A continuación las gónadas se retiraron quirúrgicamente de los embriones y se fijaron en Karnovsky para ser procesadas en la resina epoxica Embed 812 (Microscopía electrónica Science, Hatfield, PA) para realizar microscopia de campo claro, o bien, en paraformaldehído al 4% preparado en PBS 1X pH 7.1 para realizar cortes en congelación y realizar la técnica de inmunofluorescencia. Las extremidades, la cabeza o el embrión completo se colocaron en otro frasco con formol neutro al 10% para fijarlos y estimar el estadio de desarrollo embrionario, tomando como referencia la tabla de desarrollo realizada por Ferguson (1985) para *Alligator mississippiensis*, utilizando los caracteres morfológicos más notables como el desarrollo de las extremidades anteriores, los cuales fueron correlacionados con el desarrollo gonadal, tal como se describió en la sección anterior.

#### **4.2.3 Experimentos de intercambios de temperatura**

Con algunos huevos se realizaron experimentos de intercambio de temperatura sencillos, los cuales consistieron en incubar durante un tiempo, grupos de 5 huevos por estadio de desarrollo embrionario en una temperatura de 30°C (feminizante) y otro grupo de 5 huevos a una temperatura de 33°C (masculinizante), los cuales durante el desarrollo embrionario fueron intercambiados a la temperatura contraria en distintos estadios de desarrollo de *C. moreletii*, específicamente del 16 al 25. Una vez realizado lo anterior, los

embriones se dejaron desarrollar hasta el estadio 25, 26 o 27 para retirar sus gónadas quirúrgicamente, las cuales se fijaron en Karnovsky para posteriormente su inclusión en la resina epoxica EMBED 812 (Microscopía electrónica Science, Hatfield, PA) y se los histológicamente realizando cortes semifinos de las gónadas procesadas en la resina plástica.

#### **4.2.4 Microscopía de campo claro y electrónica**

Se realizó siguiendo el protocolo reportado por Antonio-Rubio *et al.* (2013), brevemente, las gónadas se fijaron en solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) durante 24 horas a 4°C a continuación se cambió por amortiguador de cacodilatos de sodio (0.1 M pH 7.3) y se mantuvieron en él por 24 horas a 4°C. Posteriormente las gónadas se post-fijaron en tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>; Sigma – Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora y se deshidrataron en soluciones graduales de etanol 70 – 100% (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, México). A continuación se colocaron en acetonitrilo dos veces por 20 minutos cada una (JT Baker) y en diluciones de epón-acetonitrilo (EMS-JT Baker) 1:1 por una hora y 2:1 otra hora. Finalmente, a las muestras se le agregó la resina epóxica EMBED 812 (Microscopía electrónica Science, Hatfield, PA) pura por 24 horas y se polimerizaron en bloques de plástico a 60°C durante 24 horas. Para cada muestra se obtuvieron cortes semifinos de 1 micra de grosor utilizando el ultramicrotomo (Leica, Wetzlar, Germany) los cuales fueron teñidos en azul de Toluidina.

#### **4.2.5 Inmunofluorecencia**

Inmediatamente después de su disección, las gónadas se fijaron en paraformaldehído al 4% preparado en PBS 1X pH 7.1 durante 20 min, se lavaron con PBS 1X por 5 min y se colocaron en sacarosa al 30 % (Sigma, Aldrich) preparada en PBS 1X pH7.1 a 4°C durante toda la noche. Las muestras se embebieron en medio de montaje óptimo para cortes en frío (OCT; Tissue-Tek, Sakura Finetek Torrance, CA, USA) y se congelaron en hexano (JT Baker) a -70°C. Posteriormente se obtuvieron cortes de 20 µm en un criostato (Leica GmbH, Heidelberg, Nussloch, Deutschland).

La inmunofluorecencia se realizó siguiendo lo previamente descrito por Moreno-Mendoza *et al.* (2004). Brevemente, los cortes se trataron con tritón X-100 al 1% (Sigma, Aldrich) preparado en PBS 1X pH 7.1 durante 10 min, se lavó con PBS 1X y se bloqueó durante 2 horas con albúmina de suero bovino al 1% (BSA; 1%, PBS 1X pH7.1, Sigma, Aldrich). Los

cortes se incubaron por separado con anticuerpos policlonales contra las proteínas VASA (1:500; ab13840, Abcam), SOX9 (1:250, AB5535; Millipore, Burlington MA), los cuales fueron diluidos en albúmina al 1% durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron con PBS 1X y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 (1: 200, A10520; Life Technologies, Carlsbad, CA) diluido 1:200 en albúmina por 1 hora a temperatura ambiente y se repitieron los pasos para lavar e incubar con el anticuerpo secundario. Finalmente, se colocó el medio de montaje para fluorescencia permanente (Dako™, Carpinteira, CA) y se guardaron a 4°C para su posterior análisis en un microscopio confocal Zeiss (LSM Pascal; Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

### **4.3 Metodología para la caracterización histológica y molecular de ovarios y testículos de *C. moreletii* jóvenes de 5 años de edad**

#### **4.3.1 Obtención de tejidos**

Se obtuvieron ovarios de dos hembras y se obtuvieron testículos de tres machos de *Crocodylus moreletii*, originarios de la Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco, México. Estos organismos fueron colectados en mayo de 2016, cuando la especie estaba en época de reproducción. Los permisos SEMARNAT/SGPA / DGVS / 05531/16 utilizados fueron parte de un programa para evaluar la biología reproductiva de esta especie, ya que están bajo protección especial. Los animales fueron sacrificados inyectando 5 ml de lidocaína en el cerebro. Los ovarios y luego los testículos se extirparon quirúrgicamente y se cortaron transversalmente en varias piezas de aproximadamente 5mm. Se fijó un fragmento en paraformaldehído (PFA) al 4% para inmunofluorescencia y otro fragmento en el fijador de Karnovsky para realizar Microscopía de campo claro y electrónica. Finalmente, se congelaron otros fragmentos para la extracción RNA total y análisis de transferencia de proteínas *Western blot*. Las muestras fueron transportadas al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y fueron procesados como se describe a continuación.

#### **4.3.2 Microscopía óptica y electrónica**

Fragmentos de ovarios y testículos fueron fijados en la solución de Karnovsky. (Karnovsky, 1965) durante 24 horas a 4 ° C posteriormente se transfirieron a amortiguador de cacodilatos de sodio (0.1 M pH 7.4) y fueron almacenados durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, las gónadas se fijaron en tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>;Sigma – Aldrich, St.

Louis, MO) durante 1 hora y fueron deshidratadas en soluciones de etanol (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, México) al 70% –100%. A continuación los fragmentos de tejido fueron colocados en acetonitrilo (J.T. Baker) dos veces durante 20 minutos cada uno, e incubado en diluciones de la resina Embed 812 (Microscopía electrónica Science, Hatfield, PA) -acetonitrilo (J.T. Baker) 1: 1 durante 1 hora y 2: 1 para otra hora. Finalmente, las muestras se incubaron en resina Embed 812 pura durante 24 horas y fueron polimerizados en bloques de plástico a 60 ° C durante 24 horas. Por cada muestra, se realizaron cortes semifinos de 1 mm de espesor y ultrafinos de 60 nm de espesor que se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Leica (Wetzlar, Alemania). Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, se montaron con medio de montaje Cytoseal (Microscopía electrónica, Hatfield, PA) y fueron observados con ayuda de un microscopio de luz (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Los cortes finos se colocaron en rejillas de cobre con un diámetro de 3 mm, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo y observado bajo un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 (JEM- 1010; JEOL, Tokio, Japón).

### 4.3.3 Inmunohistoquímica

Las muestras congeladas se cortaron en secciones de 14  $\mu$ m de espesor y se lavaron con PBS 1X durante 10 min. La peroxidasa endógena fue inactivada con 3% de peróxido de hidrógeno (J.T. Baker) en metanol durante 30 min. Los cortes fueron lavados con PBS 1X durante 5 min y Triton 1% X-100 (Sigma– Aldrich, Saint Louis, MO) se añadió durante 10 min. Los cortes fueron lavados con PBS 1X, se bloqueó con albúmina al 1% durante 2 horas y se incubó durante la noche con el anticuerpo primario FOXL2 (sc-68348; Santa Cruz Biotecnología, Dallas, TX) a una dilución de 1:50. Al día siguiente, los cortes se lavaron cuatro veces con PBS 1X durante 5 min cada uno. El *kit* de vector AB se usó y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución de 1: 100 en albúmina al 1% (Sigma- Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron cuatro veces en PBS 1X por 5 min cada uno y luego se colocaron en el reactivo AB preparado conforme a las instrucciones del *kit* Vector AB (Vectastain ABC *Kit*, Burlingame, CALIFORNIA). Los cortes se lavaron de nuevo cuatro veces con PBS 1X durante 5 min cada uno y finalmente fueron revelados con Diaminobenzidina (Sigma – Aldrich) durante 4 min. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron montados utilizando medio de montaje Cytoseal.

#### 4.3.4 Inmunofluorescencia

Los fragmentos de ovario y testículo se fijaron en PFA (4% en PBS 1X pH 7.1) durante 30 minutos, se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos y se colocaron en sacarosa (30% PBS 1x pH 7.1, Sigma-Aldrich) a 4°C durante la noche. Las muestras fueron incluidas en medio de montaje óptimo para cortes en congelación (OCT, tejido Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA) y fueron congelados utilizando hexano a -70° (J.T. Baker). Posteriormente, se obtuvieron secciones de 20  $\mu\text{m}$  en un criostato (Leica GmbH, Heidelberg, Nussloch, Deutschland). La inmunofluorescencia fue realizada según lo descrito previamente por Moreno-Mendoza *et al.* (1999). Brevemente, los cortes se trataron con Triton 1% X-100 (1% en 1 x PBS pH 7.1) durante 10 minutos, se lavó con 1 x PBS y se bloqueó durante 2 horas con 1% albúmina de suero bovino (BSA, 1% en 1 x PBS pH 7.1). Las secciones fueron incubadas por separado con anticuerpos policlonales contra SOX9 (1: 250, AB5535; Millipore, Burlington MA), TRPV4 (1: 250, ab94868; Abcam, Cambridge, MA), VASA (1:50, ab13840; Abcam) y Laminina (1: 200, conejo ab11575; Abcam), diluidos en albúmina al 1% durante la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron cuatro veces con PBS1X durante 5 minutos y se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a la cianina 3 (Cy3) (1: 200, A10520; Life Technologies, Carlsbad, CA), Cy5 (1: 100, A10523; Molecular Probes, Eugene, O) y / o isotiocianato de fluoresceína anti-conejo (FITC) (1:50, 81611; Invitrogen, Carlsbad, CA) diluido en albúmina / PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección simultánea de las proteínas de SOX9-Laminina, se realizó la post-fijación con 4% de PFA durante 15 min. Luego los cortes fueron lavados con PBS1X, se incubaron con Triton 1% X-100 durante 5 min, se lavó de nuevo con PBS1X y se bloqueó durante 2 h con BSA al 1%. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-laminina y fueron lavados e incubados con anticuerpo secundarios como se mencionó anteriormente. Finalmente se incluyeron en medio de montaje para fluorescencia permanente (DakoTM, Carpinteira, CA) y las muestras se almacenaron a 4°C. Posteriormente se realizó el análisis bajo un microscopio confocal Zeiss (LSM Pascal; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) equipado con argón-criptón y helio-neón, empleando filtros para FITC y Cy3 y la técnica de contraste Nomarski.

#### 4.3.5 Detección de la actividad de la $\Delta 5\text{-}3\beta\text{HSD}$

Se obtuvieron secciones de 14 $\mu\text{m}$  de espesor de los tejidos incluidos en Tissue-Tek, estos fueron incubados a 37°C para la detección histoenzimática medio de  $\Delta 5\text{-}3\beta\text{HSD}$  compuesto de 20 mg de  $\beta$ -nicotinamida dinucleótido de adenina ( $\beta$ -NAD; N1636-250; Sigma-

Aldrich), 20 mg de Nitro Blue Tetrazolium (N5514-10; Sigma-Aldrich) y 2 mg de dehidroisoandrosterona (D-4000; Sigma – Aldrich) durante 1 hora. Las secciones fueron lavadas con agua destilada y se montaron utilizando un medio de montaje acuoso (Dako™) para ser observadas bajo un microscopio de campo de luz (Levy, Deane, y Rubin, 1959). Como control positivo para la reacción se utilizaron cortes de testículo de ratón de la cepa CD1, pues la actividad de  $\Delta 5\text{-}3\beta\text{HSD}$  se observa en células de Leydig.

#### 4.3.6 Amplificación por RT-PCR

La extracción de RNA total de ovarios y testículos de *C. moreletii* fue realizado con el reactivo TRIZOL (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. El total de RNA obtenido se diluyó en H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich) y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvo la concentración y pureza de las muestras utilizando un espectrofotómetro de luz UV (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para confirmar la integridad de las muestras 1  $\mu\text{g}$  del RNA total se corrió en un gel de agarosa al 1.5% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) en amortiguador TAE 1X (ácido trisacético-EDTA). Para eliminar contaminación con DNA genómico, 1  $\mu\text{g}$  de RNA se trató con el enzima DNasa I (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La síntesis de DNA codificante (cDNA) se llevó a cabo utilizando el *kit* M-MLV de transcriptasa reversa (Invitrogen). La mezcla de reacción se preparó con 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, 4  $\mu\text{L}$  del amortiguador primera hebra (5X) , 2  $\mu\text{l}$  de la mezcla de dNTP (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  de oligos aleatorios (0.3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  de DTT (0.1 M), 1 $\mu\text{l}$  de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 $\mu\text{L}$  de 20 U RNase OUT™ y 1 $\mu\text{L}$  de 200 U de la enzima M-MLV. La solución se incubó a 37 ° C durante 60 min y a 65 ° C durante 5 min en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA). Se realizó amplificación de fragmentos específicos con el *kit* recombinante de polimerasa de DNA Taq (Invitrogen). Se utilizó un volumen de 4  $\mu\text{l}$  de cDNA en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contiene 9.71 $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O DEPC, 2 1 $\mu\text{L}$  Amortiguador (10 x), 11 $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 1 $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTPs (10 mM), 1,5 U de Taq polimerasa y 1 1 $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido específico (20mM). Condiciones de PCR para todos los fragmentos fueron los siguientes: 94 ° C durante 5 min, 40 ciclos a 94 ° C durante 40 segundos, 60 ° C durante 40 segundos, 72 ° C durante 60 segundos y un ciclo de extensión de 72 ° C Durante 5 min en un termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories). Los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de fragmentos se enumeran en Tabla 4. Secuencias de mRNA reportadas para *A. mississippiensis* y *Crocodylus palustris* se utilizaron para el diseño de oligonucleótidos específicos para SOX9 y VASA, utilizando el programa Primer BLAST (Ye, 2012). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del

gen FOXL2 fueron los reportados por Janes, Elsey, Langan, Valenzuela y Edwards, 2013. La secuencia utilizada para los oligonucleótidos del gen TRPV4 fue que reportado por Nagai, Saitoh, Saito y Tsutsumi, 2012. Como control positivo, se utilizaron oligos para la actina y los controles negativos fueron realizados sin cDNA. Los productos de reacción se corrieron en un gel al 1.3% de agarosa en TAE 1X, y fue visto con un transductor de UV (Vilber Lourmat, Torcy, Francia) y también se fotografió para cuantificación de la densitometría.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos y temperaturas de alineación usadas para el RT-PCR.				
Gene	Oligonucleótido 5' → 3'	AL (pb)	AT (°C)	Referencia
<b>Sox9</b>	F: TACGACTACACGGACCACCA R: ACCTCCTGAAGGCTGCTGTA	400	60	AF106572 FJ790140
<b>Foxl2</b>	F: TACTCSTACGTGGCCTSAT R: TTCTCGAACATGTCCTCGCAGG	251	60	Janes et al. 2013
<b>Vasa</b>	F: GCAGTGATGTCCAGCAGAGT R: CCGAAGAGCTTCTTCCCGTT	218	60	XM_014594050
<b>TRPV4</b>	F:CTTCTTCCAGCCCAAGGATG R:GTCTTGGCAGCCATCATGAG	299	60	Kazuya Nagai et al. 2012
<b>Actina</b>	F: GGGTCAGAAGAATTCCTATG R: GGTCTCAAACATGATCTGGG	254	60	Moreno-Mendoza et al. 2004
Secuencias empleadas para RT-PCR. La amplificación de actina se utilizó como control positivo. F, secuencia hacia adelante; R, secuencia inversa; pb, pares de bases del fragmento amplificado; AL, longitud del amplificado; AT, temperatura de alineación.				

#### 4.3.7 Análisis densitométrico

Los fragmentos correspondientes de cada gen se amplificaron por triplicado para cada muestra. La densidad óptica (Intensidad / mm<sup>2</sup>) para cada banda fue cuantificada por densitometría utilizando el programa Quantity One (Bio- Laboratorios Rad). La densidad óptica de cada muestra se normalizó con respecto a los valores de actina correspondientes. Los valores de expresión para cada gen se presentan como comunidades de expresión relativas arbitrarias, obtenido por la relación del gen de interés / *Actina* para cada muestra. Los valores de expresión relativos se presentan como la media de experimentos independientes ± desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con un 95% de confianza utilizando el Statgraphics Centurion. Programa estadístico XV.

#### 4.3.8 Secuenciación de productos RT-PCR

Las bandas correspondientes a cada gen fueron aisladas del gel de agarosa y se purificaron siguiendo el protocolo aconsejado en el *kit* QIAquick de extracción del gel (QIAGEN, Hilden, Alemania). Los productos de la reacción del RT-PCR secuenciados en el analizador genético ABI 3730XL (aplicado Biosistemas). Las secuencias se analizaron con el programa BLASTN 2.4.0 para obtener el porcentaje de similitud comparada con respecto a secuencias previamente reportadas en GenBank. Las secuencias para los fragmentos analizados fueron depositados en el GenBank con los siguientes datos: Sox9, 400 pb, 495 aa, No. de acceso de GenBank NM\_001287268.1; Foxl2, 251 pb, 307 aa, número de acceso de Gen Bank XM\_006258812.2; Vasa, 218 pb, 694 aa, número de acceso de Gen Bank XM\_014594053.1.

#### 4.3.9 Análisis de *Western blot*

Se extrajo la proteína total de las muestras de tejidos procesados con PFA 4 %. Se realizó el análisis de *Western blot* de las proteínas SOX9, FOXL2, VASA, y TRPV4. Para esto, los tejidos fueron descongelados desde de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavaron con PBS 1X durante 1 hora en cada temperatura. Como los tejidos estaban fijados en PFA al 4%, la lisis se realizó mediante la adición de 250  $\mu\text{l}$  de Tyroides-BSA a pH 7,3 (0,2% de mercaptoetanol, 20  $\mu\text{l}$  Orovanadato 100 nM, inhibidor de la proteasa ROCHE), las mismas cantidades de tejido se homogeneizaron en 250  $\mu\text{l}$  de amortiguador 2X Laemmli (S3401 Sigma-Aldrich) el cual se agregó inmediatamente. Finalmente, las muestras se agitaron en el vórtex y se hirvieron durante 5 minutos, un proceso que fue repetido tres veces más alcanzando un total de 20 min. Las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las proteínas totales de los lisados se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12% (SDSPAGE). Las muestras se corrieron a 100 V en amortiguador de corrida TRIS - Glicina - SDS a pH 8.3 por 2 h por 30 min. Una vez completada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Laboratorios Bio-Rad) en amortiguador TRIS - Glicina - Metanol pH 8.3 a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este proceso fue realizado A 25 V con 200 mA de corriente, durante 1 hora en frío. Al final de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 2% leche descremada (Svelty, Nestlé, CDMX, México) durante 24 horas. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios contra SOX9 (1: 500), TRPV4.(1: 500), VASA (1: 500) y FOXL2 (1: 500) durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  bajo agitación continua. Al día siguiente, la membrana de nitrocelulosa se lavó tres veces durante 5 minutos con 5 mL del amortiguador PBS 1X pH 7.1. Luego se incubó la membrana con un anticuerpo secundario anti-conejo



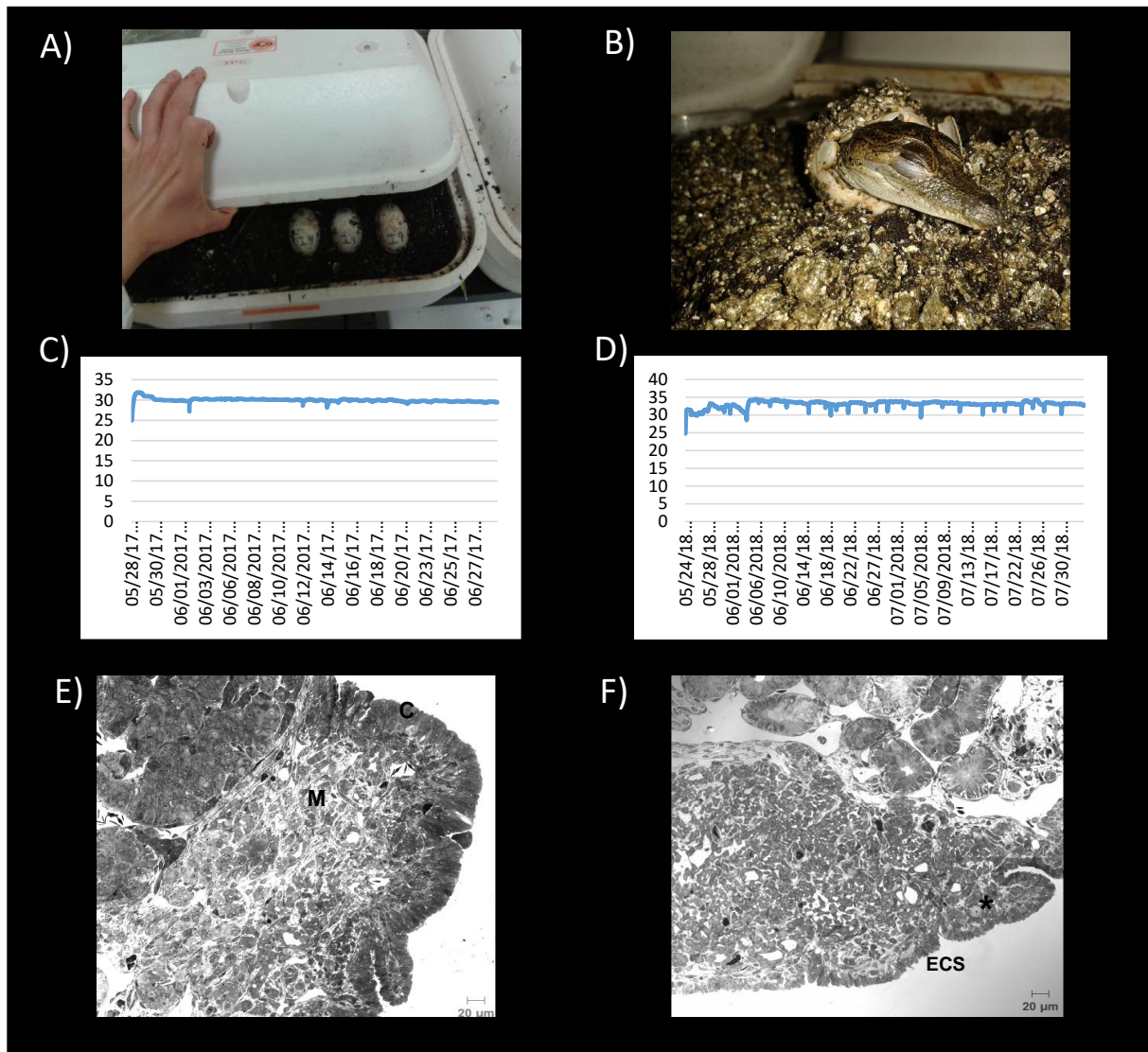
acoplado a HRP (A16104; Invitrogen, CA, EE. UU.) durante 1 h 30 min a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron de nuevo tres veces con 20 mL de PBS 1X durante 5 min y la proteína fue detectada por medio del *kit* de quimioluminiscencia BM Quimioluminiscencia Western Blotting Ratón / Conejo (34075; ThermoScientific, Rockford, IL). Finalmente, Las membranas se expusieron a placas de rayos X (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Buckinghamshire, Reino Unido) de 1 a 5 min. Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas se obtuvieron por triplicado para cada muestra. La densidad óptica (Intensidad / mm<sup>2</sup>) para cada banda se cuantificó por densitometría utilizando el programa QuantityOne (Laboratorios Bio-Rad). La densidad óptica de cada muestra se normalizó con respecto a los correspondientes valores de actina. Se presentan los valores de expresión para cada proteína como la razón proteína de interés / ACTINA para cada muestra. Valores de expresión relativos se presentan como las media de experimentos independientes con su desviación estándar. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple de Tukey con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el Statgraphics Centurion XV programa estadístico.

## V. RESULTADOS

Esta sección está dividida en tres PARTES, en cada una se ofrece una introducción a manera de resumen sobre el objetivo de la investigación que se realizó, el desarrollo de los resultados, una breve discusión y conclusiones de los mismos. El primer resultado que se muestra está relacionado con el primer objetivo del proyecto que fue determinar la temperatura de incubación necesaria para generar 100% de machos y 100% de hembras (Figura 9A -F). Como se mencionó en la metodología, un grupo de huevos fueron incubados y mantenidos durante su desarrollo en una temperatura de 30°C con un promedio de 29.9°C, la cual generó únicamente hembras en las crías y cuando estuvieron a una temperatura de 33°C con un promedio de 33.3°C se generaron exclusivamente machos (Figura 9C-D). También, se muestra una imagen representativa de los embriones sexados, donde se observa el corte transversal de un ovario y de un testículo (Figura 9E-F), demostrando que estas temperaturas son la feminizante y la masculinizante para esta especie de cocodrilo. Este es el primer resultado que se muestra pues es muy importante para comprender el desarrollo de los siguientes objetivos. Además se retoma la descripción del mismo, pero con detalle en la PARTE 2 de los resultados.

### **5.1 PARTE 1. Descripción del desarrollo embrionario del cocodrilo de pantano: *Crocodylus moreletii***

Resumen. La determinación sexual por temperatura (DST) está presente en varias especies de reptiles, incluyendo a los cocodrilos. Es un mecanismo donde la temperatura de incubación del huevo influye en la determinación del sexo del embrión. *Crocodylus moreletii* es una especie de cocodrilo mexicano que en los últimos años ha tenido problemas debido a un incremento en la proporción de machos que nacen, por lo que resulta de interés realizar la descripción embriológica de la especie, ya que nos permitiría conocer los estadios en los que se está determinando sexualmente y por lo mismo en qué estadio de desarrollo está sucediendo este problema. Gracias a estudios realizados en otras especies de como *A. mississippiensis*, se sabe que la temperatura no sólo influye en la determinación sexual del embrión, sino también en otras características particulares como: el tamaño, la pigmentación, el metabolismo y el tiempo de desarrollo embrionario.



**Figura 9. Temperatura feminizante (30°C) y masculinizante (33°C) de *Crocodylus moreletii*.** En A) Incubación de los huevos a 30°C y a 33°C. En B) Los embriones fueron sexados en estadios avanzados del desarrollo 25, 26, 27 o 28 (eclosión), la fotografía es de un estadio 28. En C) Gráfica de la temperatura de incubación obtenida de los *dataloggers* de las incubadoras a 30°C con un promedio de 29.9°C y en D) 33°C con un promedio de 33°C. En E) se muestra un corte transversal de un ovario, las características distintivas de la morfología de un ovario: la corteza ovárica y la médula. En F) se muestra las características de la morfología de un testículo: un epitelio cúbico simple y el desarrollo de cordones testiculares en la médula. C (corteza), M (médula), ECS (epitelio cúbico simple), \* cordón testicular en formación.

Estas características son dimórficas, porque el embrión que se desarrolla a una mayor temperatura tiene un periodo de desarrollo más corto, eclosiona más rápido del huevo y su tamaño es mayor con respecto al embrión que se desarrolla a una menor temperatura (Deeming *et al.* a y b 1989; Smith *et al.* 1993). Algo que preocupa a los biólogos sobre este tipo de organismos que se determinan sexualmente por temperatura, es el efecto que pueden tener el presente cambio climático y la presencia de contaminantes en el ambiente, que pueden afectar el desarrollo embrionario durante el PST y perjudicar a las poblaciones de los mismos, por lo que resulta urgente conocer más sobre la fisiología y el desarrollo este tipo de organismos, en particular del embrión (Deeming *et al.* a y b 1989; Smith *et al.* 1993). El objetivo de este apartado es caracterizar la morfología de las distintas etapas del desarrollo embrionario de *C. moreletii*. Para ello se realizó la colecta de huevos, los cuales se incubaron a 30°C (temperatura feminizante) y 33°C (temperatura masculinizante), conforme avanzó el desarrollo embrionario se obtuvieron los embriones completos, los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4%. Los embriones se observaron en un microscopio estereoscópico Zeiss stemi 2000-C y se describieron sus características morfológicas bajo los criterios de la tabla de desarrollo elaborada para *Alligator mississippiensis* por Ferguson (1985). Se comprobó que la temperatura feminizante es 30°C y la masculinizante 33°C (Ver PARTE 2 de resultados). Las diferencias entre los embriones que fueron incubados en una temperatura controlada de 33°C es que se desarrollaron más rápido que los incubados a 30°C, la pigmentación fue marrón oscuro, con franjas negras y el tamaño del embrión fue mayor que el del embrión incubado a 30°C, pues estos fueron más pequeños y claros. Podemos concluir que el desarrollo embrionario en *C. moreletii* se está llevando sin problemas en condiciones de laboratorio, por lo que posiblemente los problemas en la proporción de sexos se deban a contaminantes presentes en su medio natural. A continuación se detallarán estos resultados.

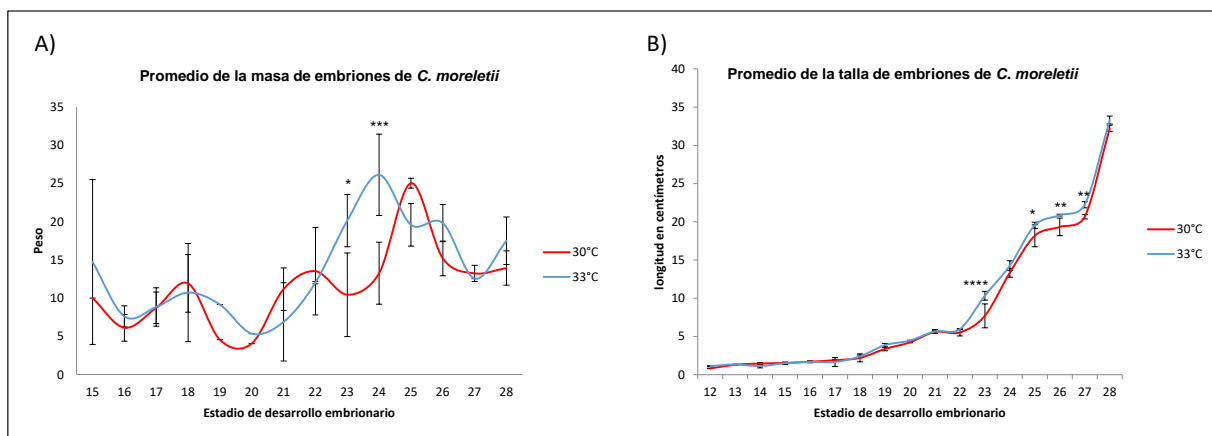
### **5.1.1 Colecta de los nidos de *C. moreletii* e incubación de los huevos**

De los nidos en riesgo que fueron colectados se incubaron un total de 220 huevos, 110 huevos a 30°C y 110 huevos a 33°C. En total fueron 11 nidos colectados en los años de 2014, 2016, 2017 y 2018. De estos se ocuparon 75 huevos para establecer el estadio de desarrollo embrionario, utilizando 2 o 3 embriones por estadio para realizar su descripción. Conforme avanzó el desarrollo embrionario se realizaron los muestreos mediante la disección de los huevos, de esta manera obtuvimos el embrión que se describió morfológicamente y también se obtuvo el número de huevos que no estaban fertilizados, los embriones muertos y los embriones que estuvieron vivos y que fueron empleados para estos experimentos (Tabla 5).

El total de huevos obtenidos durante estos años han sido 220, de los cuales 16 huevos no estaban fertilizados (7.2 % huevos), 44 embriones estuvieron muertos (20 % de los huevos) y 158 embriones estuvieron vivos para los experimentos (71.8 % de los huevos) (Tabla 5).

### 5.1.2 Crecimiento y desarrollo de los embriones de *C. moreletii*

Los embriones fueron pesados y medidos de acuerdo a los días de desarrollo embrionario. Como se esperaba el embrión que se incubó a 33°C se desarrolló más rápido que el embrión que fue incubado a 30°C, ya que el promedio total del desarrollo embrionario fue de 65 días para el embrión incubado a 33°C y de 81 días para el embrión incubado a 30°C. Así mismo, los embriones incubados a 33°C alcanzaron más rápido su peso y talla que los incubados a 30°C (Figura 10) y desarrollaron más rápido sus características morfológicas que los incubados a 30°C, de hecho los embriones van desfasados en el desarrollo por un estadio embrionario a pesar de tener los mismos días de ovoposición e incubación.



**Figura 10. Cuantificación del crecimiento de los embriones de *Crocodylus moreletii* en una temperatura feminizante 30°C y una masculinizante 33°C.** Se incubaron los huevos a 30°C y a 33°C. En A) se muestra el peso de los embriones en el desarrollo donde los que fueron incubados a 33°C alcanzaron más rápido su masa corporal que los incubados a 30°C, sólo hubo diferencia significativa en los estadios 23 y 24. En B) Talla de los embriones donde los que fueron incubados a 33°C crecen ligeramente más rápido que los incubados a 30°C, aunque sólo hubo diferencia sigficativa en los estadios 23, 25, 26, 27. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak con un  $\alpha$  0.05, valor de  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*),  $P < 0.0010$  (\*\*\*),  $P < 0.0030$  (\*\*),  $P < 0.0110$  (\*). Se muestran las barras de desviación estándar.

Tabla 5. Total de huevos de todos los nidos de *Crocodylus moreletii* incubados a 30°C y 33°C.

Total de huevos incubados por temperatura	Total de huevos por nido	No fertilizados	Muertos	Vivos para experimento
<b>30°C</b> <b>(110 huevos)</b>	N1 = 20h (10h)	0	4	6
	N2= 20h (10h)	0	3	7
	N3= 20h (10h)	0	4	6
	N4 = 20h (10h)	1	2	7
	N5 =20h (10h)	0	0	10
	N6 =20h (10h)	0	4	6
	N7=20h (10h)	2	2	6
	N8= 20h (10h)	3	2	5
	N9=20h (10h)	1	2	7
	N10=20h (10h)	0	1	9
	N11=20h (10h)	0	2	8
	<b>Total</b>		7	26
<b>33°C</b> <b>(110 huevos)</b>	N1 = 20h (10h)	2	1	7
	N2= 20h (10h)	0	1	9
	N3= 20h (10h)	0	2	8
	N4 = 20h (10h)	1	0	9
	N5 = 20h (10h)	1	1	8
	N6= 20h (10 h)	2	1	7
	N7= 20h (10h)	0	4	6
	N8= 20h (10 h)	2	2	6
	N9= 20h (10h)	0	0	10
	N10= 20h (10h)	1	3	6
	N11= 20h (10h)	0	3	7
	<b>Total</b>		9	18

Abreviaturas: N= Nido; () =Total de huevos nido incubados a temperatura de 30 o 33°C.

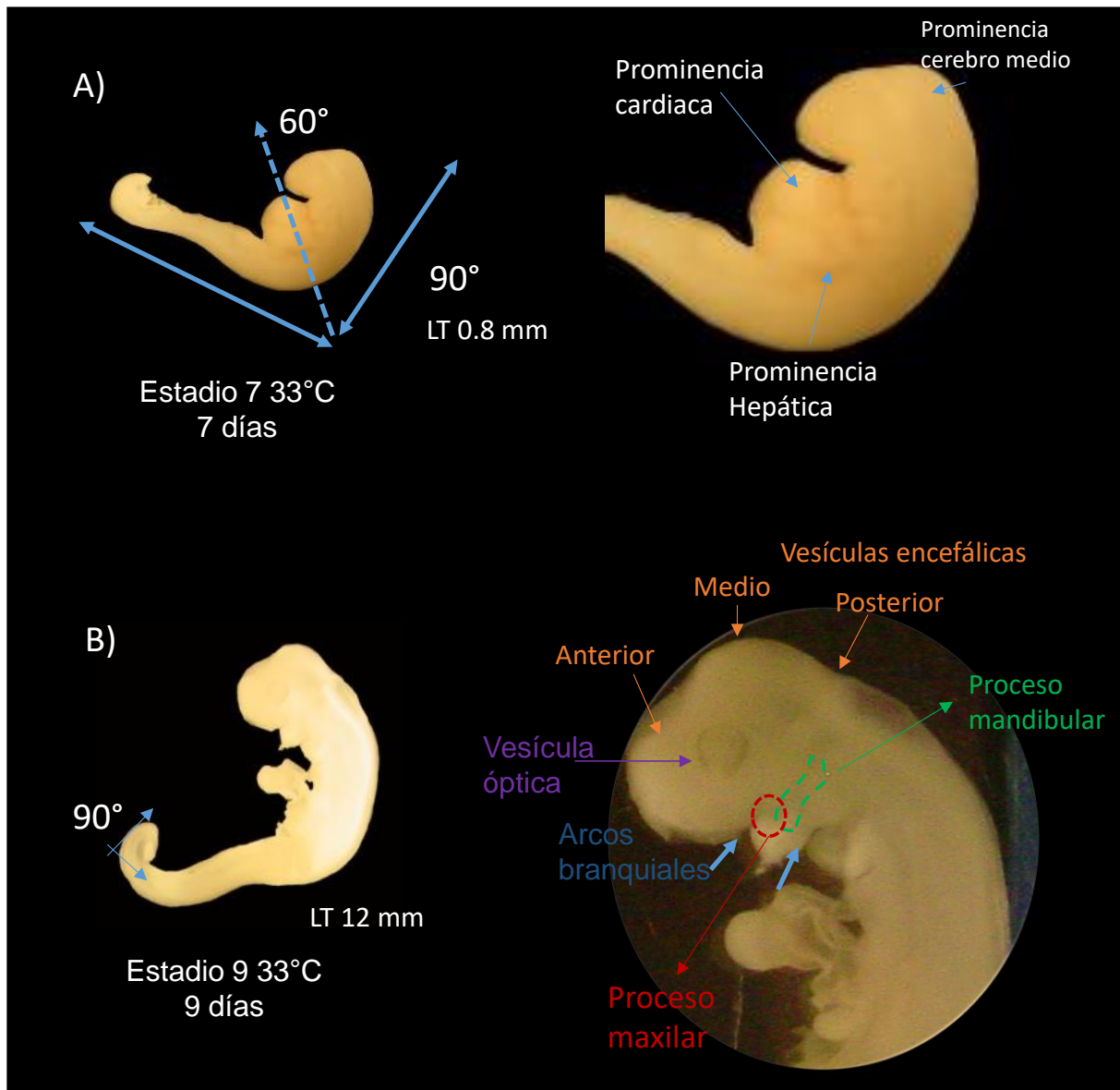
### 5.1.3 Descripción anatómica de los estadios de desarrollo embrionario

Se lograron describir varios estadios de desarrollo embrionario (del 7 al 28) y de los cuales se mencionan sus características anatómicas a continuación.

**Estadio 7.** A los 7 días en una temperatura de 33°C, este estadio de desarrollo embrionario de *C. moreletii* se caracteriza por que el embrión mide una longitud total (LT) de 0.8 mm en su posición natural. Aparece la prominencia del cerebro medio, cardíaca y hepática. La región craneal está posicionada con respecto a la cola con un ángulo de 90°. La región del cuello también se flexiona, de modo que el techo del cerebro se encuentra aproximadamente a 60° del plano corporal y el piso del cerebro a 45°. Esta dicotomía en angulación acentúa el cerebro medio. Las extremidades no están presentes, aunque se puede observar brotes sinudales, donde aparecerán los esbozos de las extremidades anteriores. La coloración del embrión es blanquecina y la cola presenta un pequeño enrollamiento al final de la misma. Tiene tres arcos branquiales, la primera hendidura branquial y surco, están presentes en el segundo y tercer surcos branquiales y el seno branquial (Figura 11 A).

**Estadio 9.** A los 9 días en una temperatura de 33°C, en este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide una longitud de 12 mm, se observan cuatro arcos branquiales, la primera y tercera hendiduras y surcos branquiales, la segunda y cuarta hendiduras branquiales y el seno branquial. Las hendiduras branquiales están presentes solo en las mitades dorsales de los surcos entre el arco 1°, 2° y 3° y 4°. La morfogénesis facial ha iniciado en el segundo arco que es el mandibular y por la presencia del proceso maxilar, además en la porción anterior del cerebro primitivo se inicia el desarrollo del ojo pues aparece la vesícula óptica y la placoda del cristalino, estos son grandes y redondos, pero sin pigmentos. El cerebro se encuentra anatómicamente en el embrión como: cerebro anterior, medio y posterior (vesículas encefálicas) (Figura 11 B). Por otra parte, aparece el brote del miembro posterior, pero no del miembro anterior, la punta de la cola está curvada a través de tres giros de 90°, y la base de la cola está claramente flexionada desde la región lumbar inferior. En el corazón las aurículas, ventrículos son visibles a través del saco pericárdico. Aparece el divertículo respiratorio. Las capas extraembrionarias como el alantoides se fusionan con el amnios y el corion.

**Estadio 10.** A los 10 días en una temperatura de 33°C y 11 días a 30°C. En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide una longitud total de 13 mm, ya se puede apreciar que ha iniciado la formación facial pues se observa que inicia la expansión maxilar superior (ms). También comienza la pigmentación del iris que es ligeramente negra, excepto por el



**Figura 11. Estadios de desarrollo embrionario 7 y 9 de *C. moreletii*.** En A) Estadio 7 que muestra las principales flexiones en el embrión. En B) principales características anatómicas de desarrollo embrionario en el estadio 9. Longitud total (LT).

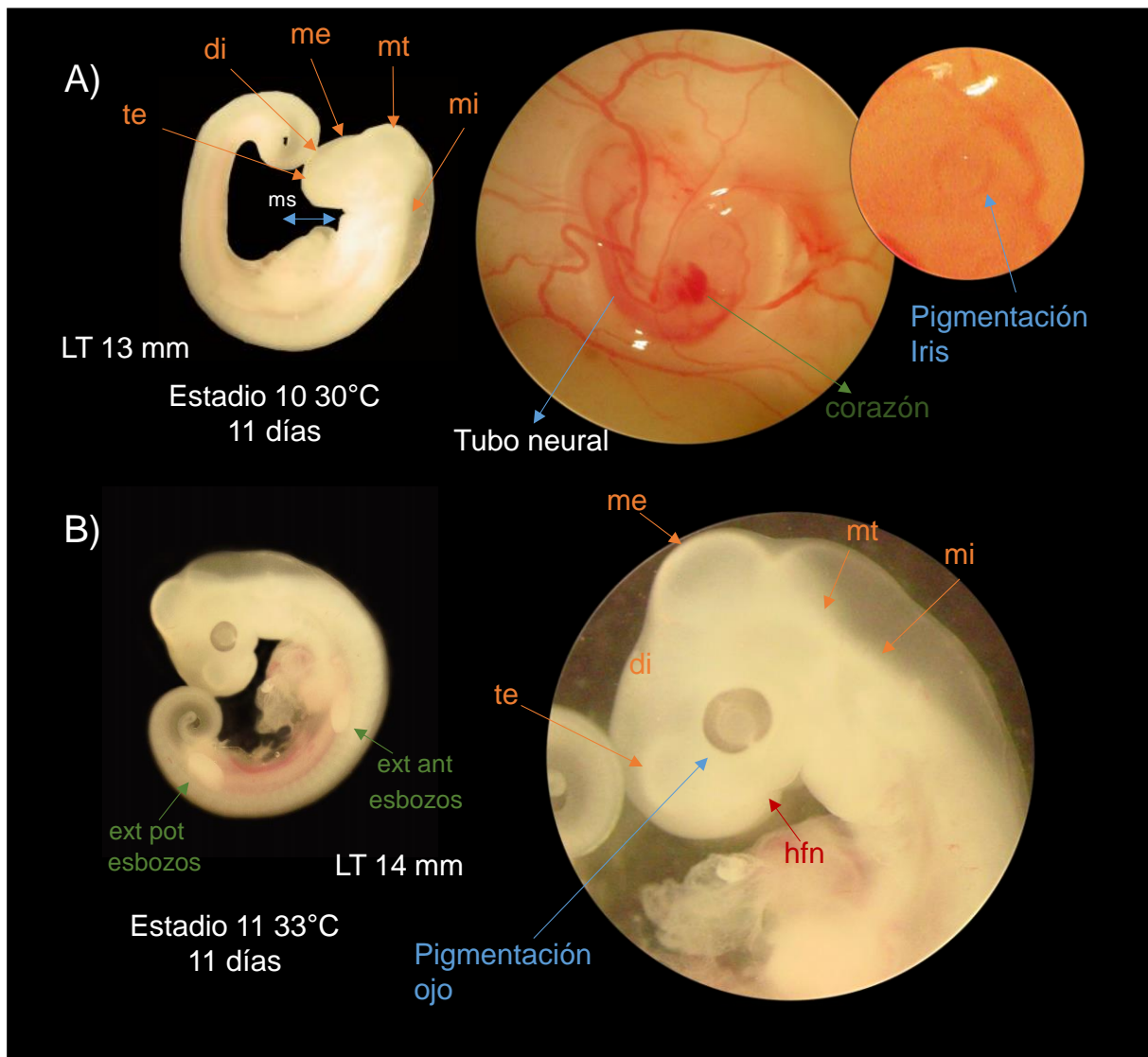


lente central opaco. Es interesante señalar que el ojo derecho suele estar pigmentado antes y con mayor intensidad que el ojo izquierdo. El cerebro está formado por el telencéfalo (te), diencefalo (di), mesencefalo (me), metencefalo (mt), mielencefalo. Las extremidades continúan siendo un brote sinudal en forma de abanico que se va alejando del cuerpo del embrión. La cola se encuentra enroscada a través de 4 vueltas de 90°. La coloración del embrión continua siendo blanquecina. Se presentan cinco arcos branquiales, los surcos y el seno branquial están presentes. La primera hendidura se encuentra dorsalmente, ventral al otocisto. La tercera hendidura branquial (entre los arcos 3° y 4°) se está cerrando. Los arcos branquiales 1° y 2° se fusionan entre sí en sus mitades ventrales, y el arco 2° ha comenzado a cubrir al tercer arco. Los arcos branquiales 4° y 5° son muy pequeños. Visto desde el aspecto frontal, el primer arco branquial en forma de herradura está claramente lobulado en la línea media de los procesos faciales (Figura 12 A).

**Estadio 11.** A los 11 días en una temperatura de 33°C y 12 días a 30°C En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide 14 mm, ya se puede observar la protuberancia del mesencefalo (me). En los procesos del desarrollo facial se observa que las hendiduras de las fosas nasales (hfn) comienzan su formación. Los procesos maxilares se extienden hasta la unión de los procesos nasales medial y lateral y son continuos con el proceso nasal lateral. La pigmentación del ojo es mayor en el del iris con respecto a los estadios de desarrollo anteriores. Las extremidades tienen forma de muñones carentes de dígitos, tanto las extremidades anteriores (ext ant) como de las posteriores (ext pot) se extienden caudalmente desde la pared del cuerpo, y ambas tienen crestas ectodérmicas apicales distintas. La extremidad anterior tiene una constricción distinta que delimita los elementos proximales y distales, pero esta constricción es menos marcada en la extremidad posterior. Un bucle de tubo del intestino medio es visible a nivel del conducto vitelino. Finalmente el segundo arco branquial continúa creciendo hacia el tercero, y los arcos 4° y 5° están comenzando a invaginarse. La primera hendidura branquial es inmediatamente ventral al otocisto (Figura 12 B). La membrana corioalantoidea se extiende dos tercios alrededor del ancho de la membrana del cascarón.

**Estadio 12.** A los 13 días en una temperatura de 30°C. En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide 15 mm, en el desarrollo del cerebro la protuberancia del mesencefalo continua creciendo. El proceso de formación maxilar superior continua y se extiende hacia adelante en forma de protuberancia, por debajo del ojo. Los orificios nasales se profundizan a medida que ocurren los procesos nasales medial y lateral. Hay una muesca

y un surco distinto en la línea media de la cara, entre los procesos nasales mediales de cada lado. La primera hendidura branquial sinusoidal se encuentra sobre el otocisto o vesícula otíca



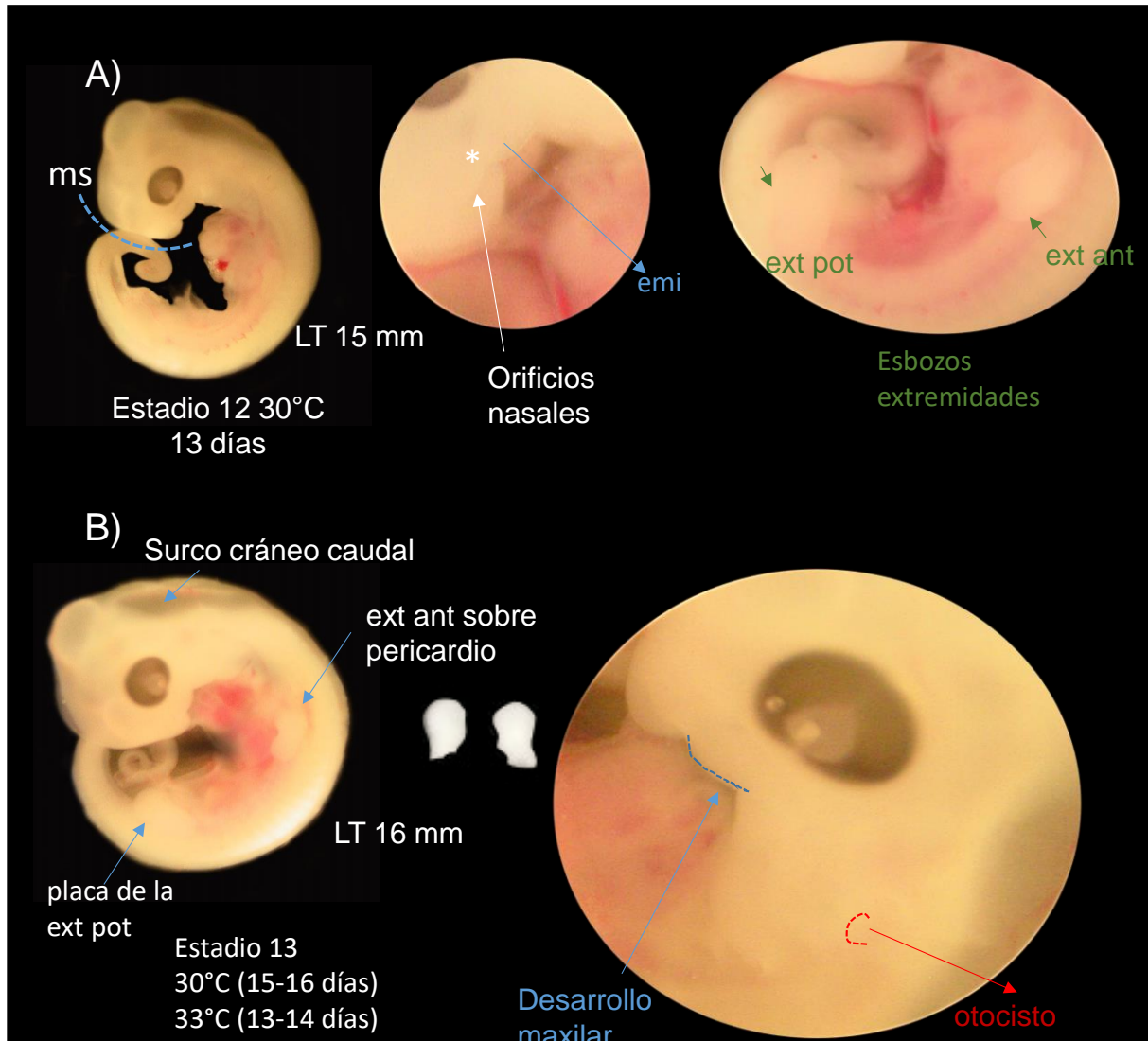
**Figura 12. Estadios de desarrollo embrionario 10 y 11 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 10. En B) del estadio 11. Telencéfalo (te), diencefalo (di), mesencéfalo (me), metencéfalo (mt), mielencéfalo, hendiduras de las fosas nasales (hfn), extremidades anteriores (ext ant) extremidades posteriores (ext pot), mandíbula superior (ms). Longitud total (LT).

y sus márgenes muestran condensaciones para los montículos auriculares. El conglomerado fusionado de arcos branquiales 1° y 2° está creciendo en forma caudal y tiene un arco que cubre para alcanzar la unión entre los arcos tercero y cuarto. Este conglomerado forma el esbozo de la mandíbula inferior, que se extiende hasta el centro de la lente del ojo. Los arcos 4° y 5° son pequeños pero visibles (Figura 13 A).

