

00361

32
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

LA TEMPERATURA DE INCUBACION COMO MODULA-
DOR DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES Y SU
RELACION EN EL ESTABLECIMIENTO GONADAL DE
LA TORTUGA MARINA Lepidochelys olivacea
(Eschscholtz, 1829)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

presenta

PABLO ARTURO SALAME MENDEZ

México, D. F.

1992



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 está 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.

INDICE

- I.- INTRODUCCION, 1
- I.a.- TEORIA HORMONAL DE LA DIFERENCIACION SEXUAL
2-5
- I.b.- LA DIFERENCIACION SEXUAL EN VERTEBRADOS, 6
- I.b.1.- Anfibios, Aves y Mamiferos, 6-8
- I.b.2.- Reptiles, 9-13
- II.- EFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE
LA DIFERENCIACION SEXUAL EMBRIONARIA EN
REPTILES, 14-15
- III.- INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ESTEROIDOGENICA EN
ORGANOS UROGENITALES EMBRIONARIOS DE REPTIL
SOBRE LOS MECANISMOS DE LA DIFERENCIACION
SEXUAL, 16-21
- IV.- LA TEMPERATURA COMO FACTOR EPIGENETICO EN LA
DETERMINACION DEL SEXO, 22
- IV.a.- Efecto de la temperatura de incubación sobre
la determinación del sexo en Reptiles, 22-30
- IV.b.- Efecto de hormonas esteroides sexuales y otras
moléculas sobre la diferenciación sexual en
Reptiles sexo-termodependientes, 31-34

II

- V.- HIPOTESIS SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE LA
DIFERENCIACION SEXUAL GONADAL EN REPTILES
SEXO-TERMODEPENDIENTES, 35-38.
- VI.- HIPOTESIS DE LA MORFOGENESIS GONADAL EN
VERTEBRADOS SEXO-TERMODEPENDIENTES, 39-42
- VII.- BIOSINTESIS Y MECANISMO MECANISMO DE ACCION DE
DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES. GENERALIDADES
43
- VII.a.- Biosíntesis, 43-50
- VII.b.- Mecanismo de acción, 51-52
- VIII.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS DEL
TRABAJO, 53-55
- IX.- MATERIALES, 56
- IX.a.1.- Material biológico, 56
- IX.a.2.- Material radiactivo, 57
- IX.a.3.- Esteroides no radiactivos, 57
- IX.a.4.- Disolventes, 58
- IX.a.5.- Soluciones amortiguadoras (Buffers), 58
- IX.a.6.- Solución de centelleo, 59
- IX.a.7.- Suspensión de carbón-dextrán, 59
- IX.b.- Anticuerpos para testosterona y estradiol,
59-60

- X.- METODOS, 61
- X.a.- BIOSINTESIS IN VITRO DE HORMONAS ESTEROIDES
SEXUALES, 61
- X.a.1.- Obtención de los tejidos, 61
- X.a.2.- Preparación de los sustratos para la
incubación, 61-64
- X.a.3.- EXTRACCION, PURIFICACION E IDENTIFICACION DE
LOS METABOLITOS RADIOACTIVOS OBTENIDOS DESPUES
DE LA INCUBACION, 65
- X.a.3.1.- Extracción, 65
- X.a.3.2.- Purificación e identificación de metabolitos,
66-67
- X.a.3.3.- Determinación de la pureza radioquímica de los
metabolitos formados después de la incubación,
67-68
- XI.- DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE
TESTOSTERONA Y ESTRADIOL EN SUERO Y ORGANOS
UROGENITALES, 69
- XI.a.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS, 69
- XI.a.1.- Suero, 69-70
- XI.a.2.- Organos urogenitales, 71
- XI.a.2.a.- Extracción de los esteroides de los tejidos
homegeneizados, 71-73

- XII.- DETERMINACION DE LA UNION DE ESTRADIOL
TRITADO AL RECEPTOR DE ESTROGENOS EN LOS
ORGANOS UROGENITALES, 74-75
- XIII.- ANALISIS ESTADISTICOS, 76
- XIV.- RESULTADOS, 77
- XIV.a.- BIOSINTESIS, 77
- XIV.a.1.- Biosíntesis in vitro de testosterona, 77-82
- XIV.a.2.- Biosíntesis in vitro de estradiol, 83-89
- XIV.b.- RADIOINMUNOANALISIS (RIA), 90
- XIV.b.1.- DETERMINACION EN SUERO, 90
- XIV.b.1.1.- Testosterona, 90-92
- XIV.b.1.2.- Estradiol, 92-93
- XIV.b.1.3.- Relación entre ambos sexos en la concentración
de testosterona y estradiol, 93-95
- XIV.b.1.4.- Establecimiento de los estadios de la
diferenciación gonadal de *L. olivacea*
para desarrollar los análisis estadísticos,
96-97
- XIV.b.1.5.- ANALISIS ESTADISTICOS, 98
- XIV.b.1.5.1.- ANALISIS DE VARIANZA, 98
- XIV.b.1.5.1.a.- Concentración de testosterona, 99-101
- XIV.b.1.5.1.b.- Concentración de estradiol, 102-104