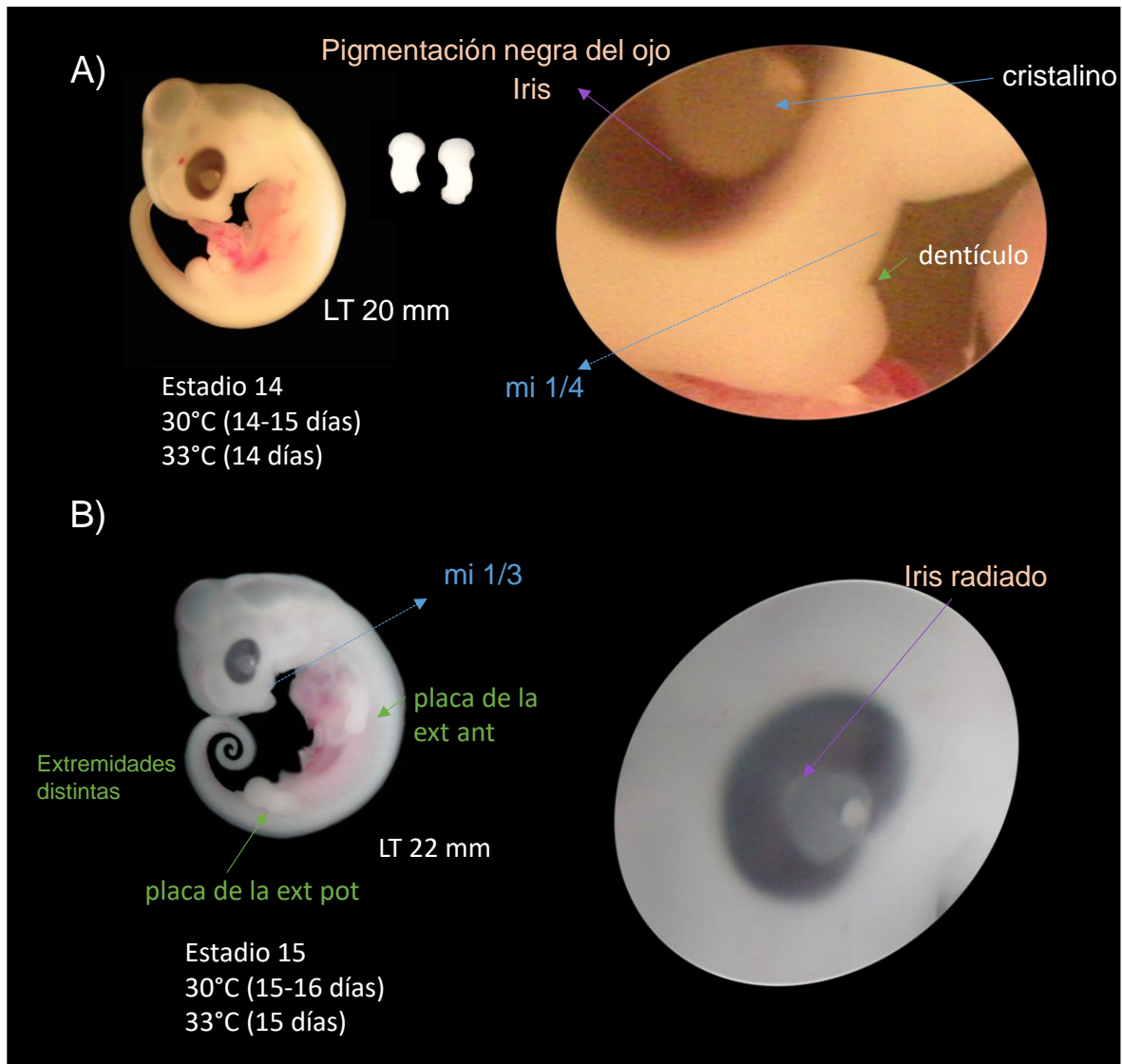
**Estadio 13.** A los 13 días en una temperatura de 33°C. En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide 16 mm, en el desarrollo del cerebro la protuberancia del mesencéfalo continua siendo visible. Los procesos del desarrollo facial continúan con el desarrollo de los orificios nasales. Además los procesos maxilares son continuos con los procesos nasales laterales. En el desarrollo de las extremidades se puede observar que la extremidad anterior ahora está claramente inclinado hacia el pericardio. La extremidad posterior distal se aplanan y se agranda en una placa que forma la placa primordial de la misma. El arco 3° está casi completamente cubierto por el arco 2°, que ahora llega al pericardio y al igual que los arcos 4° y 5° son difíciles de ver. El seno branquial se ha cerrado. El margen anterior de la mandíbula inferior ha crecido hacia delante desde el conglomerado fusionado de los arcos 1° y 2°. La primera hendidura branquial ahora está orientada más horizontalmente y en lo sucesivo se denomina meato auditivo externo. El otocisto del orificio auricular es sinusoidal con una protuberancia en la línea media formada por la fusión de las prominencias auriculares. El corioalantoides se extiende ahora como un anillo alrededor de la circunferencia interna de la membrana de la cáscara del huevo central (Figura 13 B).

**Estadio 14.** A los 14 días en una temperatura de 33°C. En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide 20 mm. La coloración del ojo es negra en el contorno del iris, excepto por la lente óptica o cristalino. La mandíbula superior tiene una forma de protuberancia o probóscide, la mandíbula inferior se extiende un cuarto por debajo de la mandíbula superior. La abertura del orificio nasal se ha cerrado debido a la fusión de los procesos nasales mediales, nasales laterales y maxilares. Los procesos nasales mediales son prominentes y tienen protuberancias externas anterodorsales. Estos crecerán más adelante para desplazar dorsalmente los orificios nasales externos. Los procesos nasales mediales también tienen dos protuberancias intraorales anteriores que indican el inicio del desarrollo del paladar primario. Un dentículo está presente en cada lado del paladar primario en desarrollo. Los procesos maxilares tienen márgenes intra orales sinusoidales que indican el inicio del desarrollo del paladar secundario. Los orificios nasales internos son más profundos. Las extremidades posteriores y anteriores ya son distintas entre ellas. El 2° arco branquial

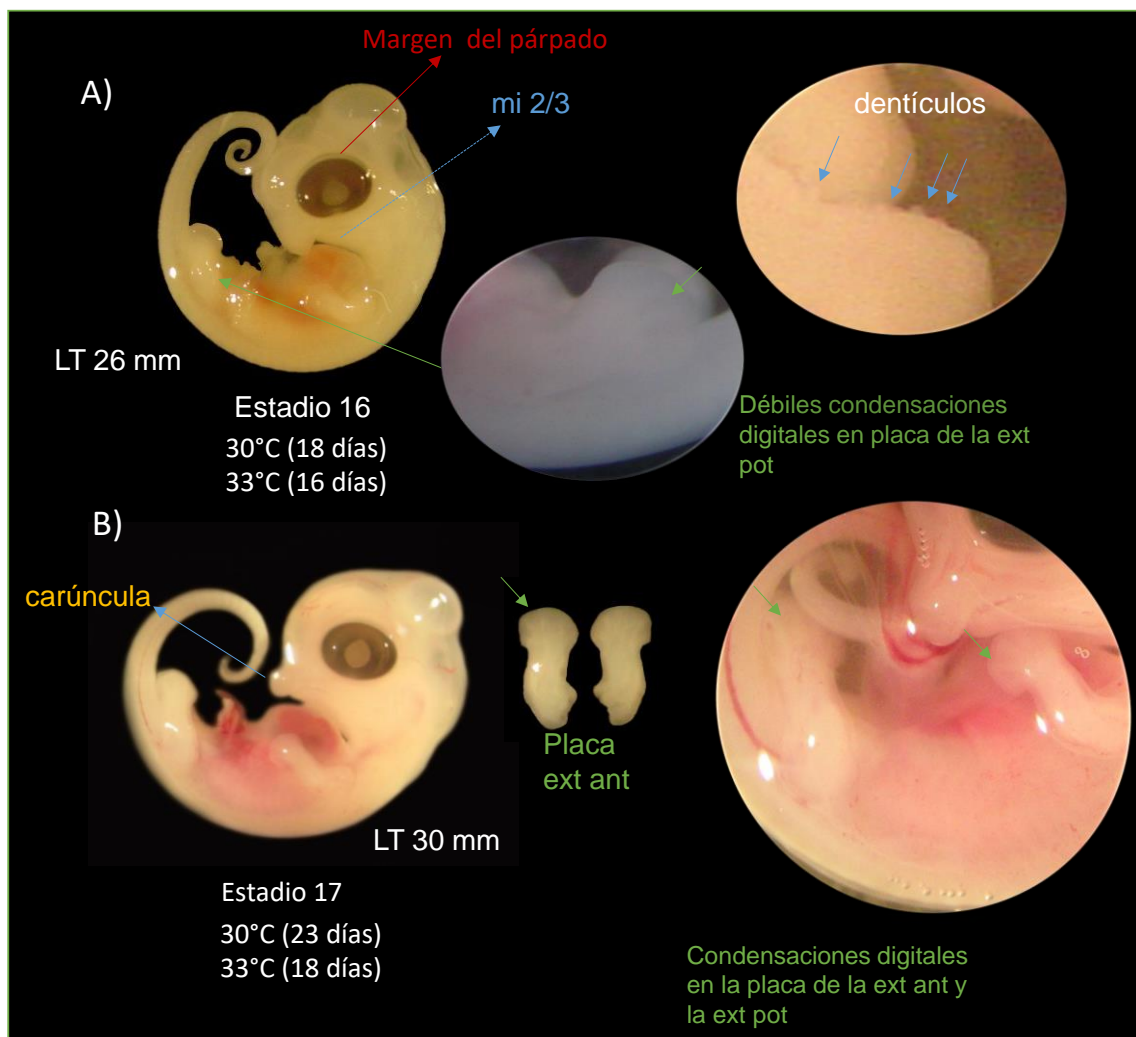
crece y junto con el 3°, 4° y 5° forman un conglomerado que junto con el primer arco forman la base de la mandíbula inferior y el cuello.



**Figura 13. Estadios de desarrollo embrionario 12 y 13 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 12. En B) del estadio 13. Esbozo mandíbula inferior) emi, extremidades anteriores (ext ant) extremidades posteriores (ext pot), mandíbula superior (ms). Longitud total (LT).



**Figura 14. Estadios de desarrollo embrionario 14 y 15 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 14. En B) del estadio 15. Mandíbula inferior (mi). Longitud total (LT).



**Figura 15. Estadios de desarrollo embrionario 16 y 17 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 16. En B) del estadio 17. Mandíbula inferior (mi), extremidades anteriores (ext ant), extremidades posteriores (ext pot). Longitud total (LT).

Un surco en el cráneo caudal sigue presente a lo largo de los márgenes dorsales de los arcos primero y segundo fusionados. El orificio auricular está agrandándose sobre la abertura externa del oído. Las opacidades blancas y las condensaciones internas para el desarrollo del oído, son evidentes en la región debajo de la abertura del oído. La cara embrionaria descansa sobre el gran bulto del tórax (saco pericárdico). Un gran bucle de intestino se observa a través del estrecho conducto vitelino y toca el vitelo subyacente. Las vísceras abdominales (por ejemplo, hígado y mesonéfrs) son visibles a través de las paredes del cuerpo. El tubérculo de los genitales todavía es pequeño (Figura 14 A).

**Estadio 15.** A los 15 días en una temperatura de 30°C. En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide 22 mm. La mandíbula superior aún tiene forma de pico y la mandíbula inferior (mi) mide un tercio a la mitad de la longitud de la mandíbula superior. Ahora ya hay dos dentículos que están presentes en los márgenes anteriores de la mandíbula superior, uno en el margen del paladar primario y el otro en el proceso maxilar detrás de la zona de cierre. Como antes, un dentículo mandibular está presente en cada lado de la línea media. De manera dorsal al complejo de la mandíbula inferior, hay tres surcos y elevaciones superficiales, que parecen ser representaciones dorsales de los arcos branquiales, que ahora se han fusionado ventralmente. Las protuberancias anterodorsales (unidas) de los procesos nasales mediales han desplazado las fosas externas dorsalmente y el paladar primario se ha formado pero aún retiene dos protuberancias anteriores. En el desarrollo del ojo se observa que la estría oscura del iris se irradia alrededor de la lente o cristalino. En el desarrollo de las extremidades ya se pueden observar las regiones proximales y distales y las placas de la extremidad anterior y de la extremidad posterior son distintas (pero sin rayos de dígitos) (Figura 14 B).

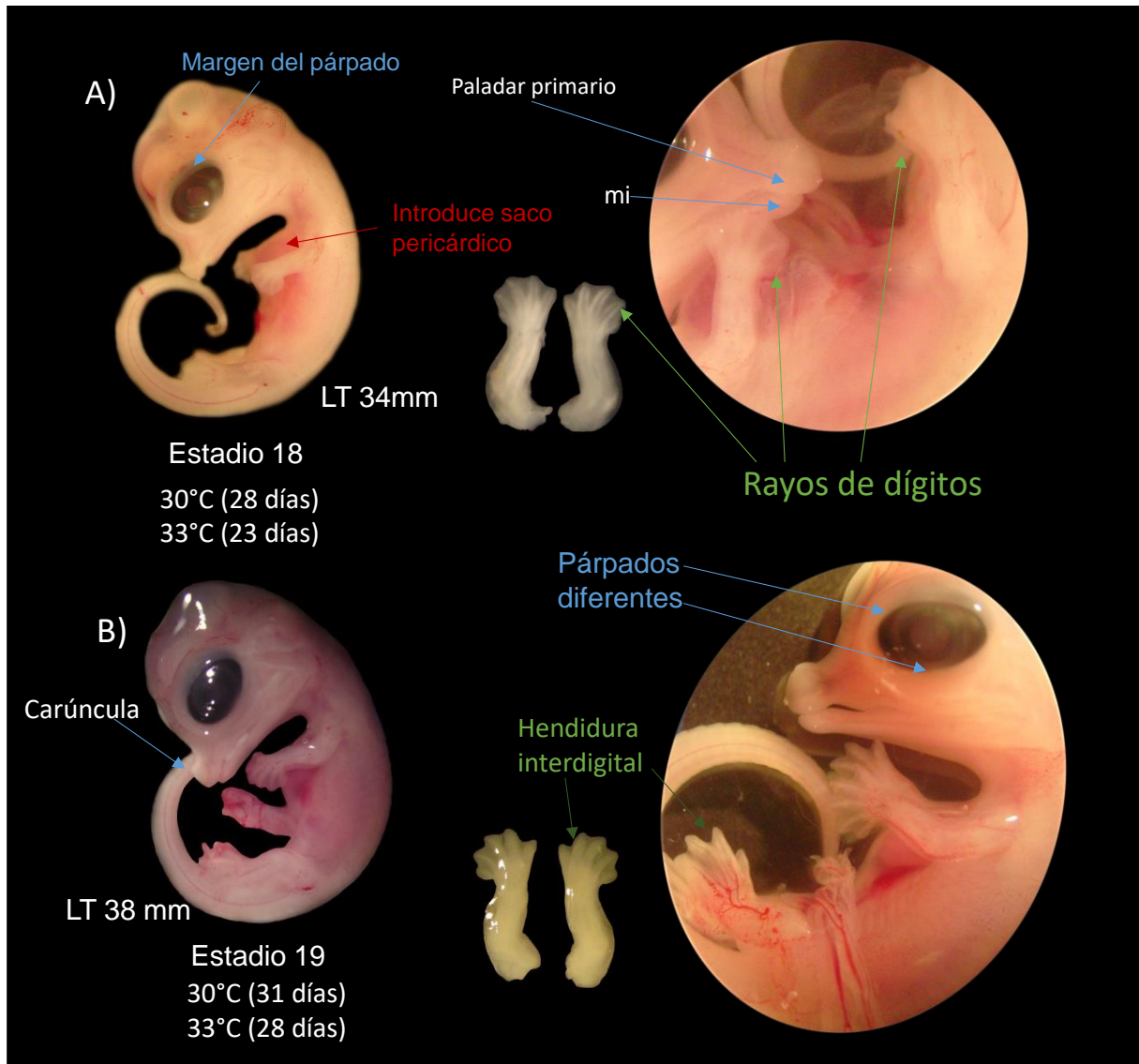
**Estadio 16.** A los 18 días a una temperatura de 30°C y 16 días a 33°C. El embrión tiene una longitud total de 26 mm. En los procesos de desarrollo facial se percibe que la mandíbula inferior (mi) es ahora dos tercios de la longitud de la mandíbula superior. También ya hay cuatro dentículos en los márgenes superiores de la mandíbula de cada lado, dos en el paladar primario y dos en el proceso maxilar. Dos dentículos se encuentran a cada lado de la mandíbula. Las extremidades tienen débiles condensaciones de dígitos que están presentes en la placa de las extremidades posteriores pero no en la placa de las extremidades anteriores. El margen del párpado superior es un borde elevado de tejido sobre cada ojo. Aparece la carúncula como dos pequeños engrosamientos, ampliamente espaciados, que son perceptibles en la punta anterior del hocico (Figura 15 A).

**Estadio 17.** A los 23 días a una temperatura de 30°C y 18 días a 33°C. La longitud total del embrión es 30 mm, en los procesos de desarrollo facial se puede observar que la mandíbula inferior está situada detrás de las protuberancias del paladar primario; además los surcos y las elevaciones dorsales de la mandíbula inferior (mi) han desaparecido. En este estadio el número de dentículos discernibles macroscópicamente en la mandíbula puede variar de acuerdo a lo que se puede percibir a simple vista. Además siete dentículos aparecen a cada lado de la mandíbula inferior. En las extremidades hay condensaciones mesodérmicas para los cinco dígitos del miembro anterior y posterior. En la carúncula se observa como dos pequeñas elevaciones ampliamente separadas han aparecido en la punta anterior del hocico. Los procesos tectoseptales se están cerrando en la mitad posterior de la cavidad nasal. El patrón somita se distingue particularmente en los aspectos dorsales del cuerpo y la cola y las costillas abdominales son visibles. La cabeza se extiende fuera del saco pericárdico debido a la elongación del cuello. El oído externo es diferente a medida que se establece la forma del meato auditivo externo observado en el adulto (Figura 15 B).

**Estadio 18.** A los 28 días a una temperatura de 30°C y 23 días a 33°C. En este estadio de desarrollo embrionario la longitud total del embrión es 34 mm. En la morfogénesis facial se observa a la mandíbula inferior por debajo del bulto del paladar primario anterior y ya no descansa sobre el saco pericárdico. Se observan aproximadamente entre 6 a 8 dentículos. Los dentículos posteriores son difíciles de ver. La carúncula continúa formada por dos protuberancias blancas ampliamente espaciadas en la punta anterior del hocico. El paladar secundario comienza a cerrarse y el margen superior de la mandíbula es más recto y menos enganchado que el anterior. Además los márgenes del párpado superior se extienden sobre el borde superior del iris formando un surco distinto entre los párpados y el ojo. En las extremidades los rayos de dígitos son condensaciones cartilagosas en las placas de las extremidades anteriores y posteriores, además estas tienen una apariencia de aleta causada por los márgenes rectos de la placa interdigital. Las escamas dorsales comienzan a marcarse y el bulto del saco pericárdico transparente está comenzando a sumergirse en la pared torácica ventral (Figura 16 A).

**Estadio 19.** A los 31 días a una temperatura de 30°C y 28 días a 33°C. La longitud total del embrión es 38 mm, la mandíbula inferior se observa por detrás del margen anterior de la mandíbula superior. Como consecuencia de esto las protuberancias premaxilares son grandes y la boca se abre. La lengua y la base de la boca se hunden debajo de los márgenes de la mandíbula inferior. El paladar está casi completamente cerrado.





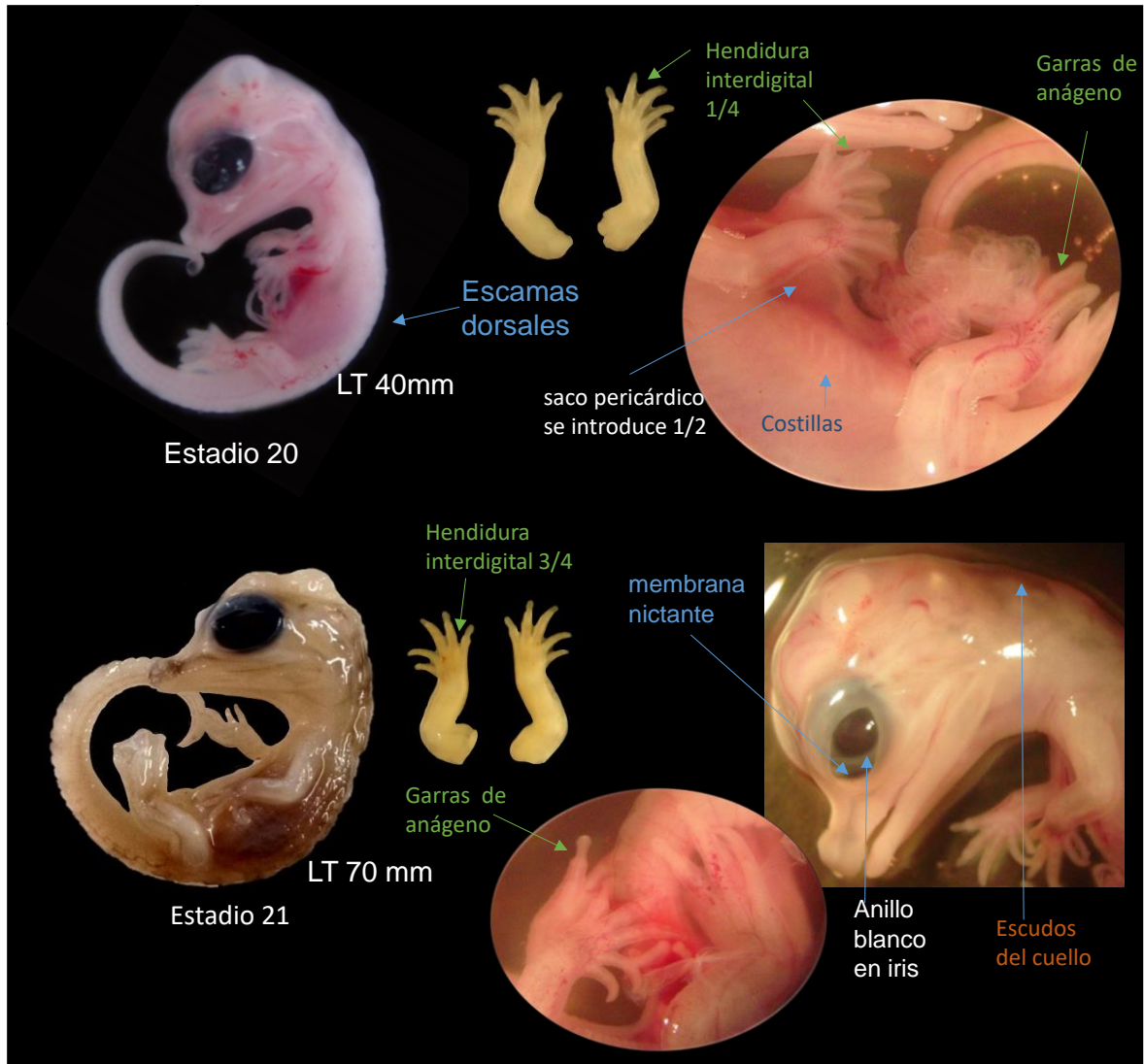
**Figura 16. Estadios de desarrollo embrionario 18 y 19 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 18. En B) del estadio 19. Mandíbula inferior (mi). Longitud total (LT).

Hay ocho a nueve dentículos visibles a cada lado de la mandíbula inferior y muchos dentículos mandibulares aparecen. Los párpados superiores e inferiores son distintos. Las dos elevaciones de la carúncula se han aproximado entre sí en la punta del hocico, aunque el tejido entre ellas es delgado. Las fosas nasales se elevan donde se cierran los paladares primarios y secundarios. Las extremidades tienen una hendidura interdigital que ha comenzado a producir pequeñas muescas marginales, particularmente en las placas de las extremidades posteriores. Las manchas blancas, que representan osificaciones subyacentes, son evidentes en los márgenes de las mandíbulas superior e inferior y alrededor de los orificios auriculares. Los genitales externos han desarrollado una protuberancia globular (Figura 16 B).

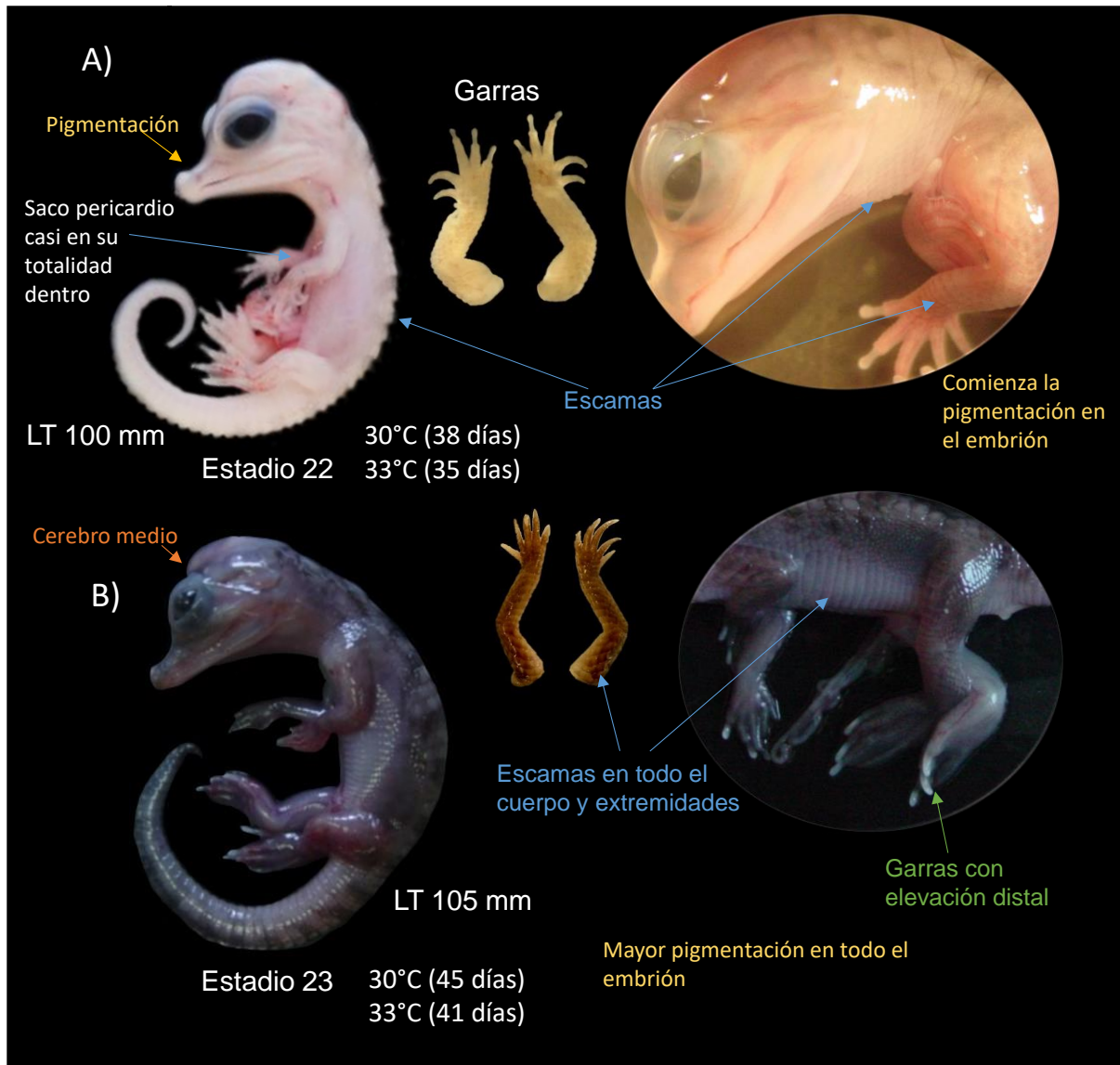
**Estadio 20.** A los 33 días a una temperatura de 30°C y 30 días a 33°C La longitud total del embrión es de 40mm, en este estadio de desarrollo embrionario ya se puede apreciar que la mandíbula inferior está en su relación adulta con la mandíbula superior. La carúncula es ahora una estructura sólida debido a la consolidación del tejido entre las dos protuberancias iniciales. El paladar está completamente cerrado pero la valvula palatal y el cartílago de basihyal aún no están presentes. En el ojo la membrana nictitante anterior es perceptible en la esquina anterior del ojo. El saco pericárdico se introduce a un medio de la cavidad del cuerpo ventral. En las extremidades las garras o uñas de anágeno se desarrollan rápidamente en una secuencia específica al principio de esta etapa. Aparecen primero en el dígito más medial de la extremidad posterior, luego en los dos dígitos que lo rodean, luego en el dígito más medial de la extremidad anterior y finalmente en los dos dígitos vecinos. En consecuencia, las uñas de anágeno están presentes en los tres dígitos más mediales de ambas extremidades anteriores y posteriores, a pesar de que el número total de dígitos varía entre los dos. La hendidura interdigital ahora se extiende a lo largo de aproximadamente un cuarto de la longitud de los dígitos. El primordio genital externo es una elevación. Aparecen manchas blancas de osificación que están presentes en los márgenes de las mandíbulas superior e inferior, alrededor del meato auditivo externo, y en los elementos proximales y distales de las extremidades. Se forman escamas dorsalmente y comienzan a marcar los escudos, los cuales aparecen en la región del cuello detrás del cráneo (Figura 17 A).

**Estadio 21.** A los 35 días a una temperatura de 30°C y 33 días a 33°C. La longitud total del embrión es 70 mm y se observa que los hemisferios cerebrales han crecido y el cerebro se observa transparente pero altamente irrigado. En cuanto a los procesos faciales continua el desarrollo de los párpados superior e inferior los cuales están superpuestos en el ojo, también continúa el desarrollo de la membrana nictante, un anillo blanco en el iris rodea el contorno

de la lente o cristalino. En las extremidades las hendiduras interdigitales se extienden tres cuartas partes a lo largo de los dígitos y las falanges se pueden distinguir en los dígitos.



**Figura 17. Estadios de desarrollo embrionario 20 y 21 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 20. En B) del estadio 21. Mandíbula inferior (mi). Longitud total (LT).

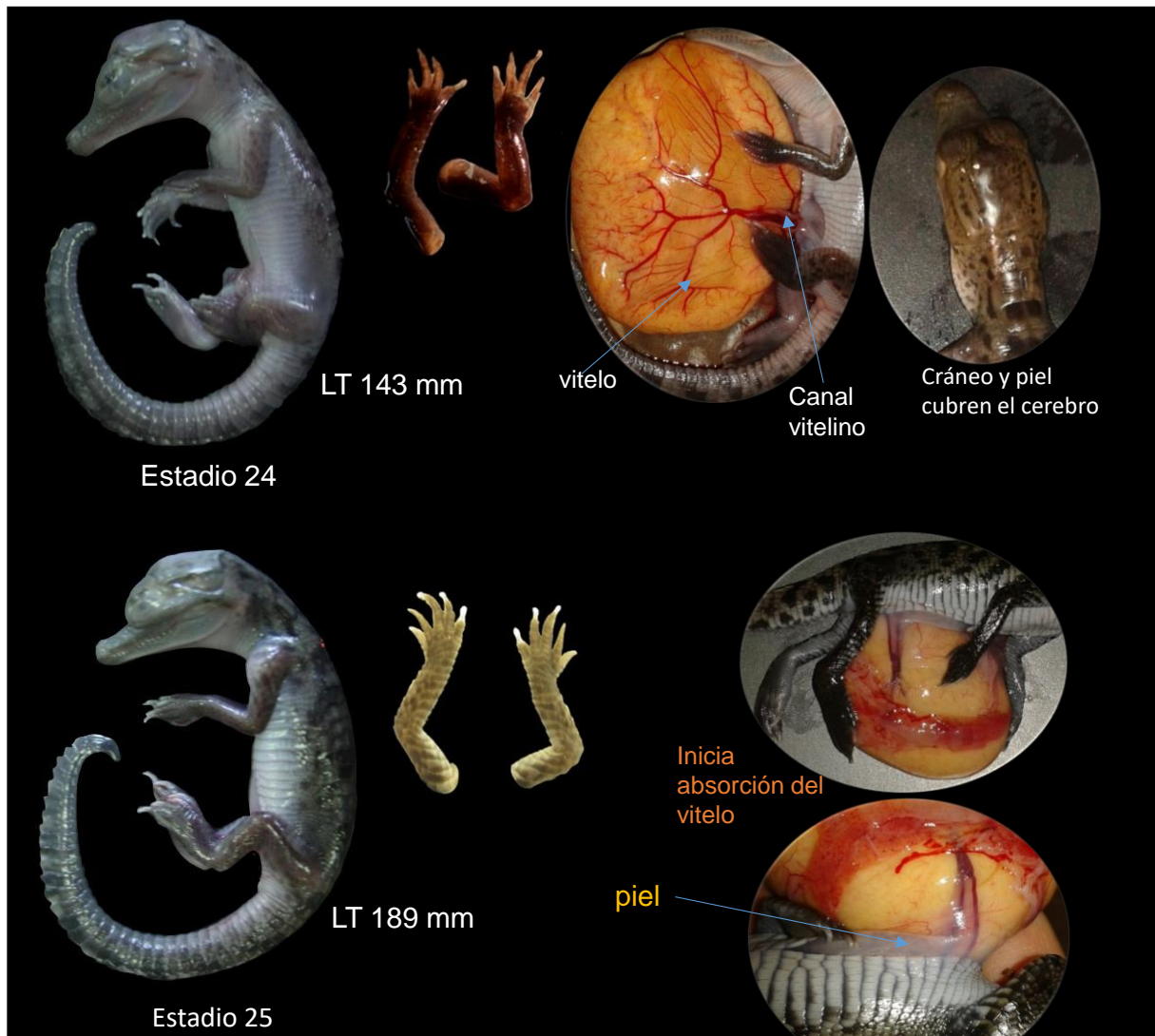


**Figura 18. Estadios de desarrollo embrionario 22 y 23 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 22. En B) del estadio 23. Longitud total (LT).

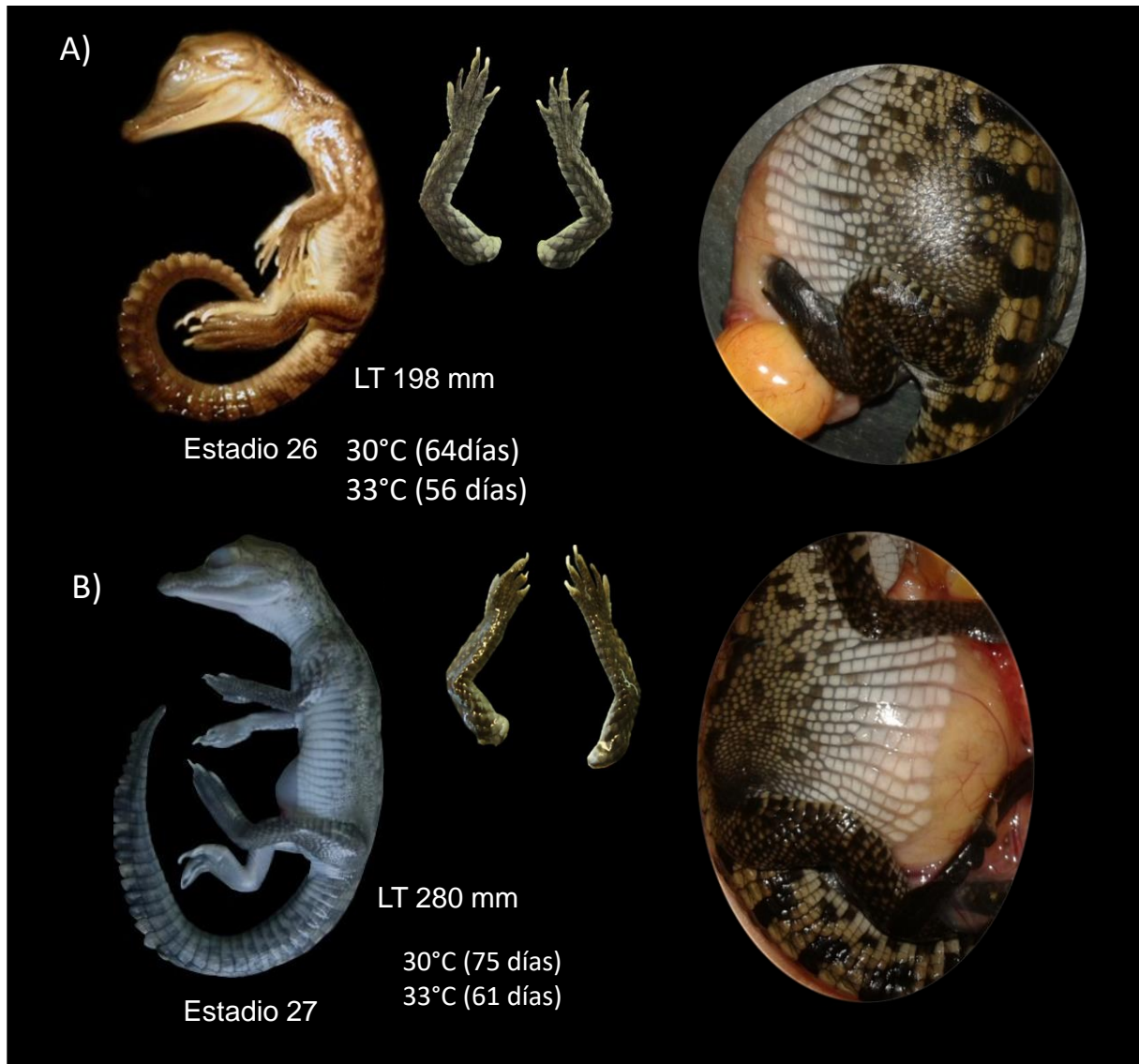
Las escamas ahora son visibles en la pared del cuerpo ventral, así como dorsalmente, en el hocico, el cuello, el cuerpo y la cola. Los escudos del cuello dorsal están claramente definidos. La carúncula es una masa sólida en la punta del hocico, pero el tejido que rodea la base de la carúncula no se diferencia de las otras escamas del hocico. Las elevaciones para los músculos nasales y constrictores son evidentes. En el paladar aparece y el cartílago de basihyal superior está presente en el margen posterior del paladar (y el cartilago inferior en la base de la lengua). Finalmente el saco pericárdico ya se introdujo un medio a la cavidad del cuerpo (Figura 17 B).

**Estadio 22.** A los 38 días a una temperatura de 30°C y 35 días a 33°C. La longitud total del embrión en este estadio de desarrollo embrionario es 100 mm. La pigmentación es visible por primera vez en los márgenes de la mandíbula superior y en los elementos proximales y distales de las extremidades, las papilas sensoriales están presentes a lo largo de los bordes laterales de la mandíbula y las escamas son evidentes en la piel gular. También hay poca pigmentación dorsal en los escudos dorsales; aunque a veces no hay pigmentación (es más común en embriones desarrollados en una temperatura de 30°C). Finalmente la hendidura interdigital está a su nivel adulto. Se observa una ligera escamación en las extremidades (aunque es difícil de observar). Los párpados ya tienen movimiento pero no se cierran por completo. Además el saco del pericardio está casi en su totalidad introducido en la cavidad del cuerpo, al final de este estadio se encuentra  $\frac{3}{4}$  dentro de la cavidad torácica (Figura 18 A).

**Estadio 23.** A los 45 días a una temperatura de 30°C y 41 días a 33°C. La longitud total de este estadio de desarrollo embrionario es de 105 mm, en el desarrollo facial ya se puede observar las papilas sensoriales que están presentes a lo largo de los bordes laterales de la mandíbula. Los párpados aún no se cierran completamente. La pigmentación es más extensa e intensa a lo largo del cuerpo del embrión. El pigmento también está presente ventralmente y en todos los elementos de las extremidades. También las extremidades anteriores y posteriores tienen escamas y pigmentación en todos los elementos proximales y distales. Las puntas de las garras de los pies tienen una ligera elevación distal. El cerebro medio es visible como una protuberancia blanca en la parte posterior del cráneo porque la piel suprayacente está poco pigmentada y el techo craneal óseo está incompleto. El saco pericárdico se introduce completamente en la cavidad corporal y la pared torácica ventral se cierra en la línea media. En el paladar se ha formado un plexo extenso de vasos sanguíneos y papilas sensoriales (Figura 18 B).



**Figura 19. Estadios de desarrollo embrionario 24 y 25 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 24. En B) del estadio 25. Longitud total (LT).



**Figura 20. Estadios de desarrollo embrionario 26 y 27 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 26. En B) del estadio 27. Longitud total (LT).

**Estadio 24.** A los 50 días a una temperatura de 30°C y 45 días a 33°C. La longitud en este estadio de desarrollo embrionario es de 143 mm, el cuerpo del embrión está totalmente cubierto por escamas y la pigmentación ahora es más intensa y en los embriones aparece el patrón de pigmentos de un adulto de *C. moreletii*. En las extremidades las garras de la extremidad anterior también tienen elevaciones en sus puntas y estas elevaciones están comenzando a formar las curvas. El cerebro medio está siendo encerrado por el hueso de cráneo y está cubierto por piel pigmentada. Un gran volumen de vitelo se encuentra fuera del cuerpo y el área de conducto vitelino ventral es grande. Las escamas ahora son muy evidentes como elevaciones en todo el embrión (Figura 19 A).

**Estadio 25.** A los 58 días a una temperatura de 30°C y 51 días a 33°C. La longitud total del embrión en este estadio de desarrollo embrionario es de 189 mm y ya es una versión en miniatura de una cría, con un volumen considerable de vitelo externo y una gran región del conducto vitelino. El cráneo se cierra por completo por hueso y el cerebro ya no se observa a simple vista, además los párpados ya cubren completamente el ojo, el cual permanece cerrado. Las extremidades están perfectamente bien formadas, tienen las escamas y la coloración como se observa en un adulto, además el gancho de las uñas se hace más evidente. Las glándulas salivales son visibles a lo largo de los márgenes laterales posteriores de la base intergular de la mandíbula inferior. La carúncula es una elevación bífida sobre una base lisa similar en estructura a la de un adulto (Figura 19 B).

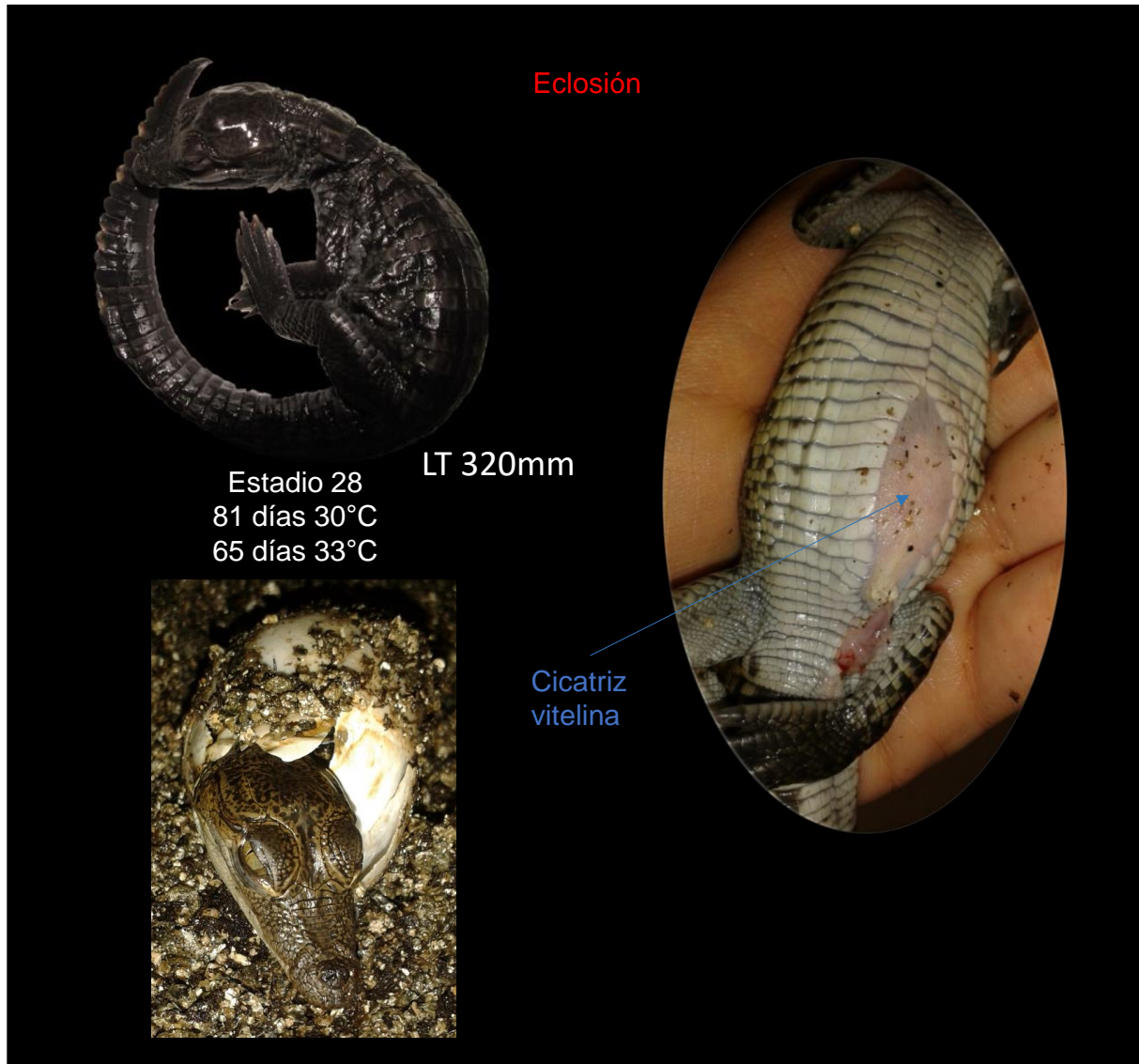
**Estadio 26.** A los 64 días a una temperatura de 30°C y 56 días a 33°C. En este estadio de desarrollo embrionario el embrión mide 198 mm, el cráneo ya está cubierto por piel y músculos. Las características morfológicas del embrión son las de un adulto, sólo que en una versión miniatura. Se caracteriza porque el vitelo ya está casi en su totalidad introducido en el abdomen excepto por un pequeño fragmento (Figura 20 A).

**Estadio 27.** A los 75 días a una temperatura de 30°C y 61 días a 33°C La longitud total del embrión es de 280 mm, como se había mencionado anteriormente ya es una versión miniatura de un adulto de *C. moreletii*. Pero se termina de absorber la cantidad restante de vitelo en la cavidad abdominal. Además inicia el crecimiento de la piel en el abdomen ventral para encerrar los intestinos embrionarios y el vitelo. La piel ventral se forma a través de la cicatriz del vitelo (Figura 20 B).

**Estadio 28.** A los 79-81 días a una temperatura de 30°C y 61-67 días a 33°C En este estadio de desarrollo embrionario eclosionan las crías de *C. moreletii* por lo que están bien formadas, miden entre 30 a 32 cm. Este estadio se caracteriza porque la cicatriz del vitelo del huevo



disminuye en longitud y ancho, a medida que el embrión o cría utiliza el vitelo abdominal (Figura 21 A).




**Figura 21. Estadio de desarrollo embrionario 28 de *C. moreletii*.** En A) Se muestra las principales características anatómicas del desarrollo embrionario del estadio 28 que es en el que eclosionan las crías. Longitud total (LT).

**TABLA 6. Días de desarrollo embrionario de *Crocodylus moreletii***

30°C

2-3 días aproximadamente



St	1	2		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Días	1	2		3	4	5	6	7	8	9	10				15


5 días aproximadamente




St	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Días	16	18	23	28	31	33	35	38	45	50	58	65	75	80

33°C

1 1/2 días aproximadamente





2 días aproximadamente



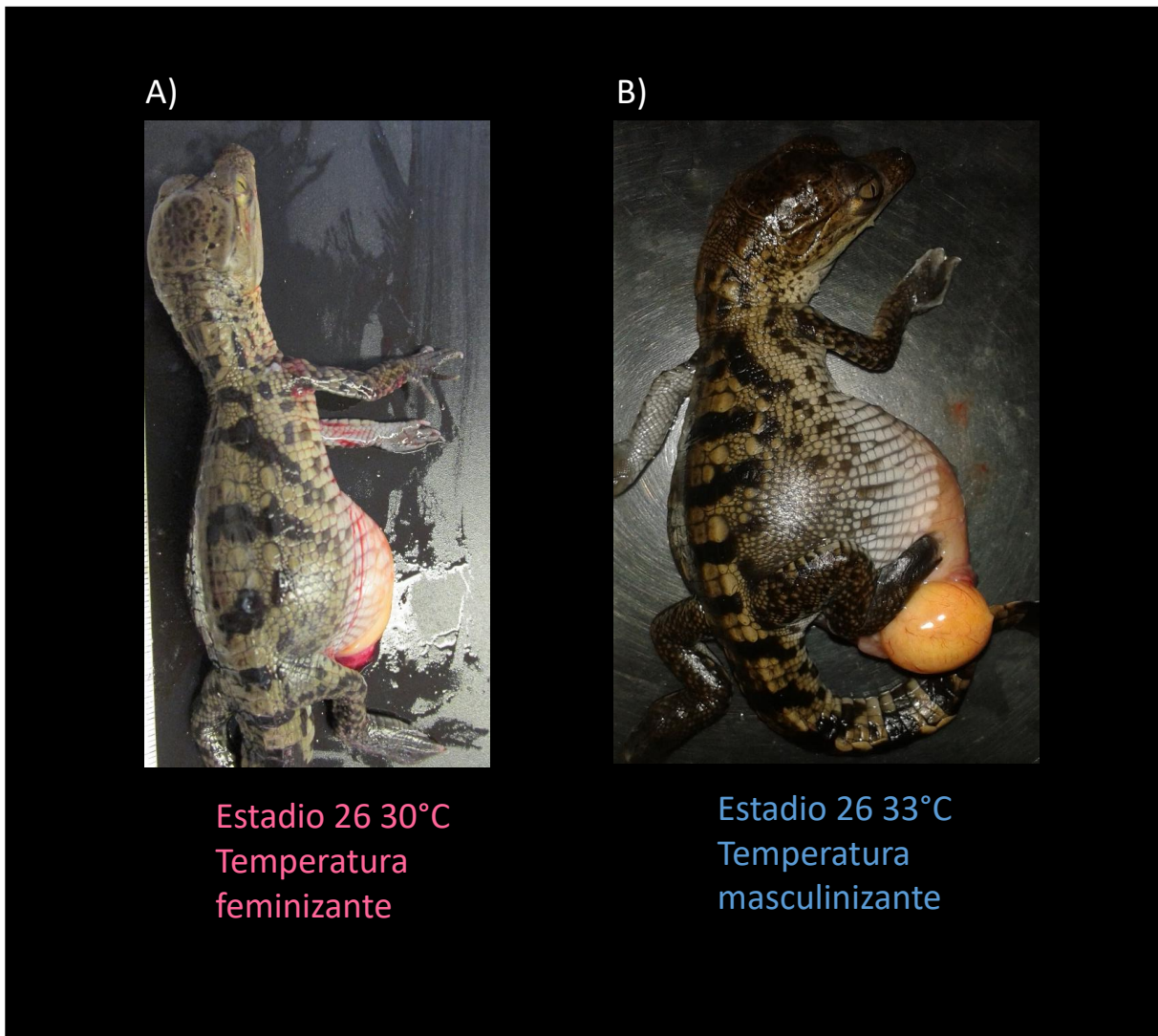
St	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Días			3							10				

5 días aproximadamente

St	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Días				23	28	30	33	35	41	45	51	56	61	65

**Velocidad en el desarrollo embrionario.** Como se esperaba los embriones que se mantuvieron a una temperatura masculinizante 33°C se desarrollaron más rápido que los embriones que se mantuvieron a una temperatura feminizante de 30°C. Dentro de los resultados más importantes sobre esta cinética en el desarrollo embrionario destaca que los embriones que se mantuvieron a 33°C van un estadio de desarrollo más adelante con respecto al embrión que se mantuvo desarrollándose a 30°C. Es decir van desfasados por un estadio de desarrollo embrionario y por lo tanto el total de desarrollo embrionario fue menor a 33°C (un promedio de 65 días) que a 30°C (un promedio de 81 días). Se muestra en la tabla 6 que compara los días de desarrollo embrionario a 30°C y a 33°C, especificando este desfase en días en el tiempo de desarrollo.



**Figura 22. Estadio de desarrollo embrionario 26 de *C. moreletii*.** Se muestra el fenotipo dimórfico entre dos embriones tales como la coloración de la piel y la forma de las franjas. En A) Embrión incubado a temperatura feminizante 30°C y en B) embrión incubado en temperatura masculinizante.

## 5.1.4 PARTE 1 Discusión

### 5.1.4.1 Efecto de la temperatura de incubación sobre el desarrollo embrionario de *C. moreletii*.

Una parte sumamente apasionante de trabajar con organismos que se determinan sexualmente por temperatura, es la estrecha interacción entre la ecología-evolución y el desarrollo embrionario (Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012). Es imposible separarlos pues el desarrollo de un individuo, en este caso el un cocodrilo, depende de la estrecha interacción entre el ambiente y los genes que se van expresando durante su desarrollo embrionario (Matsumoto *et al.* 2012). A su vez, la programación genética que tiene una especie durante su desarrollo, es consecuencia de millones de años de evolución, mediante procesos sumamente complicados como el de acomodación génica. En este proceso la selección natural incrementa la sensibilidad genética para responder a un estímulo ambiental mediante un programa de desarrollo. Por ejemplo, una característica morfológica siempre puede ser inducida por el ambiente cuando esta se encuentra ante una señal ambiental recurrente (West-Eberhard 2003, 2005). Además, la acomodación genética incrementa la plasticidad fenotípica, llevando a la obtención de los múltiples fenotipos posibles como ocurre en un polifenismo, como se explico en la introducción (Landry *et al.* 2014).

Es importante mencionar que los cocodrilos son organismos que han habitado el planeta tierra desde el cretácico y dependen en muchos aspectos del medio ambiente que los rodea, desde sus interacciones ecológicas con otras especies, donde son un depredador sumamente importante, hasta en su desarrollo, donde factores abióticos como la temperatura tienen un efecto sobre su determinación sexual y en el desarrollo embrionario (Deeming *et al.* 1989, Platt *et al.* 2007; Meredith *et al.* 2011). Esa gran plasticidad que presentan en el desarrollo, muy posiblemente sea una de las principales razones por las cuales han sobrevivido a muchos eventos de cambio climático y cambios en el planeta tierra a través de las eras geológicas (West-Eberhard 2003, 2005; Landry *et al.* 2014).

En este estudio encontramos que al igual que en otras especies de cocodrilos estudiadas (Deeming *et al.* 1989 a), la temperatura de incubación tiene un efecto directo en la velocidad del desarrollo embrionario, así como en características morfológicas del mismo, que al tratarse de la temperatura feminizante 30°C y masculinizante 33°C, desarrollan diformismos sexuales derivados de la plasticidad en el desarrollo embrionario de *C. moreletii* para responder a cada una de estas temperaturas (Deeming *et al.* 1989 b). Esta plasticidad en el desarrollo tiene que ver con plasticidad genética, plasticidad epigenética, plasticidad fisiológica y plasticidad

hormonal, que en conjunto juegan un papel importante en el desarrollo de un fenotipo (Landry *et al.* 2014).

Por ejemplo, encontramos que los embriones que son incubados a 30°C pesan ligeramente menos y ganan masa corporal más lentamente que los embriones incubados a 33°C. También la talla es ligeramente menor y su patrón de pigmentación es un poco más claro que los embriones incubados a 33°C (Figura 10). De hecho se muestra una fotografía de cómo es diferente el patrón de pigmentación a 30°C y 33°C (Figura 22). Todas estas características son el resultado de la robustez o de la canalización del desarrollo, es decir en un organismo pueden persistir ciertas características, ya sean a nivel individuo, órgano, patrón de expresión de genes, actividad o proceso celular, ante diferentes condiciones estocásticas, ambientales, condiciones genéticas o perturbaciones. En pocas palabras existe la plasticidad en el desarrollo para responder a estímulos ambientales y esta interacción entre la temperatura, el ambiente, el genoma, las hormonas, entre otras; van comprometiendo el desarrollo de una característica fenotípica, ante el estímulo de la temperatura ya sea a 30°C o a 33°C (West-Eberhard 2005; Landry *et al.* 2014).

Pero en este sentido nos preguntamos cómo influye la temperatura en el desarrollo de un embrión de *C. moreletii* para tener diferentes velocidades en el desarrollo. Pues nosotros sustentándonos en otros autores planteamos que existen dos maneras de cómo puede estar ocurriendo este fenómeno. En la primera la temperatura podría forzar el fenotipo en virtud a las leyes químicas y físicas en lo que se denomina inducción pasiva. De esta manera la temperatura puede causar cambios fenotípicos a través de la cinética de enzimas y tasas de difusión, mientras que la disponibilidad de nutrientes puede impactar en el crecimiento y la morfología (Landry *et al.* 2014).

En la segunda el cambio fenotípico puede ocurrir a través de una compleja interacción entre las señales ambientales (en este caso la temperatura) y sensores para estas señales. Es decir, en este proceso participarían moléculas de señalización, que transfieren el estímulo de la temperatura como información y toda esta maquinaria estaría involucrada en las modificaciones fenotípicas, a este proceso se le conoce como inducción activa (Windig *et al.* 2003).

Los reptiles han sido estudiados en los dos sentidos: En la forma de inducción pasiva, se sabe que la tasa de desarrollo embrionario se incrementa exponencialmente, debido al incremento de la temperatura en los animales ectotérmicos, esta deriva de estudios en la tortuga *Pelodiscus sinensis* donde encontraron que se incrementa la tasa de respiración mitocondrial y actividad de enzimas metabólicas como la enzima ciclo oxigenasa COX que

participa en la producción de prostaglandinas y en ratas que son endotérmicas, se sabe que la vía de señalización del óxido nítrico es importante en la termorregulación (Sun *et al.* 2015). Esto sugiere que los embriones de reptiles pueden ajustar su respiración mitocondrial y las actividades enzimáticas metabólicas en respuesta a la temperatura a la que se está desarrollando o está siendo incubado.

En la inducción activa se han estudiado si los embriones son capaces de termorregular su temperatura en el huevo como un reptil adulto. En donde se proponía que el embrión tal vez era capaz de moverse dentro del huevo y dirigirse hacia una fuente de calor dentro del nido, pues un reptil adulto al ser ectotermo regula su temperatura corporal tomando calor del medio ambiente. Estos regulan su temperatura óptima buscando lugares frescos o cálidos y con comportamientos como el de abrir el ojo, como lo hacen los cocodrilos. Sin embargo, hasta el momento la evidencia ha concluido que los embriones no son capaces de hacer este mecanismo de retroalimentación (Cordero *et al.* 2018). En reptiles adultos se han estudiado moléculas señalizadoras que participan en la termorregulación de la temperatura, tales como: receptores de 7 dominios transmembranales (GPCR) y canales iónicos como los TRP's, sobre todo en tortugas, gekos, cocodrilos y serpientes (Seebacher *et al.* 2005 y 2007; Nagai *et al.* 2012; Yatsu *et al.* 2015). Además el sistema nervioso periférico, la glándula pineal y la melatonina, parecen estar involucrados en los mecanismos de termoregulación de reptiles (Seebacher *et al.* 2005). Pero aún se desconocen muchos aspectos de los detalles sobre las vías de señalización y el proceso fisiológico.

Otra parte importante en el desarrollo que puede acelerar el estímulo de la temperatura, es la aparición de las características morfológicas en los embriones que se incubaron a 33°C o altas temperaturas, sobre los que fueron incubados a 30°C. Nosotros proponemos que muy posiblemente también en este proceso esté involucrada una mayor la tasa de difusión de los morfógenos; es decir, la temperatura puede acelerar la tasa de difusión de los mismos, tal como se describe en el modelo matemático de "reacción- difusión" de más de tres componentes del matemático Turing para el pez zebra (Wertheim *et al.* 2017; Shigeru *et al.* 2010). Algo interesante de estos modelos de "reacción- difusión", es que se consideran a la Ley de difusión de Fick, dentro de la cual un punto importante es el que habla sobre la velocidad de difusión de una partícula, la cual depende de la temperatura y de la viscosidad del fluido, en nuestro caso podríamos referirnos a un morfógeno. De tal manera posiblemente este tipo de modelos, en parte, nos pueden dar una mejor idea de por qué se desarrolla un embrión a la temperatura de 33°C más rápido. Por lo tanto, la gran plasticidad en el desarrollo del embrión es un factor importante para responder a la temperatura generando un fenotipo.

#### **5.1.4.2 El desarrollo general de *C. moreletii***

En general observamos que los primeros estadios de desarrollo embrionario los cambios ocurren rápidamente. Es decir, en los primeros estadios que abarcan del 2-10 los embriones incubados a una temperatura de 30°C, cambian de un estadio a otro con 2 días de diferencia. Y los embriones incubados a 33°C cambian del estadio 2-11 con un día y medio de diferencia. En estos primeros estadios el desarrollo embrionario ocurre más rápido, en donde de manera general se desarrolla el corazón, da inicio el desarrollo facial y cambia la posición del cuerpo del embrión.

En las siguientes etapas de la 11-13 a una temperatura de 30°C los embriones avanzan de una etapa a otra con 2-3 días de diferencia aproximadamente. Y los incubados a 33°C de la etapa 12 a la 17 avanzan con 2 días de diferencia aproximadamente. En estos estadios el ojo se comienza a pigmentar, está la protuberancia del mesencéfalo e inicia el desarrollo mandibular.

Del estadio 17 en adelante, en ambas temperaturas se observa que disminuye la velocidad con la que cambian de un estadio a otro los embriones, pero los incubados a 33°C continúan desarrollándose en menos días respecto a los de 30°C (3-5 días). En la Tabla 7, se muestra exactamente cuántos son los días de diferencia entre un estadio y otro de las dos temperaturas. De manera general continúa el desarrollo de la mandíbula, el párpado y ojo, se cierra el cráneo e inicia la pigmentación de la piel hasta que alcanza una morfología muy similar a la de un adulto.

#### **5.1.4.3 Comparación del desarrollo embrionario de *C. moreletii* con otras especies de cocodrilo**

Comparando nuestro resultados con la descripción de los estadios de desarrollo embrionario que realizó Ferguson (1985), podemos observar que el desarrollo de *Crocodylus moreletii* dura más que el de *Alligator mississippiensis*, ya que los embriones de *C. moreletii* incubados a 30°C en los primeros estadios se tardan 3 días más que los descritos para esos mismos estadios por Ferguson. Los estadios de desarrollo que se encuentran intermedios se tardan 8 días más y los últimos hasta 10 días más aproximadamente. En cambio, los días entre estadios de los embriones incubados a 33°C se ajustan más a lo mencionado para *A. mississippiensis*.

Particularmente encontramos características morfológicas del desarrollo embrionario de *C. moreletii*, que ocurren en diferentes estadios de desarrollo con respecto a los de *A. mississippiensis*. Una de ellas es la introducción del pericardio, pues ocurre antes en *C. moreletii* que en *A. mississippiensis*, pues observamos que en el estadio 23 de *C. moreletii* ya se introdujo el corazón en la cavidad del cuerpo y se cerraron las costillas. La pigmentación general en el embrión en el estadio 22 es mayor en *C. moreletii* que en *A. mississippiensis*. Además, en el desarrollo de ojo aparece el margen del párpado en el estadio 16 en *C. moreletii* después que en *A. mississippiensis*, que ocurre en el estadio 15, y membrana nictitante en *C. moreletii* también aparece después en el estadio 20 y no en el estadio 19 como en *A. mississippiensis*.

#### **5.1.4.4 Desarrollo de los embriones en la Laguna de las Ilusiones**

Los huevos que empleamos e incubamos en este estudio fueron colectados a partir de nidos que estuvieron en lugares que implicaban un riesgo para la anidación de la especie (*Crocodylus moreletii*), es decir, como en calles a la orilla de la laguna o en terrenos donde los dueños hacen desmonte y quema de cultivos, o en peligro de depredación, lo que incrementa la mortalidad de los mismos. En comunicación personal con el M. en C. Marco Antonio López Luna, nos ha comentado que se ha incrementado la mortandad en de los embriones en la Laguna de la Ilusiones sobre todo en las últimas etapas de desarrollo embrionario, por lo que no pueden llegar a eclosionar. Esto ha sido en los dos últimos años 2017 y 2018, lo cual es sumamente preocupante, pues además del problema en el que se están sesgando los sexos de las crías eclosionadas a machos (López Luna *et al.* 2011 y 2015), ahora parece ser que comienza un nuevo problema. Estudios de anidación de años anteriores mencionan que la Laguna de las Ilusiones está contaminada por pesticidas orgánicos, producto de las malas prácticas agrícolas (López Luna *et al.* 2015). También por productos químicos de uso humano, sugerimos que posiblemente algún químico esté afectando la salud de los embriones y su calidad de vida. También hemos encontrado embriones con defectos morfológicos en el desarrollo, muy posiblemente derivados de mutaciones que aún desconocemos, lo que es un indicador más de estos problemas.

Además la contaminación ambiental en esta laguna es un problema muy grave, pues otra posibilidad es que la microfauna del suelo este en desequilibrio ecológico, en el sentido de que los microorganismos que hacen un humus orgánico apropiado en el suelo, no existan más y estén proliferando patógenos que afectan la sobrevivencia de los embriones gravemente.



Un ambiente saludable es aquel en el que los procesos de las interacciones biológicas se realizan adecuadamente o naturalmente, es decir, un ambiente donde las especies interactúan entre sí, con: simbiosis, depredación, comensalismo, competencia, etc. Además, donde ocurren normalmente los ciclos biogeoquímicos del suelo, del agua y la atmósfera. Y todo lo anterior ha sido gravemente afectado debido a las actividades humanas, poniendo en riesgo la salud de todos los organismos que habitan en el ambiente, incluyendonos a nosotros (Valverde *et al.* 2005).

Este grave problema parece que ocurre de manera general en el estado de Tabasco, pues en este año han muerto aproximadamente 54 Manatíes (*Trichechus manatus*), al parecer por terrible contaminación del agua aunque aún no se sabe específicamente que contaminante es, se plantea que pueden ser metales pesados, hidrocarburos o el crecimiento de algas tóxicas en conjunto (López A. 2018). Pero esto es una evidencia más de como la flora y fauna del estado de Tabasco está en grave riesgo, incluyendo a *C. moreletii* e incluso la salud humana, porque hasta el momento se desconocen cuáles son los motivos que están afectados de esta manera a las poblaciones silvestres.

#### **5.1.4.5 Importancia de la elaboración de una tabla de desarrollo de *C. moreletii*.**

La tabla de desarrollo elaborada en éste trabajo contribuye para conocer más características dimórficas durante el desarrollo de los embriones en ambas temperaturas. De la misma hemos completado los estadios de desarrollo embrionario desde el estadio 9 al 28, faltan algunos estadios de los más pequeños y el 8 para tener un registro total del desarrollo embrionario de *C. moreletii*. Sin embargo, esta primera tabla que se elaboró es muy importante, ya que es la primera de una especie de cocodrilo mexicana y será de gran utilidad para los futuros estudios de la misma, pues la mortandad de los embriones en el desarrollo, defectos en el desarrollo embrionario y el sexo que eclosiona en la laguna de las Ilusiones, están siendo afectados muy posiblemente por la contaminación del ambiente, por lo que esta tabla será de utilidad para identificar el estadio de desarrollo donde ocurren estos problemas y como una comparación de como ocurre el desarrollo *in situ*. Se espera que en un futuro se puedan completar pues ha sido difícil la obtención del material biológico ya que es una especie bajo protección especial.

### **5.1.5 PARTE 1 Conclusiones**

El embrión que se incubó a una temperatura masculinizante de 33°C se desarrolló más rápido y adquiere un fenotipo distinto que el embrión que se desarrolló en una temperatura feminizante de 30°C. Se logró describir una tabla de desarrollo embrionario para una especie de cocodrilo mexicano y se espera que sea de utilidad para los ecólogos como una herramienta en programas que ayuden a la conservación de esta especie.

A continuación en la PARTE 2 de los resultados se relatará como se demostró que la temperatura feminizante es de 30°C y la masculinizante de 33°C, una parte muy importante dentro de este proyecto.

## 5.2 PARTE 2. Efecto de la temperatura de incubación sobre el mecanismo de determinación sexual gonadal en *Crocodylus moreletii*

Resumen. El cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii* se distribuye en el Golfo de México y se reproduce entre los meses de abril a septiembre, anidando en los meses de mayo a septiembre. A pesar de que es una especie de gran importancia biológica, aún se desconocen los eventos morfológicos y moleculares del desarrollo sexual de este reptil. Todas las especies de cocodrilos tienen determinación sexual por temperatura (DST), donde la temperatura influye sobre la proporción de sexos.

En este sentido es interesante e importante estudiar la población de cocodrilo de pantano en la Laguna de las Ilusiones de Villahermosa, Tabasco; pues se ha observado en los últimos años un aumento en la eclosión de machos, incrementándose hasta un 80% con respecto a las hembras. El objetivo del presente estudio fue establecer las temperaturas para generar machos y hembras y correlacionar el efecto de estas temperaturas con el desarrollo embrionario y la morfogénesis gonadal. También, establecer el patrón de expresión del gen *Sox9* y *Vasa* y el periodo sensible a la temperatura durante la DST de *C. moreletii*.

En esta segunda PARTE de los resultados de esta tesis doctoral, se cumplieron con los objetivos particulares 2, 3 y 4. Para ello realizamos la incubación a temperaturas controladas (feminizante y masculinizante) de huevos de *C. moreletii* provenientes de la Laguna de las Ilusiones. Se identificó el estadio de desarrollo embrionario, de acuerdo a lo descrito en la PARTE 1 de los resultados de esta tesis y posteriormente se sacrificaron los embriones para obtener las gónadas. Estas se fijaron para ser procesadas para microscopia e inmunofluorescencia. Encontramos que en *C. moreletii* la temperatura feminizante (TF) se estableció en 30°C, mientras que la temperatura masculinizante (TM) a 33°C. Se describieron del estadio 7 al estadio 28 del desarrollo embrionario, donde se observó que a TM los embriones se desarrollan más rápido que los incubados a TF. De los estadios 15 al 22, la gónada esta indiferenciada, observándose morfológicamente idéntica en ambas temperaturas. Sin embargo, a nivel molecular ya observamos un dimorfismo sexual, puesto que el gen *Sox9* a TF es regulado negativamente a partir del estadio 16.

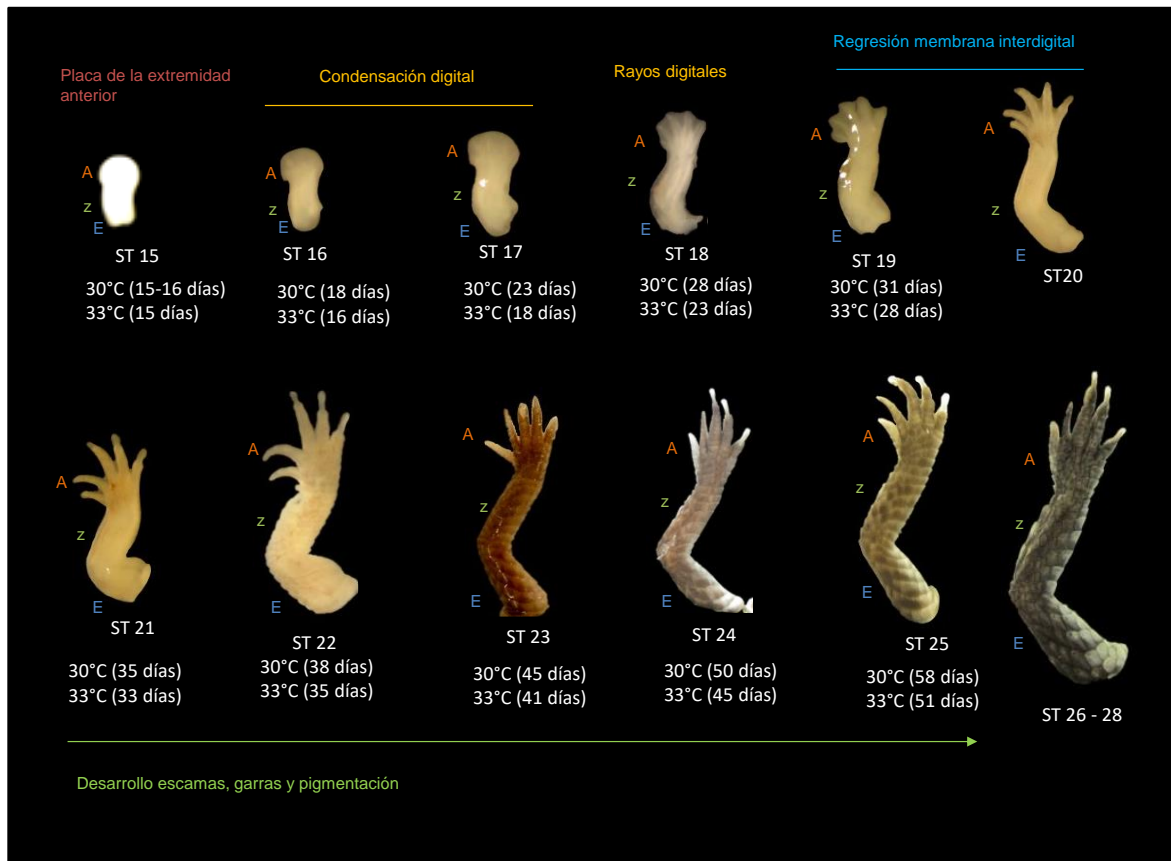
La diferenciación testicular se inicia en el estadio 24, donde la región medular está formada por cordones con células germinales y de Sertoli. La diferenciación ovárica ocurre en el estadio 25, donde se aprecia una corteza que contiene células germinales en proliferación. El periodo sensible a la temperatura que es el momento en el desarrollo embrionario donde el embrión puede percibir la temperatura y determinarse como macho o hembra, ocurre en los

estadios 21 al 23 para la temperatura feminizante (30°C) y de los estadios 18 al 22 para la temperatura masculinizante (33°C). A continuación se describen nuestros resultados detalladamente.

### **5.2.1 Temperatura feminizante, masculinizante y periodo sensible en *Crocodylus moreletii***

De los 220 huevos que fueron colectados, algunos se incubaron hasta estadios cercanos a su eclosión para sexarlos con la finalidad de caracterizar la temperatura feminizante y masculinizante. De los 35 huevos que se incubaron a una temperatura de 30°C se obtuvieron 33 embriones con un porcentaje de 100% hembras, mientras que de 35 huevos incubados en una temperatura de 33°C se obtuvieron 29 embriones con un porcentaje de 100% machos (Figura 9). Por lo tanto, la temperatura feminizante es 30°C y la masculinizante de 33°C en *C. moreletii*.

El periodo sensible a la temperatura es el momento del desarrollo cuando el embrión es capaz de percibir el estímulo de la temperatura y determinarse sexualmente. Para establecerlo en *C. moreletii* realizamos experimentos de intercambio sencillos en distintos estadios de desarrollo embrionario, como se mencionó en la metodología. Encontramos que cuando se incuban los huevos a una temperatura masculinizante, el periodo sensible a la temperatura ocurre del estadio 18 al 22 del desarrollo embrionario. Pues como se observa en la Tabla 7, todos los embriones intercambiados en estadios menores al 17, de una temperatura masculinizante de 33°C a una feminizante de 30°C, se determinaron sexualmente como hembras, es decir respondieron al cambio de temperatura. A partir del estadio 18 algunos embriones ya no responden al cambio de temperatura, ya que se determinaron sexualmente la mayoría como machos y sólo uno como hembra. A partir del estadio 21 del desarrollo todos los embriones se determinaron sexualmente como machos, o sea ya no responden al cambio de temperatura, esto nos indica que en el estadio 21 la gónada bipotencial pierde la plasticidad en el desarrollo, pues esta se ha comprometido y canaliza su desarrollo dirigiendo la morfogénesis hacía la formación de un testículo (Tabla 7).



**Figura 23. Morfogenésis de la extremidad anterior derecha.** Se muestran los principales eventos en la morfogenésis de la extremidad anterior izquierda del estadio 15 al 27. A (autopodio), Z (zeugopodio), E (estilopodio). Se basó en lo descrito para *A. mississippiensis* por Ferguson 1985 y en lo propuesto para el mismo por Vargas *et al.* 2008.

En el caso de la temperatura feminizante 30°C posiblemente el periodo sensible a la temperatura se encuentre del estadio 20 al 23 del desarrollo embrionario. Pues en el intercambio de la temperatura feminizante 30°C a la masculinizante de 33°C, observamos que los estadios menores al 20 responden al cambio de temperatura, pues se determinaron sexualmente como machos. A partir del estadio 21 comenzaron a dejar de responder al cambio de temperatura, pues se determinaron sexualmente dos embriones como hembras y dos embriones como machos. Así mismo en el estadio 22 se determinó sexualmente un embrión como macho y dos embriones como hembras (Tabla 7). Por último, en el estadio 23 se determinaron sexualmente todos los embriones como hembras. Por lo tanto en este último estadio embrionario, la gónada bipotencial pierde la plasticidad en el desarrollo, pues esta se ha comprometido y canaliza su desarrollo dirigiendo la morfogenésis hacia la formación de un

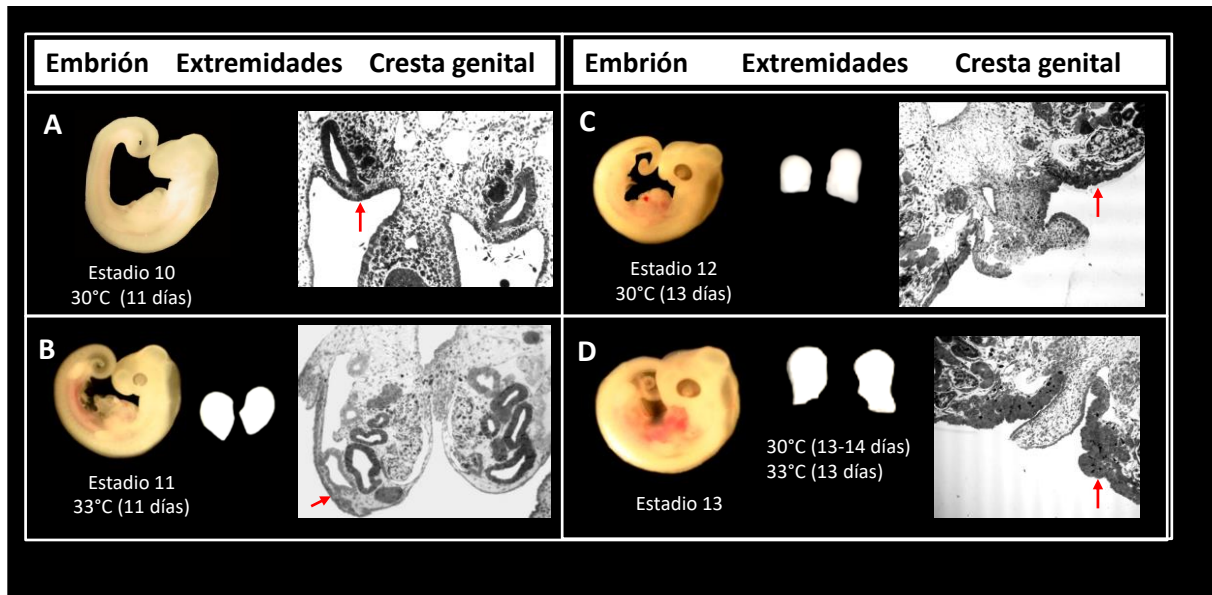
un ovario. Cabe mencionar que hasta el momento tenemos una muestra pequeña de embriones, porque trabajamos con nidos abandonados o en riesgo de depredación, por lo que fue difícil obtener los suficientes embriones viables para esta parte experimental, pues la otra cantidad de ellos fueron utilizados en otros experimentos (ver PARTE 1). Esta es la razón por la que en algunos estadios no obtuvimos embriones para sexar.

**Tabla 7. Sexo de *Crocodylus moreletii* con distintos tratamientos de incubación de huevos.**

Estadio de desarrollo	Incubación sin intercambio		Intercambio 33°C → 30°C		Intercambio 30°C → 33°C	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
	Estadio 16	0	0	3	0	0
Estadio 17	0	0	2	0	0	3
Estadio 18	0	0	1	5	0	0
Estadio 19	0	0	0	1	0	0
Estadio 20	0	0	0	4	0	2
Estadio 21	0	0	0	4	2	2
Estadio 22	0	0	0	3	6	1
Estadio 23	0	0	0	0	2	0
Estadio 24	0	0	0	4	2	0
Estadio 25	0	0	0	2	0	0
Sin intercambio	33	29				

### 5.2.2 Correlación entre la morfogénesis gonadal y el desarrollo de las extremidades

Una vez que se estableció la temperatura feminizante (30°C) y masculinizante (33°C) y se realizó la descripción morfológica de los embriones que fueron incubados bajo estas condiciones controladas en el laboratorio, se procedió a correlacionar el estadio de desarrollo embrionario con la morfogénesis de la gónada en *C. moreletii*, utilizando como referencia del estadio de desarrollo a las extremidades anteriores (Figura 23), estas se eligieron porque son particulares de cada estadio de desarrollo como se describió en la PARTE 1 de los resultados.

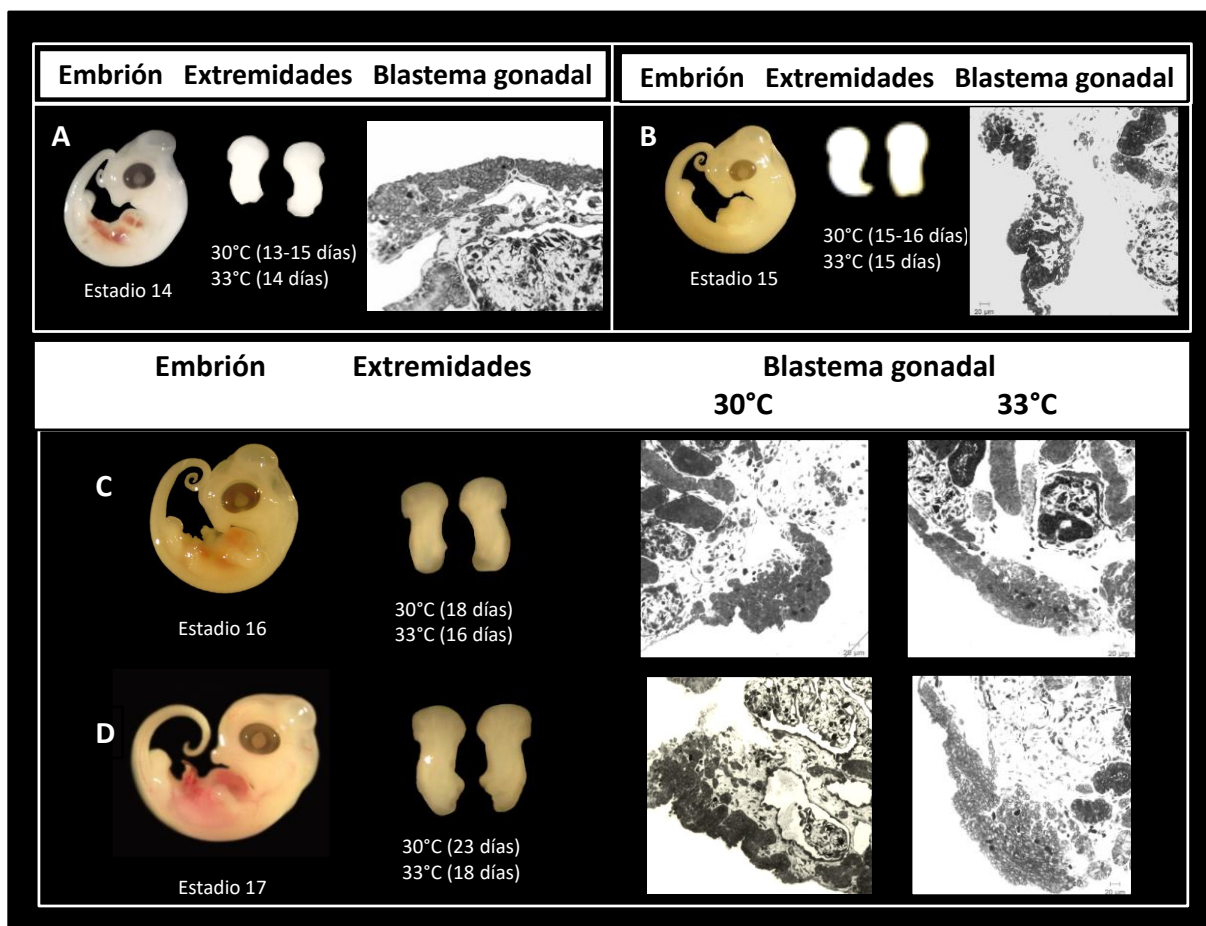


**Figura 24. Establecimiento de la cresta genital en *C. moreletii*.** Se muestran el establecimiento de la cresta genital desde del estadio 10 al 13 formada por un epitelio pseudoestratificado simple (flecha roja).

Mediante un análisis histológico se lograron establecer los siguientes periodos de morfogénesis gonadal, que se describirán a continuación. Primero ocurre el establecimiento de la cresta genital que se observa de los estadios 10 al 13, en los cuales se puede apreciar el engrosamiento del epitelio celómico que es pseudoestratificado simple, sobre la superficie ventromedial del mesonéfrs en la cavidad celómica (Figura 24 A-D), en este epitelio también ya se pueden apreciar algunas células germinales incluidas en el mismo (Figuras 24 D). En el estadio 10 los esbozos de las extremidades son protuberancias de forma sigmoidea en el embrión y del estadio 11 al 13 tienen una forma de muñón carentes de dígitos y conforme avanza el desarrollo embrionario aumenta el tamaño y se aplanan (Figura 24 B-D). En estos estadios de desarrollo las extremidades anteriores y posteriores tienen crestas ectodérmicas apicales distintas y específicamente en el estadio 13 se forma la estructura llamada placa de la extremidad posterior (Figuras 24 A-D).

La morfología de blastema gonadal la encontramos a partir del estadio 14 al 17 (Figuras 25 A-D), pues histológicamente se observan algunas células germinales en la corteza formada por un epitelio pseudoestratificado simple y subyacente a ella algunos cordones medulares en formación, que algunas células mesenquimales rodean. Las extremidades anteriores son morfológicamente una estructura llamada placa de la extremidad anterior (Figuras 25 A-D), en esta estructura durante el estadio 16 se forman condensaciones débilmente definidas de

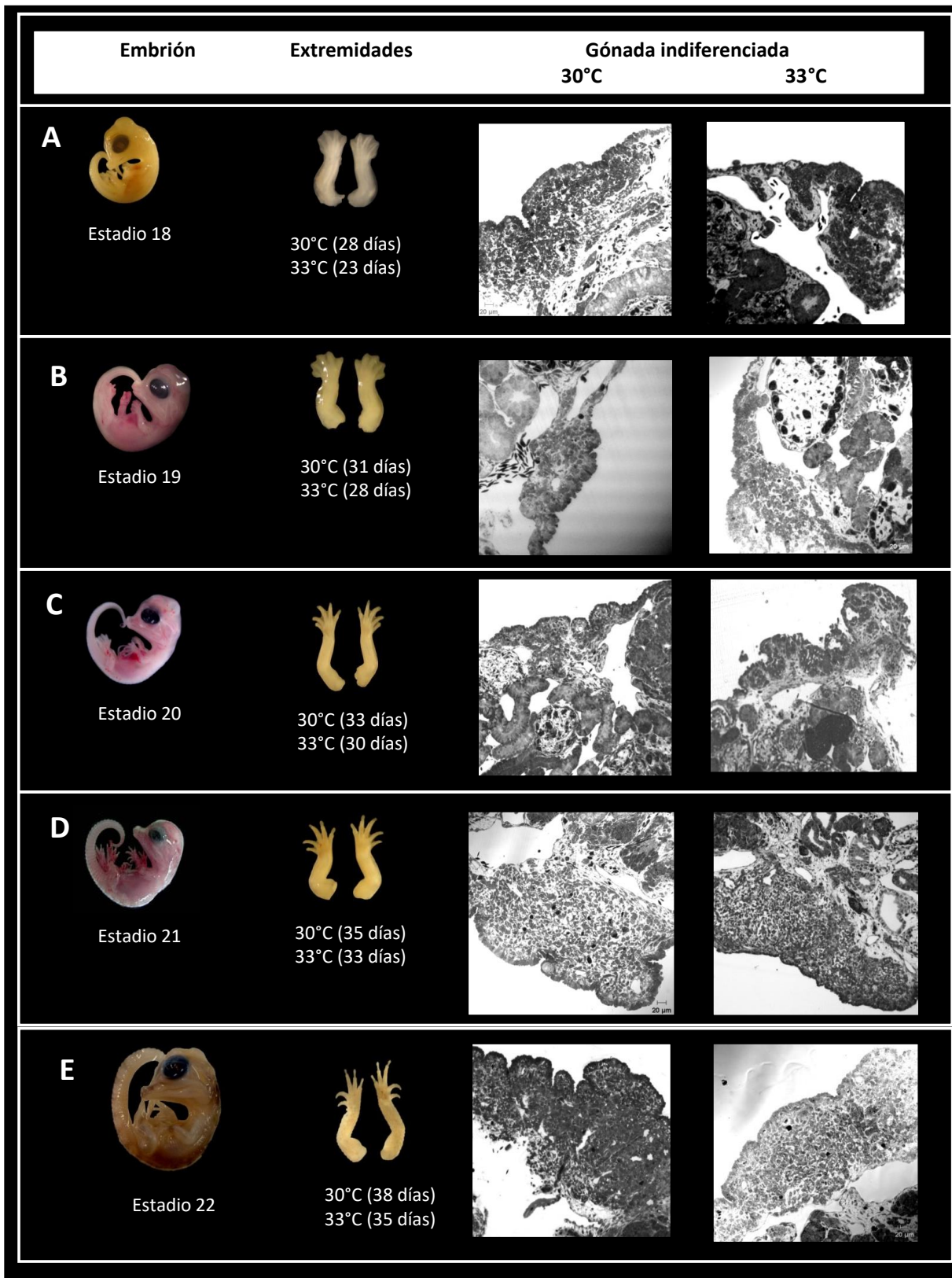
dígitos en las extremidades posteriores, aunque en las anteriores no aparece este rasgo, por lo que este estadio de desarrollo se caracteriza por lo mismo. En el estadio 17 aparecen estas condensaciones de dígitos en las placas de las extremidades anteriores y en las placas de las extremidades posteriores (Figuras 23 y 25 D). Es importante mencionar que estas condensaciones son de origen mesenquimatoso.



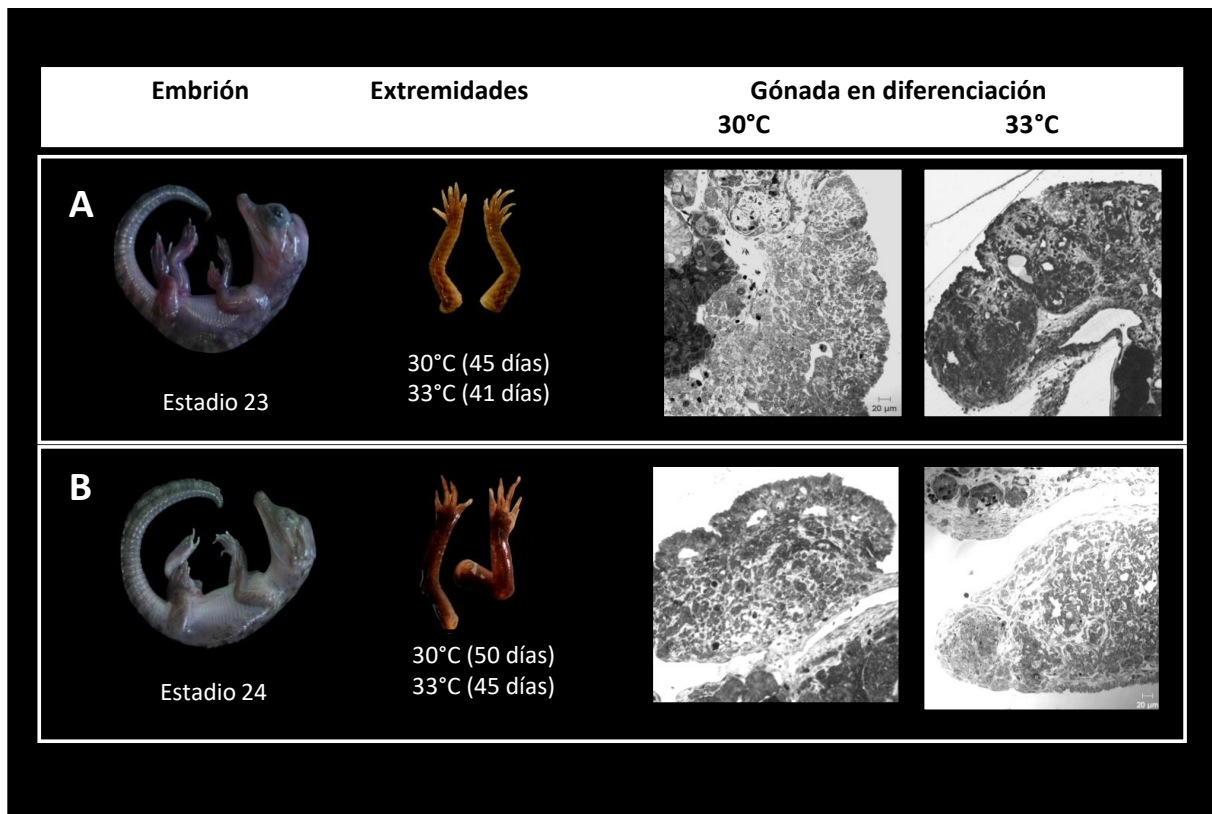
**Figura 25. Blastema gonadal del estadio 14 al 17 en *C. moreletii*.** Se muestran el establecimiento del blastema gonadal del estadio 14 al 17 formada por un epitelio pseudoestratificado simple y por la formación de los cordones medulares.

La siguiente estructura que describimos fue la gónada indiferenciada, la cual se observa del estadio de desarrollo 18 al 22 (Figuras 26 A-E), en ella los cordones sexuales son evidentes en la médula de la gónada delimitados por una membrana basal y la corteza tiene incluida una mayor cantidad de células germinales en su epitelio que sigue siendo pseudoestratificado simple. En el estadio 18 la morfología de las extremidades se caracteriza porque se tienen 5 dígitos formados por una estructura cartilaginosa llamada rayos digitales, además la membrana interdigital las cubre completamente (Figura 26 A).



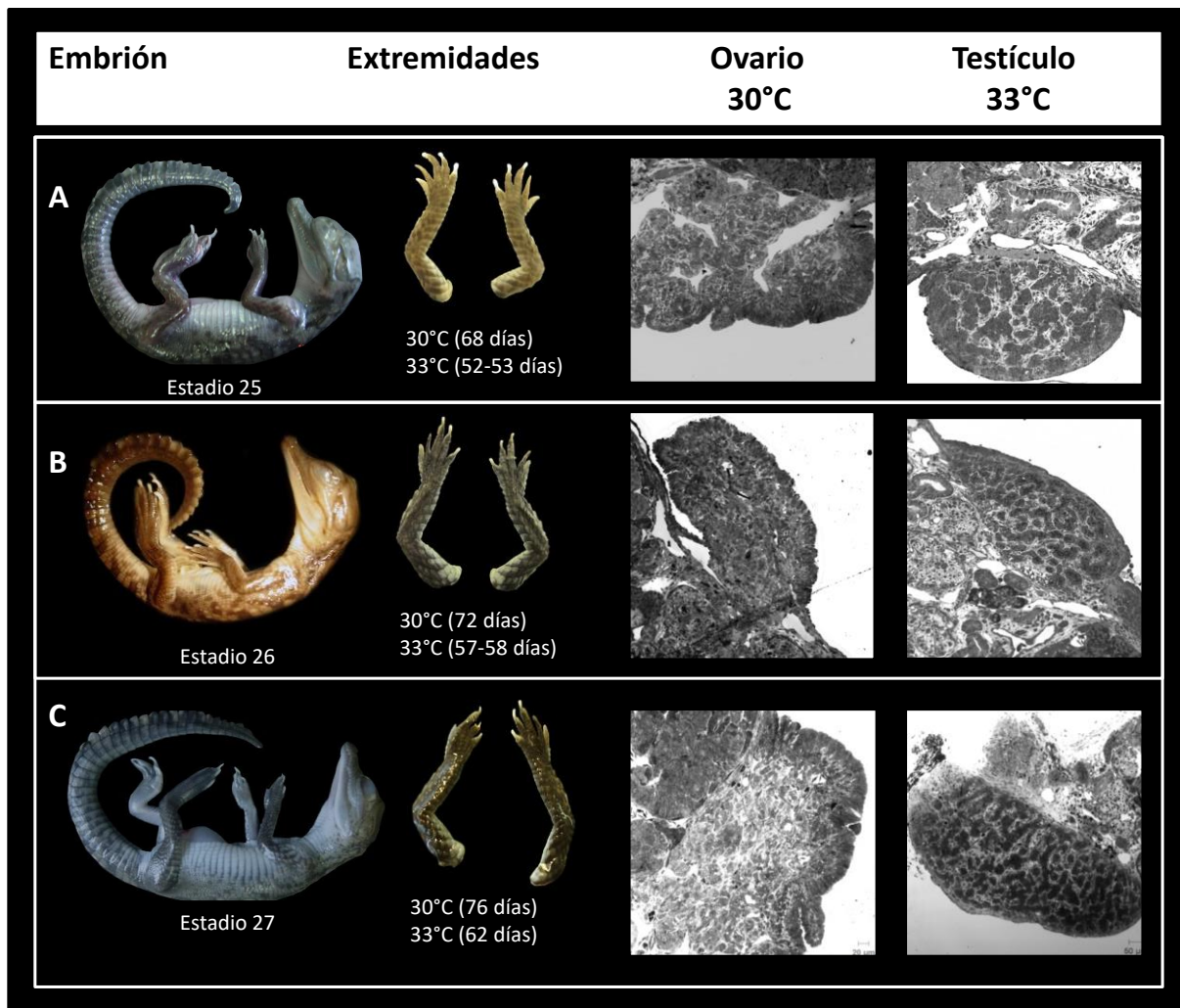


**Figura 26. Gonada indiferenciada en *C. moreletii*.** Se muestra el establecimiento de la gonada indiferenciada de los estadios 18 al 22, formada por un epitelio pseudoestratificado simple con células germinales y cordones medulares.



**Figura 27. Morfogénesis o diferenciación gonadal en *C. moreletii*.** Se muestra el inicio de la diferenciación de la gónada en los estadios 23 al 24. En el ovario ocurre la proliferación de la corteza y en el testículo la formación de cordones testiculares en la médula.

En el estadio 19 se inicia la regresión de la membrana interdigital apareciendo en las extremidades una estructura denominada hendidura interdigital (Figura 26 B). En estadio 20 la regresión de la membrana interdigital ha ocurrido 1/4 parte (Figura 26 C) y en el estadio 21 la regresión interdigital ha ocurrido 3/4 partes en los dígitos y en este último estadio aparece una estructura denominada garras o uñas de anagéno (Figura 26 D). En el estadio 22 ya se formaron los dígitos igual que en la extremidad de un adulto, ocurre la pigmentación en los elementos proximales y aparecen las escamas (Figura 26 E), es importante mencionar que en estos dos últimos estadios, la gónada aún se encuentra indiferenciada, pero ha incrementado su tamaño y aún tiene embebidas células germinales rodeadas por células somáticas en la corteza gonadal, que sigue siendo un epitelio pseudoestratificado simple, también ocurre que los cordones sexuales se pierden, pues se fragmentan formando un componente mesenquimático (Figuras 26 D y E).



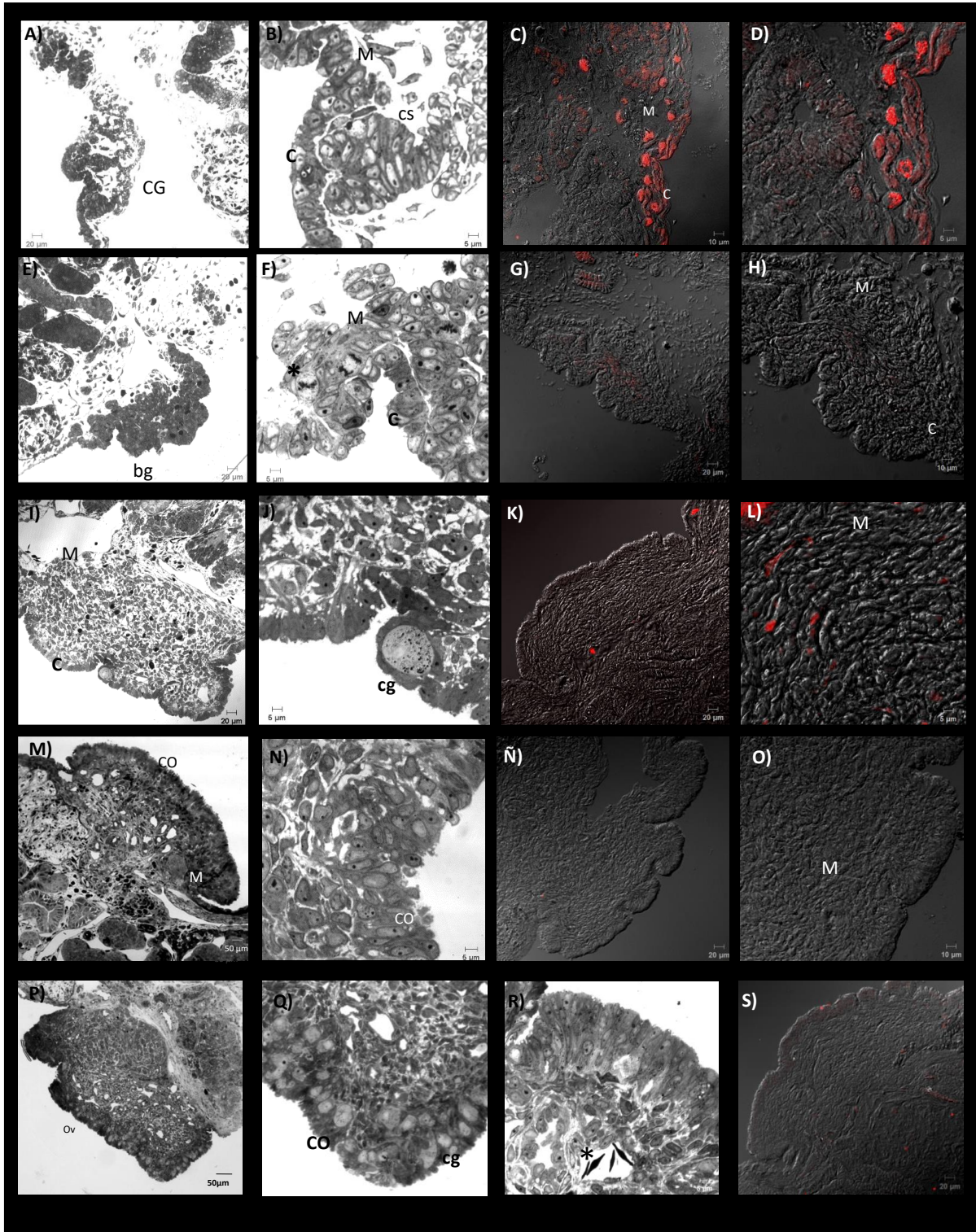
**Figura 28. Ovario y testículo en *C. moreletii*.** Del estadio 25 al 27 ya hay datos histológicos que permiten distinguir claramente entre un ovario y un testículo.

En el estadio 23 las extremidades se observan con garras y escamas incrementándose la pigmentación en las mismas. En cuanto a la gónada inicia la diferenciación en los estadios 23 y 24, que se puede apreciar con la morfogénesis de un testículo en los embriones incubados a 33°C, donde el epitelio deja de ser pseudoestratificado simple y el transforma en un epitelio cúbico simple (Figuras 27 A-B). En el caso del inicio de la morfogénesis del ovario se observa la proliferación de las células somáticas en el epitelio de la corteza gonadal (Figuras 27 A-B). Del estadio 25 al 27 ya hay datos histológicos que permiten distinguir claramente entre un ovario y un testículo. El ovario se caracteriza porque la corteza ovárica está formada por varias capas de células somáticas, producto de la proliferación del epitelio pseudoestratificado simple y el testículo se caracteriza por que en la médula ya están formados los cordones testiculares (Figuras 28 A-C). Las extremidades en estos estadios ya

son como las de un adulto, estos últimos estadios se distinguen por la cantidad de vitelo que ha consumido el embrión en el desarrollo y el cierre de la cicatriz vitelina (Resultados PARTE 1; Figuras 28 A-C). Una vez que establecimos las distintas etapas de desarrollo, procedimos a realizar el análisis histológico de la gónada que se describe a continuación.