- XIV.b.1.5.2.- ANALISIS DE REGRESION, 105
- XIV.b.1.5.2.a.- Testosterona, 105-108
- XIV.b.1.5.2.b.- Estradiol, 109-113
-
- XIV.b.2.- DETERMINACION RADIOINMUNOANALITICA DE
TESTOSTERONA Y ESTRADIOL EN ORGANOS
UROGENITALES, 114
- XIV.b.2.1.- Testosterona, 114-115
- XIV.b.2.2.- Estradiol, 115-117
-
- XIV.c.- DETERMINACION DEL RECEPTOR PARA ESTROGENOS,
118-119
-
- XV.- DISCUSION, 120
-
- XV.a.- BIOSINTESIS, 120
- XV.a.1.- Biosíntesis de testosterona y estradiol en el
complejo urogenital gónada-mesonefros de
embriones, 120-124
- XV.a.2.- Biosíntesis de testosterona y estradiol en
gónadas y mesonefros de embriones, 125-128
-
- XV.b.- CONCENTRACION DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL EN
SUERO Y ORGANOS UROGENITALES, 129-137
-
- XV.c.- DETERMINACION DEL RECEPTOR A ESTRADIOL EN
ORGANOS UROGENITALES, 138-141

XV.d.- PROPOSICION DE UNA HIPOTESIS SOBRE LA
DIFERENCIACION GONADAL EN LA TORTUGA MARINA

L. olivacea, 142-143

XVI.- CONCLUSIONES, 144-145

XVII.- LITERATURA CITADA, 146-177

La diferenciación sexual en los vertebrados es un fenómeno biológico esencial para la perpetuación de aquellas especies que se reproducen sexualmente. Se considera que la diferenciación sexual completa se realiza en tres etapas. La primera etapa abarca la determinación del sexo genética o cromosómica después de la amfimixis. La segunda etapa es la diferenciación gonadal, es decir es la etapa en la cual el primordio gonadal indiferenciado se desarrolla para constituir un testículo o un ovario; y en la tercera y última etapa se lleva al cabo el establecimiento sexual del organismo o diferenciación fenotípica.

Los mecanismos de los procesos de la diferenciación sexual no han sido aún bien dilucidados y se han establecido diversas teorías tratando de esclarecerlos. Una de ellas, la teoría hormonal postula la acción de ciertas hormonas que son biosintetizadas durante la etapa embrionaria y que juegan un papel determinante durante el proceso de la diferenciación sexual.

I.a.- TEORIA HORMONAL DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

El hombre a través de su conocimiento empírico, sabía de las consecuencias que tenía el castrar a sus animales domésticos (v.gr., el aumento de peso). Aristóteles fué el primero en describir en su libro "De las Partes de los Animales" (222) los resultados de esta manipulación en las aves y en el hombre. No fué sino hasta el año de 1775 que el investigador francés De Bordeu, quien propuso por primera vez el concepto de hormona en su libro "Recherches sur les Maladies Chroniques", sugirió que los testículos secretaban a la sangre alguna sustancia la cual era responsable de mantener el comportamiento sexual masculino como la agresividad de los animales (57; 222). En ese mismo año, el anatomista inglés John Hunter, estudió experimentalmente la proposición de De Bordeu, transplantando testículos a la cavidad abdominal de animales domésticos prepúberes castrados, demostrando que éstos se desarrollaban de manera normal. Sus hallazgos, lo llevaron a apoyar la hipótesis de De Bordeau, así como a afirmar que sus resultados se debían a factores químicos y no a factores de tipo nervioso (57; 222). Tuvieron que transcurrir más de setenta años para que se reiniciaran las investigaciones encaminadas a explicar la importancia de las gónadas para mantener la fisiología reproductiva.

En 1849 el médico alemán Berthold (84; 222) retomó la línea experimental de Hunter, demostrando que se revertía la atrofia del canto en los gallos castrados, al injertarles testículos en la cavidad abdominal. Este resultado le permitió concluir, que en efecto, una sustancia de naturaleza desconocida, producida por los testículos, era transportada por el torrente sanguíneo a todo el cuerpo, manteniendo la fisiología de los órganos sexuales accesorios y el comportamiento de cortejo de estas aves. A pesar de la descripción de este hecho, que dió lugar a lo que se conoce como principio de la acción endócrina, este trabajo no tuvo repercusión en su tiempo.