### **5.2.3 Histología de la gónada indiferenciada y la expresión del factor de transcripción SOX9**

Como los estadios de la gónada indiferenciada son varios, decidimos describir los estadios más relevantes de la morfogenésis gonadal. A los 15 días del desarrollo embrionario de *C. moreletii*, se observó una cresta germinal en el estadio 15 a una temperatura feminizante de 30°C (Figura 29 A) y un blastema gonadal en el estadio 16 a temperatura masculinizante de 33°C (Figura 30 A). La morfología de esta estructura es similar en los embriones incubados a 30°C y a 33°C. En ellas se observan un epitelio pseudoestratificado simple formando la corteza de la gónada y en la médula los cordones medulares se ubican subyacentes a la corteza gonadal (Figura 29 B y 30 B). Particularmente la gónada tiene una forma compacta siendo una estructura distinguible del mesonéfros. A los 18 días (Figura 29 E y 30 E) se encontraron células entre los cordones medulares en proliferación, específicamente en metafase y anafase (Estadio 16; Figura 29 F). Específicamente, en este periodo, se observó en la corteza una célula germinal primordial en la gónada caracterizada por su núcleo celular prominente, lo anterior fue observado en un embrión incubado a 33°C (Estadio 17; Figura 30 F). También se observan algunas células mesénquimales entre los cordones medulares, posiblemente participando en la consolidación de los mismos (Figura 29 F). Una parte importante que realizamos en este análisis de la morfogénesis gonadal, fue la caracterización de la expresión del factor de transcripción SOX9, el cual dirige la determinación y diferenciación sexual de machos en distintos grupos de vertebrados. Nosotros encontramos que en el estadio 15 a los 14 días post-ovoposición este factor de transcripción se expresa en el núcleo de células en la médula de la gónada y su expresión es similar en los embriones incubados tanto a una temperatura feminizante de 30°C y en el estadio 16 en una temperatura masculinizante de 33°C (Figura 29 C-D y 30 C-D). A partir del estadio 16 (19 días) obtuvimos un resultado trascendente, pues encontramos que ocurre el inicio de la regulación a la baja en la expresión del factor de transcripción SOX9, en la región medular de la gónada incubada a 30°C, pero esto no ocurre para la gónada que fue incubada a 33°C pues la expresión de este factor continúa (Figuras 29 G-H y 30 G-H). Histológicamente la gónada se encuentra indiferenciada, pero a nivel molecular ya hay un fuerte dimorfismo en el patrón de expresión



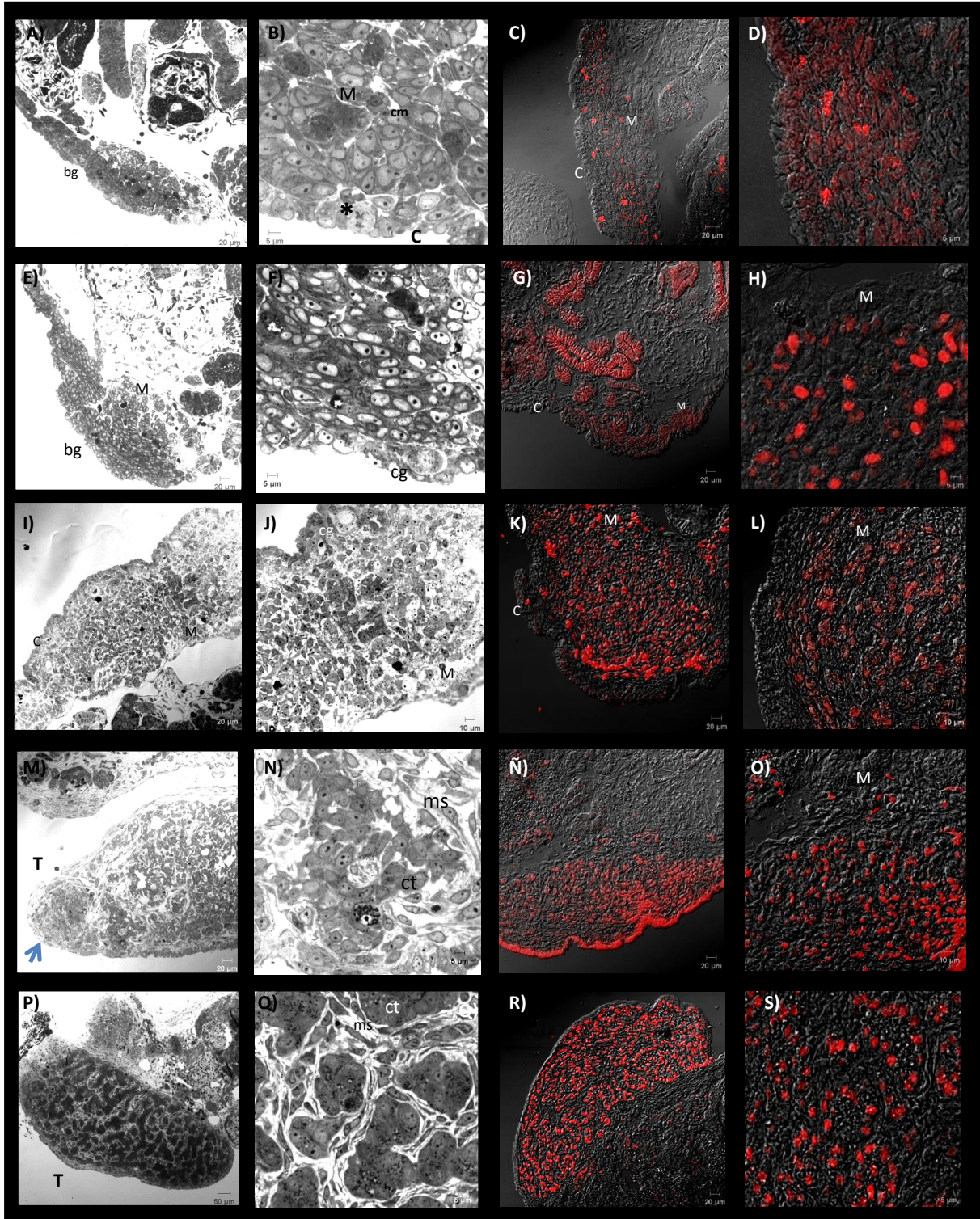
**Figura 29. Morfogénesis gonadal y la expresión del factor de transcripción SOX9 de embriones de *C. moreletii* incubados en temperatura de 30°C.** De A-D 14 días (estadio 15). A) Corte transversal de la cresta germinal (CG). En B) cordones medulares (cs), corteza (C) y Médula (M). En C-D) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De E-H) 18 días (estadio 16) E) Blastema gonadal (bg). En F) células en división celular (\*). De G-H) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De I-L) 35 días (estadio 22). En I) gónada indiferenciada. En J) célula germinal (cg) y K-L) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De M-O) 58 días (estadio 25) inicio de la diferenciación de la corteza ovárica (CO). En M) Gónada en proceso de diferenciación a un ovario. En N) Corteza engrosada (CO) C). De Ñ-O) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De P-S) 75 días (estadio 27) corteza ovárica (CO), médula (M), cg (células germinales) y R) Vaso sanguíneos (\*).

del factor de transcripción SOX9. Del estadio 21 al 22 (35 días) la histología de la gónada de los embriones incubados en ambas temperaturas (30°C y 33°C) muestra que la gónada continua siendo indiferenciada.

Particularmente la corteza presenta pliegues a lo largo de ella, está formada por un epitelio pseudoestratificado simple con células en forma de columnas y en este se disponen algunas células germinales. En la médula los cordones medulares están formados por células mesenquimales dispuestas de forma irregular y hay una mayor presencia de vasos sanguíneos (Figura 29I-J y 30I-J). Sin embargo, a los 35 días ya es más evidente la regulación a la baja del factor de transcripción SOX9 en la gónada del embrión incubado a 30°C (Figuras 29 K-L). Además, en la región medular se observa un incremento en la expresión de SOX9 en el núcleo de células alargadas de forma irregular y posiblemente las células de pre-sertoli en la gónada del embrión incubado a 33°C (Figura 30K-L).

#### **5.2.4 Histología de la gónada en diferenciación morfológica y la expresión de factor de transcripción SOX9**

A partir del estadio 23 (41 días 33°C) se distingue histológicamente la diferencia entre la gónada del embrión incubado a temperatura feminizante 30°C (Figura 29 M) y del embrión incubado a temperatura masculinizante 33°C (Figura 30 M). En el caso de la temperatura de 30°C del estadio 24 al 26 (54-64 días) se observa que existe un incremento en las capas celulares de las células epiteliales de la corteza, lo cual se sabe que se relaciona con la proliferación de las células somáticas y germinales en la misma, característica de un ovario en proceso de diferenciación (Figura 29 M-N). En la región medular de la gónada de embriones incubados a 33°C, se inicia la formación de los cordones testiculares, lo cual ocurre porque en ella se ubican las células germinales y estas son rodeadas por células somáticas (Figura 30 M-N) y el epitelio de la corteza adquiere la forma de un epitelio cúbico simple (Figura 30M). Molecularmente el factor de transcripción SOX9 está regulado a la baja en las gónadas de embriones incubados a una temperatura feminizante de 30°C (Figura 29 Ñ-O) y se está sobre-expresando en la región medular de células de forma alargada (pre-sertoli) de la gónada de embriones incubados a una temperatura masculinizante de 33°C (Figura 30 Ñ-O).



**FIGURA 30. Morfogénesis gonadal y la expresión del factor de transcripción SOX9 en embriones de *C. moreletii* incubados a temperatura de 33°C.** De A-D a los 14 días (estadio 16). A) Corte transversal el blastema gonadal (bg). En B) cordones medulares (cm), corteza (C) y Médula (M). En C-D) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De E-H) a los 18 días (estadio 17). E) Blastema gonadal (bg). En F) célula germinal (cg) embebida en la corteza. De G-H) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De I-L) 35 días (estadio 23). En I) gónada indiferenciada. En J) célula germinal (cg) y de K-L) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De M-O) a los 45 días (estadio 24). En M) Gónada en proceso de diferenciación a testículo. Se aplana el epitelio de la corteza (flecha). En N) cordones testiculares (ct), células mesenquimáticas (ms). De Ñ-O) inmunofluorescencia para el factor de transcripción SOX9. De P-Q) el testículo (T) a los 61 días (estadio 27). R) inmunofluorescencia de los cordones testiculares y en S) la expresión de SOX9 en el núcleo de las células de Sertoli.

### **5.2.5 Histología de la gonada diferenciada en un ovario o un testículo y la expresión del factor de transcripción SOX9**

**Ovario.** A los 75-81 días en el estadio 27-28, la corteza del ovario presenta un engrosamiento que va de cuatro a seis capas de células somáticas con una apariencia columnar (Figura 29 P), embebida en esta corteza se encuentran células germinales las cuales están proliferando y formando nidos de ovogonias (Figura 29 Q). En la médula ovárica se incrementa la irrigación de los vasos sanguíneos y la presencia de espacios denominados lagunas (Figura 29 R). El factor de transcripción SOX9 no se expresa (Figura 29 S). Es importante mencionar que con estas características histológicas eclosionan las crías.

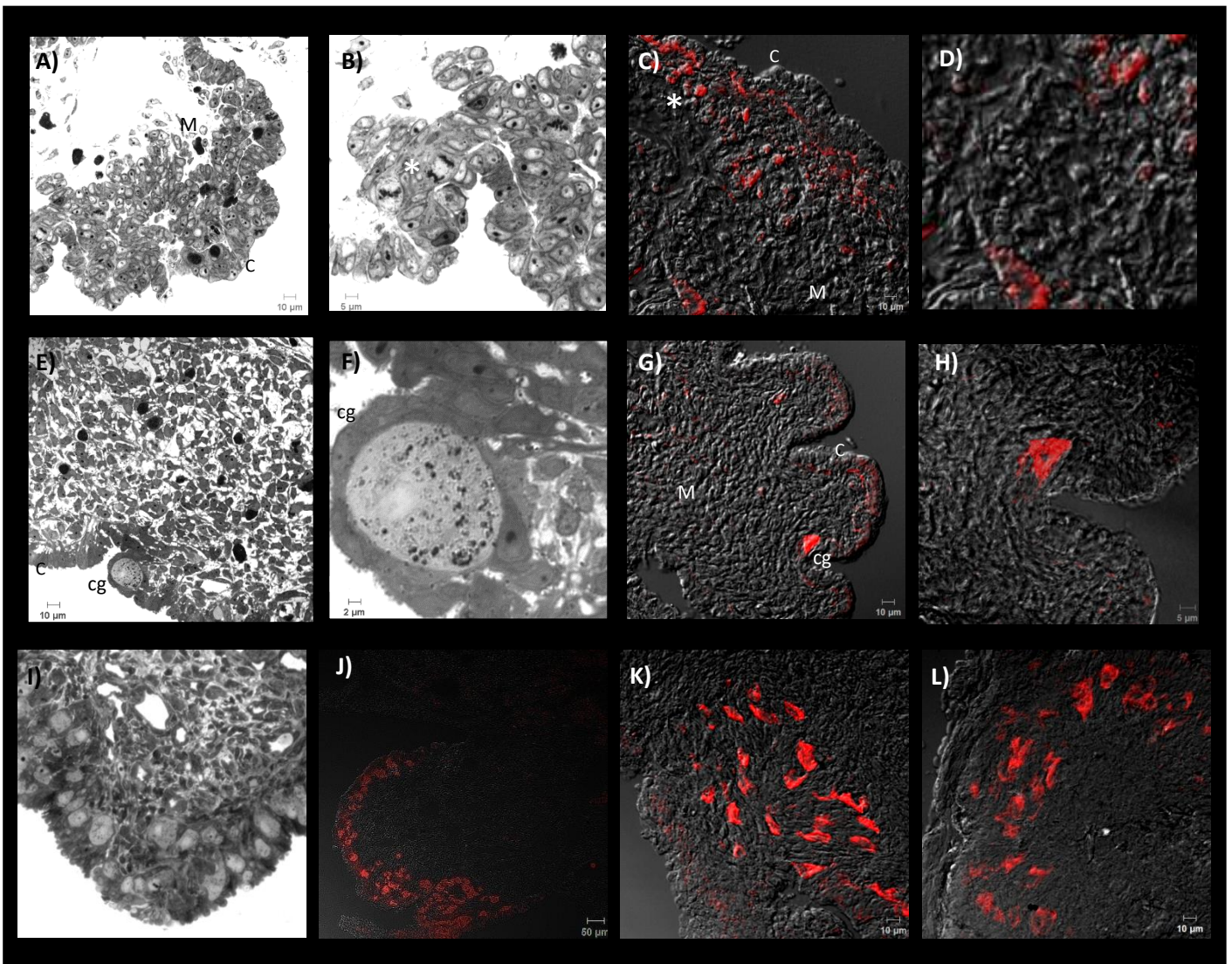
**Testículo.** A los 61-65 días en el estadio 27-28, el testículo presenta una organización general que se compone por cordones testiculares, además ya se observa una túnica albugínea incipiente o en formación (Figura 30 P). Hay una mayor apreciación de la lámina basal que delimita a los cordones testiculares y se encuentran rodeados por fibroblastos y células mioides (Figura 30 Q). Las células germinales se ubican dentro de los cordones testiculares y en estrecha relación también se encuentran las células de Sertoli, las cuales expresan al factor de transcripción SOX9 (Figuras 30 R-S). Con esta morfología testicular eclosionan las crías.

Por lo tanto, durante la morfogénesis gonadal observamos un claro dimorfismo sexual tanto en la ultraestructura y así como en la expresión molecular del factor de transcripción SOX9, que depende de la temperatura a la que se incubó el embrión, ya sea una temperatura feminizante de 30°C o una temperatura masculinizante de 33°C. Además, logramos describir la morfología del desarrollo gonadal hacia un ovario o testículo desde el estadio 15 al 28. A continuación describiremos una parte sumamente importante dentro de la morfogénesis gonadal que es la caracterización de las células germinales.

### **5.2.6 Histología de las células germinales en la gónada y la expresión de la RNA helicasa VASA**

Las células germinales son las que darán origen a los ovocitos y a las espermatogonias, estas se caracterizan morfológicamente porque tienen un núcleo grande y redondo. Se observaron a los 18 días en el estadio 16, en el caso de las gónadas de embriones incubados a 30°C, como células de gran tamaño en la región medular proliferando (Figura 31 A-B). Por otro lado, en la gónada incubada a 33°C se observan células germinales cerca de la corteza y en la corteza (Figura 32 A-B)





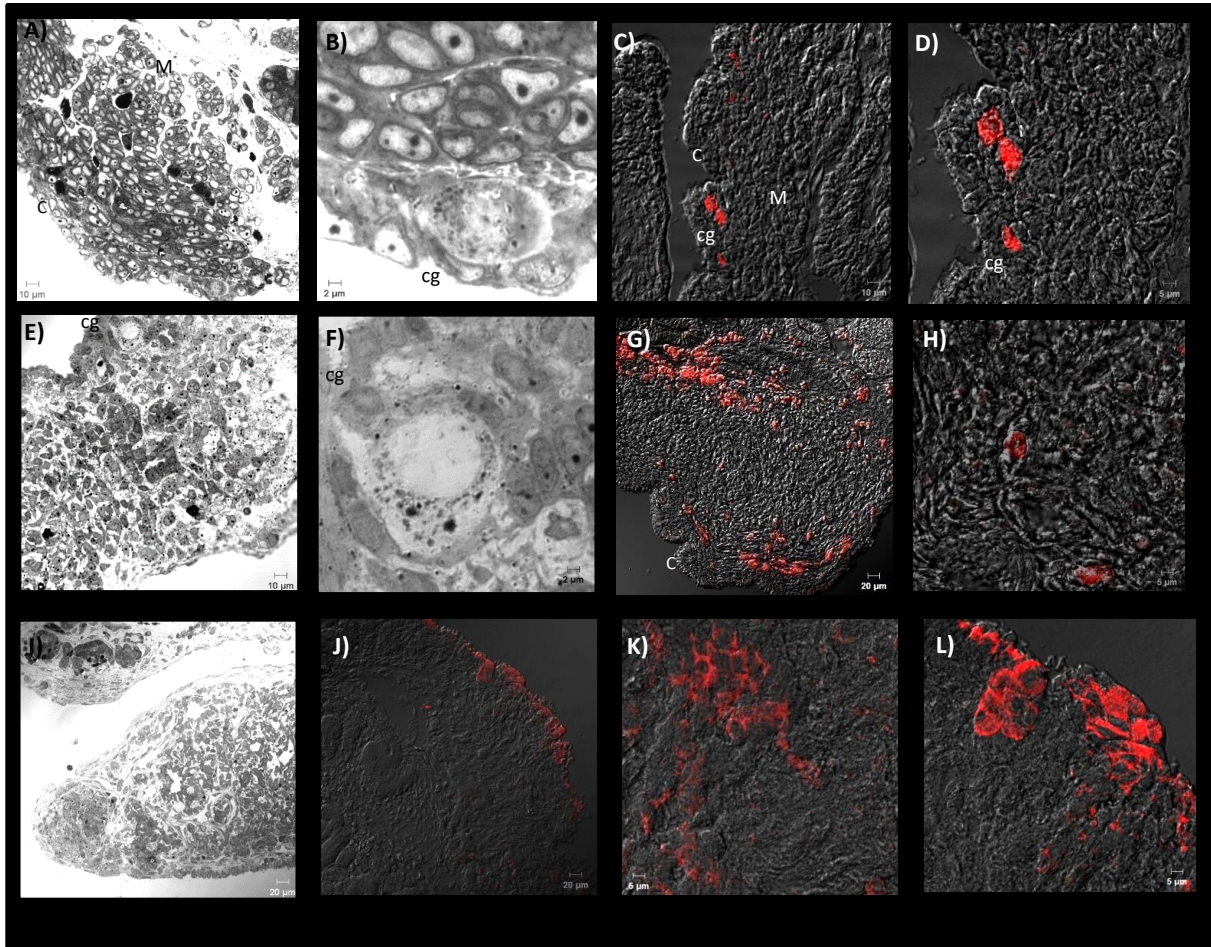
**Figura 31. Morfogénesis gonadal y la expresión de la proteína VASA de embriones de *C. moreletii* incubados a temperatura de 30°C.** De A-D) gónada de embriones incubados a 30°C a los 18 días (estadio 16). A) Corte transversal del blastema gonadal (bg), corteza (C) Médula (M). En B) células germinales en división \* en la región medular. En C-D) inmunofluorescencia para el factor de transcripción VASA y la ubicación de células germinales \* en la región medular (M). De E-H) gónada indiferenciada a los 35 días (estadio 22) resaltando una célula germinal en F). De G-H) inmunofluorescencia para el factor de transcripción VASA que marca células germinales embebidas en la corteza. De I-L) ovario a los 75 días (estadio 27) con células germinales en la corteza ovárica y positivas a VASA en K-L).

Una vez que observamos que estas células tenían la morfología de células germinales, decidimos caracterizar la expresión de la RNA helicasa VASA, codificada por su gen altamente conservado en la evolución de los vertebrados y se sabe que la proteína se expresa en el citoplasma de este tipo celular, por lo que se usa como un marcador de la presencia de

las mismas. La expresión de la proteína VASA la observamos en la región medular a una temperatura feminizante de 30°C, en un grupo de células que se ubican de manera similar a las células en proliferación, observadas en cortes finos (Figura 31 A-D). En el caso de gónadas de embriones incubados a 33°C se observó la expresión de VASA en el citoplasma de células ubicadas en la corteza (Figura 32 C-D).

A los 35 días (estadio 22-23) la corteza de la gónada se encuentra con forma de pliegues e incluida en ella, se observan células germinales con un núcleo redondo y de gran tamaño, en ambas temperaturas (Figura 31 E-F y Figura 32 E-F). La expresión de la proteína VASA se encontró en células germinales ubicadas en la corteza, en ambas temperaturas. Sin embargo; en la temperatura de 33°C se observa que estas cambian su forma redonda y de gran tamaño característico, por una forma alargada, lo que sugiere que posiblemente podrían estar migrando y reorganizándose para introducirse a los futuros cordones testiculares (Figura 32 G-H). En el caso de la temperatura de 30°C, las células germinales se observan en la corteza como si estuvieran quiescentes (Figura 31 G-H).

A los 45 días (estadio 24) en la gónada del embrión incubado a temperatura masculinizante de 33°C, se observa el inicio de la morfogénesis testicular, en la cual las células germinales tienen una morfología redonda y están agrupadas en forma de racimos dentro de los cordones testiculares (32 I-L). La expresión de la proteína VASA se detectó precisamente en grupos de células dentro de los cordones testiculares (Figura 32 J-L). A los 75 días a 30°C en el estadio 27, ya se observa el final de la diferenciación del ovario, donde hay un engrosamiento de la corteza donde están incluidas las células germinales (31 I-J). La expresión de la proteína VASA se detectó en grupos de células de gran tamaño embebidas en la corteza (Figura 31 J-L). Por lo tanto logramos caracterizar este tipo celular durante la morfogénesis gonadal, lo cual es interesante pues se desconocen muchos aspectos sobre la línea germinal en cocodrilos.



**Figura 32. Morfogénesis gonadal y la expresión de la proteína VASA de embriones de *C. moreletii* incubados a temperatura de 33°C.** De A-D a los 18 días (estadio 17). A) Blastema gonadal (bg). En B) célula germinal (cg) embebida en la corteza. En C-D) inmunofluorescencia para el factor de transcripción VASA y la ubicación de las células germinales (cg) en la corteza de la gónada. De E-H) gónada indiferenciada a los 35 días (estadio 23) resaltando células germinales en F y positivas para VASA en G y H). De I-L) testículo en diferenciación a los 45 días (estadio 24). De J-L) inmunofluorescencia para el factor de transcripción VASA que marca células germinales dentro de los cordones testiculares.

## 5.2.7 PARTE 2 Discusión

### 5.2.7.1 La temperatura de incubación y la determinación sexual por temperatura

El tema de la determinación sexual por temperatura es uno de los mecanismos biológicos más apasionantes e intrigantes que se ha estudiado en los seres vivos. Desde que Charnier lo describió para la lagartija *Agama agama* (Charnier 1966), se han realizado un gran número de investigaciones y esfuerzos para poder comprender como es que la temperatura determina sexualmente a un individuo. Conforme han avanzado los esfuerzos por entender este mecanismo, se ha hecho más difícil de integrar la información, es por ello que se necesita ver desde una perspectiva de la “ecología evolutiva del desarrollo” (Matsumoto *et al.* 2012; Landry *et al.* 2014).

Pero ¿cómo es que la temperatura de incubación influye en la determinación sexual de un individuo? Pues es un sistema complejo, ya que están involucrados dos factores, uno la temperatura que es un factor abiótico que fluctúa constantemente y el otro es la plasticidad en el desarrollo embrionario, específicamente en la gónada bipotencial, en donde el mismo genoma de un individuo, tiene la capacidad de generar dos fenotipos: ovario o testículo. Esta capacidad está dada por muchos factores que denominamos jerarquía de plasticidades, que es la suma de las distintas plasticidades que están involucradas para producir un fenotipo (plasticidad genómica, epigenética, proteómica, hormonal, fisiológica, etc.) (Matsumoto *et al.* 2012; Landry *et al.* 2014). En este sentido parece ser que la gónada del embrión responde a la temperatura de una manera muy interesante, pues este estímulo puede ser visto como una perturbación constante o un proceso estocástico constante, que estimula la expresión de genes como *Dmtr1* y *Sox9*, dependiendo de la sensibilidad dada por la jerarquía de plasticidades (Landry *et al.* 2014; Ge *et al.* 2017). Es decir, que tan constante es esta perturbación sensibilizará el contexto celular de la gónada (mediante las distintas plasticidades) llevando a la expresión de una red genética, o sea, que mediante la suma de probabilidades se facilita y sensibiliza la expresión de genes (“atractores”). Este proceso se conoce como estabilización genética. De tal manera, las perturbaciones constantes de la temperatura feminizante o masculinizante, como las condiciones brindadas bajo una incubación constante como en un laboratorio, facilitan y sensibilizan la determinación sexual hacia un sexo (Landry *et al.* 2014).

Nosotros incubamos bajo condiciones controladas 220 huevos de *C. moreletii* y encontramos que la temperatura feminizante fue de 30°C y la masculinizante de 33°C, los datalogger mostraron siempre que estas temperaturas permanecieron constantes, y lo interesante de

esto es que los huevos que fueron incubados en esa temperatura obtuvimos un 100% de hembras (30°C) y un 100% de machos (33°C). Muy posiblemente por un efecto como el que se mencionó en el párrafo anterior.

En *C. moreletii* este patrón de determinación sexual dependiente de temperatura es similar al observado en *Alligator mississippiensis*, donde la temperaturas feminizante y masculinizante son las mismas. Sin embargo, para descartar un patrón bimodal de DST, como el que existe en *Alligator mississippiensis* y *Crocodylus johnstoni*, donde se obtienen hembras a bajas y altas temperaturas y machos a temperaturas intermedias, tendríamos que realizar incubaciones por arriba de 33°C (Ferguson *et al.* 1982; Piña *et al.* 2003 y 2007).

Otra pregunta importante para aclarar de cómo la temperatura estimula la red genética masculinizante o feminizante, es qué gen enciende todo el mecanismo. En mamíferos se sabe que es el gen *Sry*, pero en reptiles no se ha encontrado a este gen (Spotila *et al.* 1994). Sin embargo, en un estudio realizado recientemente en la toruga *Trachemys scripta*, se encontró que el gen que está involucrado en este proceso es *Dmtr1* y se propone un mecanismo epigenético que regula la expresión de este gen (Ge *et al.* 2017 y 2018). En este estudio el gen *Dmtr1* se expresa en los núcleos de las células de Sertoli junto con el gen *Sox9*. Nosotros encontramos que la expresión del factor de transcripción SOX9 es dimórfica a partir del estadio 16 del desarrollo embrionario. En cocodrilos se propone que el gen *Sox9* puede ser regulado durante el periodo sensible a la temperatura y determinar sexualmente al embrión, mediante un canal iónico TRPV4 el cual censa la temperatura y del cual se ha encontrado su expresión en la gónada de embriones de *A. mississippiensis* incubados a una temperatura masculinizante (Yatsu *et al.* 2015). También nosotros encontramos la expresión de este canal iónico en ovarios y testículos de *C. moreletii* jóvenes de 5 años de edad (Ver PARTE 3 de resultados).

Los dos mecanismos que se proponen para la regulación del gen maestro *Sox9* que dirige la morfogénesis de un testículo, resultan interesantes. Además, muy posiblemente ambos mecanismos ocurren, pues hay que recordar que existen distintos patrones de determinación sexual por temperatura, en los cuales dos o más temperaturas diferentes pueden dar como resultado el mismo sexo (Ferguson 1982; Bull 1980 y 1985; Shoemaker *et al.* 2010; Inamdar *et al.* 2012). Esto nos habla de la gran plasticidad que tiene la gónada bipotencial para responder a la temperatura y poder determinarse sexualmente. Esta plasticidad estaría dada por las distintas formas que tienen para censar la temperatura (TRPV4 u otro mecanismo) y encender al gen *Sox9* (*Dmtr1* u otro mecanismo), es decir la sensibilidad para facilitar el desarrollo de un ovario o testículo, está mediada por componentes de señalización celular

que desencadenan diferentes mecanismos que pueden dar como resultado el mismo sexo y evolutivamente dio como resultado los distintos patrones de determinación sexual por temperatura, que en el caso del cocodrilo es el tipo II distinto a las tortugas que tienen el tipo 1a y el tipo 1b (Yatsu *et al.* 2015; Ge *et al.* 2017; Shoemaker *et al.* 2010).

Finalmente, es importante mencionar que las especies que se determinan sexualmente por temperatura, pueden verse afectadas por perturbaciones ambientales tales como: el cambio climático o contaminación ambiental y afectar los mecanismos de DST. Obteniendo ovarios poliquísticos u ovotestículos, debido a que en todos estos procesos está involucrada la gran plasticidad del desarrollo embrionario (Botello 1999; Canesini *et al.* 2018). Por lo tanto, el haber encontrado que de los huevos incubados a 30°C se obtienen hembras, para nosotros es un resultado muy importante, pues nos indica que los embriones son capaces de responder a la temperatura feminizante y masculinizante, por lo que probablemente el que nazcan más machos en la Laguna de las Ilusiones, en Tabasco Villa Hermosa, es un problema de contaminación ambiental, ya que muchos contaminantes pueden actuar como disruptores hormonales y afectar directamente la morfogénesis gonadal (Salame-Méndez *et al.* 2008; Córdova-Carrillo *et al.* 2010; Gonzalez *et al.* 2012; López-Luna *et al.* 2015).

En Tabasco los agroquímicos contaminan la Laguna de las Ilusiones, pues son transportados a través de la lluvia y se conoce que algunos como los bifenilos policlorados (PBC) pueden tener un efecto androgenizante, por lo que será necesario hacer un estudio sobre este posible problema que afecta directamente a esta población, pues los sitios en los cuales se colectaron los nidos se ha reportado la presencia de contaminantes con agroquímicos debido a las malas prácticas agrícolas (Córdova-Carrillo *et al.* 2010; Gonzalez *et al.* 2012; López-Luna *et al.* 2015).

Otros aspectos de la influencia de la temperatura sobre el desarrollo del embrión ha sido estudiada en *Alligator mississippiensis* (Deeming *et al.* 1989; Smith *et al.* 1993). En el caso de *C. moreletii*, se encontró que la gónada del embrión incubado a una temperatura de 33°C se desarrolla más rápido en días con respecto a la incubada a 30°C, de igual forma como ocurre en el desarrollo de los embriones. El inicio del desarrollo morfológico de la gónada es en el estadio 23 (41 días a 33°C) y el testículo se desarrolla más rápido que el ovario, este último comienza su diferenciación en el estadio 23 pero con más días de desarrollo. Se sabe que la temperatura de incubación regula varios aspectos del desarrollo, tales como en el periodo de incubación, el cual dura más a una baja temperatura. La masa es otro factor que se ve afectado, ya que en el caso de *A. mississippiensis* al eclosionar los machos son más grandes que las hembras, de manera similar en *C. moreletii* son un poco más grandes los machos.

Otro es el patrón de la pigmentación, que en nuestro caso las franjas de los cocodrilos incubados a temperatura feminizante son más claras, que las de los embriones incubados a temperatura masculinizante (Figura 22). Este efecto también ya ha sido observado en *A. mississippiensis* (Deeming *et al.* 1989a).

### **5.2.7.2 Periodos indeterminado, sensible a la temperatura y de diferenciación sexual gonadal**

Encontramos que en *C. moreletii* el periodo indeterminado de la morfogénesis gonadal abarca desde el estadio 15 hasta el 22, pues la gónada está indiferenciada. Sin embargo, el periodo sensible a la temperatura en la temperatura masculinizante, ocurre desde el estadio 18 del desarrollo embrionario hasta el estadio 22. En la temperatura feminizante ocurre desde el estadio 21 hasta el estadio 23. En este periodo de desarrollo resulta interesante porque el momento donde existe mayor plasticidad y sensibilidad, junto con el periodo indeterminado.

En el periodo sensible a la temperatura el embrión es capaz de responder a los cambios de temperatura, lo que refleja que puede cambiar su destino, es decir a pesar de que ya existe un dimorfismo sexual desde el estadio 16, mientras el embrión no llegue al estadio 22, puede modificar su sexo. Parece ser que el límite del periodo sensible a la temperatura está dado por este estadio, como ya se indicó durante el estadio 21 los cordones medulares se fragmentan y desaparecen, además existen en su lugar un componente de células mesénquimales y en el estadio 22 estas células comienzan a reagruparse nuevamente. Esto quiere decir que en el estadio 22 las células pierden su plasticidad y ya se comprometen dirigiendo el desarrollo hacia la morfogénesis de un ovario o de un testículo, pues a partir del estadio 23 ocurre el inicio de la diferenciación morfológica (Smith *et al.* 1993; Landry *et al.* 2014).

Se sabe que el periodo sensible a la temperatura está regulado por la proteína Cirbp, que se expresa temprano en el desarrollo gonadal en la tortuga *Chelydra serpentina* y su expresión influye en la determinación sexual de embriones, pero lo más importante de esta proteína es que una sola mutación en este gen, es suficiente para eliminar la sensibilidad a la temperatura. Por lo tanto, este factor epigenético puede jugar un papel importante para regular la plasticidad y sensibilidad durante el periodo sensible a la temperatura. Por lo que resultaría muy interesante ver su expresión durante la morfogénesis gonadal de *C. moreletii*. De tal manera posiblemente la plasticidad epigenética durante el periodo sensible a la temperatura puede

ser un factor clave para entender los distintos patrones de DST (Bull 1985; Landry *et al.* 2014; Georges *et al.* 2018).

Por último, como se mencionó anteriormente el periodo de diferenciación gonadal ocurriría a partir del estadio 22 pues disminuye la plasticidad en el desarrollo y los componentes de la gónada ya se comprometieron a diferenciarse en un ovario o un testículo y muy posiblemente la pérdida de esta plasticidad tenga que ver con la disminución de Cirbp (Georges *et al.* 2018).

Para determinar el periodo sensible a la temperatura de *C. moreletii* realizamos experimentos de intercambios de temperaturas de incubación, nuestros resultados muestran que en una temperatura masculinizante posiblemente el periodo sensible a la temperatura sea del estadio 18 al 22 del desarrollo embrionario. Y para una temperatura feminizante del estadio 20 al 22 del desarrollo embrionario. Sin embargo el tamaño de la muestra que obtuvimos es muy pequeño, debido a que los huevos que se nos permitió coleccionar tuvieron que ser repartidos para varios experimentos, por lo mismo se necesita incrementar su tamaño en futuras investigaciones.

En *Alligator mississippiensis* se han descrito dos PST, que según Ferguson va de los 14 a los 21 días de incubación (estadios 13-16) en temperatura masculinizante 33°C, de 28 a 35 días de incubación (estadios 13 -19) para temperatura feminizante 30°C (Ferguson 1982). El otro es propuesto por Lang y Andrews (1994) quienes mencionan que este ocurre durante los estadios 21 al 24 en *A. mississippiensis* (Smith *et al.* 1993). Recientemente el grupo de McCoy *et al.* (2015), propone para *A. mississippiensis* que antes del estadio 19, si el embrión recibe un estímulo de temperatura denominado “pulso”; por ejemplo, pulsos de temperatura feminizante, puede verse afectada la proporción de sexos (machos) de embriones incubados a una temperatura masculinizante. Esperamos que nuestros resultados puedan contribuir a establecer el PST en cocodrilos pues concuerdan con los descritos por Lang y Andrews (1994).

Tal vez la variación en todos estos resultados del PST tenga que ver con lo que se comentó en la subtitulo anterior, pues durante periodo sensible a la temperatura existe una gran plasticidad, la cual puede ser distinta entre especies generando los distintos patrones de DST y a su vez la proporción de sexos se ve afectada por los “pulsos” de temperatura, posiblemente tiene que ver con eventos de estabilización genética ante una perturbación constante (Waddington 1940; West-Eberhard 2003, 2005; Landry *et al.* 2014; McCoy *et al.* 2015)



### 5.2.7.3 Histología del desarrollo gonadal

Ya se ha descrito el desarrollo morfológico de la gónada en cocodrilos (*A. mississippiensis*). El primer trabajo al respecto fue realizado por Forbes en 1940, pero esta descripción morfológica la realizó antes de que se descubriera la DST. Posteriormente Deeming y Ferguson (1989), realizaron estudios sobre la morfogenésis gonadal y establecieron que la diferenciación testicular se llevaba a cabo en los días 24-34 y del ovario a los 41-45 días en *A. mississippiensis* (Ferguson 1985). En el estudio de Smith *et al.* (1993), encontraron que las etapas de inicio de la diferenciación ocurre a los 33 días en machos y a los 39 días en hembras de *A. mississippiensis* (Smith *et al.* 1993). Nosotros encontramos en *C. moreletii* que a los 45 días (estadio 24) ya se distingue morfológicamente un testículo de un ovario en desarrollo.

En cuanto a la diferenciación de las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante, se observaron células morfológicamente alargadas que expresan al gen *Sox9* en su núcleo y las que comienzan a rodear a las células germinales (45-53 días), durante el proceso de diferenciación de los cordones testiculares. Smith *et al.* (1993) describieron un tipo celular similar y lo denominaron de pre-sertoli, en este estudio ellos concluyeron que eran un factor fundamental para el desarrollo del testículo (Smith *et al.* 1993). Nosotros también observamos estas células y además expresan al factor de transcripción SOX9 en su núcleo, lo cual demuestra que son células de Sertoli, las cuales son fundamentales para el proceso de diferenciación y morfogénesis testicular en vertebrados. Particularmente, en reptiles se sabe que el establecimiento de las células de Sertoli está regulado fundamentalmente por SOX9 (Moreno-Mendoza *et al.* 2001). Por otra parte, resulta interesante que a pesar de que no se observa diferenciación morfológica entre las gónadas incubadas a 30°C y 33°C durante las primeras etapas de desarrollo, ya existe un diformismo sexual a nivel molecular, pues SOX9 en las primeras etapas de desarrollo a los 14 días se expresa en ambas temperaturas 30°C y 33°C, pero en temperatura feminizante de 30°C se regula negativamente su expresión a los 35 días y en la temperatura masculinizante se incrementa su expresión y este patrón dimórfico se mantiene hasta el final de la diferenciación y morfogénesis del testículo (58 días) y del ovario (75 días).

El grupo de Western y col. (1990) realizó un trabajo sobre la expresión del gen *Sox9* en *A. mississippiensis* empleando las técnicas de RT-PCR e hibridación *in situ*. Ellos investigaron los estadios 21-24 (31 días -50 días) para temperatura masculinizante y los estadios 20-23 (29 a 35 días) para la temperatura feminizante. También, encontraron una expresión positiva

de Sox9 durante estos estadios en la temperatura masculinizante. En cambio con la temperatura feminizante, encontraron una expresión basal con la técnica de RT-PCR, pero no se observó mensajero con la hibridación *in situ* (Western *et al.* 1999). Lo cual concuerda con nuestros resultados aunque nosotros analizamos la expresión de Sox9 a nivel proteína.

Finalmente, nosotros observamos con microscopia de campo claro en la morfología de la gónada células de gran tamaño y con un núcleo prominente; durante la etapa indiferenciada, de diferenciación testicular y en el ovario diferenciado. Por sus características morfológicas estas células sugieren ser células germinales (Merchant-Larios *et al.* 1989). Al realizar la inmunofluorescencia y corroborar que expresaban la proteína VASA que es característico de las células de la línea germinal, refuerza que se trata de células germinales aunque esperamos poder caracterizar a mayor profundidad este tipo celular en el futuro (Yajima *et al.* 2014).

Vasa es un gen altamente conservado en la evolución de los vertebrados e invertebrados y en *M. musculus* se sabe que está relacionado con procesos como la fertilidad, en la espermatogenesis a través de la regulación de micro RNA's. También interactúa con la proteína RanBPM y se cree que está involucrado en el reclutamiento de Ran-GTP a los microtúbulos lo cual sugiere una posible relación funcional con los microtúbulos durante la meiosis (Yajima *et al.* 2014). Además se expresa en ovocitos de *Xenopus leavis* y en ovogonias de vertebrados (Baat *et al.* 1999).

#### **5.2.7.4 Importancia de la correlación del estadio de desarrollo embrionario con el desarrollo gonadal**

En esta investigación hemos realizado una tabla de los distintos estadios de desarrollo de *C. moretii*, PARTE 1 de los resultados, basándonos en los estadios descritos por Ferguson 1985 para *A. mississippiensis*. Contamos a partir del estadio 7 en adelante con todos los estadios de desarrollo para ambas temperaturas, aunque mostramos únicamente algunos estadios de desarrollo temprano, pues no pudimos describir todos debido al poco material que colectamos, por lo que tenemos un embrión ya sea de una temperatura u otra. Esto fue debido a que la colecta de los huevos se limitó bastante, pues es una especie bajo protección especial NOM-059-SEMARNAT-2010, por ello solamente nos permitieron tomar 15 huevos por nido en peligro de depredación, en estos años de trabajo 2014-2018 hemos utilizado 220 huevos de un total de 11 nidos colectado bajo esta restricción. Además, algunos huevos estaban en mal estado debido a la colecta de nidos en malas condiciones.

También describimos con una parte de esos embriones la determinación sexual y el efecto de la temperatura sobre la morfogénesis gonadal estableciendo las etapas de gónada indiferenciada, el periodo sensible a la temperatura y de diferenciación; así como la expresión de los genes *Sox9* y *Vasa*, lo cual fue desarrollado en esta sección de resultados (PARTE 2).

La importancia de realizar una tabla de desarrollo embrionario y correlacionarla con el desarrollo gonadal, radica en que de esta forma se puede apoyar a los proyectos para la conservación de esta especie de cocodrilo, pues si se requiere rescatar nidos en peligro, se puede realizar un pequeño muestreo para conocer la etapa de desarrollo embrionario y saber si aún los embriones de ese nido están en alguna etapa donde se conserva la plasticidad en la gónada y de tal forma si se incuban a una temperatura feminizante se podrían obtener hembras, que es el sexo que hace falta introducir en la Laguna de las Ilusiones, debido al sesgo de la población hacia machos. De esta forma, se puede contribuir a que la población de esta especie continúe reproduciéndose, se auto regule y no se ponga nuevamente en peligro de extinción (Platt *et al.* 2000). De realizarse este tipo de rescate de nidos, se haría exclusivamente el sacrificio de un embrión por nido, que se desee rescatar, porque la mayoría de los embriones deben de estar en ese estadio de desarrollo embrionario.

## 5.2.8 PARTE 2 Conclusiones

Nosotros encontramos que la temperatura feminizante en *C. moreletii* es 30°C y la masculinizante es 33°C. A los 45 días (estadio 24) ya se pueden observar diferencias histológicas entre la gónada de embriones incubados a temperatura feminizante y masculinizante; ya que la diferenciación testicular inicia a los 41 días (estadio 23) y la ovárica a los 54 días (estadio 24) días post-ovoposición. Además existe una expresión dimórfica de la proteína SOX9 detectada de manera más evidente a los 18 días post- ovoposición (estadio 16). Finalmente se detectaron células germinales en ambas temperaturas, evidenciadas morfológicamente y por la expresión de la proteína VASA.

Hasta esta parte de los resultados hemos trabajado con embriones de cocodrilo y realizado la caracterización del efecto de la temperatura sobre el mecanismo de determinación sexual gonadal. Pero una parte fundamental al estudiar la reproducción de una especie, es conocer la morfología de los ovarios y testículos de cocodrilos jóvenes, porque nos ayuda a realizar comparaciones en la morfogénesis de estos órganos en el desarrollo embrionario y a lo largo de la vida de estos animales. Además la expresión de genes como el de *Sox9* y *Vasa* que encontramos en embriones, puede ser validada en los organismos adultos que es

fundamental para la morfogénesis en el desarrollo de un testículo y cuando el organismo es adulto, para mantener un ambiente masculinizante. Es por ello que realizamos la caracterización a nivel celular y molecular de los testículos y ovarios de *C. moreletii* en etapas jóvenes, que se describe a continuación en la PARTE 3 de los resultados.

### **5.3. PARTE 3. Expresión de los genes *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa* y *TRPV4* en ovarios y testículos del cocodrilo de pantano, *Crocodylus moreletii***

Resumen. Los testículos y ovarios de cocodrilos fueron descritos por Sloane (1725) en *Alligator mississippiensis* y por Dutta (1949) en *Crocodylus palustris*, respectivamente, desde entonces se han llevado a cabo muy pocos estudios morfológicos sobre los mismos. La especie de cocodrilo más estudiada es *A. mississippiensis*, donde se han descrito histológicamente los testículos y ovarios de embriones en desarrollo, de organismos eclosionados de 2 meses de edad y en adultos. Sin embargo, no existe ningún estudio realizado en organismos jóvenes, así como de la expresión de genes involucrados en el mantenimiento y diferenciación de distintos linajes celulares de testículos y ovarios.

El gen *Sox9* es importante para la determinación sexual en diversos vertebrados, así como para el mantenimiento de la morfología y fertilidad del testículo durante la vida adulta. Otro gen estudiado debido a su importante participación en el mantenimiento del linaje germinal es *Vasa*, el cual se encuentra altamente conservado en la evolución y se expresa en todos los animales. En el caso particular de los cocodrilos se ha estudiado exclusivamente la expresión de *Sox9* durante la morfogénesis gonadal y en testículos de crías de tres meses de edad de *Alligator mississippiensis*, por lo que resulta de interés realizar estudios en otras especies de cocodrilos y durante su juventud. Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar a nivel celular y molecular los testículos y ovarios de *C. moreletii* en etapas jóvenes, cumpliendo de esta manera el quinto objetivo de esta tesis doctoral. Cabe mencionar que este trabajo fue publicado en la revista *Journal Experimental Zoology* parte B, y esta es la cita: Martínez-Juárez A, López-Luna MA, Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*. 2018; 1–17. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22799>. Además este artículo fue presentado como el requisito para la titulación del programa de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM y se Anexa.

A grandes rasgos, empleamos las técnicas de inmunofluorescencia, Western blot y de RT-PCR con las que se caracterizó la expresión de los genes: *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, y *TRPV4*. Como se esperaba, se encontró la expresión de *Sox9* en machos, sorprendentemente también se encontró en hembras. Por primera vez se reporta la expresión del gen *Vasa* (un marcador de células germinales) en espermatogonias, ovogonias y ovocitos de cocodrilos inmaduros sexualmente de 5 años de edad. El gen *Foxl2* es importante para el desarrollo y

mantenimiento del ovario durante la vida adulta, como en otros vertebrados, se encontró su expresión únicamente en hembras, este último fue verificado por RT-PCR e inmunohistoquímica. Aún no se conoce cómo se regula el gen *Sox9* río arriba en reptiles, por lo que se evaluó la expresión del canal iónico TRPV4, ya que en tipos celulares como los condrocitos puede regular la translocación al núcleo de este factor de transcripción. Finalmente, el canal iónico TRPV4 se expresó en la membrana y citoplasma de las células de Sertoli y de células foliculares. Como estos resultados están publicados en un artículo se resumirán y se hablará de algunos detalles extra (Artículo publicado ver Anexos).

### **5.3.1 Estancia en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco**

Nosotros colaboramos con el Maestro en Ciencias Marco Antonio López Luna, quien labora en la Universidad Autónoma Juárez de Tabasco, como profesor investigador de tiempo completo. Por lo mismo, realizamos una visita a las instalaciones de esta universidad en Villa Hermosa, Tabasco; para poder realizar nuestra investigación sobre la biología reproductiva de cocodrilos jóvenes, pues forma parte de un programa para la conservación de esta especie (Figura 33 A-D).

De tal forma, los organismos que empleamos para esta investigación fueron donados como parte de este programa y obtenidos del Centro de Investigación para la conservación de Especies Amenazadas, que tiene una extensión de 2 hectáreas y cuenta con una población con más de 1000 cocodrilos, en su mayoría crías. Está localizado dentro de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Esta Unidad de Manejo Ambiental (UMA), es muy importante pues dentro de las instalaciones se realizan diversas investigaciones sobre la ecología, anidación y conducta de las 3 especies de cocodrilos que existen en México: el cocodrilo de pantano *C. moreletii*, el cocodrilo americano *C. acutus* y el caimán de anteojos *Caiman cocrodilus*, como se mencionó anteriormente, la finalidad es la conservación de las mismas. También se monitorea el nacimiento y cuidado de las crías hasta su edad adulta (Figura 33).



**Figura 33. UMA del Centro de Investigaciones para la Conservación de Especies Amenazadas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.** A) Se muestra la entrada al centro de investigaciones en el cual se aprecian las figuras de las 24 especies de cocodrilos que existen en el mundo. B) Las instalaciones y laboratorios. C-D) El hábitat de los cocodrilos.

Durante esta breve estancia realizada en mayo de 2016 en la época de reproducción del cocodrilo de pantano, se nos brindó un recorrido por el hábitat de los mismos y se pudieron observar a hembras preparándose para la época de anidación, la cual ocurre a finales de mayo y principios de junio. Lo anterior lo hacen seleccionando un lugar (el cual puede ser el mismo que eligieron en años anteriores). Así mismo, inician el proceso de juntar hojarasca y hierbas las cuales son masticadas y regurgitadas, de tal forma que quedan “entrelazadas” y estas a su vez son mezcladas con montículos de tierra y finalmente orinan el sitio donde ellas anidarán (Figura 34). El cortejo sucede entre gruñidos y golpeteos en el agua, lo cual culmina con el coito, la reproducción y la ovoposición de los huevos en el nido. También observamos diversos ejemplares de crías y adultos en todas las instalaciones. Después de que realizamos el recorrido y conocimos más detalles sobre el comportamiento de estos organismos durante su época de reproducción, se procedió al sacrificio de los cocodrilos

jóvenes de 5 años de edad y a las cirugías para lo obtención de las muestras, como se menciona a continuación (Figura 35).



**Figura 34. Los cocodrilos que habitan en la UMA.** En A) se muestra una hembra sumergida protegiendo el sitio donde anidará (círculo rojo). En B se muestra la preparación del nido (flecha roja). C-D) sitios donde anidan los cocodrilos.

### 5.3.2 Obtención de muestras de sangre, ovarios y testículos

De las crías en cautiverio se eligieron 5 cocodrilos jóvenes con 5 años de edad nacidos en agosto del 2011 (Figura 35). Antes de sacrificar a las 2 hembras y a los 3 machos, se obtuvieron 10 mL de sangre de la cabeza con ayuda de una jeringa, esto se realizó con la finalidad de obtener suero fisiológico el cual tenemos almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para ser utilizado en futuras investigaciones (Figura 35 B y C). También los cocodrilos fueron medidos del hocico a la punta de la cola y pesados (Tabla 8), las tallas entre las hembras y machos no variaron mucho; sin embargo, las hembras fueron ligeramente más grandes y pesadas que los machos  $\pm 2$  cm.



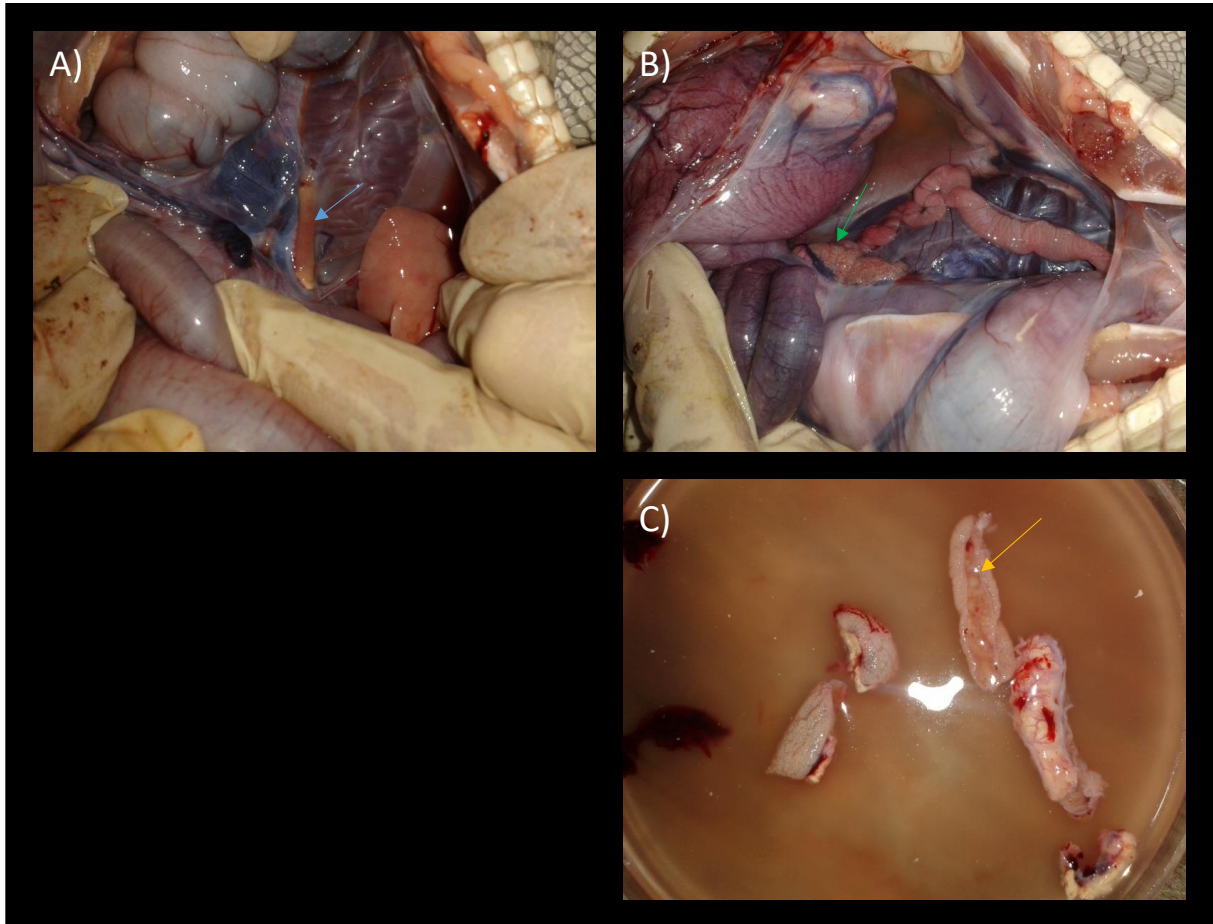
**Tabla 8. Longitud y peso de los cocodrilos *C. moreletii* jóvenes.**

Número de individuo	Longitud (cm)	Peso (Kg)
Hembra (1) #927	91.4	2.405
Hembra (2) #954	98.0	3.305
Macho (1) #905	80.9	1.769
Macho (2) #833	96	3.700
Macho (3) #779	75	1.045

Posteriormente, los cocodrilos fueron sacrificados con una sobredosis de lidocaína inyectada directamente al cerebro y se inició la cirugía de los mismos (Figura 35 B-D). Los testículos y ovarios fueron retirados quirúrgicamente (Figura 36 A-C) y procesados como se mencionó en material y métodos. A continuación, se describirá la morfología y la expresión de los genes *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa* y *TRPV4* en los mismos.



**Figura 35. Organismos donados por la UMA.** En A) el estanque donde se encuentran los cocodrilos jóvenes. En B) manejo del cocodrilo para el procesamiento experimental, específicamente antes de la obtención de la sangre. En C-D) la disección del cocodrilo después del sacrificio con una sobredosis de lidocaína.



**Figura 36. Disección de testículos y ovarios de *C. moreletii*.** En A) se muestra la ubicación de los testículos. En B) la ubicación de los ovarios. Ambos se señalan con una flecha. Finalmente C) muestra los ovarios de una hembra de 5 años de edad.

### 5.3.3 Histología del ovario de *Crocodylus moreletii* jóvenes de 5 años de edad

De los fragmentos de ovarios obtenidos de las cirugías anteriores, se procesaron para ser incluidos en la resina epoxica Embed 812 de acuerdo a lo que se menciona en material y métodos. A su vez se realizaron cortes semifinos  $1\mu\text{m}$  de espesor para observarlos en microscopia de campo claro y cortes finos  $60\text{nm}$  de espesor para observarlos en el microscopio electrónico. A continuación se describen los resultados obtenidos.

En los ovarios de las dos hembras de *C. moreletii* se reconocen dos áreas características: el estroma que se caracteriza por la presencia de lagunas (Figura 37 A) y la corteza ovárica (Figura 37 B). Además entre la corteza ovárica se pueden observar ovogonias agrupadas en nichos; así como folículos primarios (Figura 37 D y E), donde células somáticas foliculares rodean a las ovocitos y conforman un epitelio cúbico simple (Figura 37 E). La mayoría de los folículos en desarrollo son previtelogénicos en estadio I, II y III (Figura 37 B y C) según Uribe

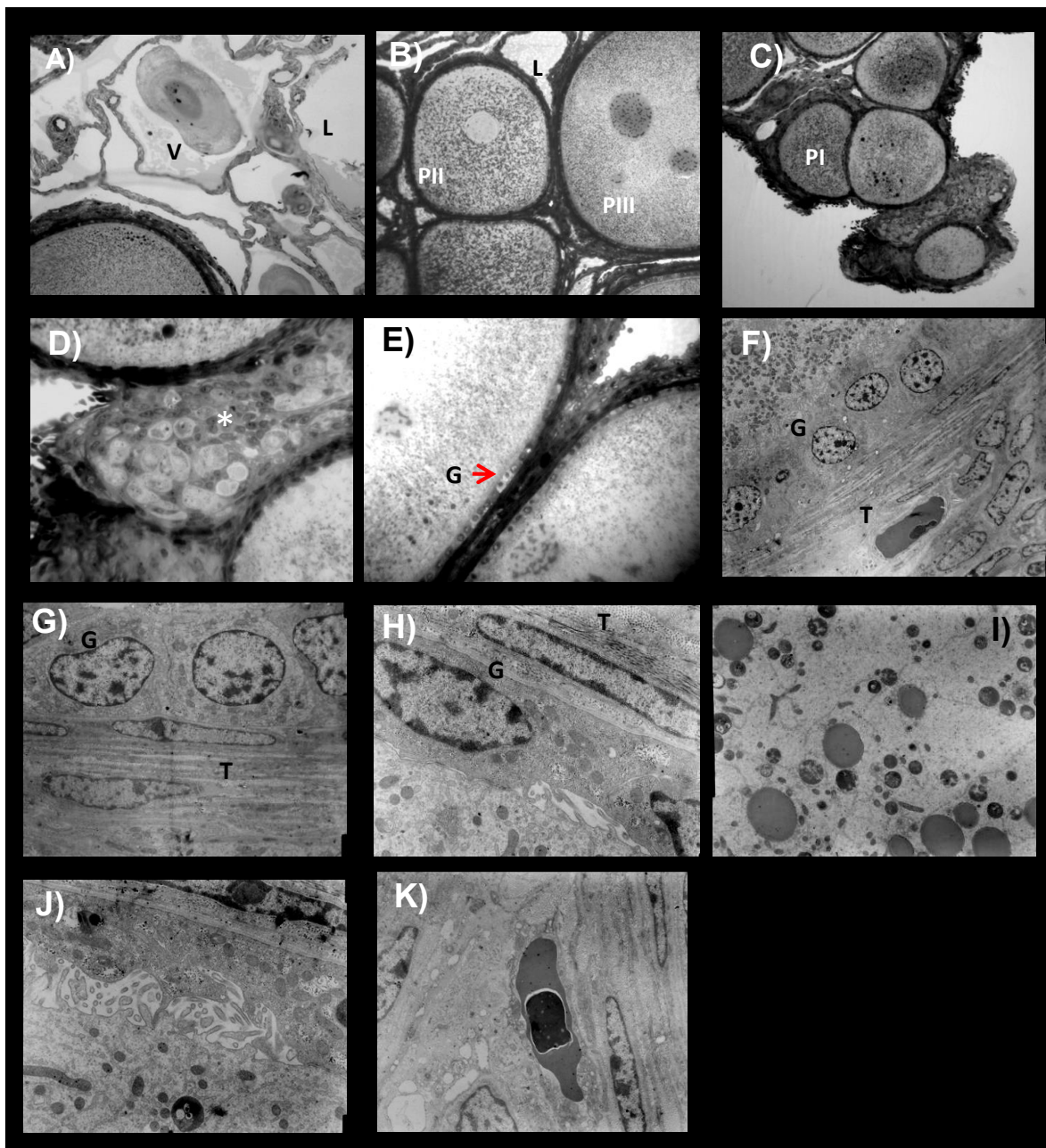
*et al.* (2000), que se caracterizan por el incremento del citoplasma en el ovocito, principalmente hay un aumento de organelos como el retículo endoplásmico, mitocondrias y ribosomas.

El epitelio folicular de los ovocitos en desarrollo se encuentra formado por una sola capa de células de la granulosa localizadas sobre una membrana basal (Figura 37 E-G). El tejido folicular se encuentra rodeado por células de la teca organizadas entre el tejido conjuntivo (Figura 37 F-H). Las células de la teca se organizan a su vez en células de la teca interna, rica en fibras de colágena (Figura 37 G) y la teca externa que está vascularizada (Figura 37H). También, se encontraron ovocitos en vitelogénesis pues en ellos se acumulan gránulos vitelinos en el citoplasma (Figura 37 I) y con prolongaciones citoplasmáticas (Figura 37 J). También se puede apreciar que es un tejido altamente irrigado por la presencia de vasos sanguíneos (Figura 37 K).

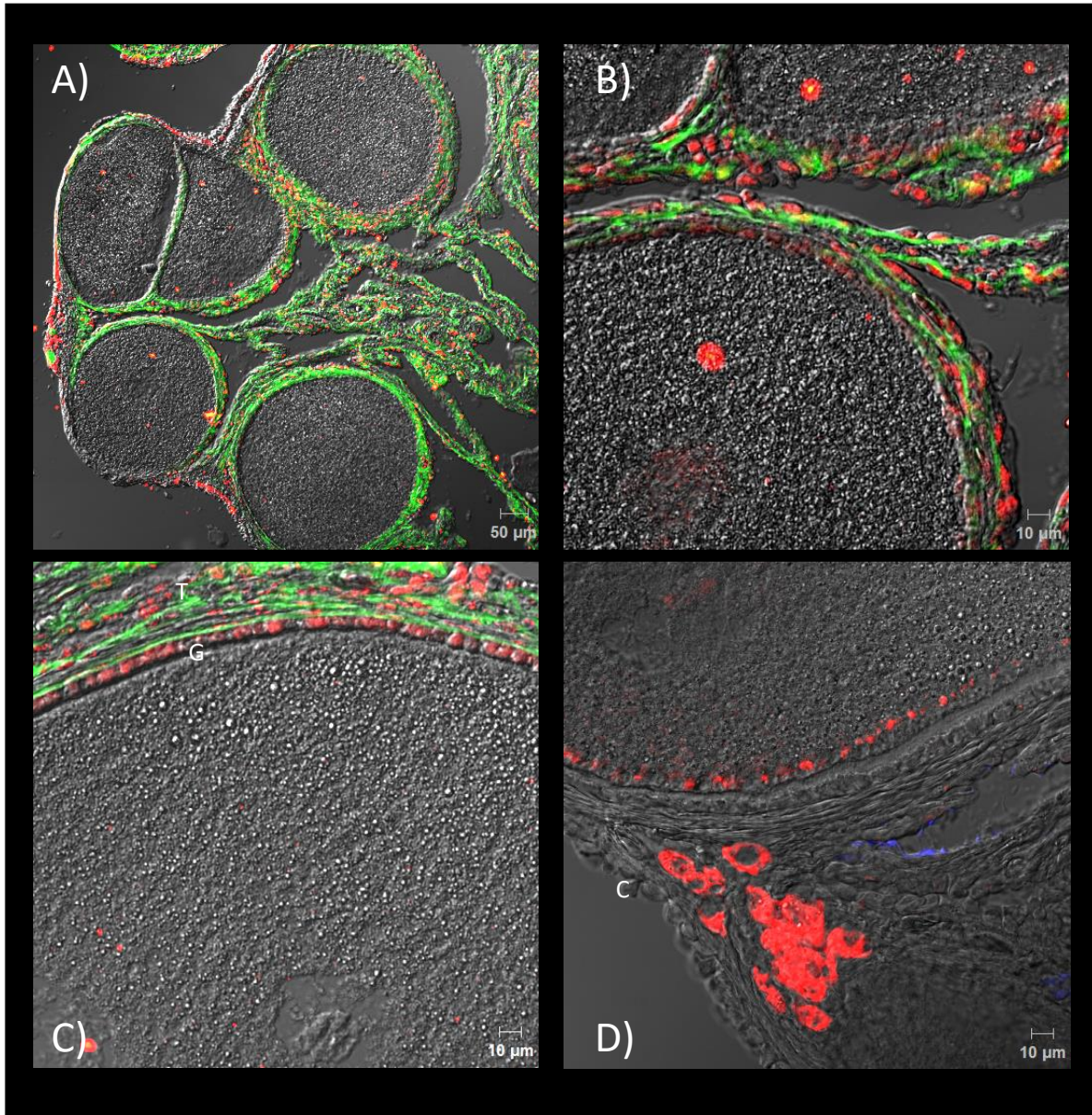
#### **5.3.4 Expresión de los factores de transcripción SOX9, FOXL2, VASA y TRPV4 en el ovario de *Crocodylus moreletii* joven de 5 años de edad**

De acuerdo con lo descrito en la metodología, realizamos una inmunofluorescencia en los ovarios de las dos hembras jóvenes para el factor de transcripción SOX9, la RNA helicasa VASA y el canal iónico TRPV4. Además una inmunohistoquímica para el factor de transcripción FOXL2. Sorprendentemente, encontramos la expresión de la proteína del factor de transcripción SOX9, en el núcleo de las células de la granulosa de ovocitos previtelogénicos (Figura 38 A-C en rojo), lo cual es interesante pues este factor de transcripción se expresa en los núcleos de las células de Sertoli de testículos. Las estructuras del ovario se delimitaron utilizando un anticuerpo contra Laminina, un marcador de matriz extracelular. Por otro lado, la expresión de VASA se encontró en el citoplasma del ovocito y en el de ovogonias que están formando nichos celulares (Figura 38 D).

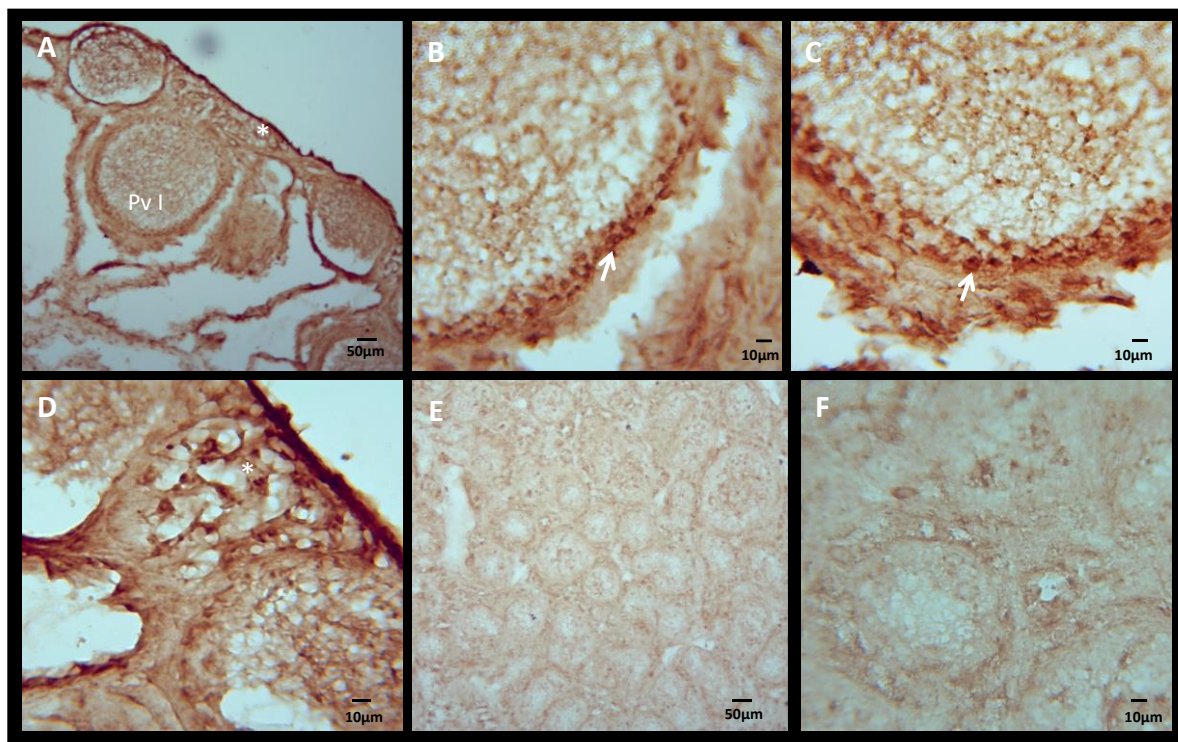
Para la detección de la proteína del factor de transcripción FOXL2 en el ovario se realizó una inmunohistoquímica, y se encontró su expresión en los núcleos de las células de la granulosa de ovocitos previtelogénicos y rodeando algunos nichos de ovogonias (Figuras 39 A-D). Como se esperaba no se encontró la expresión del factor de transcripción FOXL2 en el testículo de *C. moreletii* (Figura 39 E-F). La expresión de la proteína del canal iónico TRPV4 (Figuras 40 A-D), se encontró en la membrana de células foliculares (Figura 40 A-B) y en la membrana de células del estroma en el ovario (Figura 40 C-D).



**Figura 37. Corte transversal del ovario de hembras de *C. moreletii* con 5 años de edad.** A) Compartimento estromático del ovario conformado por lagunas (L) y vasos sanguíneos (V). B) Ovocitos pre-vitelogénicos en estadio 2 (PII) y 3 (PIII). C) Ovocitos pre-vitelogénicos en estadio 1 (PI). D) Agrupaciones de ovogonias en nichos celulares (\*). E) Folículo primario. F) Células de la granulosa sobre una membrana basal (G) y células de la teca (T). F–H) Núcleos de células de la granulosa y núcleos de células de la teca interna G–H y externa F, K. I) Citoplasma del ovocito. En J) prolongaciones citoplasmáticas. K) núcleo de la teca externa y un vaso sanguíneo. La flecha en rojo indica el epitelio simple de células de la granulosa.



**Figura 38. Expresión del factor de transcripción SOX9 y VASA en hembras *C. moreletii* jóvenes con 5 años de edad.** A) Corte transversal del ovario donde se muestran ovocitos pre-vitelogénicos. B-C) Amplificación de A, donde se puede observar en rojo células de la granulosa que expresan la proteína SOX9 en su núcleo y en verde la expresión de Laminina que delimita al ovocito. Finalmente en D) se muestra en rojo la expresión de VASA en el citoplasma de una ovogonia y cerca de la membrana celular de un ovocito en PIII. G (granulosa), T (teca) y C (corteza).



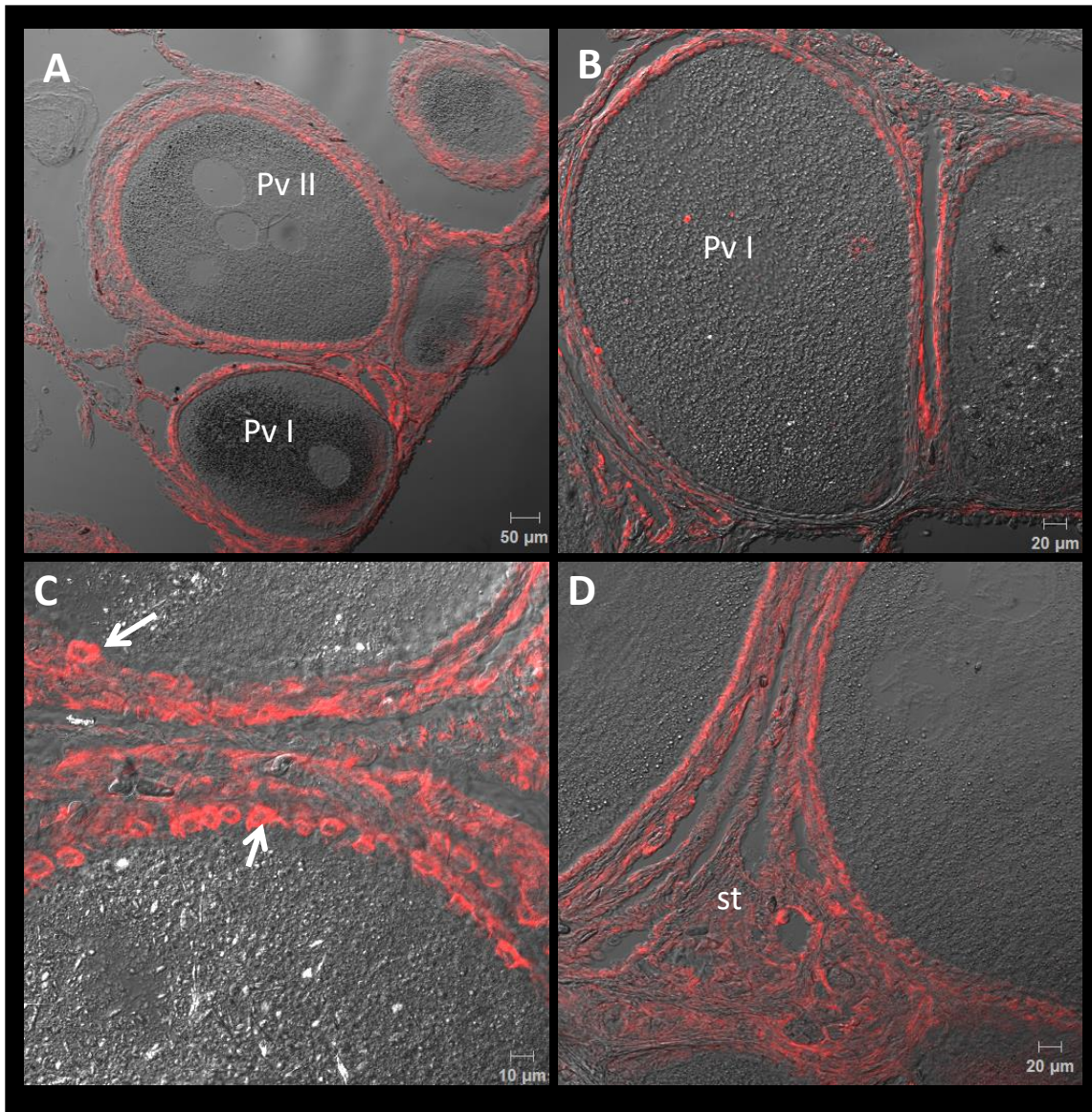
**Figura 39. Expresión del factor de transcripción FOXL2 en el ovario y testículo de individuos jóvenes de *C. moreletii*.** A) corte transversal del ovario donde se muestran ovocitos en previtelogénesis I (pv I), el asterisco señala nichos de ovogonias. En B-C) Amplificación de A, donde se puede observar núcleos de células de la granulosa que expresan FOXL2 (flechas). D) Amplificación de A, donde se puede observar como algunos nichos de ovogonias están siendo rodeadas por células somáticas que expresan FOXL2 (\*). E) En el testículo no se encontró la expresión de FOXL2. F) Amplificación de E) mostrando un cordón testicular.

### 5.3.5 Actividad de la $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD en el ovario de *C. moreletii*.

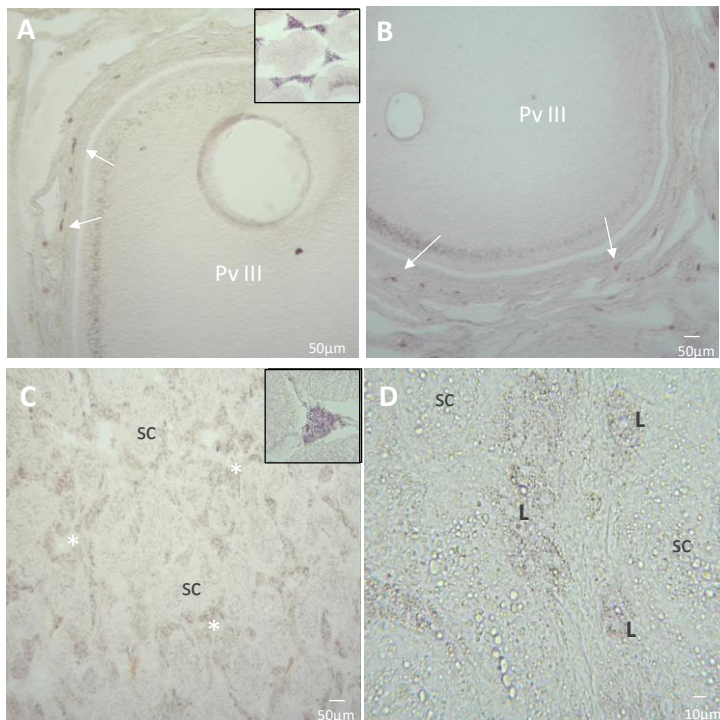
La actividad de la  $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD se observó por la acumulación de depósitos de granulos de formazán como resultado de la transferencia de hidrógenos del hidroxisteroide a la sal del tetrazolium, vía un nucleótido de piridina (NAD<sup>+</sup>), de esta manera la sal se reduce y puesto que la forma reducida es insoluble y coloreada (sal de formazán), se deposita en el sitio de la reacción.

En los ovarios de *C. moreletii*, se detectaron depósitos de formazán, señal de actividad esteroidogénica en escasas células localizadas en la región de las tecas de los folículos (Figuras 41 A y 41 B). También una ligera señal se observó en la periferia el citoplasma de

ovocitos previtelogénicos en etapa III (Figura 41 B). Se utilizó como control positivo la reacción de secciones de testículo de ratón adulto, donde la actividad se detectó específicamente en las células de Leydig (inserto Figura 41 A).



**Figura 40. Expresión del canal iónico TRPV4 en el ovario de hembras de *C. moreletii* de cinco años de edad.** A) Sección transversal donde se muestra la expresión del canal iónico TRPV4 (rojo) en ovocitos previtelogénicos I y II. B) Expresión de TRPV4 en células de la granulosa y el compartimento estromático en ovocitos previtelogénicos I. C) A mayor aumento se observa la expresión de TRPV4 en la membrana de las células foliculares que rodean al ovocito (flechas) y D) en componentes del estroma (st).



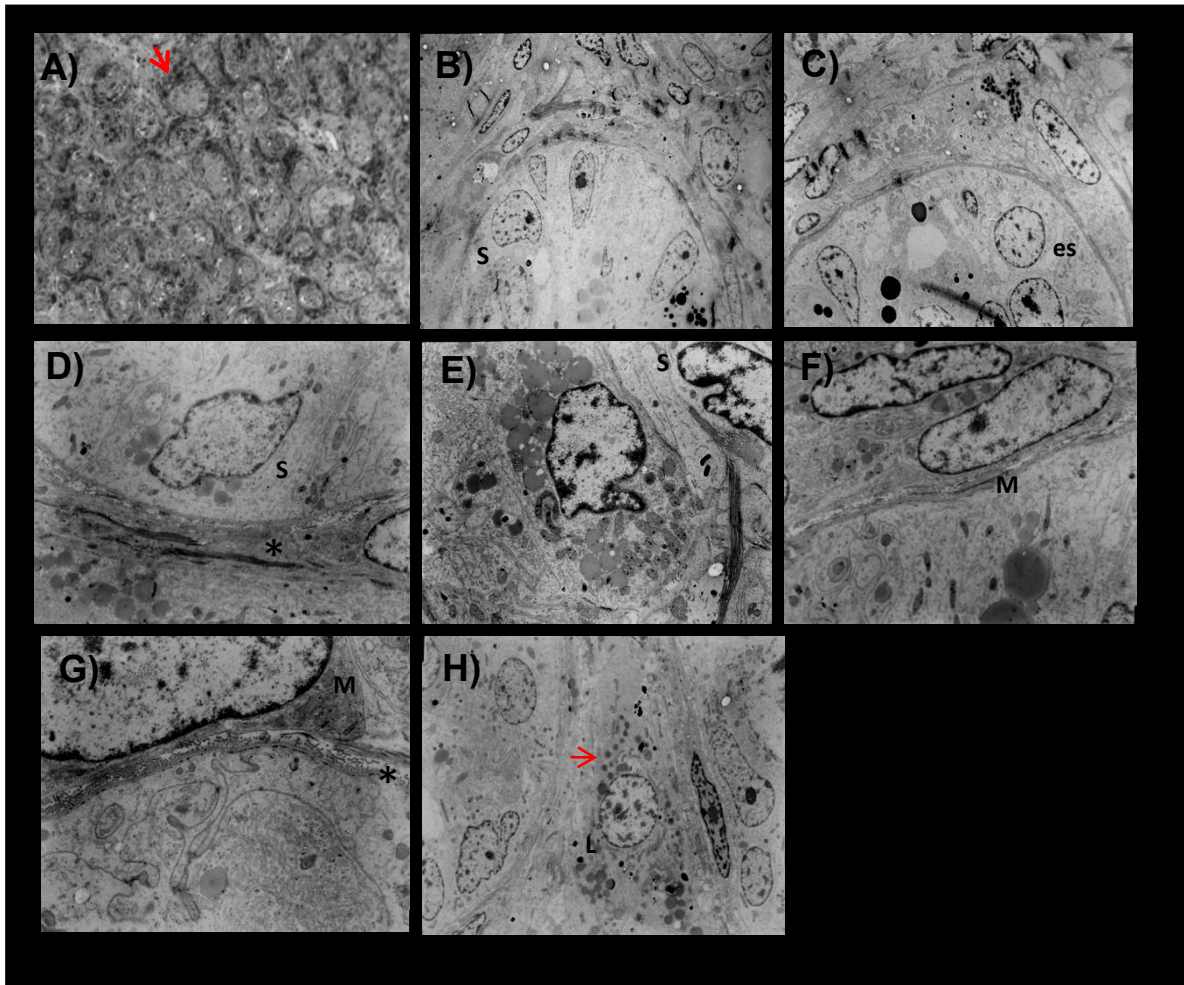
**Figura 41. Detección de la actividad de la  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD en ovarios y testículos de *C. moreletii* de 5 años de edad.** A-B) Detección de la actividad de la  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD en células de la teca (flechas) de ovocitos previtelogénicos III (PvIII). C) Detección de la actividad de la  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD en células intersticiales (\*) localizadas entre los cordones seminíferos (sc). Como control positivo de la  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD se utilizó testículo de ratón, donde la actividad es específica en células de Leydig (inserto en A y C). D) Amplificación de (C), donde una tenue actividad se observa en células de Leydig (L).

### 5.3.6 Histología del testículo de machos de *Crocodylus moreletii* jóvenes de 5 años de edad

El testículo es un órgano de forma ovalada e histológicamente está compuesto por cordones seminíferos delimitados por una membrana basal. En el cordón seminífero no hay luz (Figura 42 A), pero en su interior se pueden observar las células de Sertoli (Figura 42 B, D, E) y algunas espermatogonias (Figura 42 C), aunque estas últimas son escasas y no hubo evidencia de espermatogénesis. Estas características se asemejan a la pre-pubertad de otros vertebrados como los mamíferos.

Por otro lado, hacia el exterior del cordón seminífero se puede observar la presencia de células miodes y fibroblastos incluidos en una matriz extracelular conformada principalmente de fibras de colágeno (Figura 42 F y G). Entre el tejido intersticial se observan la presencia de las células de Leydig, las cuales se caracterizan por la forma regular de su núcleo (Figura 42 H) y la presencia de gotas lipídicas, esto último asociado a su naturaleza esteroideogénica. Una vez que observamos la morfología de los testículos de cocodrilos jóvenes, procedimos a correlacionar la expresión de genes importantes para el mantenimiento de un testículo funcional y se describe a continuación.





**Figura 42. Corte transversal del testículo de machos de *C. moreletii* de 5 años.** A) Corte transversal del testículo de macho. Hacia el interior del cordón seminífero en B) Núcleos de células de Sertoli (S), C) espermatogonias (es). D-E) A mayor aumento células de Sertoli (S). F-G) Núcleos de células mioides y de fibroblastos, también se observan fibras de colagéna (\*). H) Célula de Leydig con su núcleo de forma irregular (L), además está asociada a la presencia de gotas lipídicas (flecha).

### **5.3.7 Expresión de los factores de transcripción SOX9, FOXL2, VASA y TRPV4 en el testículo de *C. moreletii* de 5 años de edad**

Realizamos la inmunofluorescencia en los testículos de los tres machos para SOX9 y VASA. Como se esperaba, se encontró la expresión de la proteína del factor de transcripción SOX9 en el núcleo de las células de Sertoli (Figura 43 A-C), las cuales se aprecian dentro de los cordones seminíferos formando la barrera hematotesticular. Las estructuras se delimitaron utilizando un anticuerpo contra Laminina (se muestra en verde). En el caso de la proteína de VASA, se observó su expresión en el citoplasma de células germinales o espermatogonias, dentro de los cordones seminíferos en rojo (Figura 43 D-F). Finalmente se muestra los

núcleos de las células de Sertoli (azul) y la expresión de VASA en espermatogonias de los cordones testiculares (rojo) en una doble inmunofluorescencia (Figura 43 F). Con respecto a FOXL2, que es un gen que se expresa en los núcleos de las células foliculares, como se esperaba no se encontró expresión de esta proteína en el testículo de *C. moreletii*, lo anterior fue verificado mediante una inmunohistoquímica (Figuras 39 E-F).

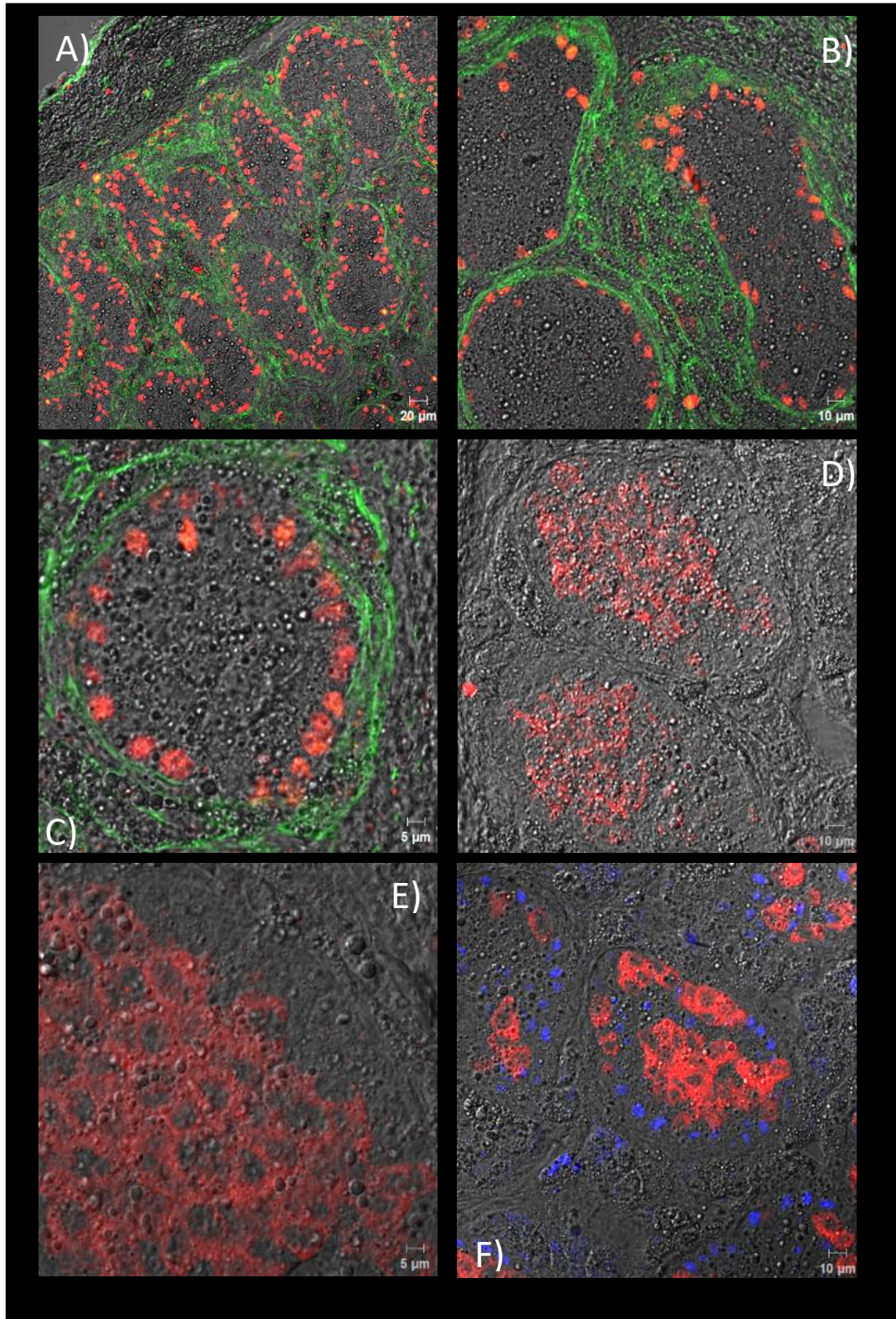
Finalmente, se detectó la expresión de la proteína del canal iónico TRPV4 principalmente en la membrana de las células de Sertoli, así como en el estroma que rodea a los cordones testiculares (Figuras 44 A-B). Realizando un doble marcaje con la proteína de SOX9 (azul), se corroboró el patrón de expresión de TRPV4 en la membrana de las células de Sertoli localizadas en la periferia de los cordones testiculares (Figuras 44 C-D).

### **5.3.8 Actividad de la $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD en el testículo de *C. moreletii***

La actividad de la  $\Delta 5$ -3 $\beta$ HSD en los testículos de *C. moreletii* se observó de manera tenue, comparada con la actividad detectada en el testículo de ratón empleado como control positivo de la técnica. Sin embargo, si fue posible detectar una ligera señal en el compartimento estromático, rodeando a los cordones testiculares, donde de manera general se localizan las células de Leydig en el testículo de los vertebrados (Figura 41C-D). Analizando a mayor detalle la acumulación de depósitos de gránulos de formazán, estos se detectaron de manera tenue en células con características de células esteroideogénicas, evidenciadas por la acumulación de lípidos (Figura 41). Como control positivo de la reacción se utilizaron secciones de testículo de ratón adulto, donde la actividad se detectó específicamente en las células de Leydig (inserto Figura 41C).

### **5.3.9 Semicuantificación del mRNA para los genes *Foxl2*, *Sox9*, *Vasa* y *Trpv4* en hembras y machos de *Crocodylus moreletii***

La expresión de los transcritos de los genes *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa* y *Trpv4* se detectaron mediante RT-PCR de punto final utilizando RNA total obtenido de ovarios y testículos de *C. moreletii* (Figura 45). Los transcritos de *Sox9* y *Vasa* se observaron tanto en ovarios como en



**Figura 43. Expresión del factor de transcripción SOX9 y VASA en machos de *C. moreletii* jóvenes con 5 años de edad.** A) Corte transversal del testículo donde se muestran los cordones seminíferos. B-C) Amplificación de A, donde se puede observar en rojo a las células de Sertoli que expresan la proteína SOX9 en su núcleo y en verde Laminina que delimita a los al túbulos seminíferos y marca al intersticio del mismo. E) Expresión de VASA en el citoplasma de espermatogonias. F) Doble inmunofluorescencia para VASA (rojo) y SOX9 (azul).

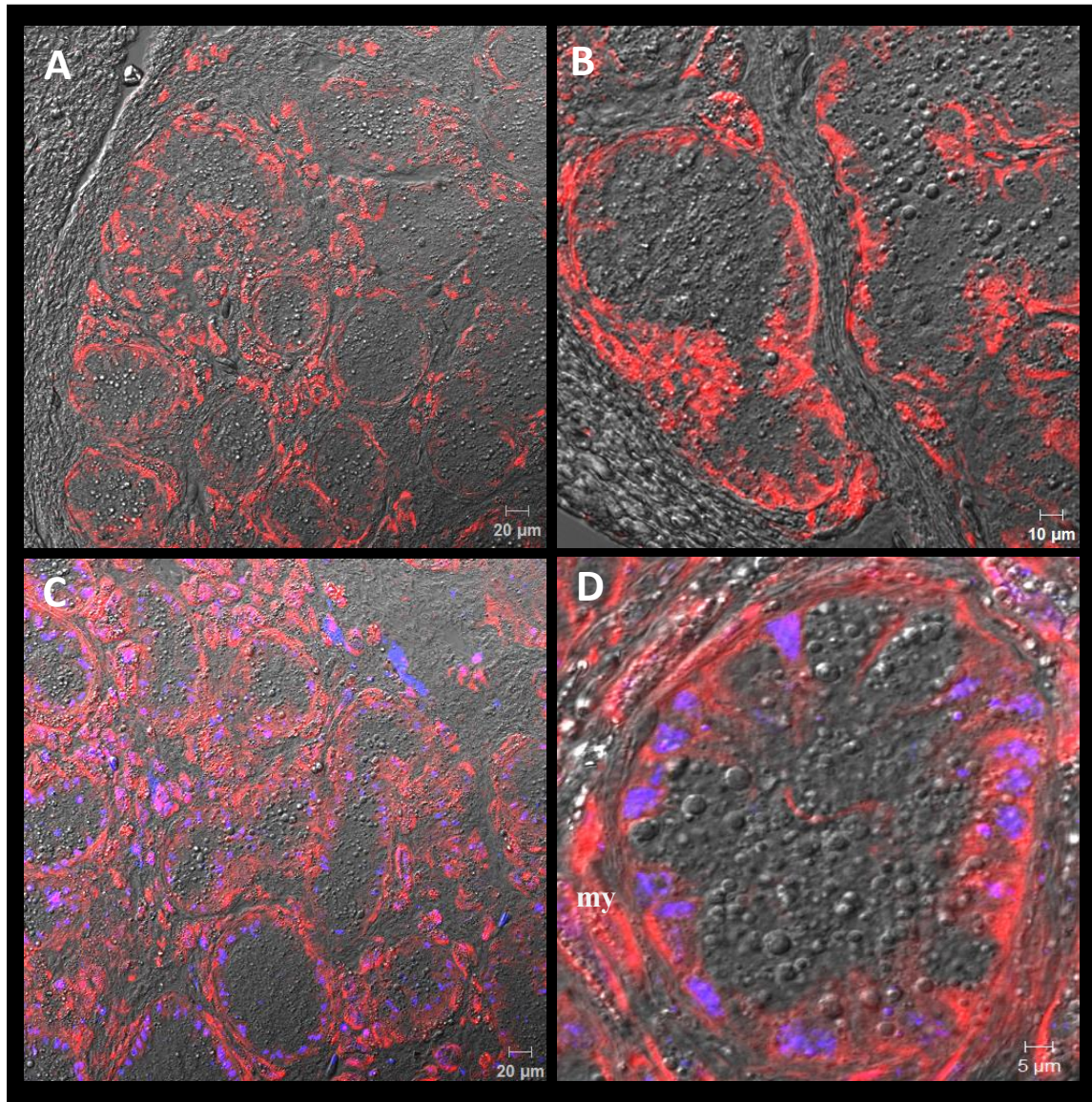
testículos; mientras que la expresión de *Foxl2* fue exclusiva de ovarios (Figura 45 A). Los niveles de expresión relativa para *Sox9*, *Foxl2* y *Vasa* se muestran en la Figura 45 B. Nuestro análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas en la expresión de *Sox9* y *Vasa* entre ovarios y testículos; mientras que en la expresión de *Foxl2* si se observaron diferencias significativas entre ambos sexos, siendo negativa la expresión en machos.

En el caso particular del gen *Trpv4* se encontró el mensajero tanto en hembras como en machos (Figura 45 C), el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre hembras y machos. Los niveles de expresión relativa de para el gen *Trpv4* se muestran en la Figura 45 D.

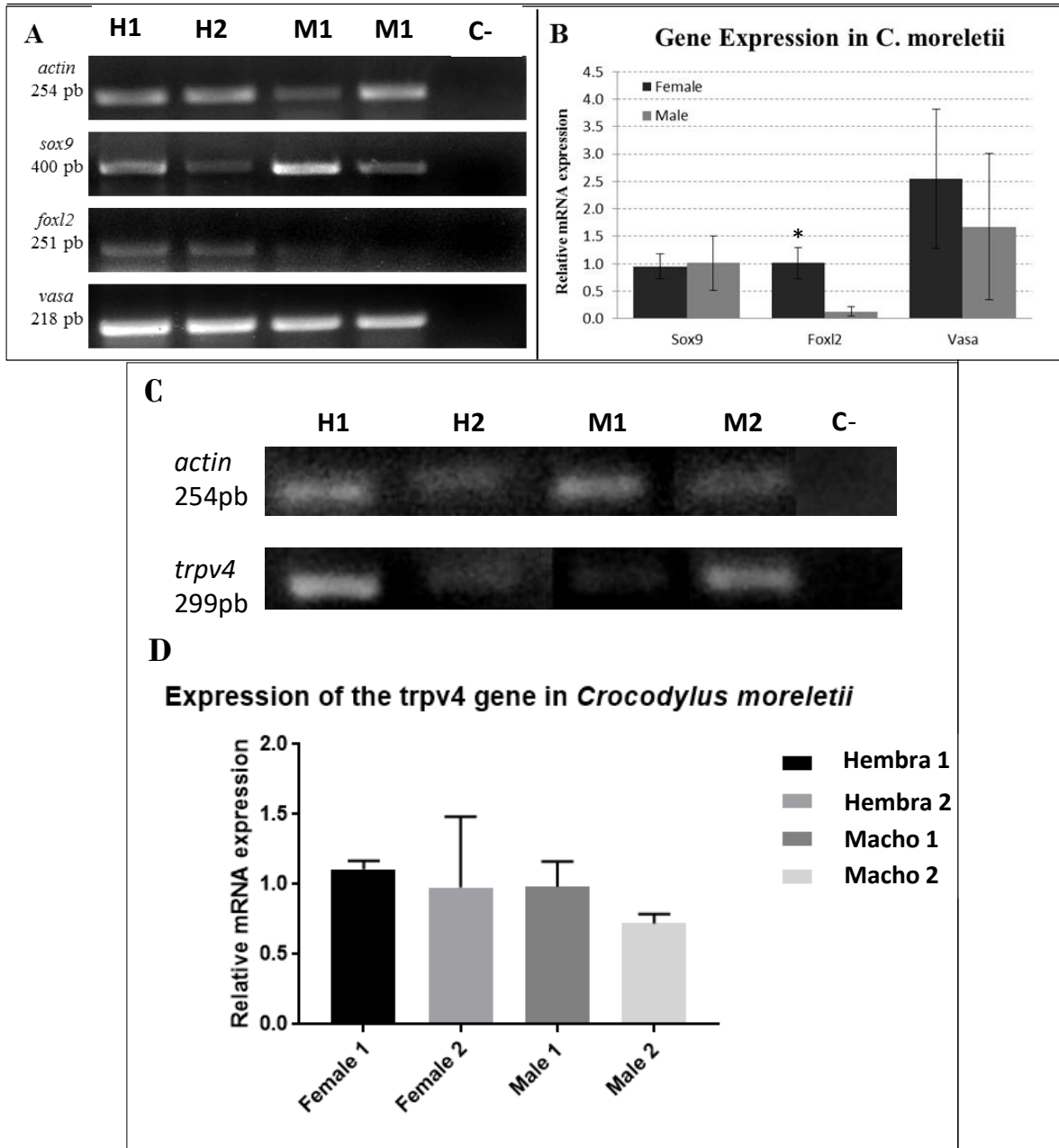
Para la secuenciación de los productos de RT-PCR se obtuvieron fragmentos parciales de los genes *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa* y *Trpv4*. Nuestro análisis de secuencias mostro que los fragmentos obtenidos tienen similitud con secuencias de reptiles y otros vertebrados previamente reportadas en el GenBank. Las secuencias reportadas y los porcentajes de similitud observadas para cada gen se presentan en la Tabla 9.

#### **5.3.10 Cuantificación de los niveles de proteína de los factores de transcripción SOX9, FOXL2, VASA y TRPV4 en hembras y machos de *Crocodylus moreletii***

A su vez se realizó la cuantificación de las proteínas mediante la técnica de *Western blot* (Figura 46). La expresión del factor de transcripción SOX9 es mayor en el testículo que en el ovario, por lo que si se expresa SOX9 en el ovario corroborando los resultados de la detección *in situ* de la proteína obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia (Figura 46 A) pero el análisis estadístico no mostró diferencia significativa (Figura 46 D). También como se había encontrado por RT-PCR, el factor de transcripción FOXL2 se expresa solo en el ovario (Figura 46 A). Con respecto a la RNA helicasa VASA, esta se expresa tanto en el testículo como en el ovario; sin embargo, los valores fueron mayores en el testículo (Figura 46 B). El análisis estadístico de FOXL2 y VASA si mostraron diferencias significativas entre ambos sexos (Figura 46 D). De igual forma la expresión del canal iónico TRPV4 se encontró en testículos y ovarios; sin embargo, la expresión resulto mayor en el testículo de *C. moreletii* aunque no hubo diferencia significativa entre hembras y machos (Figura 46 B, D). Los valores de la expresión de estas proteínas se estandarizaron con Actina (Figura 46 C-D).



**Figura 44. Expresión del canal iónico TRPV4 en el testículo de machos jóvenes de *C. moreletii*.** En A) se muestra la expresión en rojo del canal iónico TRPV4 en la membrana de las células de Sertoli. En B) un cordón seminífero a mayor aumento mostrando lo mismo. C-D) Doble marcaje donde se detecta la expresión de la proteína de SOX9 en el núcleo de las células de Sertoli (azul), mientras que en rojo se observa la expresión de TRPV4 en la membrana de las células de Sertoli. TRPV4 también se observa en la membrana de algunos tipos celulares que conforman el compartimento estromático (rojo), como células mioides (my).



**Figura 45. Amplificación de los genes Sox9, Vasa, Foxl2 y TRPV4.** Se realizó la extracción de RNA total del ovario (H1, H2) y del testículo (M1, M2) de *C. moreletii*. En A) la expresión del gen de Sox9 tanto en hembras como en machos observándose la banda de 400 pb. La expresión del gen Vasa se observó en hembras y machos detectando una banda de 218 pb. La expresión de Foxl2 fue exclusivamente en hembras evidenciado por la banda de 251 pb. Como control positivo se amplificó un fragmento de 254 pb del gen de beta-Actina. En B) Análisis densitométrico para los genes Sox9, Vasa y Foxl2. Sólo hubo diferencia significativa entre machos y hembras en la expresión del gen Foxl2. En C) Se muestra la expresión del gen del canal iónico TRPV4 que es un fragmento de 254pb. En D) Su análisis densitométrico, no hubo diferencia significativa en su expresión entre hembras y machos. Como controles negativos durante la amplificación (-) se incluyeron reacciones sin cDNA. (P<0.05).