Aproximadamente 50 años después, Benoit confirmó la interpretación de Berthold y dió evidencias experimentales en apoyo a la en aquellos años controvertida teoría intersticial (171). Esta teoría asumía la producción de una sustancia en las células intersticiales del testículo, la cual podría ser responsable de la diferenciación sexual (174). Para entonces Bernard en 1859 (8) ya había propuesto el concepto de "secreción interna", el cual establece que una sustancia secretada por un órgano, viaja a través de la sangre para ejercer su efecto a distancia.

Después del trabajo de Benoit, surgió una de las teorías básicas de la diferenciación sexual. Bowin y Ancel en 1903 (9)

al estudiar las estructuras genitales de embriones de cerdo durante el período de la diferenciación sexual, encontraron que el tejido intersticial del testículo estaba muy desarrollado, proponiendo que la diferenciación de las estructuras genitales, y de las gónadas embrionarias, era causada por una o varias sustancias producidas por células ubicadas en el compartimento extracordonal de la gónada (células de Leydig). Además de sugerir que ciertas sustancias producidas en las gónadas en diferenciación del feto masculino, influenciaban su diferenciación sexual, lo cual apoyaba a la teoría intersticial. La hipótesis de estos autores, fué acogida sin restricciones por la comunidad científica de entonces y se le denominó Teoría Hormonal de la Diferenciación Sexual (20). Sin embargo, la proposición de que ciertas sustancias producidas por un órgano tenían efecto sobre la fisiología de otros, seguía siendo incierta. Bayliss y Starling en 1902 (7) propusieron que la fisiología de los órganos de un individuo, era regulada por un complejo de mediadores o mensajeros químicos integrados en un sistema endócrino. Posteriormente, Starling en 1905 (182-184) observó que los mensajeros químicos, a los que llamó hormonas, tenían que ser transportados al través del torrente sanguíneo, desde el órgano en que eran producidos, hasta el órgano sobre el que tenían efecto.

La era moderna de la investigación de la fisiología de la

diferenciación sexual, se inicia con el estudio del free-martinismo en bovinos, a partir de los trabajos simultáneos, pero independientes, de Lillie en 1916 y 1917 (87; 88), y de Keller y Tander en 1916 (82). El free-martinismo es el término que se usa para denotar gemelos de diferente sexo unidos por anastomosis vasculares coriónicas, en donde el gemelo femenino, presenta características sexuales masculinas. A partir de estos estudios, se consolidó el concepto funcional de la diferenciación sexual embrionaria a nivel hormonal, así como su comprobación experimental. Por lo que se considera a estos tres investigadores como los responsables de acrisolar la Teoría Hormonal de la Diferenciación Sexual (20; 51). Para explicar este proceso, los investigadores mencionados, propusieron que el desarrollo anormal del gemelo femenino era ocasionado en un estadio muy temprano del desarrollo embrionario, por una sustancia secretada por las gónadas del gemelo masculino. En consecuencia, estos autores sugirieron que el agente transformante era una hormona producida por las gónadas del feto masculino.

I.b.- LA DIFERENCIACION SEXUAL EN VERTEBRADOS

I.b.1.- ANFIBIOS, AVES y MAMIFEROS

La hipótesis de que la diferenciación sexual estaba determinada por hormonas producidas y secretadas por las gónadas, fomentó las investigaciones experimentales para abordar el problema de la diferenciación sexual embrionaria. Los primeros estudios experimentales fueron realizados por Mincoura en 1921 (99) haciendo transplantes de tejido gonadal embrionario en el pollo y por Burns en 1924 (18) y 1925 (19) mediante parabiosis en embriones de anfibio. Más tarde, los investigadores se interesaron por determinar la influencia de factores extrínsecos, como la temperatura, sobre la diferenciación sexual en anfibios. Los experimentos clásicos en este sentido, incluyeron el empleo de temperaturas extremas, no fisiológicas, para provocar la inversión sexual en larvas de anfibios (131; 151; 192; 213-215), utilizando posteriormente peces (34; 151).

A partir de la década de los cuarentas, los investigadores pudieron aplicar nuevas técnicas para abordar estos estudios en embriones de aves (171; 221) y mamíferos (77), por ejemplo, la castración por irradiación, el cultivo de órganos sexuales, y la administración de hormonas esteroides sexuales (HES) a

embriones y a animales sexualmente inmaduros y maduros (46; 51; 151).

Los estudios bioquímicos de las HES se desarrollaron a partir de la década de los años 30's (20; 32). En 1935, Dantchakoff (30); Willier et al.(212), y Wolff y Ginglinger (219; 220), demostraron que la administración de HES a embriones masculinos de pollo alteraba los conductos sexuales, provocando intersexualidad e inversión sexual de las gónadas, limitando la acción de estas HES a una etapa determinada del desarrollo. Sin embargo, estos hallazgos no indicaban si la ontogenia de la diferenciación sexual dependía de las HES biosintetizadas y secretadas por las gónadas embrionarias. Wolff en 1947 (218) al efectuar trasplantes homotípicos de trozos de gonadas embrionarias de pollo, a pollos previamente castrados, concluyó que las gónadas transplantadas tanto masculinas como femeninas, biosintetizaban hormonas esteroides, ya que provocaban la diferenciación de los conductos sexuales del huésped. Sin embargo, estos resultados no sugerían que bajo condiciones fisiológicas, las hormonas esteroides embrionarias realmente estuvieran jugando algún papel en la diferenciación sexual (221; 222).

Las anteriores evidencias, indican que la diferenciación de los órganos sexuales accesorios se lleva al cabo a partir de la

presencia de las gónadas embrionarias, al través de sus HES secretadas (para revisión 20; 24; 51; 151). Por otro lado, hoy en día se desconoce si realmente las HES participan en la autorregulación de la diferenciación gonadal, los mecanismos por los que se llevaría a efecto, así como el dilucidar los mecanismos por los que las HES provocan la reversión sexual gonadal.

I.b.2.-

REPTILES

El estudio del desarrollo gonadal y de los conductos genitales en reptiles, se inició a finales del siglo diecinueve (para revisión vease 46; 151). El primer trabajo experimental fué realizado por Sanfelice en 1888 (45), quien al extirpar parte del testículo de la serpiente *Natrix* (*Tropidonotus*) *natrix* y de la lagartija *Lacerta agilis* observó cierta regeneración de la gónada. Esta línea de investigación se reinicia a principios del siglo XX con los trabajos de Regamey en 1935 (156) quien al castrar machos y hembras de *Lacerta agilis*, encontró que los sexos eran ambiguos. Este mismo investigador al transplantar testículos en hembras ovariectomizadas observó la transformación del ducto a vaso deferente y del rudimento mesonéfrico a una estructura semejante al epididimo. Por el contrario, el mismo experimento realizado en machos no tubo el éxito esperado. Jensen en 1939 (45) demostró el efecto de la castración en la toruga *Terrapene carolina* sobre la reducción del tamaño del epididimo. Takewaki y Hatta en 1941 (45) al ovariectomizar una serpiente *Natrix* sp., observaron la atrofia de los oviductos. Otros estudios demostraron que la eliminación de las gónadas, producía atrofia de otros órganos del aparato reproductor (para revisión 20; 45; 151).

Raynaud en 1964 (134) cultivó trozos de la región caudal de embriones de *Anguis fragilis* en ausencia de las gónadas pero manteniendo intacta la parte de los conductos de Wolff y de Muller, el mesonefros, urodeo y proctodeo, observando que el primordio fálico, así como los genitales externos, se diferenciaron normalmente. Dufaure en 1965 (37) al realizar una destrucción parcial o total de los primordios gonadales de *Lacerta vivipara*, encontró que el falo de las hembras se diferenciaba en un pene y el de los machos se desarrollaba normalmente. Este autor propuso que durante cierto estadio del desarrollo normal, los estrógenos secretados por los ovarios embrionarios, inducirían la regresión del primordio de los genitales externos, mientras que en los embriones masculinos el falo se desarrolla autónomamente, debido a que los testículos en diferenciación no secretan estrógenos. En estudios posteriores este mismo autor demostró la regresión de los primordios genitales externos de *L. vivipara* al cultivarlos en membrana alantoidea en presencia de estrógenos (38). Por otro lado, Raynaud y Frilley en 1965 (143) al destruir totalmente por irradiación el primordio gonadal de *Anguis fragilis* encontraron que los genitales externos en ambos sexos, se desarrollaron normalmente. Raynaud y Pieau en 1973 (149) y 1974 (150) al cultivar durante siete días un conducto de Muller de 24 días de desarrollo de la tortuga *Emys orbicularis* en presencia de testículos embrionarios de

Testudo graeca, demostraron una clara regresión del epitelio de los conductos de Muller.

A los estudios arriba mencionados, se suman los referentes a la estrategia experimental de determinar los efectos de las hormonas esteroides sexuales, sobre gónadas y órganos accesorios de reptiles en etapa prepúber como púber. Administrando primero extractos con actividad estrogénica (foliculina) y posteriormente, el de administrar estrógenos y andrógenos puros. La foliculina era un extracto de líquido folicular de aves y que presentaba efectos estrogénicos (20; 51; 222), demostrándose que este extracto folicular o de ovarios de *Crotalus terrificus* en efecto, tenía actividad estrogénica ya que en ratonas ovariectomizadas provocó el estro (47). Al inyectar foliculina de mamífero a tortugas (*Testudo iberica* (79)) y lagartijas (*Sceloporus sp.* (56)) prepúberes, en las hembras los oviductos se hipertrofiaron y en los machos (lagartijas) el diámetro de los epididimos se redujo. La foliculina de *Anolis sp.* inyectada a machos púberes del mismo género sus testículos se atrofiaron (41).