**Tabla 9. Análisis de similitud de las secuencias obtenidas de la amplificación de Sox9, Vasa y Foxl2 de *Crocodylus moreletii*.**

Description	Query cover (%)	Ident (%)	GenBankAccession
<i>Sox9</i>			
<i>Crocodylus palustris</i> Sox9 (Sox9) gene, complete cds, alternatively spliced	95	100	FJ790140
<i>Alligator mississippiensis</i> SRY box 9 (SOX9), Mrna	78	96	NM_001287268.1
<i>Eublepharis macularis</i> Sox9 (Sox9) mRNA parcialcds	76	91	AF217252.1
<i>Canis lupus familiaris</i> SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9), mRNA	76	91	NM_001002978.1
<i>Lepidochelys olivacea</i> Sox9 (Sox9) mRNA, complete cds	78	90	GQ258676.1
<i>Macaca mulatta</i> SRY-box 9 (SOX), mRNA	74	90	NM_001032868.1
<i>Calithrix jacchus</i> SOX9 mRNA, complete cds	74	90	AF322899.1
<i>Pongo pygmaeus</i> SOX9 mRNA, complete cds	74	90	AF322898.1
<i>Gallus gallus</i> SRY (sex determining regionY)-box ) (SOX9), mRNA	74	90	NM_204281.1
<i>Homo sapiens</i> SRY-box 9 (SOX9), mRNA	74	90	NM_000346.3
<i>Foxl2</i>			
Predicted: <i>Amississippiensis</i> forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	96	99	XM_006258812.2
Predicted: <i>Gavialis gangeticus</i> forkhead box L2 (FOXL2), partial mRNA	96	98	XM_019503081.1
<i>Alligator mississippiensis</i> forkhead transcription factor FOXL2 mRNA, partial cds	96	98	XM_004664203.1
Predicted: <i>Jaculus jaculus</i> forkhead box L2 (Foxl2), mRNA	96	96	XM_006158196.2
<i>Trachemys scripta</i> forkhead transcription factor L2 (FoxL2) gene, partial cds	96	96	AY155535.1
Predicted: <i>Gekko japonicus</i> forkhead box L2 (FOXL2), mRNA	94	96	XM_015411286.1
<i>Vasa</i>			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4(DDX4), transcript variant X4, mRNA	89	97	XM_014594053.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X3, mRNA	89	97	XM_014594052.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X2, mRNA	89	97	XM_014594051.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X1, mRNA	89	97	XM_014594050.1
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X2, mRNA	89	96	XM_006021247.2
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), transcript variant X1, mRNA	89	96	XM_006021246.2
Predicted: <i>Pelodiscus sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), mRNA	86	82	XM_014581741.1
<i>Actina</i>			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> , actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	96	XM_006273980.2

Predicted: <i>Alligator sinensis</i> , actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	95	XM_006022731.2
Predicted: <i>Chrysemys picta belli</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), transcript variant X2, mRNA	92	92	XM_005299975.2
Predicted: <i>Chrysemys picta belli</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), transcript variant X1, mRNA	92	92	XM_005299974.1
Predicted: <i>Pelecanus crispus</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (LOC104025962), mRNA	91	91	XM_009480579.1
<i>Cheloniamydas</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	91	NM_001290670.1
<i>Gallus gallus</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	83	91	NM_001079481.1
<i>Xenopus tropicalis</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	89	NM_203763.1
<i>Clupeaharengus</i> actin, alpha, skeletal muscle 2-like (LOC105907633), mRNA	92	87	NM_001309834.1
<i>Xenopus laevis</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (actc1), mRNA	92	87	NM_001086591.1

### 5.3.11 PARTE 3 Discusión

#### 5.3.11.1 La madurez sexual de *Crocodylus moreletii*

Se ha reportado que la madurez sexual en *Alligator mississippiensis* ocurre entre los 6-10 años, y que esta diferencia se debe principalmente a variaciones entre regiones geográficas. En cuanto al tamaño corporal, los machos varían entre los 1.8–2.2 m, aunque por observaciones en el campo caimanes menores a 2.7 m no tienen éxito para reproducirse. En cambio las hembras alcanzan su madurez sexual hasta los 10 años y alcanzan una talla promedio de 1.8 m (Lance 1989). En la especie de *Crocodylus moreletii* se ha documentado que las hembras alcanzan su madurez sexual entre los 7 y 8 años de edad o a los 1.5 m, y los machos a los 8 años de edad o entre los 1.8-2.7m de longitud. Los organismos muestreados en este trabajo se encontraban entre los 98 y 75 cm de longitud, por lo que se sugiere que aún no han alcanzado la madurez sexual, lo anterior concuerda perfectamente con los resultados obtenidos en la histología de los ovarios y testículos. Tomar en cuenta el tamaño del individuo sobre la madurez sexual es importante debido a un factor social, el cual se puede observar mejor en los machos, donde si estos alcanzan el tamaño apropiado antes de la edad reproductiva, se pueden reproducir con las hembras exitosamente (Casas-Andreu 2011; Platt 2008).

#### 5.3.11.2 Expresión de los genes *Sox9*, *Foxl2* y *Vasa*

Con las técnicas de RT-PCR e inmunodetección pudimos corroborar la expresión de genes importantes para la función del testículo, como es el caso de *Sox9*, que como se



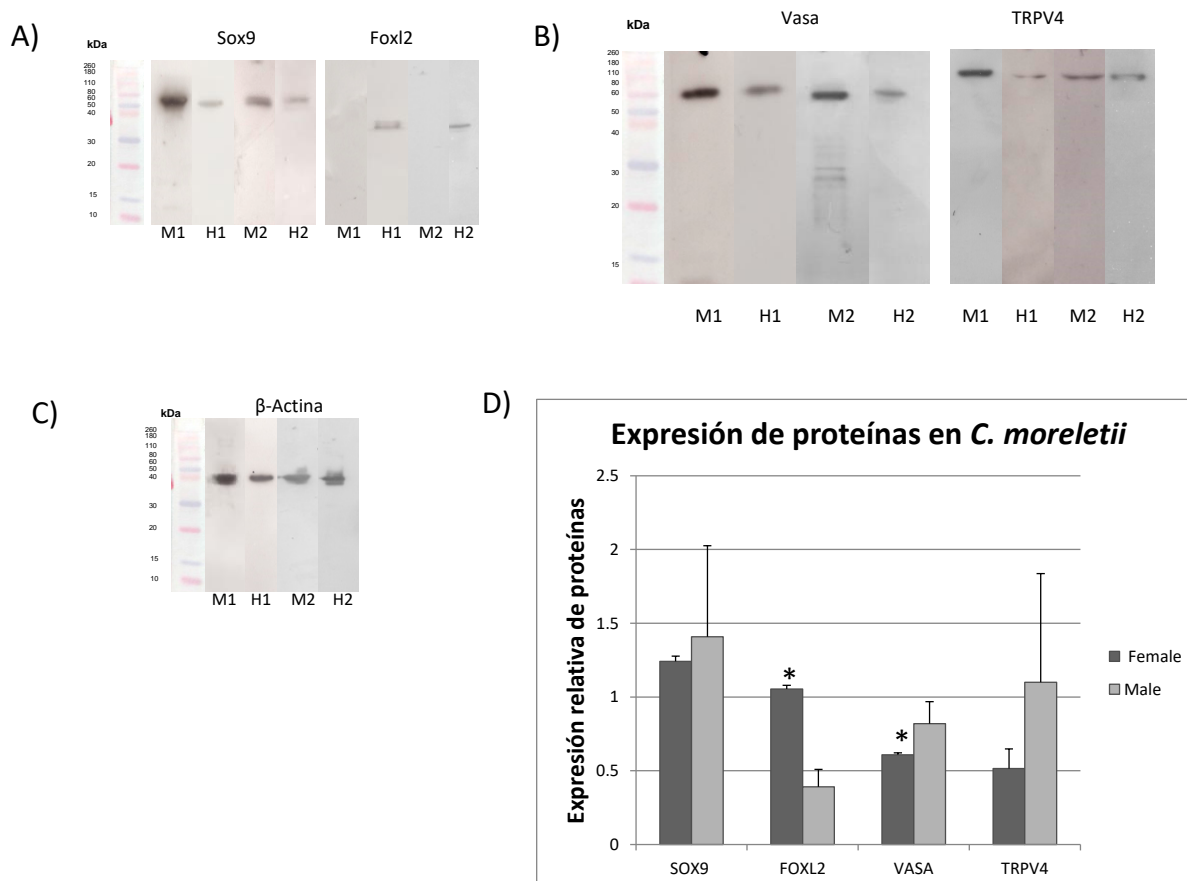
esperaba este gen se expresó en machos; sin embargo, sorprendentemente también se encontró en hembras. Es interesante mencionar que pese a que SOX9 se expresaba en ambos sexos, los niveles de expresión de este factor de transcripción fueron mayores en machos que en hembras. Hasta el momento no se tiene claro el papel que puede tener el gen *Sox9* en los ovarios, aunque en otros vertebrados como: *Danio reiro*, *Xenopus tropicalis* y *Chapalichthys encaustus* se ha encontrado la expresión del mismo en ovocitos de hembras adultas (Chiang *et al.* 2001; El Jamil *et al.* 2008; Guerrero-Estévez *et al.* 2012). En estos estudios se han encontrado dos isoformas del gen *Sox9*; particularmente una isoforma *Sox9a* que se expresa en el testículo de *Danio reiro* y la otra, *Sox9b*, que se expresa en ovocitos previtelogénicos de la misma especie (Chiang *et al.* 2001; Guerrero-Estévez *et al.* 2012). El anticuerpo que empleamos para este estudio, reconoce a ambas isoformas de *Sox9*. También se pudo detectar la expresión de ambos mRNA para *Sox9* mediante la técnica de RT-PCR.

Fisiológicamente aún se desconoce el papel de *Sox9* en el ovocito, pero se propone que este gen adquirió una nueva función durante la evolución. En el caso de *Mus musculus*, se propone que participa durante la foliculogénesis, donde se ha observado que su expresión depende del estadio de desarrollo del folículo, es decir, *Sox9* se expresa más en ovocitos preantrales y disminuye su expresión en ovocitos antrales, hasta que es nula en ovocitos preovulatorios (Notarnicola *et al.* 2006). Además como nosotros encontramos la expresión de *Sox9* en ovocitos previtelogénicos, resultaría interesante evaluar ovocitos vitelogénicos de ovarios de hembras adultas de 8 años que ya se reproduzcan, pues podría ocurrir algo similar como con *Mus musculus*, donde la expresión de *Sox9* se inhibe en estadios avanzados de la foliculogénesis, lo que reforzaría su posible papel en la regulación de la formación de folículos.

Por otro lado, a partir de estudios de cáncer de ovario, se sabe que la sobrerregulación del gen *Sox9* vía el receptor de Prostaglandinas (Pgds), puede regular la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa (Malki *et al.* 2007); además una regulación del gen *Sox9a* muy similar ha sido conservada durante la evolución, pues se sabe que regula mecanismos de apoptosis vía el factor de transcripción p53, así como la producción de matriz extracelular vía MAPK específicamente vía ERK ½, siendo esto importante para la transición de ovario a testículo en el pez joven hermafrodita *Danio reiro* (Sun *et al.* 2013).

El gen *Sox9* regula la producción de matriz extracelular durante la condrogénesis y al ser un gen maestro que dirige la diferenciación sexual en vertebrados, se piensa que este también controla ríos abajo componentes que producen la matriz extracelular durante la diferenciación

morfológica de los cordones testiculares (Barrio nuevo *et al.* 2010). Por lo tanto, se propone que durante la foliculogénesis tiene un papel similar en cuanto a la producción de matriz extracelular, durante el desarrollo del folículo por las células foliculares y de la teca.



**Figura 46. Western blot de la expresión de los factores de transcripción SOX9, VASA, FOXL2 y el canal iónico TRPV4 en el testículo y ovario de *C. moreletii*.** A) Se muestra el inmunoblot para las proteínas SOX9 (56kD), FOXL2 (38kD). En B) para VASA (76kD) y TRPV4 (91kD) en C)  $\alpha$ -Actina de músculo liso (42kD). D) Se muestran los niveles de expresión relativa obtenidos del análisis densitométrico de las bandas obtenidas para cada proteína. (P<0.05).

La especificidad del factor de transcripción SOX9 para mantener un ambiente masculinizante en el testículo mediante las células de Sertoli, estaría dado por el tipo de isoforma de Sox9 que se exprese en su núcleo y del contexto celular proteico que interacciona con el mismo, es decir, que factores de transcripción interactúan con SOX9, tales como: WT1 y SF1 que ayudan a mantener la expresión del gen Sox9 durante el desarrollo embrionario del testículo. O bien, su interacción con factores de transcripción de la familia SOX como SOX8, pues se

sabe que ratones SOX8<sup>-/-</sup> son estériles y las células de Sertoli se transdiferencian a células de la granulosa, ocurriendo la completa degeneración del túbulo seminífero. Con lo que proponen que la interacción de SOX9 con SOX8 tiene un papel fundamental en mantener la masculinización en el testículo adulto (Barrionuevo *et al.* 2016). Muy probablemente la señalización celular y los factores de transcripción con los que interacciona, sean muy diferente en el ovario.

En cuanto a los genes que mantienen la función y morfología del ovario como *Foxl2*, como se esperaba encontramos la expresión del mensajero y de la proteína exclusivamente en ovarios, específicamente en las células de la granulosa de ovocitos previtelogénicos, lo que apoya que el patrón de expresión del gen *Foxl2* está altamente conservado en la evolución. El papel de *Foxl2* es regular negativamente al factor de transcripción *Sox9* y promover la producción de estrógenos. Sin embargo, encontramos la expresión de *Sox9* y de *Foxl2* en los núcleos de las células de la granulosa, por lo que se pretende evaluar a futuro la expresión simultánea de estos dos genes, pues resulta de gran interés, ya que posiblemente no se expresen al mismo tiempo en las células de la granulosa y se encuentre regionalizada su expresión en ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos (Notarnicola *et al.* 2006).

Por último, *Vasa* que es el gen de una RNA helicasa que se expresa durante la especificación de la línea germinal, encontramos su expresión tanto en ovogonias que están agregadas en nichos celulares, así como en el citoplasma de ovocitos previtelogénicos del tipo II; en ovocitos de estadios más avanzados ya no se detecta la expresión de este gen. Es interesante la expresión de VASA en ovogonias agrupadas en nichos dentro de la corteza del ovario, pues una característica de VASA es que se expresa en células progenitoras de la línea germinal (Seydoux *et al.* 1999), por lo que posiblemente tenga un papel manteniendo el *pool* de ovogonias durante la ovogénesis. También se encontró su expresión en las espermatogonias de los testículos. Al respecto, se sabe que en *Mus musculus* el gen *Vasa* juega un papel muy importante tanto en la especificación y mantenimiento de la fertilidad de la línea germinal que va a dar origen a los espermatozoides (Tanaka *et al.* 2000). En cuanto a sus niveles de expresión del mRNA se mantienen semejantes en ambos sexos. En el caso de la proteína se detectó ligeramente una mayor cantidad de *Vasa* en machos, lo cual tendría que ver con la histología del ovario pues nos percatamos que los nichos de ovogonias son áreas pequeñas dentro de la corteza ovárica con una pequeña cantidad de células, además conforme avanza la formación del folículo y los ovocitos son previtelogénicos disminuye su expresión o es nula; en cambio en los testículos *Vasa* se está expresando en las espermatogonias de todos los

cordones testiculares, que son probablemente más células que expresan a esta RNA helicasa. Estos resultados son de interés pues hasta el momento no se había reportado su expresión en cocodrilos.

### 5.3.11.3 Expresión del canal iónico TRPV4

La regulación del gen *Sox9* es fundamental en la diferenciación del testículo durante el desarrollo embrionario. Además se sabe que junto con el gen *Sox8* participa en el mantenimiento del linaje de las células de Sertoli y la fertilidad del testículo en machos adultos y en el desarrollo embrionario (Barrionuevo *et al.* 2016). En mamíferos el gen *Sry* regula positivamente la expresión del gen *Sox9*; sin embargo, los reptiles carecen de este gen (Coriant *et al.* 1994), por lo que posiblemente exista otra vía de señalización que promueva la regulación positiva de *Sox9*. Nosotros encontramos tanto la expresión de la proteína del canal iónico TRPV4 en el citoplasma de las células de Sertoli, así como la expresión del gen *Sox9* en el núcleo de las células de Sertoli. Haciendo aún más interesantes nuestros resultados se encontró que los machos expresan una mayor cantidad de *Sox9* y *Trpv4* que las hembras y aunque no hubo diferencia significativa en la expresión del mRNA de TRPV4 entre machos y hembras, se observa una ligera tendencia en donde las hembras al parecer tienen mayor cantidad de mensajero, por lo que puede tener una relación en que se está transcribiendo más proteína en los machos. En trabajos realizados en condrocitos, se ha caracterizado bien que el canal iónico TRPV4 puede regular positivamente al factor de transcripción SOX9, por lo que se sugiere que puede estar ocurriendo lo mismo en las células de Sertoli en el testículo del cocodrilo, además dentro de esta regulación se podrían conservar elementos en la vía de señalización que se sabe que en mamíferos participan en la regulación del gen *Sox9*, tales como: la proteína cinasa A (PKA), el receptor para prostanglandinas y la enzima adenilato ciclasa dependiente de cAMP, principalmente (Muramatsu *et al.* 2007; Juhász *et al.* 2014). Por lo que nosotros sugerimos que una posible explicación de este patrón de expresión de TRPV4 en las células de Sertoli, sea el mantener la regulación en la expresión del gen *Sox9* en el testículo.

También observamos la expresión de TRPV4 en la membrana de las células foliculares y estroma del ovario. Estos resultados coinciden con los de un estudio realizado en el aparato reproductor de *Mus musculus* y cultivos de sus células foliculares, donde encontraron que el canal catiónico permeable  $\text{Ca}^{2+}$  TRPV4, se localiza en una subpoblación de cilios móviles en las células epiteliales del ámpula y del istmo con una alta intensidad en invaginaciones

proximales de los pliegues epiteliales del oviducto. Por lo que proponen que en el oviducto, tanto TRPV4 y las poliquistinas podrían ser importantes en la transmisión de los cambios fisicoquímicos del oviducto durante la ovulación, así como tener una participación importante en la formación y maduración del folículo (Teilmann *et al.* 2005).

Por lo tanto, el contexto celular específico de las células de Sertoli y de las células foliculares es muy importante, es decir, que proteínas y factores de transcripción se expresan en estos tipos celulares, son un elemento fundamental para dirigir la señalización en distintos procesos fisiológicos y celulares. Es decir, que los factores de transcripción que están participando en mantener la expresión de Sox9, son fundamentales para determinar su función en el tejido.

#### **5.3.11.4 Actividad de la $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD e histología de ovario y testículo**

Los resultados que hemos obtenido sobre la histología de los órganos reproductores de cocodrilos jóvenes de *C. moreletii* es novedosa y apoya nuestros resultados observados en cuanto a inmunofluorescencias y RT-PCR. El primero en estudiar la morfología del ovario en un cocodrilo fue Dutta *et al.* (1949-1953), quien describió los ovarios en *C. palustris* y *Gavialis gangeticus*; el ovario de *A. mississippiensis* fue descrito por Joanen y McNease en (1980) y en estudios más recientes por Uribe *et al.* (2000) y Moore *et al.* (2010). En general estos trabajos se han realizado en cocodrilos adultos y neonatales de una semana posteclosión hasta cinco meses. En particular en el trabajo realizado por Uribe *et al.* (2000) realizaron una descripción histológica del ovario de hembras adultas de *Alligator mississippiensis* encontrando tres estadios de la ovogénesis: previtelogenesis (I-V), vitelogenesis (VI-X) y preovulación.

Nosotros realizamos el análisis histológico de hembras *C. moreletii* de 5 años de edad, en donde ultraestructuralmente se observaron ovogonias formando agrupaciones celulares semejantes a nichos, que en los cortes histológicos se observaron interconectadas entre ellas y rodeadas por células somáticas, tal como lo observó Moore *et al.* (2010) en individuos eclosionados de hasta 5 meses de edad. También la mayoría de los ovocitos se encuentran en distintos estadios de previtelogénesis, ya que se pueden observar ovocitos donde se inicia el crecimiento del mismo y a su vez posee un citoplasma uniforme (Previtelogénesis I); así como ovocitos esféricos u ovals con su citoplasma marcado con finas fibras y gránulos (Previtelogénesis II), rodeados por completo por células foliculares y algunas células de la

teca (Previtelogenesis III). No hemos encontrado ovocitos en previtelogénesis IV y V. La mayoría de los ovocitos en Previtelogénesis III presentaron algunas células en la región de la teca positivas a la  $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD, lo que sugiere que células precursoras de células esteroidogénicas han iniciado su actividad en las hembras de *C. moreletii* de 5 años de edad. Se logró apreciar que los ovarios histológicamente tienen una morfología similar a lo que se ha observado en *A. mississippiensis* y en otros reptiles, ya que en la corteza se ubican los ovocitos y la región medular contiene lagunas, vasos sanguíneos y músculo liso. El vitelo presenta gotas lipídicas de tamaño uniforme y estructuras fibrilares.

El testículo de cocodrilos ha sido estudiado histológicamente en el caimán americano *A. mississippiensis* durante el desarrollo embrionario (Forbes *et al.* 1940; Smith *et al.* 1993) y en organismos neonatos de una semana hasta tres meses posteclosión (Moore *et al.* 2010), así como en adultos (Lance *et al.* 1989) y subadultos (Cott *et al.* 1961; Graham *et al.* 1968) en el caimán *C. niloticus*. En el caso de los machos de *C. moreletii* muestreados en este trabajo, se encontró por microscopía de campo claro que histológicamente tiene una morfología muy similar a la de un macho adulto de *A. mississippiensis* que se encuentra fuera de la temporada reproductiva y de neonatales de 3 meses, donde en resumen los cordones seminíferos están delimitados por una membrana basal, hacia el interior se observan células de Sertoli y espermatogonias, evidenciado por su morfología y la expresión de Sox9 y Vasa respectivamente.

Un dato interesante sobre este trabajo es que no se observaron espermátocitos, ni espermatozoides, a pesar de que las muestras se colectaron en mayo, uno de los meses dentro de los que se encuentran en reproducción. Lo anterior se debe muy probablemente a que cocodrilos *C. moreletii* jóvenes de 5 años no han alcanzado aún su madurez sexual. En el intersticio del testículo se encontró lo que se esperaba con respecto a otros reptiles y vertebrados, ya que poseen células miodes, fibroblastos (que producen matriz extracelular) y células de Leydig (que producen hormonas esteroideas). Sin embargo, la actividad de las células de Leydig está disminuida, ya que la detección de la  $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD apenas fue perceptible, lo que apoya junto con las observaciones histológicas, que los cocodrilos de la especie *C. moreletii* de 5 años son aún inmaduros sexualmente y que las futuras células esteroidogénicas (Leydig) se localizan al igual que en todos los vertebrados en la región intersticial del testículo, las cuales apenas están iniciando su actividad esteroidogénica cuando los cocodrilos machos cuentan con 5 años de edad.

### 5.3.12 PARTE 3 Conclusión

Las hembras y los machos de 5 años de edad en *C. moreletii* son inmaduros sexualmente, lo cual fue evidenciado a través de los resultados obtenidos mediante el análisis histológico de la estructura y ultraestructura que presentaron sus ovarios y testículos, a pesar de haber sido recolectados durante su época de reproducción. Se encontraron novedosos resultados que apoyan la expresión del gen *Sox9* en hembras; además de que logramos reportar por primera vez la expresión del gen *Vasa* en células germinales de cocodrilos. Se reportó la expresión del canal iónico TRPV4 y se propone un papel como posible regulador de la expresión del factor de transcripción SOX9 en células de Sertoli. Por lo tanto, se espera que estos resultados apoyen investigaciones futuras sobre la biología de la reproducción en cocodrilos y otros reptiles.

Con esta PARTE 3 concluimos con la descripción de los resultados, a continuación procederemos a discutirlos e integrarlos brevemente.

## VI. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo de tesis se estudió la biología de la reproducción del cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii*, desde como se determina sexualmente en su desarrollo embrionario, hasta como es la morfología de estos organismos en la pre-pubertad (jóvenes de 5 años de edad). Dentro de los aspectos más interesantes que tienen este tipo de organismos, es que se determinan sexualmente por temperatura, es decir que para determinar el sexo de un embrión existe una estrecha relación entre el ambiente (un factor abiótico como la temperatura) y el genoma del organismo. Dado que el ambiente tiene una influencia directa sobre el desarrollo de un fenotipo, es importante explicar nuestros resultados desde el punto de vista de la “Ecología Evolutiva del Desarrollo” (Shoemaker *et al.* 2009; Matsumoto *et al.* 2012; Landry *et al.* 2014), pues resulta interesante integrarlos desde esa perspectiva como se discutió en los resultados (PARTE 1 y 2).

Dentro de los resultados más importantes que tenemos en esta tesis, es que logramos caracterizar el desarrollo morfológico de la gónada, estableciendo las siguientes etapas: gónada indiferenciada, de periodo sensible a la temperatura y de diferenciación sexual gonadal. Durante ellas observamos que la plasticidad en el desarrollo de un embrión es muy importante, sobre todo en el periodo sensible a la temperatura, ya que en este los embriones vistos como individuos dentro de una población, parecen tener distintas sensibilidades genéticas y por esta razón se van determinando sexualmente poco a poco dentro de la misma. Podría decirse que en cada embrión conforme transcurre el desarrollo embrionario, se van canalizando las distintas plasticidades (jerarquía de plasticidades) en distintos tiempos, ocurriendo así la morfogenésis gonadal. Lo anterior es un proceso fisiológico muy complejo, que culmina seguramente con modificaciones epigenéticas en su genoma (Smith *et al.* 1993; Landry *et al.* 2014).

Pero por qué epigenéticas, pues resulta interesante proponer que en el desarrollo todo culmina con la diferenciación y la regulación epigenética de genes, pues los procesos de este tipo son códigos celulares establecidos mediante metilaciones, acetilaciones u otras modificaciones epigenéticas que determinan o comprometen la diferenciación y función celular, además de que son diferentes entre linajes celulares y en este caso entre fenotipos sexuales (ovario y testículo). Por ejemplo: se ha caracterizado la regulación epigenética de los genes *Sox9* y la enzima *Cyp19a1 aromatasa* en *A. mississippiensis*, descubriendo que tiene un patrón de metilación dimórfico, donde en el desarrollo de gónadas derivadas de



embriones incubados a una temperatura masculinizante muestran una elevada metilación del promotor *Cyp19a1 aromatasa* y una expresión génica baja en comparación con la incubación a una temperatura feminizante, donde es baja la metilación y alta su expresión génica. Lo contrario se observó para *Sox9*, con un aumento de la metilación del promotor y una disminución de su expresión en gónadas embrionarias provenientes de una temperatura de incubación feminizante con relación a la masculinizante (Matsumoto *et al.* 2012; Parrott *et al.* 2014; Landry *et al.* 2014)

Por lo que, en parte la sensibilidad genética del embrión que se observa durante el periodo sensible a la temperatura, debe depender de las probabilidades de “acceder” o no a un gen y de su actividad transcripcional y en esto último participan las modificaciones epigenéticas, de ahí el papel tan importante que tiene la plasticidad epigenética, pues puede permitir que una célula o conjunto de células, lleguen más pronto o no al proceso de estabilización genética, ante una perturbación o estímulo estocástico (temperatura). Es por esta razón que a futuro resultaría muy interesante investigar en esta especie de cocodrilo si la enzima *Cirbp* participa regulando el PST, como es su expresión durante este periodo del desarrollo gonadal, así como si se encuentra regulando epigenéticamente a otros factores que influyan en la plasticidad genética de la DST, como de enzimas metilasas y acetilasas que participen en las modificaciones epigenéticas de *Sox9*, *Foxl2* o *Cyp19a1* (Landry *et al.* 2014; Georges *et al.* 2018).

Sin embargo, no es que la plasticidad epigenética sea la vía más importante en la DST durante el desarrollo embrionario, al contrario es una parte dentro de la gran red de señalización que está participando en estos eventos de diferenciación. Es decir, la regulación epigenética depende de otros eventos celulares que están mediando la transducción de la señal entre el ambiente y los genes, donde elementos como los receptores, proteínas cinasas, enzimas y las hormonas, participan intrepetando y respondiendo al estímulo de la temperatura, mediante un mecanismo aún no descrito en su totalidad, regulando así el compromiso celular y la diferenciación, lo anterior culmina con las marcas epigenéticas que ocurren en el genoma de las células diferenciadas de un individuo, así como la canalización de todas las plasticidades, para establecer de esta forma la morfología y función del ovario o el testículo (Pieu 1995; Landry *et al.* 2014; Georges *et al.* 2018).

Dentro de los puntos mencionados anteriormente una pregunta interesante es por qué las plasticidades molecular y fisiológica son tan interesantes en la DST. Principalmente porque

gracias ellas y a su interacción podemos obtener un fenotipo, derivado de la abundancia en los transcritos, de las proteínas y finalmente de la actividad proteica, que resultan en la morfología y fisiología de un órgano. Es decir, la señalización celular río arriba de todos los eventos epigenéticos, como los receptores que son estimulados por la temperatura, son los que interpretan la señal, la transforman a señales bioquímicas (como hormonas, segundos mensajeros o proteínas cinasas, etc) que a su vez transducen la señal en una cascada de señalización, hasta llegar a esta regulación epigenética de genes. En este sentido nosotros proponemos que el canal iónico TRPV4 juega un papel importante en la regulación del gen *Sox9* en jóvenes inmaduros sexualmente (PARTE 3) y posiblemente en embriones, regulando su expresión río arriba, es decir, interpretando el estímulo de la temperatura como una señal bioquímica, pues también se ha encontrado la expresión de TRPV4 en *A. mississippiensis* durante el PST (Pieu 1995; Landry *et al.* 2014; Yatsu *et al.* 2014).

Además nosotros encontramos la expresión dimorfica de *Sox9* durante la morfogénesis gonadal de embriones de *C. moreletii*, por lo que resultaría interesante en un futuro buscar si este patrón de expresión depende de TRPV4, pues a pesar de que se sabe que *Dmtr1* regula la expresión del gen *Sox9* y a su vez *Dmtr1* es regulado por la desmetilasa KDM6B durante la DST en la tortuga *Trachemys scripta*, recordemos que los reptiles conservan diferentes patrones de determinación sexual y muy posiblemente más de un mecanismo bioquímico, que al ser estimulado por distintas temperaturas dan como resultado los mismos sexos, por lo que varios genes pueden estar involucrados en encender a *Sox9* (Yatsu *et al.* 2014; Ge *et al.* 2017; Ge *et al.* 2018).

Además, los cocodrilos parecen ser organismos con una gran plasticidad fisiología a lo largo de su vida, pues esta no se pierde cuando son adultos, ya que también encontramos que se expresa *Sox9* en los ovarios de *C. moreletii* jóvenes de 5 años de edad. Por lo que proponemos que es una isoforma de la proteína de SOX9, que durante la evolución adquirió una función distinta para regular el proceso de foliculogénesis, lo cual sería diferente a lo que ocurre en el testículo, donde *Sox9* participaría manteniendo un ambiente masculinizante en el mismo. Lo anterior sugiere que durante la evolución este gen se ha duplicado y se han seleccionado diferentes isoformas de estas proteínas que adquirieron distintas funciones fisiológicas. También, algo interesante es que encontramos que la expresión de *Sox9* es dimorfica durante el desarrollo embrionario, pero no en adultos, y esto puede deberse a que tal vez juega un papel importante durante la foliculogénesis y este proceso en cocodrilos se inicia hasta en etapas posteclosión, por lo que resultaría interesante investigar en *C. moreletii*

la expresión de *Sox9* en etapas posteclosión (Notarnicola *et al.* 2006; Agrawal *et al.* 2009; Moore *et al.* 2010; Landry *et al.* 2014).

La determinación sexual por temperatura en los cocodrilos ha jugado un papel importante en la adaptación y el éxito reproductivo de los mismos, pues de todas las especies de cocodrilo que existen en la actualidad se tiene registros fósiles muy antiguos desde el Cretácico y específicamente de *C. moreletii* desde el Pleistoceno (Ross 1987). Pero por qué estas especies han prevalecido en el planeta durante miles de años y pese a tantos cambios en el planeta como el clima, han tenido éxito reproductivo a pesar de sólo presentar DST. Muy posiblemente tiene que ver con la persistencia de la plasticidad genética de las poblaciones, una evidencia de ello es que las especies como *C. moreletii* y *C. acutus* pueden generar híbridos. Los cuales resultaría muy interesante investigarlos a futuro, en especial los aspectos relacionados con la DST, morfogénesis gonadal y la morfología y reproducción de adultos. Porque nos darían mucha información sobre la plasticidad reproductiva de estas especies y de los límites que tiene, en el sentido de conocer si los híbridos son estériles o no (Cedeño-Vázquez *et al.* 2008; Pacheco-Sierra *et al.* 2016).

Pero a pesar de que los cocodrilos presentan una gran capacidad de adaptación, en la actualidad se enfrentan a varios problemas que los afectan gravemente: la reducción de sus territorios de caza y hábitats, la contaminación ambiental, la caza, el cambio climático y pese a que son organismos que presentan una gran capacidad de adaptación y adecuación. Tantos problemas en las poblaciones en un corto periodo de tiempo, podrían llevarlas a la extinción, porque debido a las actividades humanas hemos afectado enormemente los ecosistemas donde habita y se reproduce el cocodrilo de pantano y otras especies de cocodrilo, mamíferos, peces, aves, etc. (Sánchez Herrera *et al.* 2011), impidiendo de esta manera que se lleven a cabo normalmente las interacciones ecológicas de estos individuos dentro de sus poblaciones y con sus entornos ambientales, así como la evolución de las mismas. Es por ello que nuestros resultados son de gran importancia, pues tenemos que reunir todos los esfuerzos necesarios para la conservación de las especies y los hábitats de estos seres vivos.

Finalmente, logramos cumplir con los 5 objetivos planteados para esta tesis doctoral y se describieron los resultados en las tres partes mencionadas anteriormente: PARTE 1 la descripción de la morfología y desarrollo embrionario de *C. moreletii*, PARTE 2 caracterización del efecto de la temperatura en la determinación sexual de este cocodrilo y PARTE 3 la morfogénesis gonadal de cocodrilos jóvenes de 5 años de edad. Obteniendo resultados de

gran interés, que se espera puedan aportar información valiosa para conocer más sobre la DST y la reproducción de *C. moreletii* contribuyendo a la conservación de este último.

## **VII. CONCLUSIÓN GENERAL**

En conclusión el estudiar la biología reproductiva de *C. moreletii* es de suma importancia, para apoyar a los programas de conservación de esta especie, pues nosotros obtuvimos información muy interesante y fundamental sobre el efecto de la temperatura en la determinación sexual gonadal. Así como, en la morfología de ovarios y testículos de organismos jóvenes. Además, esperamos que nuestros resultados contribuyan a este tema tan complejo que es la Determinación Sexual por Temperatura en reptiles, específicamente en cocodrilos.

## VIII. REFERENCIAS

- Abouheif, E., Wray, G.A. 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science*. 297, 249–252.
- Adolfsson, S., Ellegren, H. 2013. Lack of Dosage Compensation Accompanies the Arrested Stage of Sex Chromosome Evolution in Ostriches. *Mol Biol Evol*. 30, 806–810.
- Agrawal, R., Wessely, O., Anand, A., Singh, A., Aggarwal, R. 2009. Male-specific expression of Sox9 during gonad development of crocodile and mouse is mediated by alternative splicing of its proline-glutamine-alanine rich domain. *FEBS Journal*, 276: 4184–4196.
- Álvarez del Toro, M. 1974. Los Crocodylia de México: estudio comparativo. *Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables*. México, 70 p.
- Álvarez del Toro, M. y L. Sigler. 2001. Los Crocodylia de México. 1a Edición. IMRNAR, PROFEPA. México. 134 pp.
- Angelopoulou, R., Lavranos, G., Manolakou, P. 2012. Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reprod Biol Endocrinol*. 22, 10-13.
- Antonio-Rubio, N.R., Porrás-Gómez, T.J., Moreno-Mendoza, N. 2013. Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reprod Fertil Dev*. 25, 825-36.
- Lang, W.J., Andrews, V.H. 1994. Temperature dependent sex determination in Crocodylians. *J of Exp Zool*. 270, 28-44.
- Aubin-Horth, N., Renn, S.C.P. 2009. Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Mol Ecol*. 18, 3763–3780.
- Barrios, G. y J. Cremieux (comp.). 2018. Protocolo de ranqueo para cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México.
- Barrionuevo, F., Scherer, G. 2010. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int J Biochem Cell Biol*. 42, 433-6.
- Barrionuevo, F. J., Hurtado, A., Kim, G. J., Real, F. M., Bakkali, M., Kopp, J. L., Sander, M., Scherer, G., Burgos, M., Jiménez, R., 2016. Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *Elife*. 5, 1-23.

- Braat, A. K., Zandbergen, T., Van de Water, S., Goos, H. J., Zivkovic, D. 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev Dyn.* 216,153-167.
- Beolens, Bo; Watkins, Michael; Grayson, Michael (2011). *The Eponym Dictionary of Reptiles*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 296 pp. ISBN 978-1-4214-0135-5. ("Bibron", p. 25) pdf en: <http://www.ssarherps.org/pdf/HOH/HoH32.pdf>
- Bertho, S., Pasquier, J., Pan, Q., Trionnaire, G., Bobe, J., Postlethwait, J.H., Pailhoux, E., Scharl, M., Herpin, A., Guiguen, Y. 2016. Foxl2 and Its Relatives Are Evolutionary Conserved Players in Gonadal Sex Differentiation. *Sex Dev.* 10, 111-129.
- Bondavalli, C., Ulanowicz, R.E. 1999. Unexpected Effects of Predators upon Their Prey: The Case of the American Alligator. *Ecosystems*, 2: 49–63.
- Botello, A. V., Ponce-Vélez, G., Villanueva, S. 1999. Procesos de contaminación en el Sureste de México. *Rev. Mex. Hist. Nat.* 49, 57–73.
- Braat, A. K., Zandbergen, T., Van de Water, S., Goos, H. J., Zivkovic, D. 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev Dyn.* 216,153-167.
- Brochu C. 2001. Congruence between physiology, phylogenetics and the fossil record on crocodylian historical geography. 9-28 pp. *En: Crocodylian Biology and Evolution* (eds. Grigg, G. C., Seebacher, F. y Franklin, C.E.).
- Bull, J.J. 1980. Sex determination in reptiles. *Review Biology.* 5, 3-21.
- Bull, J.J. 1985. Sex determining mechanisms: An evolutionary perspective. *Experientia.* 41, 1285.
- Canesini, G., Stoker, C., Galoppo, G. H., Durando, M. L., Tschopp, M. V., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M. M., Ramos, J. G., 2018. Temperature- vs. estrogen-induced sex determination in *Caiman latirostris* embryos: Both females, but with different expression patterns of key molecules involved in ovarian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 259,176-188.
- Capel, B., 2017. Vertebrates sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nat. Rev. Genet.* 18, 675-690.
- Casas-Andreu, G., Barrios-Quiroz, G., Macías-Ríos, R. 2011. Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Rev Mex Biod.*, 82: 261-273.

- Cedeño-Vázquez, J. R., J. Perran Ross y S. Calmé. 2006. Population status and distribution of *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in Southeastern Quintana Roo, México. *Herpetological Natural History*. 10, 53-66.
- Cedeño-Vázquez, J.R. Rodríguez, D., Calmé, S., Ross, J.P., Densmore, L.D., Thorbjarnarson, J.B. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: I. Evidence from mitochondrial DNA and morphology. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 309, 661-673.
- Charnier, M. 1966. Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d' *Agama agama* (*Agamidae, Lacertilien*). *C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.* 160, 620-622.
- Charnov, E.L., and Bull, J.J. 1977. When is sex environmentally determined? *Nature*. 266, 828-830.
- Chassot, A.A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., Chaboissier, M.C. 2008. La activación de la señalización de beta-catenina por Rspo1 controla la diferenciación del ovario de mamíferos. *Hum Mol Genet*. 17, 1264-1277.
- Chassot, A. A., Gillot, I., Chaboissier, M. C. 2014. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction*. 148, R97-110.
- Chesnay, 1884. En <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/btv1b84507211>
- Chiang, E.F., Pai, C.I., Wyatt, M., Yan, Y.L., Postlethwait, J., Chung, B. 2001. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol*. 231, 149-63.
- CONABIO. 2005. Proposal for the reclassification of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in the Endangered Species Act (ESA) of the United States of America. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Córdova-Carrillo, A., Pérez-Sánchez, E., Rodríguez-Quevedo, F., Ovando-Hidalgo, N., Zequeira Larios, C. 2010. Agroquímicos utilizados en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla: Una afectación indirecta para el Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*). *Kuxulkab*. 17, 31-42.
- Cordero, G. A., Telemeco, R. S., Gangloff, E. J., 2018. Reptile embryos are not capable of behavioral thermoregulation in the egg. *Evol. Dev*. 20, 40-47.
- Cott, H.B. 1961. Scientific results of an inquiry into the ecology and economic status of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in Uganda and Northern Rhodesia. *Trans Zool Soc. London*, 29: 211-356.

- Coriant, A. M., Valleley, E., Ferguson, M.W. J., Sharpe, P. T. 1994. Chromosomal and temperature-dependent sex determination: The search for conserved mechanism. *The J Exp Zool.* 270, 112–116.
- Cutting, A., Chue, J., Smith, C. A. 2013. Just how conserved is vertebrate sex determination? *Dev Dyn.* 242, 380–387.
- De Felicci, M. 2010. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Mol Hum Reprod.* 16, 632–636.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P. 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol.* 18, 6653–6665.
- Deeming, D.C., Ferguson, W.M.J. 1988. Environmental regulation of sex determination in reptiles. *Phys Royal Soc.*, 322: 19-39.
- Deeming, C., Ferguson, J. 1989 a. The Mechanism of Temperature Dependent Sex Determination in Crocodylians: A Hypothesis. *Am Zool.* 29,973-985.
- Deeming, D.C., Ferguson, M.W.J. 1989 b. Effects of incubation temperature on growth and development of embryos of *Alligator mississippiensis*. *J Comp Phys.* 159:183-193 p.
- Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A., Harfush, M., Merchant-Larios, H. 2012. Formation of the genital ridges is preceded by a domain of ectopic Sox9-expressing cells in *Lepidochelys olivacea*. *Dev Biol.* 361:156–166.
- Dutta, S. K. (1949-1953). A comparative study of the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of reptiles. University of Allahabad Studies. Zoology Section. (The article is divided in 11 chapters. Chapters 1–7 appeared from 1949 to 1953. Chapters 8–11 may not have been published).
- Dodd, K., Murdock, C., Wibbels, T. 2006. Interclutch Variation in Sex Ratios Produced at Pivotal Temperature in the Red-eared Slider, a Turtle With Temperature-dependent Sex Determination. *J Herpetol.* 40, 544-549.
- Domínguez – Laso, J., L. Sigler, and O. Hinojosa, 2004. Determinación del estado actual de las poblaciones silvestres del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en Mexico y su estatus en la CITES. CONABIO – IHNE.



- Domínguez Laso, J., 2006. Determinación del estado de las poblaciones silvestres del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México y evaluación de su estatus en la CITES. Instituto de Historia Natural y Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS009. México D.F.  
En: <http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos.cgi?Letras=CS&Numero=9>.
- Duméril, Auguste (1812–1870). En: Kraig Adler (ed.) Contributions to the History of Herpetology 1, 1989, ISBN 0916984192. En: <http://www.ssarherps.org/pages/HOH/HoH43.htm>
- Duméril A., Bibron G. Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles. 9 vols. 1 atlas, Librairie Encyclopédique de Roret, Paris 1834–1854. En: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/31908649#page/9/mode/1up>
- Dutta, S.K. 1949-1953. A comparative study of the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of reptiles. University of Allahabad Studies. Zoology Section. (The article is divided in 11 chapters. Chapters 1-7 appeared from 1949-1953. Chapters 8-11 may not have been published).
- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., Penrad-Mobayed, M. 2008. Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. Dev Dyn. 237, 2996-3005.
- Ewert, M.A., Nelson, C.E. 1991. Sex Determination in Turtles: Diverse Patterns and Some Possible Adaptive Values, Copeia 1, 50-59.
- Ewert, M.A. Lang, W. J., Nelson, C.E. Geographic variation in the pattern of temperature-dependent sex determination in the American snapping turtle (*Chelydra serpentina*). J Zool. 265, 81-95.
- Ferguson, M.W., Joanen, T. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. Nature. 298, 850-853.
- Ferguson, M.W.J. 1985. Reproductive biology and embryology of crocodylians. En: Gans, C., Billett, F., Maderson PFA (eds) Biology of the Reptilia, vol 14. *Development-A Wiley*, New York, 329-491 p.
- Forbes, T.R. 1940. Studies on the reproductive system of the alligator IV. Observations on the development of the gonad, the adrenal cortex and the Müllerian duct. Cont. Embry. 28, 129-156.
- França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., Griswold, M.D. 2016. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. Andrology. 4, 189-212.

- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., Noce, T. 1994. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12258-12262.
- Gamble, T., Zarkower, D. 2012. Sex determination. *Curr Biol.* 22, 257-262.
- Ge, C., Ye, J., Zhang, H., Zhang, Y., Sun, W., Sang, Y., Capel, B., Qian, G., 2017. Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development.* 144, 2222-2233.
- Ge, C., Ye, J., Weber, C., Sun, W., Zhang, H., Zhou, Y., Cai, C., Qian, G., Capel, B., 2018. The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science.* 360, 645-648.
- Georges, A., L'Hôte, D., Todeschini, A.L., Auguste, A., Legois, B., Zider, A., Veitia, R.A. 2014. The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *Elife.* 3 doi: 10.7554/eLife.04207.
- Georges A., Holleley, C. E., 2018. How does temperature determine sex? *Science.* 360, 601-602.
- Gilbert, S.F. 2001. Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Dev Biol.* 233: 1–12.
- Gonzalez-Jauregui, M., Valdespino, C., Salame-Méndez, A., Aguirre-León, G., Rendón-von Osten, J. 2012. Persistent organic contaminants and steroid hormones levels in Morelet's crocodiles from the southern Gulf of Mexico. *Arch. Environ. Con. Tox.* 62, 445–454.
- Graham, A. 1968. The Lake Rudolf crocodile (*Crocodylus niloticus laurenti*) population. Unpublished M.Sc. Thesis, University College, Nairobi, Kenya.
- Graves, J.A. 2013. How to evolve new vertebrate sex determining genes. *Dev Dyn.* 242, 354-359.
- Gribbins, K. M., Siegel, D. S., Anzalone, M. L., Jackson, D. P., Venable, K. J., Rheubert, J. L., Eelsey, R. M. 2010. Ultrastructure of spermiogenesis in the American alligator, *Alligator mississippiensis* (Reptilia, Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Morphology* 271, 1260-127.
- Grigg, G., Gans, C. 1993. Morphology and Physiology of the Crocodylia. 326-336 pp en: *Fauna of Australia*, Vol 2A (Amphibia and Reptilia). Australian Government Publishing Service, Canberra, AU.

- Guerrero-Estévez, S., Moreno-Mendoza, N. 2012. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J Fish Biol.*, 80, 572-94.
- Harley, V.R., Clarkson, M.J., Argentaro, A. 2003. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrinol Rev.* 24, 466–487.
- Hekkala, E.R., Platt, S.G., Thorbjarnarson, J.B., Rainwater, T.R., Tessler, M., Cunningham S.W., Twomey, C., Amato, G. 2015. Integrating molecular, phenotypic and environmental data to elucidate patterns of crocodile hybridization in Belize. *R Soc Open Sci.* 2, 150409. doi: 10.1098/rsos.150409
- Inamdar-Doddamani, L. S., Vani, V., Seshagiri, P. B. 2012. A tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*, exhibiting a potentially novel FMFM pattern of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 317, 32-46.
- Jakob, S. 2010. FOXL2 represses the testis-specific enhancer of Sox9 to maintain ovary differentiation. Doctoral thesis , UCL (University College London).
- Janes, D. E., Elsey, R. M., Langan, E. M., Valenzuela, N., Edwards, S. V. 2013. Sex-biased expression of sex-differentiating genes FOXL2 and FGF9 in American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Sexual Development.* 7, 253–260.
- Joanen, T., McNease, L. 1980. Reproductive biology of the American alligator in southwest Louisiana. In J B. Murphy & J T. Collins (Eds.), *Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles* (pp. 153–159). *Contr. Herp.No. 1*). Lawrence, Kansas: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Juhász, T., Matta, C., Somogyi, C., Katona, É., Takács, R., Soha, R. F., Zákány, R. 2014. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal.* 26, 468–482.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137–138.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., Koopman, P., 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122, 2813-2822.

- Kim, S.Y., Weiss, J., Tong, M., Laronda, M.M., Lee, E.J., Jameson, J.L. 2009. Foxl2, a forkhead transcription factor, modulates non classical activity of the estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 150, 5085-93.
- Kohno, S., Parrott, B. B., Yatsu, R., Miyagawa, S., Moore, B. C., Iguchui, T., Guillette Jr L. J., 2014. Gonadal Differentiation in Reptiles Exhibiting Environmental Sex Determination. *Sex. Dev.* 8, 208-226.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., Furusawa, M. 1994. Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev Biol*. 162, 354-563.
- Kroon, F.J., Munday, P.L., Westcott, D.A., Hobbs, J.P., Liley, N.R. 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proc Biol Sci*. 272, 1399-1405.
- Kushlan, J.A. 1974. Observations on the role of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) in the southern Florida wetlands. *Copeia*. 1974, 993–996.
- Lance V. A. 1989. Reproductive Cycle of the American Alligator. *Am Zool*. 29, 999-1018.
- Landry C. R. Ecological Genomics. 2014. Springer Dordrecht Heidelberg New York London 359 pp.
- Lang, J.W. 1987. Crocodilian termal selection. En: Webb, G.J.W., Manolis, S.C., White head, P.J. *Gestion de la fauna: Crocodiles and alligators*, 301-317 p. Surrey Beatty Pty Ltd, Sydney.
- Lang, J. W., Andrews, H., Whitaker, R. 1989. Sex determination and sex ratios in *Crocodylus palustris*. *Am Zool*. 29: 935-952.
- Linder, P. 2006. Dead box proteins a family affair-active and passive players in RNA-remodeling. *Nucl Acids Res*.34, 4168-4180.
- Liu, C. F., Parker, K., Yao, H. H. 2010. WNT4/beta-catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin betaB in the mouse fetal ovary. *PloS one*, 5, e10382. doi:10.1371/journal.pone.0010382.
- López A.R. 2018. Continúan investigación por muerte de manatíes. *La Jornada*. <https://www.jornada.com.mx/ultimas/2018/09/13/continuan-investigacion-por-muerte-de-manaties-2289.html>
- López-Luna, M.A., Hidalgo-Mihar, M.G., Aguirre-León. 2011. Descripción de los nidos del cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii* en un paisaje urbanizado en el suroeste de México. *Act Zool Mex.*, 27:1-16.

- López-Luna M.A., Hidalgo-Mihart, M.G., Aguirre-León G., González-Ramón, M. C., Rangel-Mendoza J. A. 2015. Effect of nesting environment on incubation temperature and hatching success of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in an urban lake of Southeastern Mexico. *J Therm Biol.* 49, 66-73.
- Escobedo-Galván, A.H., López-Luna, M.A., Cupul-Magaña, F.G. 2016. Thermal fluctuation within nests and predicted sex ratio of Morelet's Crocodile. *J Therm Biol.* 58, 23-8.
- Lutfalla, G., Roest-Crollius, H., Brunet, F. G., Laudet, V., Robinson-Rechavi, M., 2003. Inventing a sex-specific gene: a conserved role of DMRT1 in teleost fishes plus a recent duplication in the medaka *Oryzias latipes* resulted in DMY. *J. Mol. Evol.* 57, 148-153.
- Malki, S., Bibeau, F., Notarnicola, C., Roques, S., Berta, P., Poulat, F., Boizet-Bonhoure, B. 2007. Expression and biological role of the prostaglandin D synthase/SOX9 pathway in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 255,182-193.
- Martínez-Juárez, A., López-Luna, M. A., Porrás-Gómez, T.J., Moreno-Mendoza, N., 2018. Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 330, 148-164.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., Zarkower, D. 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature.* 476, 101-104.
- Matsumoto, Y., Crews, D. 2012. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol Cell Endocrinol.* 354, 103–110.
- Matsumoto, Y., Crews, D. 2017. Genetic Polymorphisms in Aromatase (*cyp19a1*) Are Not Associated with Gonadal Phenotypes in Red-Eared Slider Turtle Hatchlings Developed at a Pivotal Temperature. *Sex Dev.* 11, 151-160.
- Matzkin, L.M. 2014. Genómica ecológica de los cambios del hospedador en *Drosophila mojavensis*. En: Landry C., Aubin-Horth N. (eds) *Genómica ecológica. Avances en medicina experimental y biología*, vol 781. Springer, Dordrech.
- Mawaribuchi, S., Musashijima, M., Wada, M., Izutsu, Y., Kurakata, E., Park, M.K., Takamatsu, N., Ito, M. 2017. Molecular Evolution of Two Distinct *dmrt1* Promoters for Germ and Somatic Cells in Vertebrate Gonads. *Mol. Biol. Evol.* 34,724–733.
- McAliley, L.R., Willis, R.E., Ray, D.A., White, P.S., Brochu, C.A., Densmore, L.D. 2006. Are crocodiles really monophyletic? Evidence for subdivisions from sequence and morphological data. *Mol Phyl Evo.* 39, 16-32.