La administración de estrógenos puros como la estrona a hembras prepúberes del lagarto *Alligator mississippiensis* (42; 45), a la tortuga *Malaclemys sp.* (161), de dietiletilbestrol en crías de la tortuga *Emys leprosa* (185; 196; 198), así como

de benzoato de estradiol al saurio *Anguis fragilis* (133), la zona cortical de los ovarios se hipertrofió, así como de estimular el crecimiento de los oviductos, y en serpientes adultas de *Uromastix* sp. la administración de dipropionato de estradiol provocó el crecimiento de los conductos genitales (81).

Por su parte, la administración de andrógenos a hembras en etapa reproductiva, la androsterona en *Uromastix* sp. (80) o la testosterona en *Hemidactylus flaviviridis* (167) hipertrofiaron sus oviductos y el falo. En machos y hembras castrados de la serpiente *Tamnophis* sp. la administración de propionato de testosterona estimuló el crecimiento de los órganos sexuales accesorios (202), y en lagartos (*A. mississippiensis* (43; 44)) y saurios (*Anguis fragilis* (132; 139)) recién eclosionados y prepúberes la administración de este andrógeno como de testosterona, se estimula el crecimiento de sus órganos sexuales accesorios. En cocodrilos (*Crocodilus niloticus* (55)) recién eclosionados la administración de testosterona, en las hembras provoca la formación de un testóide (estructura que presenta células germinales preespermatoogénicas en la región posterior de la gónada, desprovista de corteza), la hipertrofia de los conductos de Muller, así como de un escaso estímulo sobre el desarrollo de los conductos de Wolff y masculinización de la

cloaca. Por su parte la administración de testosterona en tortugas recién eclosionadas (*Malaclemys terrapin* (161); *Emys leprosa* (197) y *Anguis fragilis* (130; 140; 141)), en los machos provocó hipertrofia de los conductos de Wolff y del falo.

Aunque son muchos los estudios que se han realizado, utilizando a la clase Reptilia como modelo experimental para esclarecer los mecanismos involucrados en el establecimiento de la diferenciación sexual, no se ha logrado a la fecha integrarlos adecuadamente de modo que nos permitan comprender mejor este proceso fundamental para la perpetuación de las especies de esta Clase.

II.- EFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA DIFERENCIACION SEXUAL EMBRIONARIA EN REPTILES

El estudio experimental de los efectos de las hormonas esteroideas sexuales (HES) exógenas sobre la diferenciación sexual embrionaria en reptiles, se inició en forma independiente por Dantchakoff (30; 31) y Risley (157-160) a mediados de los años 30's. La administración de estrógenos a huevos de reptiles en diferentes etapas del desarrollo embrionario, la foliculina, la estrona como el estradiol, en lagartijas de *Lacerta sp.* (30; 31) más no en serpientes de *Thamnophis sirtalis* (68) provocaron la reversión del sexo masculino. En *Lacerta viridis* el estradiol administrado antes de su diferenciación sexual gonadal inhibe el desarrollo de los primordios de los órganos copulatorios (36; 38), así como de reducir el tamaño de los conductos de Muller y de los genitales externos (135-138).

Por su parte, la administración de andrógenos como el propionato de testosterona a tortugas de *Chrysemys marginata bellii* provocó una reversión parcial del sexo femenino (conversión parcial de los ovarios en testículos), y en lagartijas de *Lacerta vivipara* (35; 36; 38) y *L. viridis* (139; 140) concentraciones bajas (< 250 mg) provoca reversión sexual femenina (conversión de ovarios en testículos) y a dosis

altas (> 250 mg) provoca agenesia de los conductos de Muller e hipertrofia los de Wolff, además de modificar los conductos urinarios y el falo, así como de provocar en ambos sexos de *Anguis fragilis* el desarrollo de ovarios (132; 139-141; 154), proceso denominado por Gallien como efecto paradójico (50; 51). Este mismo andrógeno al ser administrado en etapas avanzadas del desarrollo embrionario en serpientes de *Thamnophis sirtalis* (68), en los machos provocó hipertrofia de de los conductos de Muller, así como de discretas modificaciones morfológicas en el aparato genital. En las hembras inhibió el desarrollo folicular persistiendo los cordones sexuales medulares en los ovarios. La testosterona administrada en el alantoides de *Anguis fragilis* antes y durante la diferenciación sexual, provocó la hipertrofia de los conductos de Wolff en embriones de ambos sexos, además de acortar de manera patente los conductos de Muller (140; 141; 154). Por su parte, este andrógeno al ser administrado a serpientes de *Thamnophis sirtalis* en etapas avanzadas de su desarrollo embrionario provocó en los machos hipertrofia de los conductos de Wolff y del mesonefros (68)