- McCoy, J. A., Parrott, B. B., Rainwater, T. R., Wilkinson, P. M., Guillette, Jr L. J., 2015. Incubation history prior to the canonical thermosensitive period determines sex in the American alligator. *Reproduction*. 150, 279-287.
- Merediz, A.G., 1999. Ecology, sustainable use by local people and conservation of the Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Sian Ka'an Biosphere Reserve, Quintana Roo, Mexico. Tesis doctoral. State University of New York. Syracuse, New York. 58 pp.
- Melamed, E., Arnold, A.P. 2007. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. *Genome Biol.* 8, R202.
- Merchant-Larios, H., Villalpando, F., Centeno, A., Urruiza, B. 1989. Gonadal Morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herp M.* 3, 43-61.
- Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A. 2010. Gonadal Morphogenesis and Gene Expression in Reptiles with Temperature-Dependent Sex Determination. *Sex Dev.* 4, 50-61.
- Meredith, R.W., Hekkala, E.R., Amato, G., Gatesy, J. 2011. A phylogenetic hypothesis for *Crocodylus* (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Mol Phylogenet Evol.* 60, 183-191.
- Miguel-Aguilar, X., Herrera Muñoz, J., Merchant-Larios, H., Casas-Andreu, G. 1998. Efecto de la Temperatura de Incubación sobre la Actividad Esteroidogénica en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*. *Rev. Soco Mex. Hisr. Nat.* 48, 95-103.
- Minkina, A., Matson, C.K., Lindeman, R. E., Ghyselinck, N. B., Bardwell, V. J., Zarkower, D., 2014. DMRT1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation. *Dev. Cell.* 29, 511–520.
- Mitchell, T. S., Maciel, J. A., Janzen, F. J., 2013. Does sex-ratio selection influence nest-site choice in a reptile with temperature-dependent sex determination?. *Proc. Biol. Sci.* 280, 2013-2460.
- Mitchell, N. J., Nelson, N. J., Cree, A., Pledger, S., Keall, S. N., & Daugherty, C. H. 2006. Support for a rare pattern of temperature-dependent sex determination in archaic reptiles: evidence from two species of tuatara (*Sphenodon*). *Front in zool.* 3, 3-9.
- Miyagawa, S., Yatsu, R. Iguchi, T. 2018. Environmental control on sex differentiation in reptiles. En: *Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life. Part 2: Diversity in Sex Differentiation.* Springer 367-390pp.

- Moore, B., Hamlin, H., Botteri, N., Lawler, A., Mathavan, K., Guillette, Jr. 2010. Posthatching Development of *Alligator mississippiensis* Ovary and Testis. *J. Morph.* 271, 580–595.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V.R., Merchant-Larios, H. 1999. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *J Exp Zool.* 284, 705-10.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V.R., Merchant-Larios, H. 2001. Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Dev Biol.* 229, 319–326.
- Moreno-Mendoza, N., Torres-Maldonado, L., Chimal-Monroy, J., Harley, V., Merchant-Larios, H. 2004. Disturbed expression of Sox9 in pre-sertoli cells underlies sex-reversal in mice b6.Ytir. *Biol Reprod.* 70, 114-122.
- Morelet A. 1845. Description des mollusques terrestres et fluviatiles du Portugal. pp. [1–3], I–VII, 1–116, Pl. I–XIV. Paris. (Bailliere).  
En:<https://archive.org/details/descriptiondesmo00more/page/n17>
- Morelet A. 1860. Iles Açores. Notice sur l’histoire naturelle des Açores suivie d’une description des mollusques terrestres de cet archipel.  
En: <https://archive.org/details/ilesaoresnotic00more/page/n6>
- Morelet A. Índice Internacional de Nombres de las Plantas (IPNI). Real Jardín Botánico de Kew, Herbario de la Universidad de Harvard y Herbario nacional Australiano (eds.)  
En:[https://es.wikipedia.org/wiki/Pierre\\_Marie\\_Arthur\\_Morelet](https://es.wikipedia.org/wiki/Pierre_Marie_Arthur_Morelet)
- Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Ohno, T., Amano, K., Ooishi, R., Sugahara, T., Shiojiri, S., Tashiro, K., Suzuki, Y., Nishimura, R., Kuhara, S., Sugano, S., Yoneda, T., Matsuda, A., 2007. Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *J Biol Chem.* 282, 32158-32167.
- Murdock, C., Wibbels, T. 2003. Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Res.* 101, 302-308.
- Nagai, K., Saitoh, Y., Saito, S., & Tsutsumi, K. (2012). Structure and hibernation-associated expression of the transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) mRNA in the Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*). *Zoological Science.* 29, 185–190.

- Nicol, B., Grimm, S.A., Gruzdev, A., Scott, G.J., Ray, M.K., Yao, H.H. 2018. Genome-wide identification of FOXL2 binding and characterization of FOXL2 feminizing action in the fetal gonads. *Hum Mol Genet.* 27, 4273-4287.
- Nishino, K., Hattori, N., Tanaka, S., Shiota, K. 2004. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *Send to J Biol Chem.* 279, 22306-13.
- Notarnicola, C., Malki, S., Berta, P., Poulat, F., Boizet-Bonhoure B. 2006. Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Exp Patt.* 6, 695-702 .
- Oreal, E., Pieau, C., Mattei, M. G., Josso, N., Picard, J. Y., Carré-Eusèbe, D., Magre, S., 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn.* 212, 522-532.
- Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J.E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G, Schlessinger D. 2005. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 14:2053–2062.
- Pacheco-Sierra, G., Gompert, Z., Domínguez-Laso, J., Vázquez-Domínguez, E. 2016. Genetic and morphological evidence of a geographically widespread hybrid zone between two crocodile species, *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii*. *Mol Ecol.* 25, 3484-3498.
- Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pépin, B., Cotinot, C., Veitia, R., Pailhoux, E., 2006. Activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol. Endocrinol.* 36, 399-413.
- Parrott, B.B., Kohno, S., Cloy-McCoy, J.A., Guillette, L.J. Jr. 2014. Differential incubation temperatures result in dimorphic DNA methylation patterning of the SOX9 and aromatase promoters in gonads of alligator (*Alligator mississippiensis*) embryos. *Biol Reprod.* 9; 2.
- Pezaro, N., Doody, J.S., Thompson, M.B. 2017. The ecology and evolution of temperature-dependent reaction norms for sex determination in reptiles: a mechanistic conceptual model. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 92, 1348-1364.
- Picard, M.A., Cosseau, C., Mouahid, G., Duval, D., Grunau, C., Toulza, È., Allienne, J.F., Boissier, J. 2015. The roles of Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom. *C R Biol.* 338 451-462.



- Pieau, C. 1971. Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux Cheloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'oeufs incubés artificiellement. C. R. Acad. Sci. Paris 272(D), 3071- 3074pp.
- Pieau, C. 1972. Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Cheloniens, *Emysorbicularis* L. et *Testudo graeca* L. C. R. Acad. Sci. Paris 274(D), 71 9-722pp.
- Pieau, C. 1995. Temperature variation and sex determination in reptiles. BioEssays. 18,19-26.
- Pieau, C., Dorizzi, M., Mercier, R. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. Cell Mol Life Sci. 55, 887-900.
- Piña, C., Larriera, A., Cabrera, MR. 2003. Effect of Incubation Temperature on Incubation Period, Sex Ratio, Hatching Success, and Survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). J Herp., 37:199-202.
- Piña, C., Siroski, P., Larriera, A., Lance, V., Valverde, L. 2007. The temperatura-sensitive period (TSP) During incubation of broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*) eggs. Amph-Rep. 28,123-128.
- Place, A. R., Lang, J., Gavasso, S., Jeyasuria, P., 2001. Expression of P450 (arom) in *Malaclemys terrapin* and *Chelydra serpentina*: a tale of two sites. J. Exp. Zool. 290, 673-690.
- Platt, S.G., Thorbjarnarson, J.B. 2000. Population Status and Conservation of Morelet's Crocodile. Biol Cons. 96, 21-29.
- Platt, S.G., Rainwater, T.R. and McMurry, S.T. 2002. Diet, gastrolith acquisition, and initiation of feeding among hatchling Morelet's crocodiles in Belize. Herp J. 12, 81–84.
- Platt, S.G., Rainwater, T.R., Finger, A.G., Thorbjarnarson, J.B., Anderson, T.A. and McMurry, S.T. 2006. Food habits, ontogenic dietary partitioning and observations on foraging behavior of Morelet's crocodile *Crocodylus moreletii* in northern Belize. Herp J. 16, 281-290.
- Platt, S.G., Rainwater, T.R., Snider, S., Garel, A., Anderson, T.A. and McMurry, S.T. 2007. Consumption of large mammals by *Crocodylus moreletii*: Field observations of necrophagy and interspecific kleptoparasitism. Southwestern Naturalist. 52, 310-317.
- Platt, S.G., Rainwater, T.R., Thorbjarnarson, J.B., McMurry, S.T. 2008. Reproductive dynamics of a tropical freshwater crocodylian: Morelet's crocodile in northern Belize. J Zool. 275, 177-189.

- Platt, S.G., Sigler, L. and Rainwater, T.R. 2010. Morelet's Crocodile *Crocodylus moreletii*. Pp. 79-83 in Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Third Edition, ed. by S.C. Manolis and C. Stevenson. Crocodile Specialist Group: Darwin.
- Qin, Y., Bishop, C.E. 2005. Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. Human Molecular Genetics, 14, 1221–1229.doi: 10.1093/hmg/ddi133
- Ramsey M, Shoemaker CM, Crews D. 2007. Gonadal expression of Sf1 and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. Differentiation. 75, 978–991.
- Ramsey, M., Crews, D., 2009. Steroid signalling and temperature-dependent sex determination- Revising the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. Semin.Cell. Dev. Biol. 20, 283-292.
- Rhen, T., Lang, J. W., 1995. Phenotypic plasticity for growth in the common snapping turtle: effects of incubation temperature, clutch and their interaction. Am Nat. 146, 726-747.
- Rhen T, Metzger K, Schroeder A, Woodward R. 2007. Expression of putative sex-determining genes during the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Sex Dev. 1, 255–270.
- Rice, E. S., Kohno, S., John, J. S., Pham, S., Howard, J., Lareau, L. F., O'Connell, B. L., Hickey, G., Armstrong, J., Deran, A., Fiddes, I., Platt, R. N., Gresham, C., McCarthy, F., Kern, C., Haan, D., Phan, T., Schmidt, C., Sanford, J. R., Ray, D. A., Paten, B., Guillette, L. J. Jr., Green, R. E., 2017. Improved genome assembly of *American alligator* genome reveals conserved architecture of estrogen signaling. Genome. Res. 27, 686-696.
- Rivera-Téllez, E., G. López Segurajáuregui, L. A. Antaño Díaz y H. Benítez Díaz. 2017. Informe del Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano en México, temporadas 2014 a 2015 y análisis de tendencias del 2011 al 2015. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México 35.pp
- Rodriguez, D., J.R. Cedeño-Vázquez, M.R.J. Forstner y L.I.D. Densmore III. 2008. Hybridization between *Crocodylus acutus* and *Crocodylus moreletii* in the Yucatan Peninsula: II. Evidence from Microsatellites. Journal of Experimental Zoology 309A: 674-686.
- Roos, C.A. 1987. *Crocodylus moreletii* Dumeril and Bibron Morelet's crocodile. Catalogue of American Amphibians and Reptiles.407.3 p.

- Ross, J.P. 2000. *Crocodylus moreletii*. En: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2010.1
- Roos, J., Aggarwal, R.K., Janke. 2007. Extended mitogenomic phylogenetic analyses yield new insight into crocodylian evolution and their survival of the Cretaceous Tertiary boundary. *Mol Phylo Evo.* 45, 663–673.
- Salame-Méndez, A., F. Méndez-de la Cruz, G. Aguirre-León & H. Serrano. 2008. Disrupción endocrina de la diferenciación sexual. *ContactoS.* 70, 43-49.
- Sánchez, O., Álvarez-Romero, J. 2006. Conservation Status of the Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in México: a proposal for its reclassification in the U. S. Endangered Species Act (ESA). 255 -264 pp. En: Crocodiles. Proceedings of the 18th working meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN. The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, Inglaterra. [http://iucncsg.org/ph1/modules/Publications/proceedings/CSG\\_18th\\_Proceedings\\_2006.pdf](http://iucncsg.org/ph1/modules/Publications/proceedings/CSG_18th_Proceedings_2006.pdf). Scientific Commission's voyage to Morea. Archived 2013-12-02 at the Wayback Machine.
- Sánchez Herrera, O., G. López Segurajáuregui, A. García Naranjo Ortiz de la Huerta y H. Benítez Díaz. 2011. Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 270 pp.
- SERNAPAM. México, Tabasco. Recuperado el 21 de julio de 2016 de <http://sernapam.tabasco.gob.mx/>
- Seebacher, A. F., Craig, E. F., 2005. Physiological mechanisms of thermoregulation in reptiles: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 175, 533–541.
- Seebacher, F., Murray, S. A., 2007. Transient receptor potential ion channels control thermoregulatory behaviour in reptiles. *PLoS One.* 2, e281
- Seydoux G, Strome S. 1999. Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development.* 126, 3275-3283.
- Shapiro B.J. 2014. Signatures of Natural Selection and Ecological Differentiation in Microbial Genomes. In: Landry C., Aubin-Horth N. (eds) *Ecological Genomics. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 781. Springer, Dordrecht

- She, Z.Y., Yang, W.X. 2014. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J Mol Endocrinol.* 53, 21-37.
- Shine, R., Elphick, M.J., Donnellan, S. 2002. Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. *Ecol Lett.* 4, 486–489.
- 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. *Dev Dyn.* 236, 1055–1063.
- Shoemaker-Daly, C., Crews, D. 2009. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature dependent sex determination in reptiles. *Sem Cell Dev Biol.* 20, 293–303.
- Shoemaker-Daly, C.M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., Crews, D. 2010. Genetic Network Underlying Temperature-Dependent Sex Determination Is Endogenously Regulated by Temperature in Isolated Cultured *Trachemys scripta* Gonads. *Dev Dyn.*, 239: 1061–1075.
- Shigeru, K., Takashi, M. 2010. Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation. *Science.* 329,1616-1620.
- Sigler L., León-Ojeda F., Domínguez-Lazo J., López-Ozuna L., Lavín-Murcio P. y O. Hinojosa. 2002. Surveys of wild populations of Morelet's crocodile *Crocodylus moreletii* in several states of the Mexican Republic. 16th Working meeting of the Crocodile Specialist Group from the I.U.C.N. Gainesville, Florida, EUA.
- Smith, C.A., Joss, M.P. 1993. Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature-dependent sex determination. *Cell Tissue Res.* 273, 149–162 .
- Smith, C.A. Elf, P. Lang, W.J., Joss, M.P. 1995. Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation.* 58, 281-290.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., Sinclair, A. H., 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature.* 461, 267-271.
- Spotila, J. R., Spotila, L.D. 1994. Molecular mechanisms of TSD in Reptiles: A search for the magic bullet. *J Exp Zool.* 270, 117-127.
- Spotila, L. D., Spotila, J. R., Hall, S. E. 1998. Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* 281, 417-427.

- Sultan, S.E. 2007. Development in context, the timely emergence of eco-devo. *Trends Ecol Evo.* 2211, 575-582.
- Sun, D., Zhang, Y., Wang, C. Hua, X., Zhang, X.A., Yan, J. 2013. Sox9-related signaling controls zebrafish juvenile ovary–testis transformation. *Cell Death Dis.* 11, e930.
- Sun, B.J., Li, T., Gao, J., Ma, L., Du, W.G. 2015. High incubation temperatures enhance mitochondrial energy metabolism in reptile embryos. *Sci Rep.* 5, 8861.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T. 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841-853.
- Tang, W.Q., Mu, Y., Valenzuela, N., Du, W.G. 2017. Effects of Incubation Temperature on the Expression of Sex-Related Genes in the Chinese Pond Turtle, *Mauremys reevesii*. *Sex Dev.* 11, 307-319.
- Teilmann, S. C., Byskov, A. G., Pedersen, P. A., Wheatley, D. N., Pazour, G. J., Christensen, S. T. 2005. Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Mol Reprod Dev.* 71, 444–452.
- Teranishi, M., Shimada, Y., Hori, T., Nakabayashi, O., Kikuchi, T., Macleod, T., Pym, R., Sheldon, B., Solovei, I., Macgregor, H., Mizuno, S. 2001. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chromosome Res.* 9, 147-165.
- Tista-Olmos, C. 1999. Membrana nictitante, tercer párpado y brillo. *Imagen Veterinaria*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Tokunaga, S. 1985. Temperature – Dependent Sex Determination in *Gekko japonicus* (*Gekkonidae*, *Reptilia*). *Develop, Growth and Differ.* 27, 117-120.
- Trukhina A.V., Lukina N.A., Wackerow-Kouzova N.D., Smirnov A.F. 2013. The variety of vertebrate mechanisms of sex determination. *Biomed Res Int.* 587460/1-8.
- Uda, M, Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J.E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D., Pilia, G. 2004. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 13, 1171-1181.
- Uhlenhaut, N.H., Treier, M. 2006. Foxl2 function in ovarian development, *Molecular Genetics and Metabolism.* 88, 225-34 p.

- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., Riethmacher, D., Schütz, G., Cooney, A.J., Lovell-Badge, R., Treier, M. 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*.139, 1130-1142.
- Uribe, M.C., Guillette, J. 2000. Oogenesis and Ovarian Histology of the American Alligator: *Alligator mississippiensis*. *J Morph*. 245, 225-240.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A. P., 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 397, 405-409.
- Valleley, E. M., Cartwright, E. J., Croft, N. J., Markham, A. F., Coletta, P. L., 2001. Characterization and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J. Exp. Zool*. 291, 85-91.
- Valverde, T., Cano-Santana, Z. Meave, J., Carabias, J. 2005. *Ecología y Medio Ambiente*. PEARSON Prentice Hall, México. 230 p.
- Vargas, A.O., Kohlsdorf, T., Fallon, J.F., Vanden-Brooks, J., Wagner, G.P. 2008. The Evolution of HoxD-11 Expression in the Bird Wing: Insights from *Alligator mississippiensis*. *PLoS ONE*. 3, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003325>.
- Viets, B.E., Ewert, M.A., Talent, G.L., Craig, E.N. 1994. Sex determining Mechanisms in Squamate Reptiles, *The Journal of Exp Zool* 270, 45-56.
- Waddington, C.H. 1959. Evolutionary systems-animal and human. *Nature*. 183, 1634–1638.
- Warner, D.A. 2011. Capítulo 1: Hormones and reproduction of vertebrates. En Vol 3 Reptiles, Elsevier. 1-38 pp.
- Warner, D. A., Mitchell, T. S., Bodensteiner, B. L., Janzen, F. 2017. The effect of hormone manipulations on sex ratios varies with environmental conditions in a turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Integr. Physiol*. 327, 172-181.
- Wang, D. S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K., Nagahama, Y. 2007. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol Endo*. 21, 712-725.
- Webb, G.J., Beal, W.A.M., Manolis, S.C., Dempsey, K.E. 1987. The effects of incubation temperature on sex determination and embryonic development rate in *Crocodylus johnstoni* and *C.*

*porosus*. En: Wild Management: *Crocodylus* and *Alligators*. G.J.W. Webb, S.C. Manolis, and P.J. Whitehead, eds. Surrey Beatty and Sons, Sydney, 507-531 p.

Wertheim, K.Y., Roose, T. Can VEGFC Form Turing Patterns in the Zebrafish Embryo? Bull Math Biol. 3, doi:10.1007/s11538-018-00560-2.

Western, P.S., Harry, J.L., Graves, J.A., Sinclair, A.H. 1999. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. Dev Dyn. 216, 411-419.

West-Eberhard, M.J. 2003. Developmental plasticity and evolution. Oxford University Press, New York

West-Eberhard, M.J. 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. Proc Natl Acad Sci USA. 102, 6543–6549.

Windig, J., De Kovel, C., De Jong, G. 2003. Genetics and mechanics of plasticity. In: DeWitt T, Scheiner S (eds) Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches. Oxford University Press, New York

Wolf, Jochen BW; Bryk, Jarosław (2011-02-01). "General lack of global dosage compensation in ZZ/ZW systems? Broadening the perspective with RNA-seq". BMC Genomics. 12, 91. .

Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., Kitano, T. 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Biochem Biophys Res. Commun. 359, 935–940.

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., Fukuta, N., Katsu, Y., Ohta, Y., Tominaga, M., Guillet, L. J. Jr, Iguchi, T., 2015. TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. Sci Rep. 18, 18581.


Yntema, C.L. (1976). Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydraserpentina*. J. Morph. 150, 453-462pp.

Yoshimoto, S., Okada, E., Oishi, T., Numagami, R., Umemoto, H., Tamura, K., Kanda, H., Shiba, T., Takamatsu, N., Ito, M. 2006. Expression and promoter analysis of *Xenopus* DMRT1 and functional characterization of the transactivation property of its protein. Dev Growth Differ. 48, 597-603.

## **ANEXOS**



# Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*

Adriana Martínez-Juárez<sup>1</sup> | Marco A. López-Luna<sup>2</sup> | Tania J. Porras-Gómez<sup>1</sup> | Norma Moreno-Mendoza<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, Mexico

<sup>2</sup>División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, Mexico, Mexico

## Correspondence

Norma Moreno-Mendoza, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228 México, D.F. 04510 México, Mexico.

Email: angelica@biomedicas.unam.mx

## Funding Information

Grant sponsor: UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN205515; Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 288797/254969.

## Abstract

The *Sox9* gene is important for determining sex in vertebrates, as well as for maintaining testis morphology and fertility during adult life. In the same way, *Vasa* is an important gene for the maintenance of the germinal lineage and has been highly conserved throughout evolution, as it is expressed in germ cells of both vertebrates and invertebrates. In the particular case of crocodiles, the expression of *Sox9* during gonadal morphogenesis and in the testes of 3-month-old *Alligator mississippiensis* has been studied. However, it is interesting to carry out studies on other species of crocodiles in relation to their particular mechanism for sex determination influenced by temperature. In this work, we investigated the expression of the *Sox9*, *Vasa*, *Foxl2*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of 5-year-old juvenile crocodiles from *Crocodylus moreletii*. As expected, *Sox9* expression was found in males, but surprisingly, it was also found in females. For the first time, the expression of *Vasa* was reported in spermatogonia, oogonia, and oocytes of 5-year-old crocodiles. *Foxl2* is important for the development and maintenance of the ovary during adult life in vertebrates; moreover, *Foxl2* protein and transcripts are both highly expressed in the ovaries compared to the testes. A possible upstream regulator of the *Sox9* gene in reptiles has not yet been discovered; as such, the expression of the *TRPV4* ion channel was evaluated. The *TRPV4* ion channel was expressed in the cytoplasm of Sertoli and follicular cells and was therefore proposed as a possible regulator of *SOX9*.

## KEYWORDS

crocodile, ovary, *Sox9*, temperature-dependent sex determination, testes, *TRPV4*

## 1 | INTRODUCTION

The *SOX9* transcription factor has been highly conserved throughout the evolution of vertebrates, including reptiles (Nagai, 2001; Soullier et al., 1999). *SOX9* is a member of the *SOX* family of transcription factors and has a high mobility group-boxDNA-binding domain and two transactivation domains (Harley, Clarkson, & Argentaro, 2003). It is expressed in the nuclei of Sertoli cells after 11.5 days of embryonic development of mouse and is necessary for the differentiation of this cell lineage, as well as for the formation of the seminiferous tubules in morphogenesis of the testis. *SOX9* also directly interacts with the steroidogenic factor type 1 to induce anti-Müllerian hormone expression and promote the regression of Müllerian ducts during morphogenesis of the male reproductive tract (De Santa Barbara et al., 1998; She et al., 2014). In mouse, *SOX9* expression and function have been widely characterized during the fetal (She et al., 2014) and adult (Qin

et al., 2005) stage. In particular, *SOX9* expression in sexual determination during early embryogenesis has also been described for turtles, such as *Lepidochelys olivacea* and *Trachemys scripta*, and for the alligator, *Alligator mississippiensis* (Moreno-Mendoza, Harley, & Merchant-Larios, 1999; Shoemaker-Daly, Jackson, Yatsu, Matsumoto, and Crews, 2010; Western, Harry, Graves, & Sinclair, 1999). However, it is still unclear how *SOX9* involvement in the post-hatching and adult stages is regulated, as reptiles with temperature-dependent sex determination (TSD) lack the *SRY* gene, which is an upstream regulator of *SOX9* in mammals (Coriant, Valleley, Ferguson, & Sharpe, 1994).

The testicles of crocodiles were described for the first time by Hans Sloane, in 1725, and in alligators (*A. mississippiensis*) from Louisiana, and since then, little work on their morphology has been undertaken (Gribbins et al., 2010; Lance, 1989; Moore et al., 2010). During reproduction, it has been observed that testicular mass increases in size and spermatogenesis initiates, and live spermatozoa are found in the sulcus

of the penis. The testicles are located in the upper part of the abdominal cavity that is covered by the tunica albuginea, and the seminiferous tubules are found in the parenchyma, which consists of germline cells at different stages, for example, spermatogonia, spermatocytes, spermatids, and spermatozoa (Gribbins et al., 2010; Lance, 1989; Moore et al., 2010). In mouse and other vertebrates, it is known that these cell types express the ATP-dependent RNA helicase VASA (Fujiwara et al., 1994; Tanaka et al., 2000). This protein is used as a specific marker of the germline at the fetal and adult stages. Adjacent to these germline cells are the Sertoli cells; in adult mice, Sertoli cells express the *Sox9* gene, which maintains the morphology and fertility of the testis (França, Hess, Dufour, Hofmann, & Griswold, 2016; Qin et al., 2005). The seminiferous tubules are surrounded by connective tissue and Leydig cells, which are located in the interstitium and are responsible for the production of testosterone (Lance, 1989; Wen, Cheng, & Liu, 2016).

The *Sox9* gene can be synergistically and negatively regulated by two independent pathways: WNT4/RSPO1 and the transcription factor Forkhead box L2 (FOXL2), which allow the development of an ovary during embryogenesis (Uhlenhaut et al., 2009; She et al., 2014). In turn, in adult mice, the transcription factor FOXL2 prevents the transdifferentiation of granulosa cells into Sertoli cells thus making it a very important element for maintaining adult ovary morphology in several vertebrate species (Bertho et al., 2016; Uhlenhaut et al., 2009).

The crocodile ovary was first described by Dutta in 1949 in *C. palustris* and later by Joanen and McNease in 1980 in *A. mississippiensis* (Dutta, 1949-1953; Joanen et al., 1980). This organ is located in the dorsal wall of the peritoneum, and histologically, it is composed of two regions: the ovarian cortex and the marrow. The ovarian cortex contains oogonia and follicles at different stages, that is, previtellogenic, vitellogenic, luteal bodies, and atretic, that are classified on the basis of morphological and cytoplasmic characteristics (Uribe et al., 2000). Expression of the VASA protein has been reported at all stages of oogenesis in species such as *Xenopus laevis* and *Danio rerio* (Braat, Zandbergen, Van de Water, Goos, & Zivkovic, 1999; Komiya, Itoh, Ikenishi, & Furusawa, 1994). In the case of the mouse, the *Vasa* gene is expressed in germ cells and stem cells that are thought to possibly differentiate into oocytes (De Felici, 2010). Follicular development in crocodiles involves the maturation and differentiation of granulosa cells; in mammals, the *Foxl2* gene plays an important role in this process and in maintaining fertility in the adult ovary (Uhlenhaut et al., 2009). The medullary portion of the ovary is formed from connective tissue with lacunae surrounding the follicles (Uribe et al., 2000).

It is important to mention that some specific physiological processes during spermatogenesis (Mizrak et al., 2008) and folliculogenesis (Teilmann et al., 2005) are regulated by ion channels from the Transient Receptor Potential (TRP) superfamily. TRPV4, a cationic channel that belongs to this family, is involved in the regulation of many homeostasis processes and is expressed in several types of tissues (Darby, Grace, Baratchi, & McIntyre, 2016). Likewise, the expression of TRPV4 mRNA has been observed in *A. mississippiensis* embryos during the temperature-sensitive period, when they are sexually determined (Yatsu et al., 2015, 2016). Thus, TRPV4 is considered to possibly play an important role in the regulation of testicular

morphology via upstream regulation of the activity of the transcription factor SOX9, as this has been demonstrated in other physiological processes, such as chondrogenesis (Muramatsu et al., 2007).

The regulation of *Sox9* gene expression, either positive in the testis or negative in the ovary of vertebrates, is fundamental to maintaining all the physiological processes of those tissues involved in reproduction. The aim of our work was therefore to characterize the expression of the *Sox9* and *Foxl2* genes as well as the TRPV4 ion channel in the ovaries and testicles of 5-year-old crocodiles using the RNA helicase VASA as a germline marker, correlating our results with the ultrastructure of these tissues. As expected, *Sox9* expression was found in males, but surprisingly, it was also found in females. For the first time, the expression of *Vasa* is reported in spermatogonia, oogonia, and oocytes of 5-year-old crocodiles. Both protein and transcripts of the *Foxl2* gene are highly expressed in the ovaries compared to the testes. A possible upstream regulator of the *Sox9* gene in reptiles has not yet been discovered; as such, the expression of the TRPV4 ion channel was evaluated. The TRPV4 ion channel was expressed on the membrane of Sertoli and follicular cells and is therefore proposed as a possible regulator of SOX9.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Tissue collection

Ovaries were obtained from two females and testicles were obtained from three males of *Crocodylus moreletii*, originating in Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco, México. These organisms were collected in May 2016 when the species was in breeding season. The SEMARNATSGPA/DGVS/05531/16 permits used were part of a programme to evaluate the reproductive biology of this species, as they are under special protection as an endangered species. Animals were sacrificed by injecting 5 ml of lidocaine into the brain. The ovaries and testes were then surgically removed and cut into several pieces. A fragment was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence, and another fragment in Karnovsky's fixative to perform light and electron microscopy. Finally, other fragments were frozen prepared for total RNA extraction and Western blot analysis. Samples were transported to the Institute of Biomedical Research of the UNAM and processed as described in the following.

### 2.2 | Light and electron microscopy

Fragments of ovaries and testicles were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965) for 24 hr at 4°C and were then transferred into sodium cacodylate buffer (0.1 M pH 7.4) and stored for 24 hr at 4°C. Subsequently, gonads were post-fixed in osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 1 hr and dehydrated in 70%–100% ethanol solutions (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. of México, México). They were then placed in acetonitrile (J.T. Baker) twice for 20 min each and incubated in dilutions of the Embed 812 resin (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA)-acetonitrile (J.T. Baker) 1:1 for 1 hr and 2:1 for another hour. Finally, samples were incubated in pure Embed 812 resin

for 24 hr and polymerized in plastic blocks at 60°C for 24 hr. For each sample, semi-thin sections of 1- $\mu$ m thickness and 60-nm thickness were obtained using a Leica ultramicrotome (Wetzlar, Germany). The semi-thin sections were stained with toluidine blue, mounted with Cytoseal mounting medium (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) and observed under a light microscope (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). The fine sections were placed on copper grids with a diameter of 3 mm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEOL 1010 transmission electron microscope (JEM-1010; JEOL, Tokyo, Japan).

### 2.3 | Immunohistochemistry

Frozen samples were cut into 14- $\mu$ m-thick sections and washed with 1  $\times$  PBS for 10 min. Endogenous peroxidase was inactivated with 3% hydrogen peroxide (J.T. Baker) in methanol for 30 min. Sections were then washed with 1  $\times$  PBS for 5 min and 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) was added for 10 min. Sections were then washed with 1  $\times$  PBS, blocked with 1% albumin for 2 hr and incubated overnight with FOXL2 primary antibody (sc-68348; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at a 1:50 dilution. The next day, sections were washed four times in 1  $\times$  PBS for 5 min each. The Vector AB kit was used and sections were incubated with the anti-rabbit secondary antibody at a 1:100 dilution in 1% albumin (Sigma-Aldrich) for 1 hr at room temperature. Sections were washed four times in 1  $\times$  PBS for 5 min each and then were placed in the AB reagent prepared following the Vector AB kit instructions (Vectastain ABC Kit, Burlingame, CA). Sections were washed again four times in 1  $\times$  PBS for 5 min each and finally were developed with Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) for 4 min. Slides were allowed to dry at room temperature and were mounted using Cytoseal mounting medium.

### 2.4 | Immunofluorescence

Ovary and testis fragments were fixed in PFA (4% in 1  $\times$  PBS pH 7.1) for 30 min, washed with 1  $\times$  PBS for 5 min and placed in sucrose (30% PBS 1  $\times$  pH 7.1, Sigma-Aldrich) at 4°C overnight. Samples were soaked in optimum mounting medium for frozen sections (OCT, Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA) and frozen in hexane (J.T. Baker) at -70°C. Subsequently, we obtained 20- $\mu$ m sections in a cryostat (Leica GmbH, Heidelberg, Nussloch, Deutschland). Immunofluorescence was performed as previously described by Moreno-Mendoza et al. (1999). Briefly, sections were treated with Triton X-100 (1% in 1  $\times$  PBS pH 7.1) for 10 min, washed with 1  $\times$  PBS and blocked for 2 hr with 1% bovine serum albumin (BSA, 1% in 1  $\times$  PBS pH 7.1). Sections were incubated separately with polyclonal antibodies against SOX9 (1:250, AB5535; Millipore, Burlington MA), TRPV4 (1:250, ab94868; Abcam, Cambridge, MA), VASA (1:50, ab13840; Abcam), and Laminin (1:200, rabbit ab11575; Abcam), diluted in 1% albumin, overnight at 4°C. They were then washed four times with 1  $\times$  PBS for 5 min and incubated with antibodies against cyanine 3 (Cy3) (1:200, A10520; Life Technologies, Carlsbad, CA), Cy5 (1:100, A10523; Molecular Probes, Eugene, OR) and/or anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:50, 81611; Invitrogen, Carlsbad, CA) diluted in albumin/1  $\times$  PBS for 1 hr at room

temperature. For the simultaneous detection of the SOX9-Laminin proteins, post-fixation with 4% PFA was performed for 15 min. Sections were then washed with 1  $\times$  PBS, incubated with 1% Triton X-100 for 5 min, washed again with 1  $\times$  PBS and blocked for 2 hr with 1% BSA. Subsequently, sections were then incubated with the anti-Laminin antibody, and the washes and secondary antibody incubations were repeated. Finally, permanent fluorescence assembly medium (Dako™, Carpinteria, CA) was added and samples were stored at 4°C for further analysis under a Zeiss confocal microscope (LSM Pascal; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) equipped with argon-krypton and helium-neon, employing filters for FITC and Cy3 and the Nomarski interference contrast technique.

### 2.5 | Detection of $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD activity

Fourteen-micron-thick sections were obtained from the tissues included in Tissue-Tek, and incubated at 37°C in histoenzymatic detection medium of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD composed of 20 mg of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ -NAD; N1636-250; Sigma-Aldrich), 20 mg of Nitro Blue Tetrazolium (N5514-10; Sigma-Aldrich) and 2 mg of dehydroisoandrosterone (D-4000; Sigma-Aldrich) for 1 hr. Sections were washed with distilled water and mounted in a permanent aqueous medium (Dako™) for observation under a light field microscope (Levy, Deane, & Rubin, 1959). As a positive control for the reaction, adult mouse testis sections of CD1 strain were used, where very specific  $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD activity has resulted in Leydig cells.

### 2.6 | Amplification by RT-PCR

Total RNA extraction from ovaries and testes of *C. moreletii* was performed using the TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The total RNA obtained was diluted in H<sub>2</sub>O treated with diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma-Aldrich) and stored at -70°C. The concentration and purity of the samples were obtained using a UV light spectrophotometer (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg, Germany). To confirm the integrity of the samples, 1  $\mu$ g of total RNA was run on a 1.5% agarose gel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) in 1  $\times$  TAE solution (Tris-acetic acid-EDTA). To eliminate contamination with genomic DNA, 1  $\mu$ g of RNA was treated with the enzyme DNase I (Invitrogen), following the protocol suggested by the manufacturer.

DNA coding synthesis (cDNA) was carried out using the M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). The reaction mixture was prepared with 1  $\mu$ g of total RNA, 4  $\mu$ l of first-strand buffer (5  $\times$ ), 2  $\mu$ l of dNTP mix (10 mM), 1  $\mu$ l of random primers (0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l of DTT (0.1 M), 1  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 20 U RNase OUT™ and 200 U of M-MLV enzyme. The solution was incubated at 37°C for 60 min and at 65°C for 5 min in a MyCycler™ thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA). Amplification of specific fragments was performed with the Taq DNA Polymerase Recombinant Kit (Invitrogen). A volume of 4  $\mu$ l of cDNA was used in a final volume of 20  $\mu$ l of a mixture containing 9.7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O DEPC, 2  $\mu$ l Buffer (10  $\times$ ), 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ l dNTPs mix (10 mM), 1.5 U Taq Polymerase and 1  $\mu$ l of each specific oligonucleotide (20  $\mu$ M). PCR conditions for all

**TABLE 1** Sequence of Primers and Annealing Temperatures used for RT-PCR

Gene	Primer 5'→3'	AL (pb)	AT (°C)	Reference
<i>Sox9</i>	F: TACGACTACACGGACCACCA	400	60	AF106572
	R: ACCTCCTGAAGGCTGCTGTA			FJ790140
<i>Foxl2</i>	F: TACTCSTACGTGGCCTSAT	251	60	Janes et al., 2013
	R: TTCTCGAACATGCTCCTCGCAGG			
<i>Vasa</i>	F: GCAGTGATGTCCAGCAGAGT	218	60	XM_014594050
	R: CCGAAGAGCTTCTCCCGTT			
<i>TRPV4</i>	F:CTTCTCCAGCCCAAGGATG	299	60	Nagai et al., 2012
	R:GTCTTGGCAGCCATCATGAG			
<i>Actin</i>	F:GGTCAGAAGAATTCCTATG	254	60	Moreno-Mendoza et al. (2004)
	R:GGTCTCAACATGATCTGGG			

Sequences employed for RT-PCR. The amplification of actin was used as a positive control. F, forward sequence; R, reverse sequence; bp, base pairs of amplified fragment; AL, amplicon length; AT, annealing temperature.

fragments were as follows: 94°C for 5 min, 40 cycles at 94°C for 40 sec, 60°C for 40 sec, 72°C for 60 sec, and a 72°C extension cycle for 5 min in a MyCycler thermocycler (Bio-Rad Laboratories). The specific oligonucleotides used for amplification of fragments are listed in Table 1. mRNA sequences reported for *A. mississippiensis* and *Crocodylus palustris* were used for the design of oligonucleotides specific to *SOX9* and *VASA* using the Primer BLAST programme (Ye, 2012). The oligonucleotides used for the amplification of the *FOXL2* gene were those reported by Janes, Elsey, Langan, Valenzuela, and Edwards, 2013. The sequence used for the oligonucleotides of the *TRPV4* gene was that reported by Nagai, Saitoh, Saito, and Tsutsumi, 2012. As a positive control, oligonucleotides were used for actin and negative reactions were performed without cDNA. The reaction products were run on a 1.3% agarose gel in 1 × TAE, viewed using a UV transilluminator (Vilber Lourmat, Torcy, France) and photographed for densitometry quantification.

## 2.7 | Densitometric analysis

Fragments corresponding to each gene were amplified in triplicate for each sample. The optical density (Intensity/mm<sup>2</sup>) for each band was quantified by densitometry using the Quantity One programme (Bio-Rad Laboratories). The optical density of each sample was normalized with respect to the corresponding actin values. The expression values for each gene are presented as arbitrary relative expression communities, obtained by the ratio of the gene of interest/actin for each sample. Relative expression values are presented as the means of independent experiments ± standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey multiple comparison test with a 95% confidence interval was performed, using the Statgraphics Centurion XV statistical programme.

## 2.8 | Sequencing of RT-PCR products

Bands corresponding to each gene were isolated from the agarose gel and purified following the protocol advised in the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). RT-PCR products were sequenced using the ABI 3730XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). The obtained sequences were analyzed with the BLASTN

programme 2.4.0 in order to obtain the percentage of similarity compared to sequences previously reported in GenBank. Sequences for the analyzed fragments were deposited in the GenBank with the following data: *sox9*, 400 pb, 495 aa, GenBank Accession No. NM\_001287268.1; *Foxl2*, 251 pb, 307 aa, Gen Bank Accession No. XM\_006258812.2; *Vasa*, 218 pb, 694 aa, Gen Bank Accession No. XM\_014594053.1.

## 2.9 | Western blot analysis

We extracted total protein from the processed tissues and the samples were used for Western blot analysis of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* proteins. For this, the tissues were gradually thawed from -20°C to 4°C and washed with 1 × PBS for 1 hr at each temperature. As the tissues were fixed in 4% PFA, lysis was performed by adding 250 μl of Tyrodes-BSA at pH 7.3 (0.2% β-mercaptoethanol, 20 μl 100 nM orthovanadate, ROCHE protease inhibitor), the comparable amounts of each tissue were homogenized and 250 μl of 2 × Laemmli lysis buffer (cat S3401; Sigma-Aldrich) was added immediately. Finally, the samples were vortexed and boiled for 5 min, a process which was repeated three more times reaching a total of 20 min. Samples were stored at -80°C until use.

Total proteins obtained from tissue lysates were separated by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Samples were run at 100 V in TRIS-Glycine-SDS buffer at pH 8.3 for 2 hr 30 min. Once electrophoresis was completed, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories) in TRIS-glycine-methanol buffer pH 8.3 at 4°C. This process was performed at 25 V with 200 mA current, for 1 hr at low temperature. At the end of the transfer, the nitrocellulose membrane was blocked with 2% skim milk (Svelty, Nestle, CDMX, México) for 24 hr. Membranes were incubated with the primary antibodies against *SOX9* (1:500), *TRPV4* (1:500), *VASA* (1:500), and *FOXL2* (1:500) overnight at 4°C under continuous agitation. The next day, the nitrocellulose membrane was washed three times for 5 min with 5 ml of the 1 × PBS pH 7.1 buffer. The membrane was then incubated with a secondary antibody coupled to anti-rabbit HRP (A16104; Invitrogen, CA, USA) for 1 hr 30 min at room temperature. The membranes were then washed again three times with 20 ml of 1 × PBS for 5 min and the protein was detected by

means of chemiluminescence BM Chemiluminescence Western Blotting Mouse/Rabbit (34075; ThermoScientific, Rockford, IL). Finally, membranes were exposed to ray plates (Amersham Hyperfilm™ ECL, Buckinghamshire, UK) for 1 to 5 min. The bands corresponding to each protein were obtained by triplicate for each sample. The optical density (Intensity/mm<sup>2</sup>) for each band was quantified by densitometry using the Quantity One programme (Bio-Rad Laboratories). The optical density of each sample was normalized with respect to the corresponding actin values. The expression values for each protein are presented as arbitrary relative expression communities, obtained by the ratio of the protein of interest/actin for each sample. Relative expression values are presented as the means of independent experiments ± standard deviation. One-way ANOVA, followed by a Tukey multiple comparison test with a 95% confidence interval was performed, using the Statgraphics Centurion XV statistical programme.

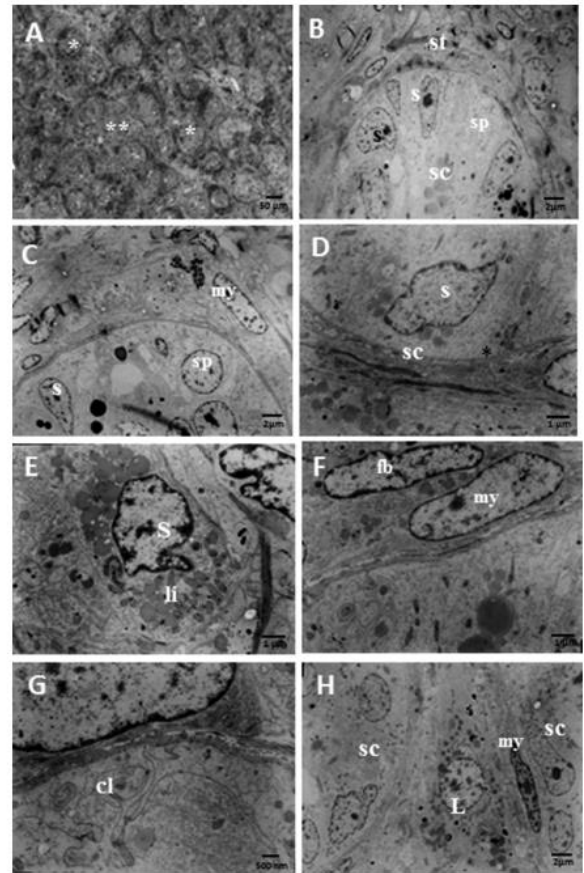
### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Morphology of the 5-year-old *C. moreletii* testis

The testes are oval-shaped organs that are histologically composed of seminiferous cords delimited by a basal membrane. Histological examination of the testes revealed that there was no lumen within the seminiferous cord (Figure 1A), but Sertoli cells (Figure 1B, D, and E) and some spermatogonia (Figure 1C) were visible inside the seminiferous cord; however, there was no evidence of spermatogenesis. These morphological characteristics resembled those described for other vertebrates during pre-puberty and in mammals. Likewise, the presence of myoid cells and fibroblasts arranged in an extracellular matrix mainly consisting of collagen fibers (Figure 1F and G) was observed towards the exterior of the seminiferous cord. The presence of Leydig cells, identified by the regular shape of their nucleus (Figure 1H) and the presence of lipid droplets, with the latter associated with their steroidogenic nature was apparent between the interstitial tissue.

#### 3.2 | Localization of SOX9, FOXL2, VASA, and the ion channel TRPV4 in the testicle of *C. moreletii*

The SOX9 protein was localized in the nucleus of Sertoli cells, which are located at the periphery of the seminiferous cords forming the blood-testis barrier (Figure 2A and D). The seminiferous cords were delimited using an antibody against Laminin, an important component of the extracellular matrix. Laminin, apart from being localized in the basement membranes of the seminiferous cords, was also distributed in the stromal compartment of the testes. Considering FOXL2, only a weak signal appeared to be localized in randomly distributed epithelial cells in the testis of *C. moreletii* (Figure 3E and F). In the case of VASA protein, its expression was observed in the cytoplasm of germ cells or spermatogonia, within the seminiferous cords (Figure 4A). Double labeling with VASA and SOX9 resulted in a similar localization. SOX9 was observed in the nuclei of Sertoli cells localized in the blood-testis barrier, and VASA was detected in the cytoplasm of spermatogonia located inside the seminiferous cord (Figure 4B and C). Expression of TRPV4

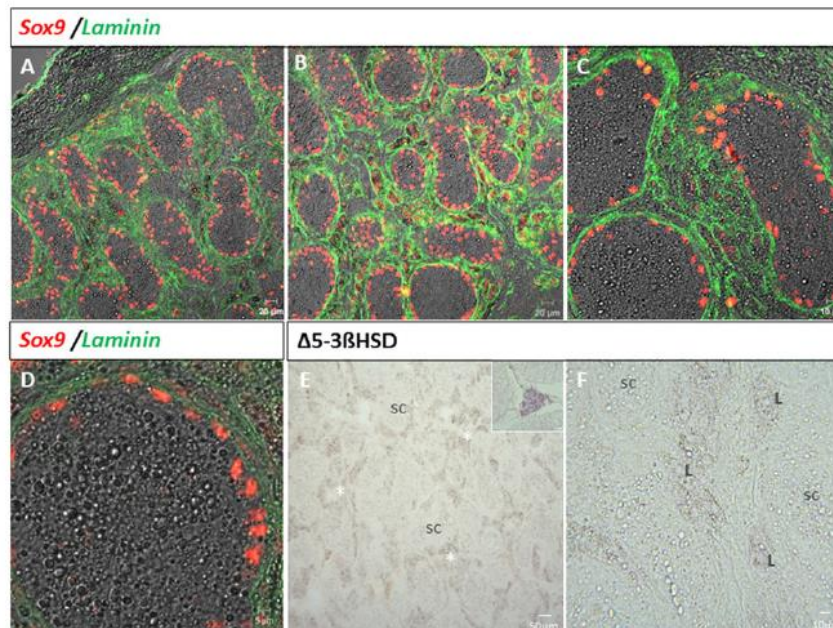


**FIGURE 1** Gross morphology and transmission electron microscopy of the testis of 5-year-old *C. moreletii*. (A) Transverse section of the testis showing testicular cords with both round (\*) and elongated (\*\*) morphology. (B) Seminiferous cord (sc) formed from Sertoli cells (s) and spermatogonia (sp). Outside the cord, the stromal compartment (st) is evident. (C) With greater amplification, we observe part of a seminiferous cord (sc) containing Sertoli cells (s) and spermatogonia (sp). In the stromal compartment, some myoid cells (my) are visible. (D) Detail of the nucleus of a Sertoli cell (s) adjacent to the basement membrane of seminiferous cord (sc). (E) A Sertoli cell (s) is shown, identified by its irregular nucleus and large amount of lipids (li) in its cytoplasm. (F) Myoid cells (my) and fibroblasts (fb) located in the stromal compartment of the testicles. (G) Collagen fibers (cl) in the cytoplasm of a myoid cell. (H) A Leydig (L) cell is shown located between two seminiferous cords (sc) and adjacent to a myoid cell (my)

ion channel protein was mainly detected on the membrane and cytoplasm of Sertoli cells, as well on the membrane of stromal cells surrounding the cords (Figure 4D and E). Double labeling with the SOX9 protein corroborated the pattern of TRPV4 expression on the membrane and in the cytoplasm of Sertoli cells located at the periphery of the testicular cords (Figure 4F).

#### 3.3 | Detection of $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity in the testis of *C. moreletii*

$\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity was detected by accumulation of formazan granular deposits as a result of hydroxysteroid hydrogen transfer to the



**FIGURE 2** Expression of SOX9 transcription factor, Laminin and detection of  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity in the testis of 5-year-old *C. moreletii* males. (A and B) Transverse section of the testis showing the seminiferous cords delimited by laminin expression (green) and SOX9 (red). (C) Amplification of B, where the nuclei of the Sertoli cells expressing the SOX9 protein can be observed in red and Laminin protein delimiting the seminiferous cords and marking the interstice of the testicle are in green. (E) Detection of  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity in interstitial cells (\*) located between the seminiferous cords (sc). Mouse testis was used as a positive control for  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD, where activity is specific in Leydig cells (insert in E). (F) Amplification of (E), where weak activity is visible in cells with characteristics of Leydig (L) cells [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

tetrazolium salt via a pyridine nucleotide (NAD<sup>+</sup>). In this way, the salt is reduced, and because the reduced form is insoluble and colored (formazan salt), it is deposited at the reaction site. We observed weak  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity in the testis of *C. moreletii* compared with the activity detected in the mouse testis that was used as a positive control for this technique. However, it was possible to detect a weak signal in the stromal compartment surrounding the testicular cords, where Leydig cells are generally located in the testis of vertebrates (Figure 2E). Analyzing the accumulation of formazan granule deposits in greater detail, these deposits were subtly detected in cells with steroidogenic cell characteristics as evidenced by lipid accumulation (Figure 2F). As a positive control of the reaction, sections of adult mouse testis were used, where activity was specifically detected in Leydig cells (insert, Figure 2E).

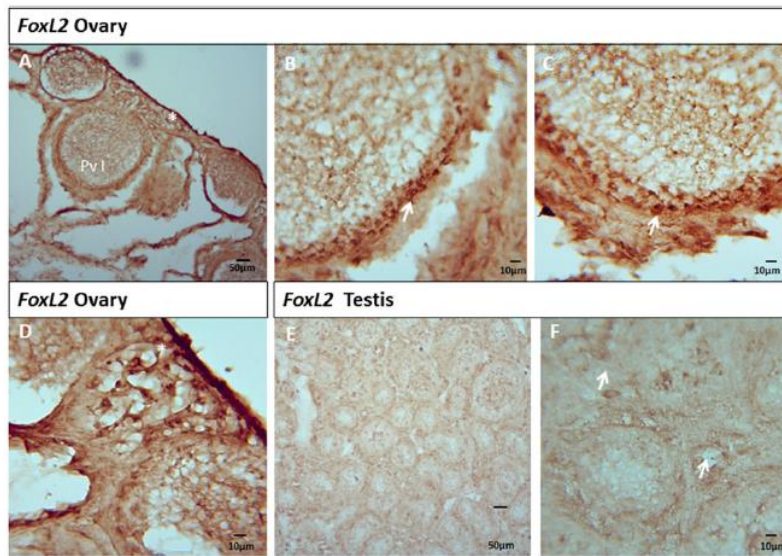
### 3.4 | Morphology of the 5-year-old *C. moreletii* ovary

Fragments of *C. moreletii* ovaries were processed for structural and ultrastructural analysis by light and electron microscopy, respectively. Oocytes were classified according to stage of development based on the description by Uribe et al. (2000) for *A. mississippiensis*. In the ovaries of *C. moreletii* females, two defining areas are evident: the stromal compartment, characterized by the presence of lacunae (Figure 5A), and the ovarian cortex (Figure 5B). The cortical surface of the ovary consists of oogonia grouped into cell niches (Figure 5D), as well as primary follicles (Figure 5C and D), where follicular somatic cells surround the oocytes and form a simple cuboidal epithelium (Figure 5E). Most of the developing follicles are at stages I, II, and III

(Figure 5B and C), which are principally characterized by increased cytoplasm in the oocyte as well as an increase in organelles such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, and ribosomes. The follicular epithelium of the developing oogonia is formed from a single layer of granulosa cells located on a basement membrane (Figure 5E and F). The follicular tissue is surrounded by theca cells arranged between the connective tissue (Figure 5F). Theca cells are, in turn, organized into cells of the inner theca, which is rich in collagen fibers, together with the vascularized outer theca (Figure 5F and I). Oocytes were apparently undergoing previtellogenesis, as shown by the accumulation of vitelline granules in the cytoplasm (Figure 5G), and the cytoplasmic projections (Figure 5H). The presence of several blood vessels also indicates that this is a highly irrigated tissue (Figure 5I).

### 3.5 | Localization of SOX9, FOXL2, VASA, and the ion channel TRPV4 proteins in the *C. moreletii* ovary

According to the methodology described, the SOX9 protein was detected by immunofluorescence in the ovaries of 5-year-old female *C. moreletii*. Surprisingly, we found the SOX9 transcription factor protein localized in the nucleus of the granulosa cells of previtellogenic oocytes, as well as in some cells that compose the theca of the ovary (Figure 6A–D). To delimit the localization of SOX9, double labeling was performed with the Laminin antibody, which confirmed the localization of SOX9 in the cell nucleus of the granulosa and some cells of the stromal compartment (Figure 6A–D). Concerning the localization of the FOXL2 protein in the ovary, it was found in the nuclei of the granulosa



**FIGURE 3** Expression of the FOXL2 transcription factor in the ovary and testis of 5-year-old *C. moreletii* individuals. (A) Cross-section of the ovary where previtellogenic oocytes I (pv I) are visible, the asterisk denotes oogonial niches. (B) and (C), amplification of (A), where nuclei of granulosa cells expressing FOXL2 (arrows) are visible. (D) Amplification of (A), where some oogonial niches are apparently being surrounded by somatic cells expressing FOXL2 (\*). (E) In the testis, only a weak FOXL2 signal was evident in some randomly distributed cells. (F) Amplification of (E) showing some cells positive to FOXL2 (arrows) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

cells of previtellogenic oocytes and surrounding some oogonial niches (Figure 3A and D). Likewise, immunofluorescence was carried out to detect the expression of VASA and TRPV4 proteins. The RNA helicase VASA was localized in the cytoplasm of oogonia grouped into cell niches (Figure 7A–C) and in the cytoplasm of type II, previtellogenic oocytes (Figure 7B). Notably, as folliculogenesis and stages of previtellogenesis progress, the expression of VASA protein decreased until it practically disappeared. The TRPV4 ion channel protein (Figure 7D–F) was localized in the cytoplasm and on the membrane of follicular cells (Figure 7E) and in ovarian stroma (Figure 7F).

### 3.6 | Detection of $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity in the *C. moreletii* ovary

In the ovaries of *C. moreletii*, deposits of formazan, which is a sign of steroidogenic activity, were detected in a few cells located in the region of the theca of the follicles (Figure 6E and F). A weak signal was also observed at the periphery of the cytoplasm of stage III previtellogenic oocytes. As in the testis of *C. moreletii*, sections of adult mouse testis were used as a positive control for the experiment, where steroidogenic activity was specifically detected in Leydig cells (insert Figure 6E).

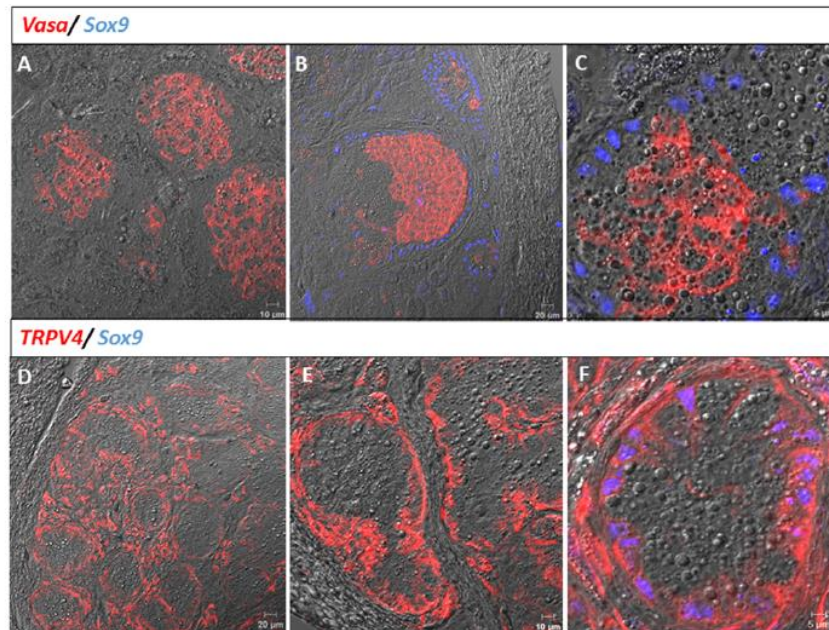
### 3.7 | Semi-quantification of *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* mRNA in female and male *C. moreletii*

Expression of the transcripts of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes was detected by end-point RT-PCR using RNA obtained from the ovaries and testes of *C. moreletii* (Figure 8). *Sox9*, *Vasa* and *Foxl2*

transcripts were observed in both ovaries and testes (Figure 8A). The relative expression levels for *Sox9*, *Foxl2*, and *Vasa* are shown in Figure 8B. Our statistical analysis showed that there are no significant differences in the expression of *Sox9* and *Vasa* between the ovary and testis, whereas *Foxl2* expression showed significant differences between the two sexes, with significantly lower expression of transcripts in the testes. In the particular case of the *TRPV4* gene, the mRNA was found in both females and males (Figure 8C), and statistical analysis did not show significant differences between the two sexes. The relative expression levels for the *TRPV4* gene are shown in Figure 8D. For sequencing of RT-PCR products, partial fragments of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes were obtained. Our sequence analysis showed that the fragments obtained are similar to sequences from reptiles and other vertebrates previously reported in GenBank. Reported sequences and similarity percentages observed for each gene are presented in Table 2.

### 3.8 | Protein quantification of SOX9, FOXL2, VASA, and TRPV4 in *C. moreletii* ovaries and testes

Protein quantification was performed using Western blot analysis (Figure 9). We observed that, similar to results obtained for the localization of the protein for the SOX9 transcription factor, SOX9 was expressed in both sexes; however, the expression of this protein was greater in the testes than in the ovaries. Additionally, as RT-PCR revealed, the expression of the transcription factor protein FOXL2 was considerably higher in the ovary compared to the levels detected in the testis. Considering the RNA helicase VASA, we observed that VASA was expressed both in the testis and the ovary; however, its levels were



**FIGURE 4** Expression of RNA helicase VASA and TRPV4 ion channel in the testis of 5-year-old *C. moreletii* males. (A) Cross-section of the testis where the expression of the RNA helicase VASA in the cytoplasm of spermatogonia is visible in red. (B) Double immunofluorescence where the cytoplasm of spermatogonia is marked in red and the nuclei of the Sertoli cells within the seminiferous cord are marked in blue. (C) Amplification of (B). (D) TRPV4 ion channel was detected on the membrane and in the cytoplasm of Sertoli cells (red). (E) A seminiferous cord marked with TRPV4 is shown at higher magnification. (F) Double labeling where the expression of Sox9 protein is detected in the nucleus of the Sertoli cells, whereas the expression of TRPV4 is presented in red, in both the cytoplasm and membrane of Sertoli cells, as well as in some cell types that make up the stromal compartment (red), such as myoid cells (my) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

higher in the testis. Similarly, expression of the TRPV4 ion channel was found in the testes and ovaries, but its expression was higher in the testis of *C. moreletii* (Figure 9B).

## 4 | DISCUSSION

### 4.1 | Sexual maturity in *C. moreletii*

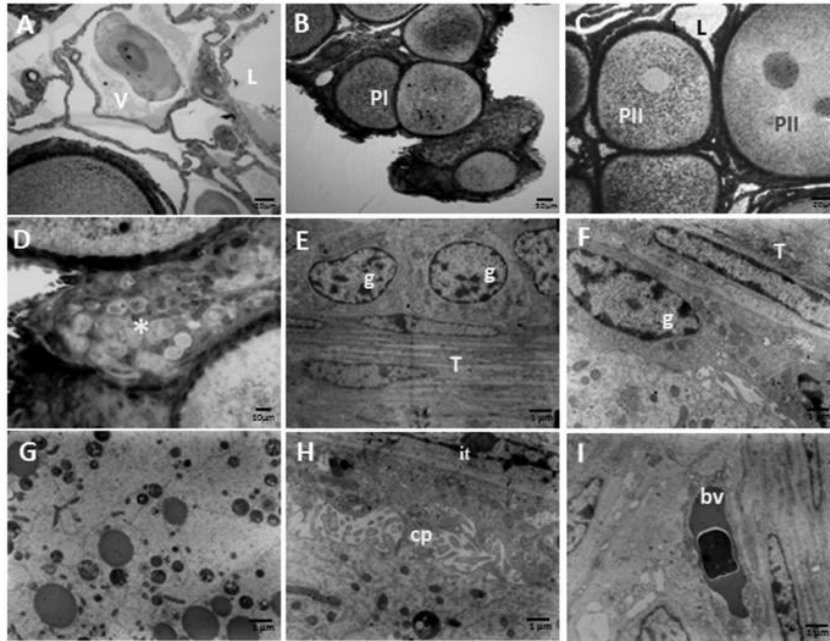
It has been reported that sexual maturity in *A. mississippiensis* occurs between 6 and 10 years of age and that this difference is mainly due to variations between geographic regions. For body size, males vary between 1.8 and 2.2 m; although, according to field observations, alligators smaller than 2.7 m are not able to reproduce. In contrast, females reach sexual maturity at 10 years of age upon reaching an average size of 1.8 m (Lance, 1989). In the *C. moreletii* species, it has been suggested that females reach sexual maturity between 7 and 8 years of age or at 1.5 m in length, and males at 8 years of age or between 1.8 and 2.7 m in length. The organisms sampled in this study were between 75 and 98 cm in length, suggesting that they have not yet reached sexual maturity, which is consistent with the histological results obtained for the ovaries and testes. Considering the size of the individual at sexual maturity is important because of the social factor, which is best observed in males; this is because if they reach the appropriate size before the reproductive age, they can successfully reproduce with

females (Casas-Andreu, Barrios-Quiroz, & Macias-Ríos, 2011; Platt, Rainwater, Thorbjarnarson, & McMurry, 2008).

### 4.2 | Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, and *Vasa* genes

In the present study, we analyzed the expression of genes important for testis function, that is, *Sox9*, a gene which was expressed in testes as expected; however surprisingly, its expression was also found in the ovary. Interestingly, although SOX9 is expressed in both sexes, the expression levels for this transcription factor were higher in males than in females. So far, the role of the *Sox9* gene in the ovaries of adult females has not been clear. However, in other vertebrates such as *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, and *Chapalichthys encaustus*, *Sox9* expression has been observed in adult female oocytes (Chiang et al., 2001; El Jamil, Kanhoush, Magre, Boizet-Bonhoure, and Penrad-Mobayed, 2008; Guerrero-Estévez et al., 2012). In these studies, two isoforms of the *Sox9* gene have been found: the *Sox9a* isoform expressed in the testis of *D. rerio* and the *Sox9b* isoform expressed in previtellogenic oocytes of the same species (Chiang et al., 2001). The antibody we used for this study recognizes both isoforms of *Sox9*. This would explain its detection in the analyzed testes and ovaries of *C. moreletii*. Physiologically, the role of *Sox9* in the oocyte is still unknown; however, it has been proposed that this gene acquired a new function during evolution (Figure 10A). In the case of the mouse, *Sox9* was thought to be involved in folliculogenesis, where its expression apparently depends on the



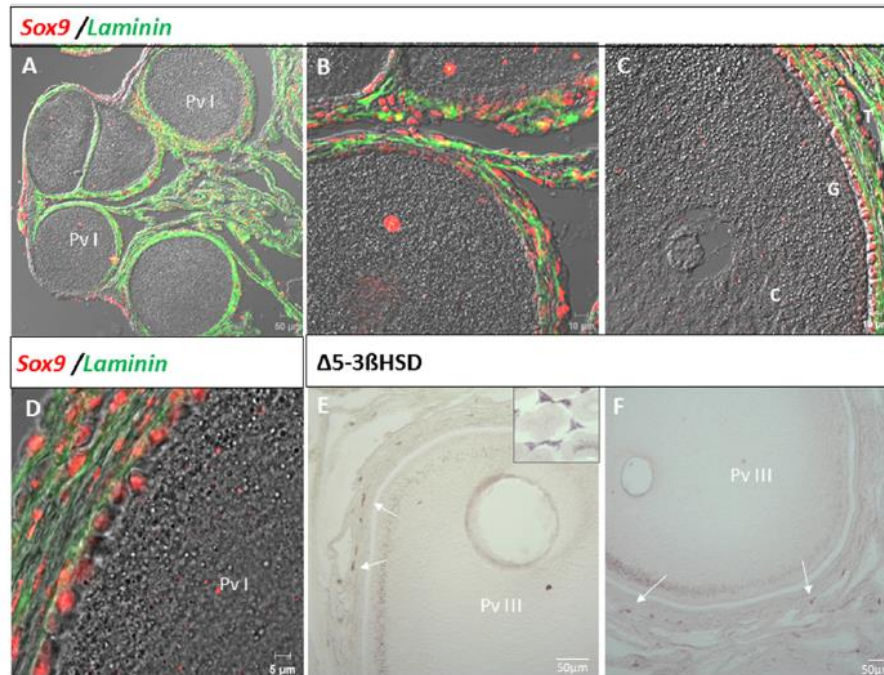


**FIGURE 5** Gross morphology and electron microscopy of the ovary of 5-year-old *C. moreletii* females. (A) Stromal compartment of the ovary made up of lacunae (L) and blood vessels (V). (B) Previtellogenic oocytes at stage I (PI). (C) Previtellogenic oocytes at stage II (PII) and III (PIII). (D) Groups of oogonia in cellular niches (\*). (E) Cells of granulosa (g) on a basement membrane and theca cells (T). (F) Cells of granulosa cells (g) and nuclei of inner theca cells (T). (G) Cytoplasm of the oocyte. (H) Cytoplasmic prolongations (cp) that join the oocyte to its inner theca (it). (I) Blood vessels (bv) located in the external theca of the follicle

stage of follicle development, such that SOX9 is expressed more in pre-antral oocytes and its expression is reduced in antral oocytes until it disappears in preovulatory oocytes (Notarnicola, Malki, Berta, Poulat, & Boizet-Bonhoure, 2006). Likewise, as we discovered the expression of Sox9 in previtellogenic oocytes, it would be interesting to evaluate ovaries from 8-year-old females already involved in reproduction. This may be the case in mouse, in which the expression of Sox9 is inhibited, and this would corroborate a possible role for Sox9 in the regulation of follicle formation (Notarnicola et al., 2006).

Although the morphological changes that occur in the developing testes and ovaries are well defined in some species with sexual determination by temperature (DST), the genetic regulation of gonadal morphogenesis is poorly understood. However, it is to be expected that genes involved in DST and sensitive to temperature will be expressed in a space-time manner according to the morphological changes that occur during gonadal differentiation. In the testicle of *C. moreletii*, the Sox9 protein is detected in the somatic cells that correspond to Sertoli cells and coincides with their location within the seminiferous cords. Therefore, in a way similar to that reported in other reptiles and vertebrates in general, the Sox9 gene in *C. moreletii* may play a role in the development of testicular structures and thus in the differentiation and maintenance of the testicle. The functional importance of Sox9 in the differentiation of the masculine phenotype (testicular differentiation) has been amply reported among vertebrates (Kent, Wheatley, Andrews, Sinclair, & Koopman, 1996; Morais da Silva et al., 1996; Moreno-Mendoza et al., 1999; Spotila, Spotila, & Hall, 1998).

The expression of Sox9 during ovarian morphogenesis of reptiles has also been studied. It has been reported that although in early stages of embryonic development Sox9 is expressed in the gonads of embryos incubated at both temperatures, subsequently dimorphic expression takes place, where Sox9 is negatively regulated at feminizing temperature (Moreno-Mendoza et al., 1999; Spotila et al., 1998; Western et al., 1999). Concerning expression of Sox9 in the ovary of post-hatched crocodiles; this has not been studied. The pattern found in *C. moreletii* has characteristics similar to that reported in teleost fish and in *Xenopus tropicalis*. In the case of teleosts, two isoforms of the gene have been described, one specific to the ovary and another specific to the testicle with different functions. In this way, we suggest that in post-hatched organisms, the expression of one of the Sox9 isoforms (Sox9a) in the Sertoli cells maintains testicular structure and function, whereas in the ovary the other isoform of the Sox9 (Sox9b) gene, when expressing itself in the granulosa cells of previtellogenic oocytes may be involved in the process of folliculogenesis, where its expression apparently depends on the degree of follicular development, as has also been proposed in the case of mice (Notarnicola et al., 2006). Therefore, we suggest that in *C. moreletii*, the expression of Sox9a must occur before and during gonad differentiation and maintains its expression in the developing testicle. Subsequently, in the adult testicle, its expression is maintained in the support cells to maintain testicular function. In adult ovaries, the follicular cells of previtellogenic oocytes express Sox9b, favoring a biological role that differs from this gene during the later stages of oogenesis.

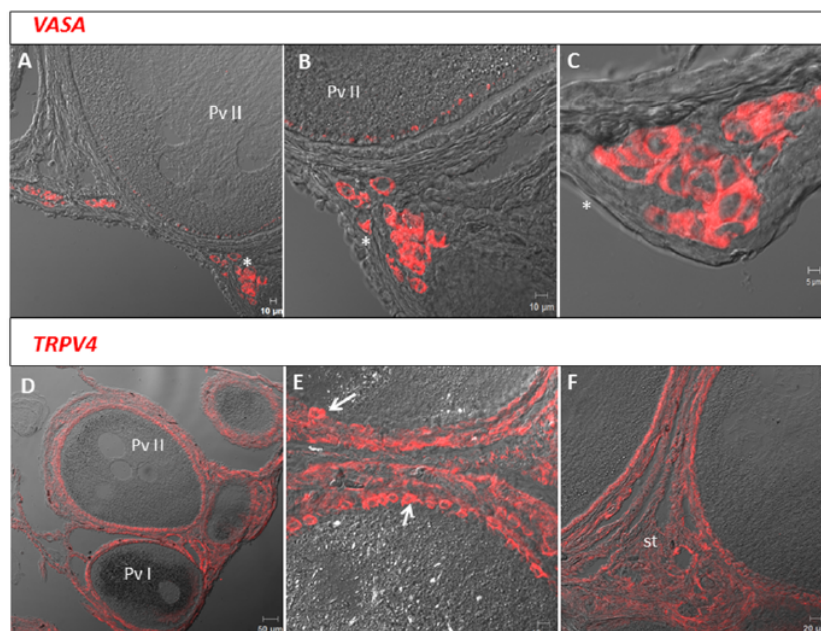


**FIGURE 6** Expression of SOX9, Laminin and  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD in the ovary of 5-year-old *C. moreletii* females. (A) Cross-section of the ovary, where previtellogenic oocytes (pv) are shown. (B–D) Amplification of A, where granulosa cells that express the SOX9 protein in their nucleus in red and expression of laminin, which delimits the oocyte in green. G (granulosa), T (theca), and C (cytoplasm). (E and F) Detection of  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD activity in theca cells (arrows) of previtellogenic oocytes III (PvIII). Mouse testis was used as a positive control for  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD, where activity is specific in Leydig cells (insert in E) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

As for genes that maintain the function and morphology of the ovary such as *Foxl2*, we find higher levels of expression of the mRNA and protein in ovaries, whereas levels of transcripts in the testes are barely perceptible; however, these levels are sufficient to produce translated *Foxl2* protein. In the ovaries, we specifically found the expression of FOXL2 in the granulosa cells of previtellogenic oocytes, which is consistent with the idea that the expression pattern for the *Foxl2* gene is highly conserved throughout evolution (Figure 10B) (Bertho et al., 2016). It has been proposed that the expression of the *Foxl2* gene is essential for the differentiation of granulosa cells and maintenance of the ovary, by negatively regulating the expression of *Sox9*. In the absence of *Foxl2*, there is no differentiation of the granulosa cells and therefore there is no formation of secondary follicles from primary follicles, as these die by apoptosis in the absence of functional granulosa cells. As reported, *Foxl2* in our findings for *C. moreletii* presents a sexually dimorphic expression pattern, so it can be considered an indicator of functional female heterogamy (Cocquet et al., 2018; Schmidt et al., 2004; Shoemaker-Daly et al., 2010). The presence of *Foxl2* transcripts in the testis has been previously reported during embryonic development and in juvenile organisms of *A. mississippiensis*, where an alternative *Foxl2* function is suggested in addition to the role it plays in ovarian development (Janes et al., 2013). In this regard, the present study corroborates the expression of *Foxl2* gene both in its transcripts and in its protein, but only in 5-year-old organisms, where sexual maturity has not yet been reached. Based on observations made concerning *A. mississippiensis* and those described in this study for *C. moreletii*,

we posit that *Sox9* and *Foxl2* may at some point be coexpressed during gonadal morphogenesis to carry out some unknown function, possibly related to the mechanism of DST, and later expressed dimorphically to influence another function, such as sexual maturity, in the ovaries and testes. According to our observations, being organisms that have not reached sexual maturity, the expression pattern of both the protein and the *Foxl2* transcripts suggests that in *C. moreletii* the expression of this gene remains in the granulosa cells of the ovary as it continues to regulate the maintenance of ovarian functionality.

As for the *Vasa* gene, the RNA helicase expressed during specification of the germinal line, we find its expression both in oogonia that are aggregated in cellular niches and in the cytoplasm of type II previtellogenic oocytes; in oocytes at more advanced stages, the expression of this gene is no longer detected. VASA expression in oogonia grouped in niches within the ovary cortex is interesting, as characteristically this gene is expressed in progenitor cells of the germinal line (Seydoux et al., 1999), which is why it possibly plays a role in maintaining the pool of oogonia during oogenesis. Their expression was also found in spermatogonia of the testis. In this respect, it is known that, in mouse, the *Vasa* gene plays a very important role both in the specification and in the maintenance of germline fertility that will give rise to spermatozoa (Tanaka et al., 2000). *Vasa* mRNA expression levels remained similar in both sexes; however, in the case of the protein, it was detected at a slightly greater level in the testes. These findings may be because, in the ovary, VASA protein is detected only in cell groups similar to niches. In addition to the fact that as the



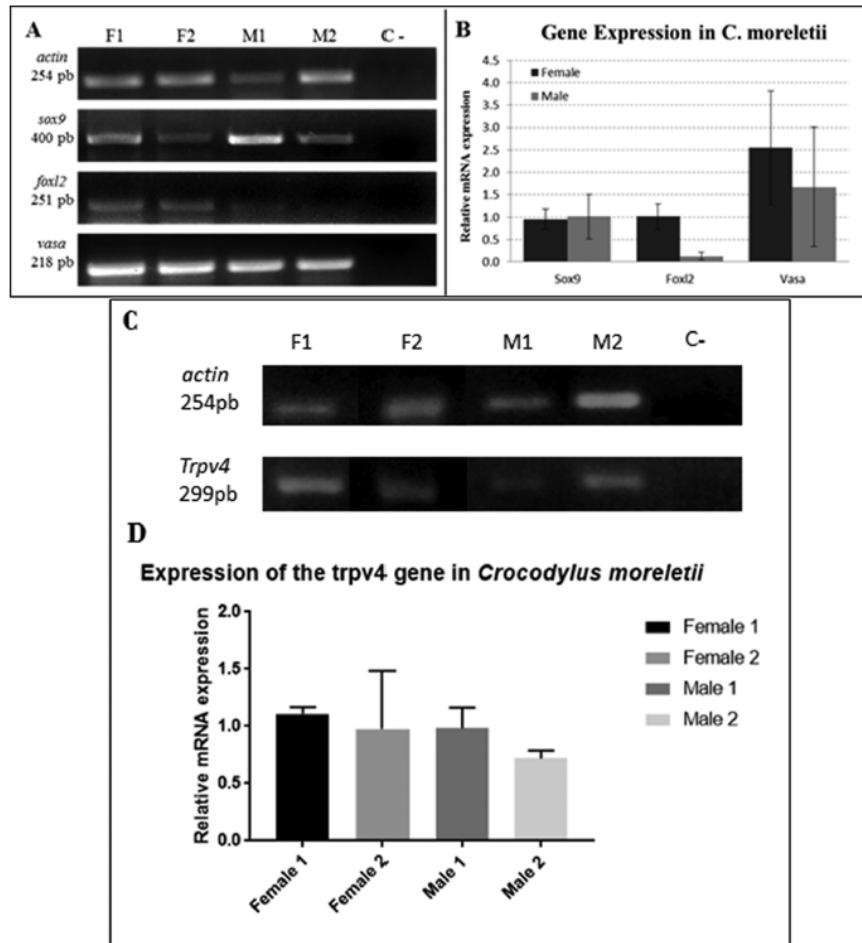
**FIGURE 7** Expression of RNA helicase VASA and TRPV4 ion channel in the ovary of 5-year-old *C. moreletii* females. (A) Cross-section showing the ovarian cortex with expression of RNA helicase VASA. (B) Expression of VASA in the cytoplasm of an oocyte at previtellogenesis stage II (Pv-II) and in the cytoplasm of oogonia grouped in niches (\*). (C) Amplification of (B) where the expression of VASA (red mark) in the cytoplasm of oogonia that form niches can be detected (\*). (D) Cross-section showing expression of TRPV4 protein (red) in previtellogenic oocytes I and II. (E) At greater magnification, the expression of TRPV4 is visible in the membrane and cytoplasm of the follicular cells surrounding the oocyte (arrows) and (F) in components of the stroma (st) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

follicular stage progressed and the follicles became previtellogenic, the expression of VASA decreased considerably. Conversely, in the case of the testes, VASA was expressed in all spermatogonia that compose the testicular cords, which probably represent the majority of cells that express RNA helicase. These results are of interest because, so far, VASA expression has not been reported in crocodiles; however, their expression pattern is very similar to other vertebrates (Figure 10C).

#### 4.3 | Expression of the TRPV4 ion channel

In mammals, the *SRY* gene positively regulates the expression of the *Sox9* gene; however, reptiles lack the *SRY* gene (Coriant et al., 1994). Thus, it is possible there is another signaling pathway that promotes the upregulation of *Sox9*. We found the expression of the TRPV4 ion channel protein on the membrane of Sertoli cells as well as the expression of the *Sox9* gene in the nucleus of Sertoli cells. This ion channel has been studied in other reptiles and, according to our findings, its identity is closely related to *C. moreletii* (Figure 10D). Our results were made even more interesting as we found that males express a greater amount of *SOX9* and TRPV4 than females. Moreover, although there was no significant difference in mRNA expression of TRPV4 between males and females, there was a slight tendency for females to express more TRPV4 mRNA, which may be related to more protein being translated in males. In works performed on chondrocytes, it has been well documented that the TRPV4 ion channel can positively regulate

the *SOX9* transcription factor (Muramatsu et al., 2007). Likewise, it is thought that the same may be occurring in the Sertoli cells of the crocodile testicle, and within this regulation, it may be that elements of the signaling pathway known to be involved in the regulation of the *Sox9* gene in mammals are conserved such as protein kinase A (PKA), the prostaglandins receptor and cAMP (Juhász et al., 2014; Muramatsu et al., 2007). We therefore suggest that a possible explanation for this pattern of TRPV4 expression in Sertoli cells is to maintain regulation of the expression of the *Sox9* gene in the testis. We propose that the signaling pathway of TRPV4 in both ovaries and testes possibly retains elements, but that each has its particularities. In this regard, it has been proposed that the expression of the transcription factor *Sox9* plays a possible role in the nucleus of follicular cells; promoting the production of extracellular matrix (Darby et al., 2016). In the case of the ion channel TRPV4, it is thought that this represents a very important sensor for the environment of the follicle, in the sense that it regulates the production of the extracellular matrix during its maturation and formation. In the case of *Sox9* in the testicle, it is thought that this is a transcription factor that maintains the cell-cell junctions, promoting spermatogenesis and fertility in the testicle, as well as the production of extracellular matrix. Particularly in the case of the TRPV4 ion channel, it is suggested that this is a sensor that regulates the *Sox9* gene when  $Ca^{2+}$  enters, and that may promote via the kinase A (PKA) protein, known for the role it plays stimulating the phosphorylation of the *Sox9* transcription factor, promoting its translocation to the nucleus, where it interacts



**FIGURE 8** Relative mRNA expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *Trpv4* genes in the testis and ovary of *C. moreletii*. (A) Representative gels showing the amplification of specific fragments in ovaries (F1 and F2) and testis (M1 and M2) of *C. moreletii*. Bands correspond to mRNA fragments of *Sox9* (400 bp), *Foxl2* (251 bp), and *Vasa* (218 bp). Actin detection (254 bp) was used as an internal control. (B) Graph showing the levels of relative expression obtained in the densitometric analysis. The *Sox9* and *Vasa* genes did not show significant differences between females and males, whereas *Foxl2* showed significant differences between the sexes. (C) Representative agarose gel showing the amplification of fragments from the *Trpv4* gene. The bands correspond to fragments of 299 bp. (D) The expression of the *Trpv4* gene did not show significant differences between females and males; ( $P < 0.05$ )

with other transcription factors and stimulates the cellular processes mentioned above (Juhász et al., 2014; Muramatsu et al., 2007).

#### 4.4 | $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD activity and histology of the ovary and testicle

We have obtained novel results concerning the morphology of the reproductive organs of the 5-year-old *C. moreletii* crocodile that corroborate our observations regarding specific protein and mRNA expression. The first to study the morphology of the ovary in a crocodile was Dutta (1949-1953), who described the ovaries in *C. palustris* and *Gavialis gangeticus*. The ovary of *A. mississippiensis* was described by Joanen and McNease in 1980 and in more recent studies by Uribe et al. in 2000 and Moore et al. in 2010. Generally, these studies have been carried out on adult and neonatal crocodiles from one week

up to 5 months post-hatching. We performed the histological analysis of *C. moreletii* females at 5 years of age using electron microscopy and we observed oogonia forming cell groups similar to niches. Herein, we also observed that the histological sections were interconnected and surrounded by somatic cells, as observed Moore et al., 2010 in hatchlings of up to 5 months of age. We also found most oocytes present at different stages of previtellogenesis, as oocytes can be observed when they begin to grow (Previtellogenesis I) and when they are surrounded by follicular cells and few theca cells (Previtellogenesis III). We did not find oocytes in previtellogenesis IV and V. Most oocytes in Previtellogenesis III had some cells in the theca region that were  $\Delta^5$ -3 $\beta$ HSD-positive, suggesting that steroidogenic precursor cells have initiated their activity in 5-year-old *C. moreletii* females. Apparently, ovaries already have a morphology similar to that observed in *A. mississippiensis* and other reptiles.

**TABLE 2** Analysis of Similarity of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, *TRPV4*, and *Actin* Sequences

Description	Query Cover (%)	Ident (%)	GenBankAccession
<b>Sox9</b>			
<i>Crocodylus palustris</i> Sox9 ( <i>Sox9</i> ) gene, complete cds, alternatively spliced	95	100	FJ790140
<i>Alligator mississippiensis</i> SRY-box 9 ( <i>SOX9</i> ), mRNA	78	96	NM_001287268.1
<i>Eublepharis macularius</i> Sox9 ( <i>Sox9</i> ) mRNA partialcds	76	91	AF217252.1
<i>Canis lupus familiaris</i> SRY (sex determining region Y)-box 9 ( <i>SOX9</i> ),	76	91	NM_001002978.1
<i>Lepidochelys olivacea</i> Sox9 ( <i>Sox9</i> ) mRNA, complete cds	78	90	GQ258676.1
<i>Macaca mulatta</i> SRY-box 9 ( <i>SOX</i> ), mRNA	74	90	NM_001032868.1
<i>Callithrix jacchus</i> SOX9 mRNA, complete cds	74	90	AF322899.1
<i>Pongo pygmaeus</i> SOX9 mRNA, complete cds	74	90	AF322898.1
<i>Gallus gallus</i> SRY (sex-determining region Y)-box ( <i>SOX9</i> ), mRNA	74	90	NM_204281.1
<i>Homo sapiens</i> SRY-box 9 ( <i>SOX9</i> ), mRNA	74	90	NM_000346.3
<b>Foxl2</b>			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> forkhead box L2 ( <i>FOXL2</i> ), mRNA	96	99	XM_006258812.2
Predicted: <i>Gavialis gangeticus</i> forkhead box L2 ( <i>FOXL2</i> ), partial mRNA	96	98	XM_019503081.1
<i>Alligator mississippiensis</i> forkhead transcription factor <i>FOXL2</i> mRNA, partial cds	96	98	XM_004664203.1
Predicted: <i>Jaculus jaculus</i> forkhead box L2 ( <i>Foxl2</i> ), mRNA	96	96	XM_006158196.2
<i>Trachemys scripta</i> forkhead transcription factor L2 ( <i>FoxL2</i> ) gene	96	96	AY155535.1
Predicted: <i>Gekko japonicus</i> forkhead box L2 ( <i>FOXL2</i> ), mRNA	94	96	XM_015411286.1
<b>Vasa</b>			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), transcript variant X4, mRNA	89	97	XM_014594053.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), transcript variant X3, mRNA	89	97	XM_014594052.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), transcript variant X2, mRNA	89	97	XM_014594051.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), transcript variant X1, mRNA	89	97	XM_014594050.1
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), transcript variant X2, mRNA	89	96	XM_006021247.2
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), transcript variant X1, mRNA	89	96	XM_006021246.2
Predicted: <i>Pelodiscus sinensis</i> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 ( <i>DDX4</i> ), mRNA	86	82	XM_014581741.1
<b>TRPV4</b>			
Predicted: <i>Crocodylus porosus</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 ( <i>TRPV4</i> ), mRNA	77	91	XM_019538691.1
Predicted: <i>Gavialis gangeticus</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 ( <i>TRPV4</i> ), mRNA	77	88	XM_019507324.1
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 ( <i>TRPV4</i> ), transcript variant X5, mRNA	77	86	XM_019486579.1
<i>Alligator mississippiensis</i> transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 ( <i>TRPV4</i> ), mRNA	77	86	NM_001317145.1
Predicted: <i>Gekko japonicus</i> transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 ( <i>TRPV4</i> ), mRNA	75	84	XM_015413237.1
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 ( <i>TRPV4</i> ), mRNA	77	86	XM_006015214.2
<b>Actin</b>			
Predicted: <i>Alligator mississippiensis</i> , actin, alpha, cardiac muscle 1 ( <i>ACTC1</i> ), mRNA	92	96	XM_006273980.2
Predicted: <i>Alligator sinensis</i> , actin, alpha, cardiac muscle 1 ( <i>ACTC1</i> ), mRNA	92	95	XM_006022731.2
Predicted: <i>Chrysemys picta bellii</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 ( <i>ACTC1</i> ), transcript variant X2, mRNA	92	92	XM_005299975.2
Predicted: <i>Chrysemys picta bellii</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 ( <i>ACTC1</i> ), transcript variant X1, mRNA	92	92	XM_005299974.1
Predicted: <i>Pelecanus crispus</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 ( <i>LOC104025962</i> ), mRNA	91	91	XM_009480579.1

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Description	Query Cover (%)	Ident (%)	GenBankAccession
<i>Cheloniamydas</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	91	NM_001290670.1
<i>Gallus gallus</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	83	91	NM_001079481.1
<i>Xenopus tropicalis</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1), mRNA	92	89	NM_203763.1
<i>Clupeaharengus</i> actin, alpha, skeletal muscle 2-like (LOC105907633), mRNA	92	87	NM_001309834.1
<i>Xenopus laevis</i> actin, alpha, cardiac muscle 1 (actc1), mRNA	92	87	NM_001086591.1

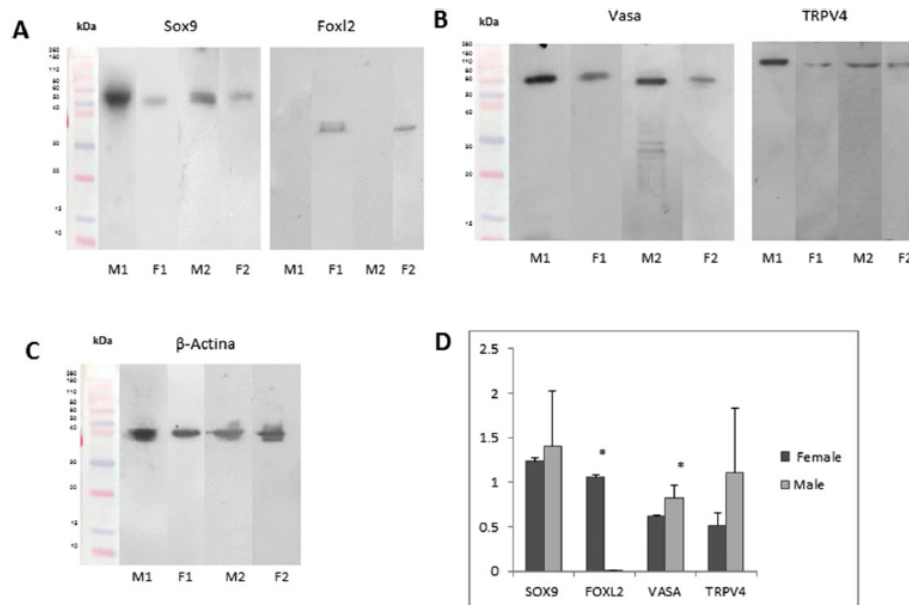
Sequences obtained in the analysis of similitude using BLASTN software. *Sox9*, *Foxl2*, *Trpv4*, *Vasa*, and *Actin* gene had similarity to sequences corresponding to genes reported for other reptiles and other vertebrates in GenBank.

Testicle morphology in crocodiles has been studied in the American alligator *A. mississippiensis* during embryonic development (Forbes, 1940; Smith et al., 1994) and in neonatal organisms from 1 week to 3 months post-hatching (Moore et al., 2010), as well as in adults (Lance, 1989; Gribbins et al., 2010) and subadults (Cott et al., 1961; Graham et al., 1968) in the *C. niloticus* caiman. In the case of *C. moreletii* males sampled in this work, light field microscopy revealed a morphology very similar to that of an adult male of *A. mississippiensis* determined by the reproductive season and neonatal period of 3 months, where in summary the seminiferous cords are delimited by a basal membrane, Sertoli cells and spermatogonia are observed in the interior, evidenced by their morphology and the expression of SOX9 and VASA, respectively.

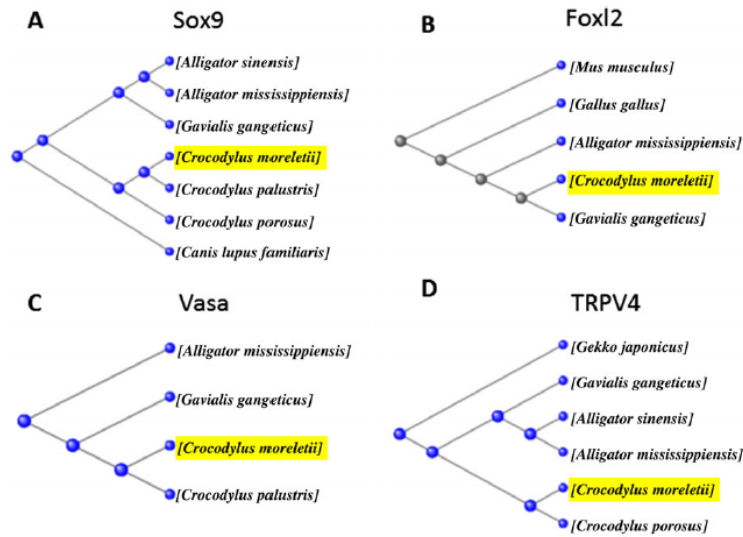
An interesting fact about this work is that no spermatids or spermatozoa were observed, even though samples were collected in May,

one of the months during which they are found reproducing. This is most likely because 5-year-old *C. moreletii* crocodiles have not yet reached sexual maturity. In the interstice of the testis, we found what was expected in terms of other reptiles and vertebrates, as they have myoid cells, fibroblasts (which produce extracellular matrix) and Leydig cells (which produce steroid hormones). However, Leydig cell activity is diminished, as the detection of  $\Delta^5$ - $3\beta$ HSD was scarcely perceptible, which together with histological observations, corroborates the fact that 5-year-old *C. moreletii* crocodiles are still sexually immature and that steroidogenic (Leydig) cells that are located in the interstitial region of the testis as in all vertebrates, only initiate their steroidogenic activity when male crocodiles reach 5 years of age.

In conclusion, 5-year-old females and males of *C. moreletii* are sexually immature. This is evidenced by the results obtained from the ultrastructure of their ovaries and testes, despite having been



**FIGURE 9** Expression of protein from genes *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *Trpv4* in the testis and ovary of *C. moreletii*. (A) Immunoblot for SOX9 (56 kDa) and FOXL2 (38 kDa); (B) VASA (76 kDa) and TRPV4 (91 kDa); and (C) smooth muscle  $\alpha$ -Actin (42 kDa). (D) The relative expression levels obtained from the densitometric analysis of the bands obtained for each protein are visible, these were normalized with respect to actin protein. Significant differences between sexes ( $P < 0.05$ ). Male 1 (M1), Male 2 (M2), Female 1 (F1), and Female 2 (F2) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



**FIGURE 10** Homology for the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *Trpv4* genes of *C. moreletii*. An alignment was made to look for the homology of the sequences of the genes reported in our work, for which the BLAST program was used. The consensus tree obtained for each of the gene sequences is shown. (A) *Sox9*, (B) *Foxl2*, (C) *Vasa*, and (D) *TRPV4*. All the trees show that the sequences are highly related to those already reported for other crocodile species, as well as being highly conserved in evolution [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

collected during their breeding season. We found novel results that corroborate the expression of *Sox9* gene in females; likewise, for the first time, we were able to report the expression of the *Vasa* gene in germ cells of crocodiles. Expression of the TRPV4 ion channel was reported and we posit that it plays a role as a possible regulator of the expression of the SOX9 transcription factor in Sertoli cells. These results are therefore expected to promote future research on reproduction biology in crocodiles and generally in reptiles.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Secretary for the Environment and Natural Resources (SEMARNAT: SGPA/DGVS/05531/16) for the permit granted for the management and obtaining of biological samples. We thank to Rocio Antonio-Rubio for assistance with the animals and RT-PCR analyses. This paper is a requisite for A.M.J. to obtain a Ph.D. degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México.

#### ORCID

Norma Moreno-Mendoza  <http://orcid.org/0000-0002-3508-799X>

#### REFERENCES

- Bertho, S., Pasquier, J., Pan, Q., Le Trionnaire, G., Bobe, J., Postlethwait, J. H., ... Guiguen, Y. (2016). Foxl2 and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation. *Sexual Development*, 10, 111–129. <https://doi.org/10.1159/000447611>
- Braat, A. K., Zandbergen, T., Van de Water, S., Goos, H. J., & Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics*, 216, 153–167. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199910\)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<153::AID-DVDY6>3.0.CO;2-1)
- Casas-Andreu, G., Barrios-Quiroz, G., & Macias-Ríos, R. (2011). Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 82, 261–273.
- Chiang, E. F., Pai, C. I., Wyatt, M., Yan, Y. L., Postlethwait, J., & Chung, B. (2001). Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: Expression of similar transcription activators in distinct sites. *Developmental Biology*, 231, 149–163. doi: [Doi.org/10.1006/dbio.2000.0129](https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0129)
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., ... Veitia, R. (2018). Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics*, 39, 916–921. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.916>
- Corient, A. M., Valleley, E., Ferguson, M. W. J., & Sharpe, P. T. (1994). Chromosomal and temperature-dependent sex determination: The search for conserved mechanism. *The Journal Experimental Zoology*, 270, 112–116. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700112>
- Cott, H. B. (1961). Scientific results of an inquiry into the ecology and economic status of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in Uganda and Northern Rhodesia. *Journal of Zoology*, 29, 211–356. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1961.tb00220.x>
- Darby, W. G., Grace, M. S., Baratchi, S., & McIntyre, P. (2016). Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 8, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.012>
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., ... Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6653–6665. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6653>
- De Felicci, M. (2010). Germ stem cells in the mammalian adult ovary: Considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction*, 16, 632–636. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq006>
- Dutta, S. K. (1949-1953). *A comparative study of the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of reptiles*. University of Allahabad Studies. Zoology Section. (The article is divided in 11 chapters. Chapters 1–7 appeared from 1949 to 1953. Chapters 8–11 may not have been published).

- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., & Penrad-Mobayed, M. (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Developmental Dynamics*, 237, 2996–3005. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21692>
- Forbes, T. R. (1940). Studies on the reproductive system of the alligator IV. Observations on the development of the gonad, the adrenal cortex and the Müllerian duct. *Contributions to Embryology*, 28, 129–156.
- França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., & Griswold, M. D. (2016). The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4, 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., & Noce, T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 12258–12262. PMID: PMC45416
- Graham, A. (1968). *The Lake Rudolf crocodile* (*Crocodylus niloticus* Laurenti) population. Unpublished M.Sc. Thesis, University College, Nairobi, Kenya.
- Gribbins, K. M., Siegel, D. S., Anzalone, M. L., Jackson, D. P., Venable, K. J., Rheubert, J. L., & Elsey, R. M. (2010). Ultrastructure of spermiogenesis in the American alligator, *Alligator mississippiensis* (Reptilia, Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Morphology*, 271, 1260–1271. doi: 10.1002/jmor.10872
- Guerrero-Estévez, S., & Moreno-Mendoza, N. (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *Journal of Fish Biology*, 80, 572–594. doi: 10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x
- Harley, V. R., Clarkson M. J., & Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrine Reviews*, 24, 466–487. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0025>
- Janes, D. E., Elsey, R. M., Langan, E. M., Valenzuela, N., & Edwards, S. V. (2013). Sex-biased expression of sex-differentiating genes FOXL2 and FGFR3 in American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Sexual Development*, 7, 253–260. <https://doi.org/10.1159/000350787>
- Joanen, T., & McNease, L. (1980). Reproductive biology of the American alligator in southwest Louisiana. In J. B. Murphy & J. T. Collins (Eds.), *Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles* (pp. 153–159). Contr. Herp. No. 1). Lawrence, Kansas: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Juhász, T., Matta, C., Somogyi, C., Katona, É., Takács, R., Soha, R. F., ... Zákány, R. (2014). Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-SOX9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal*, 26, 468–482. doi: [Doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.001)
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137–138.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., & yKoopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 122, 2813–2822.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., & Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 162, 354–363. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1093>
- Lance, V. A. (1989). Reproductive cycle of the American alligator. *American Zoologist*, 29, 999–1018.
- Levy, H., Deane, H. W., & Rubin, B. L. (1959). Visualization of steroid 3 $\beta$ -dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 65, 933–943. doi: [Doi.org/10.1210/endo-65-6-932](https://doi.org/10.1210/endo-65-6-932)
- Mizrak, S. C., Gadella, B. M., Erdost, H., Ozer, A., Van Pelt, A. M. M., & Van Dissel-Emiliani, F. M. F. (2008). Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: An in vitro study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 52, 1477–7827. doi: [Doi.org/10.1186/1477-7827-6-52](https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-52)
- Moore, B. C., Hamlin, H. J., Botteri, N. L., Lawler, A. N., Mathavan, K. K., & Guillet, L. J. Jr. (2010). Posthatching development of *Alligator mississippiensis* ovary and testis. *Journal of Morphology*, 271, 580–595. doi: 10.1002/jmor.10818
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., & y Lovell-badger, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the genes in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*, 14, 62–68.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R., & 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. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991101\)284:6<705::AID-JEZ12>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991101)284:6<705::AID-JEZ12>3.0.CO;2-1)
- Moreno-Mendoza, N., Torres-Maldonado, L., Chimal-Monroy, J., & Merchant-Larios, H. (2004). Disturbed expression of Sox9 in pre-Sertoli cells underlies sex-reversal in mice B6.Ytir. *Biology of Reproduction*, 70, 114–122.
- Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Ohno, T., Amano, K., Ooishi, R., Sugahara, T., ... Matsuda, A. (2007). Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 32158–32167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706158200>
- Nagai, K. (2001). Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene*, 270, 161–169. doi: [Doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00479-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00479-6)
- Nagai, K., Saitoh, Y., Saito, S., & Tsutsumi, K. (2012). Structure and hibernation-associated expression of the transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) mRNA in the Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*). *Zoological Science*, 29, 185–190. <https://doi.org/10.2108/zsj.29.185>
- Notarnicola, C., Malki, S., Berta, P., Poulat, F., & Boizet-Bonhoure, B. (2006). Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expression Patterns*, 6, 695–702. doi: [Doi.org/10.1016/j.modgep.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.01.001)
- Platt, S. G., Rainwater, T. R., Thorbjarnarson, J. B., & McMurry, S. T. (2008). Reproductive dynamics of a tropical freshwater crocodilian: Morelet's crocodile in northern Belize. *Journal of Zoology*, 275, 177–189. doi: 10.1111/j.1469-7998.2008.00426.x
- Qin, Y., & Bishop, C. E. (2005). Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Human Molecular Genetics*, 14, 1221–1229. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi133>
- Seydoux, G., & Strome, S. (1999). Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: Regulation of gene expression in early germ cells. *Development*, 126, 3275–3283. PMID: 10393107
- She, Z. Y., & Yang, W. X. (2014). Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53, R21–37. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0018>
- Shoemaker-Daly, C. M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., & Crews, D. (2010). Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* Gonads. *Developmental Dynamics*, 239, 1061–1075. doi: 10.1002/dvdy.22266
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C., & Treier, M. (2004). The murine Winged-Helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131, 933–942. doi: 10.1242/dev.00969
- Smith, C. A., & Joss, M. P. (1994). Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature-dependent sex determination. *Cell and Tissue Research*, 273, 149–162. <https://doi.org/10.1007/BF00304622>



- Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., Vanacker, J. M., Berta, P., & Laudet, V. (1999). Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 517–527. doi: 10.1007/PL00006495
- Spotila, L. D., Spotila, J. R., & Hall, S. E. (1998). Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal Experimental Zoology*, 281, 417–427. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<417::AID-JEZ7>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<417::AID-JEZ7>3.0.CO;2-R)
- Tanaka, S. S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., ... Noce, T. (2000). The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes and Development*, 14, 841–853. <https://doi.org/10.1101/gad.14.7.841>
- Teilmann, S. C., Byskov, A. G., Pedersen, P. A., Wheatley, D. N., Pazour, G. J., & Christensen, S. T. (2005). Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 444–452. doi: 10.1002/mrd.20312
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., ... Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139, 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>
- Uribe, M. C., & Guillette, L. J. Jr. (2000). Oogenesis and ovarian histology of the American Alligator: *Alligator mississippiensis*. *Journal of Morphology*, 245, 225–240. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200009\)245:3<225::AID-JMOR4>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200009)245:3<225::AID-JMOR4>3.0.CO;2-M)
- Wen, Q., Cheng, C. Y., & Liu, Y. X. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, S1084–9521, 30067–30072. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.03.003>
- Western, P. S., Harry, J. L., Graves, J. A., & Sinclair, A. H. (1999). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Developmental Dynamics*, 216, 411–419. doi: Retrieved from 10.1002/(SICI)1097-0177(199912)216:4/5<411::AID-DVDY9>3.0.CO;2-Y
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., ... Iguchi, T. (2015). TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Scientific Reports*, 18, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep18581>
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Parrot, B., Yamaguchi, K., Ogino, Y., ... Iguchi, T. (2016). RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during Alligator mississippiensis temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics*, 17, 77. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2396-9>
- Ye, J. (2012). Primer BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 134, 1471–2105. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

**How to cite this article:** Martínez-Juárez A, López-Luna MA, Porras-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*. 2018;1–17. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22799>

Zimbra:

angelica@correo.biomedicas.unam.n

---

**Revision requested for TB\_2018\_373**

---

**De :** Christopher Gordon (Journal of Thermal Biology)  
<EvisSupport@elsevier.com>

mar, 30 de oct de 2018 10:32

**Asunto :** Revision requested for TB\_2018\_373

**Para :** angelica@biomedicas.unam.mx

**Responder a :** cjgordon.gordon1 <cjgordon.gordon1@gmail.com>

Ref: TB\_2018\_373

Title: MECHANISMS RELATED TO SEXUAL DETERMINATION BY TEMPERATURE IN REPTILES

Journal: Journal of Thermal Biology

Dear Dr. Moreno-Mendoza,

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Thermal Biology. I have completed the review of your manuscript and a summary is appended below. The reviewers recommend reconsideration of your paper following major revision. I invite you to resubmit your manuscript after addressing all reviewer comments.

When resubmitting your manuscript, please carefully consider all issues mentioned in the reviewers' comments, outline every change made point by point, and provide suitable rebuttals for any comments not addressed.

To submit your revised manuscript:

- Log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=TB](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=TB)
- Locate your manuscript under the header 'My Submissions that need Revisions' on your 'My Author Tasks' view
- Click on 'Agree to Revise'
- Make the required edits
- Click on 'Complete Submission' to approve

**What happens next?**

After you approve your submission preview you will receive a notification that the submission is complete. To track the status of your paper throughout the editorial process, log in to Evise® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=TB](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=TB).

**Enrich your article to present your research with maximum impact.** This journal supports the following [Content Innovations](#):

I look forward to receiving your revised manuscript as soon as possible.

Kind regards,

Dr Gordon  
Co-Editor  
Journal of Thermal Biology