III.- INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ESTEROIDOGENICA EN ORGANOS UROGENITALES EMBRIONARIOS DE REPTIL SOBRE LOS MECANISMOS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

La embriología descriptiva ha proporcionado importante información sobre el desarrollo embrionario del aparato genital en los reptiles (46; 151), sin embargo se conoce poco sobre los mecanismos tanto fisiológicos como bioquímicos que intervienen en su diferenciación sexual gonadal, así como del desarrollo de su aparato genital. Se sabe que poco después de la formación de los túbulos seminíferos en *Anguis fragilis*, las células internas de la gónada se vuelven fuertemente basófilas, lo que sugiere la biosíntesis de proteínas durante la diferenciación testicular (145), así como de una precóz capacidad de biosintetizar hormonas esteroides sexuales (152). Además se ha demostrado que al igual que en las aves, la diferenciación y desarrollo del primordio gonadal genital como lo son las gónadas, ductos genitales, urodeo, y el falo depende de interacciones inductivas (151).

Teniendo en consideración la Teoría Hormonal de la Diferenciación Sexual, se ha hecho uso de la técnica hitoquímica para constatar actividad esteroideogénica en estadios tempranos del desarrollo. Mediante esta técnica, se han mostrado evidencias que demuestran que las células de la

pared de los túbulos seminíferos del testículo embrionario de *Anguis fragilis* presentan una actividad secretora (152; 153). Por ejemplo, poco después de su diferenciación testicular, las células epiteliales de los túbulos seminíferos, contienen gránulos de lípidos en el epitelio germinal (superficie del testículo) (152; 153). Algunas gotas de lípidos como de colesterol, se localizan en el tejido intertubular; estas se han observado en las células somáticas de los túbulos seminíferos de embriones de 15 días de la tortuga *Podarcis sicula* (29).

Mediante las técnicas histoquímicas también se ha estudiado, a nivel gonadal, la presencia de la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de HES, como por ejemplo, la A5-3B-ol-hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Enzima que transforma la estructura A5-3B-hidroxi de los precursores esteroides sin actividad biológica, a compuestos activos con estructura A4-3-cetona (vease inciso VII.a). En embriones de *Podarcis sicula* de 15 días de desarrollo, los ovarios presentan una reacción positiva a dicha enzima a nivel de la médula pero no en la corteza, mientras que en el testículo, dicha reacción se localiza en las células somáticas de los túbulos seminíferos (29). En las gónadas de embriones masculinos de *Lacerta vivipara* se ha detectado la actividad de esta enzima en los cordones sexuales a partir del día 17-18 del desarrollo, días

que corresponden al estadio en que se lleva al cabo la diferenciación testicular (39). En estadios del desarrollo más avanzados, la reacción en los machos se localiza en los túbulos seminíferos (región medular), siendo rara o ausente en los tejido cortical y germinal. En las hembras se hace evidente en la región medular del ovario, siendo muy escasa en el epitelio germinal (39; 101). En *Vipera aspis* después de su eclosión, la actividad de la enzima se hace patente en los testículos a nivel de los túbulos seminíferos, principalmente en las células intersticiales (probablemente células de Leydig), en cambio en las hembras no se hace evidente en los ovarios (100; 101).

La actividad de la enzima, se hace patente únicamente en las gónadas en diferenciación de embriones de *Emys orbicularis* que se desarrollaron bajo el efecto de la temperatura masculinizante (117; 118). En cambio, en embriones de la tortuga marina sexo-termodependiente *Lepidochelys olivacea* la enzima se hace evidente sólo en la glándula suprarrenal durante la ontogenia de la diferenciación sexual gonadal en embriones de ambos sexos (96).

Al estudiar la relación entre la actividad esteroidogénica y la regresión de los conductos Mullerianos en embriones de reptiles del sexo masculino, la actividad de la enzima A5-3B-01-hidroxiesteroide-deshidrogenasa se hace patente en los

embriones de *Podarcis sicula* de 18 días de incubación, época en que se presenta la diferenciación de los conductos de Muller y que coincide con la adquisición de los caracteres sexuales secundarios (29). En *Vipera aspis* (100; 101) y en *Lacerta vivipara* (100; 101) la actividad de esta enzima en los testículos se hace evidente también durante la regresión de los conductos de Muller. Raynaud y Pieau (146) encontraron que en los embriones masculinos de *Lacerta viridis* la actividad de la enzima se hace evidente en los cordones testiculares, incrementándose durante el cese del crecimiento y subsecuente destrucción de los conductos de Muller. Actualmente se sabe que este proceso en reptiles, al igual que en otras clases de vertebrados, requiere de HES secretadas por la gónada en diferenciación como por los testículos embrionarios (45; 151). Recientemente Austin (3) ha estudiado el papel de las HES sobre la regresión de los conductos de Muller, utilizando como modelo al lagarto americano *Alligator mississippiensis*, demostrando que la testosterona ni potencia la regresión de los conductos de Muller ni causa por si misma su regresión como sucede en las aves (69; 92; 191) y los mamíferos (70), proponiendo que el testículo de este lagarto probablemente produce una molécula semejante al factor inhibidor de los conductos Mullerianos (FIM; MIS o AMH; 76) y que los estrógenos previenen la acción inhibitoria sobre estos conductos debida a la sustancia(s) producida(s) por el testículo.

Por último, la evidencia que ha indicado la presencia de hormonas esteroides sexuales (HES) durante la diferenciación sexual gonadal y su papel que juegan en dicho proceso, es el estudio de Pieau y colaboradores (128). Estos investigadores estudiaron la producción de hormonas esteroides en relación con la temperatura de incubación durante la diferenciación sexual gonadal de la tortuga sexo-termodependiente *Emys orbicularis*, para lo cual cuantificaron por radioinmunoanálisis la concentración, a nivel gonadal, de 8 esteroides: tres de ellos precursores en la biosíntesis de HES (pregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstendiona) y cinco HES (progesterona, testosterona, dihidrotestosterona, estrona y estradiol). Encontrando, por ejemplo, que en embriones de la etapa 24, que corresponde a gónadas ya diferenciadas en ovarios o testículos, los embriones provenientes de huevos que fueron incubados bajo la temperatura masculinizante (24-26°C), la concentración de los estrógenos (estrona >> estradiol) fue mayor, en cambio en los embriones cuyos huevos fueron incubados a la temperatura feminizante (29-30°C) la concentración de ambos estrógenos fue considerablemente menor. Por su parte, en ambos sexos de la misma etapa la testosterona fue indetectable. Con respecto a la concentración total de los ocho esteroides, ésta fue mayor en los embriones, tortugas eclosionadas y tortugas jóvenes (tres meses de edad) provenientes de huevos incubados a la temperatura masculinizante que en los incubados

a la temperatura feminizante. Con base a estas observaciones, Pieau y colaboradores (128) proponen que en esta especie, en efecto, existe una correlación entre la diferenciación sexual gonadal y la concentración de HES, así como con la temperatura de incubación.

IV.- LA TEMPERATURA COMO FACTOR EPIGENETICO
EN LA DETERMINACION DEL SEXO

IV.a.- EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION
SOBRE LA DETERMINACION DEL SEXO
EN REPTILES

Se conoce que en algunas especies de vertebrados la temperatura ambiental, es un factor epigenético exógeno que interviene en el establecimiento del sexo. Esto se ha observado en algunos miembros de las Clases Pisces (23; 67), Anfibia (26; 34) y Reptilia (24; 151; 200). En esa última Clase, se tienen evidencias de que en dieciseis géneros, entre los que se incluyen cinco de tortuga marina (*Caretta*, *Chelonia*, *Eretmochelys*, *Dermochelys* y *Lepidochelys*) la temperatura de incubación influye sobre la determinación del sexo. La mayoría de los estudios realizados a este respecto (11; 12; 181; 200), han tenido un enfoque evolutivo, ecológico y/o conservacionista, sin tratar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares involucrados en este hecho. Por otro lado, los trabajos de Crews et al. (25), Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (97) y Pieau (117-119; 128; 129), han sido enfocados para conocer el mecanismo mediante el cual la temperatura de incubación determina la diferenciación sexual, dando por resultado, hipótesis sobre como esta variable

epigenética, regula la diferenciación sexual gonadal (para revisión 24; 151).

A principios de los años 30's, Risley (157; 158) sugirió la conveniencia de usar embriones de la tortuga *Sternotherus odoratus* como modelo experimental para estudiar la diferenciación sexual gonadal, ya que encontró casos patentes de reversión de ovarios a testículos en animales provenientes de huevos incubados a no más de 30°C bajo condiciones de laboratorio. Observando que las gónadas de los embriones masculinos se revertían, pasando los testículos por una etapa de gónada femenina típica, es decir, desarrollaban una corteza bien definida. Esta fase hermafrodita persiste hasta la eclosión o la eventual madurez sexual (158; 160). A pesar de la proposición de Risley, los reptiles "sexo-termodependientes" pasaron desapercibidos como modelo experimental en el estudio de los procesos implicados en la diferenciación sexual. No fue sino hasta el trabajo de Charnier en 1966 (28) quien estudió los procesos de diferenciación gonadal en la lagartija *Agama agama* usando temperaturas variables de incubación, trabajo que dió la pauta para estudiar el efecto que tiene la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo. Este investigador encontró que de los huevos incubados entre 26-27°C se desarrollaban principalmente hembras y a 29°C machos. A partir de este trabajo, y particularmente en

quelonios, surgieron los trabajos pioneros de Pieau sobre las tortugas *Testudo graeca* y *Emys orbicularis* (115; 116; 118-125; 127) y los de Yntema sobre la tortuga *Chelydra serpentina* (224-227).

Pieau estudió el efecto de diferentes temperaturas de incubación sobre la proporción de los sexos en embriones, neonatos y tortugas jóvenes de *Emys orbicularis*. El examen en cada uno de estos animales del aparato genital, los conductos de Muller y la histología gonadal, reveló que los huevos incubados a temperatura constante entre 18-35°C, se desarrollaron machos, hembras e intersexos, y por debajo de los 27.5°C todos los embriones mostraron un fenotipo masculino (115; 116; 118; 119; 123; 124). En un experimento posterior (123) se incubaron los huevos de esta misma especie a 25°C±1°C, pero la determinación del tipo de sexo de los animales se realizó varios meses después de la eclosión. La observación de que todos los animales presentaban sexo masculino demostró la persistencia del tipo de sexo (por lo menos hasta esta etapa) determinado por la temperatura de incubación. En incubaciones entre 27.5-28°C se desarrollaron en mayor proporción machos, encontrando intersexualidad en algunos especímenes. Entre 28-29°C se desarrollaron ambos sexos, así como intersexos (123). En incubaciones entre 28.5-29°C la mayor proporción se desarrolla como hembras,

mientras que a 29-29.5°C aunque la mayoría son hembras se encontraron también algunos intersexos (123). Entre 29.5-30°C todos los embriones, tortugas de recién eclosión y tortugas de más de tres meses posteclosión se desarrollaron como hembras (115; 116; 119; 122; 123; 124; 127).

Por su parte, Yntema encontró que al incubar huevos de *Chelydra serpentina* a 22, 26 y 28°C la mayoría de las tortugas son machos, presentando algunas ovotestes. A 24°C sólo se desarrollan machos y a 30°C sólo se desarrollan hembras (224-227). Resultados similares han sido obtenidos por Wilhoft et al. (208). Estudios llevados al cabo por Pieau sobre *Testudo graeca* indican que huevos incubados abajo de los 30°C se desarrollan machos, pero arriba de los 31°C se desarrollan tortugas que presentan testículos atípicos (115; 116; 121).

Los términos de temperatura crítica (118; 119; 121-123; 127; 230), pivote (104; 230), sensible (1) o umbral (11), han sido usados para designar el rango de temperatura (1°-2°C) en que ambos sexos (y algunas veces intersexos) pueden diferenciarse entre los individuos del mismo nido, y arriba o abajo de esta temperatura, el fenotipo sexual puede manifestarse o invertirse. Para establecer estos periodos, los huevos son puestos o intercambiados en diferentes estadios del

desarrollo embrionario, bajo el efecto de una sola temperatura, ya feminizante o masculinizante. Siendo el período termosensible el tiempo que corresponde a la duración mínima de exposición a una o a otra temperatura, resultando el desarrollo de hembras o machos. Siendo por tanto dos períodos, uno para la diferenciación de hembras y otra para los machos (125; 127).

La tortuga *Chelydra serpentina* muestra dos temperaturas umbral, una cercana a los 29°C (que es la temperatura más definida en Emydidae) en la que se desarrollan hembras y la otra cercana a los 21°C, en la que se desarrollan machos (224-227). Para *Testudo graeca* es entre 30 y 31°C (121), así como a los 21 y 29°C (224-227). En ambas especies aún no se ha determinado una temperatura en donde se encuentre una relación macho:hembra 1:1 (116; 121; 208; 224-227). En *Chelydra serpentina* (224-227) y en *Sternotherus odoratus* (201) se desarrollan hembras tanto a altas como a bajas temperaturas. De huevos de esta última especie, incubados a 23.5°C se desarrolla un 19% de machos, a 28.0-29.5°C un 3%, y a 30.5°C un 82%. Estos resultados indican la presencia de una temperatura umbral entre 23° y 25°C y otra entre 25° y 28°C (199-201). Correspondiendo el efecto feminizador a "un fenómeno natural que mantiene el balance en la relación de sexos en poblaciones a latitudes altas o durante años calientes no frecuentes, en donde las temperatura: incubación

naturales pueden tender a producir una preponderancia de machos" (201). En *Emys orbicularis* la temperatura umbral es de $28.5^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ (123; 127).

Otros estudios llevados al cabo para determinar periodos sensibles han sido en *Emys orbicularis* (120; 127), *Chelydra serpentina* (226), *Graptemys ouachitensis* y *Chrysemys picta* (14), *Caretta caretta* (229; 230), *Dermodochelys coriacea* (162), y *Lepidochelys olivacea* (1). Embriones de *E. orbicularis* en la etapa 16 (según tabla de Yntema para *Chelydra serpentina* (223)), estadio en donde aún las gónadas son histológicamente indiferenciadas, provenientes de huevos incubados bajo la influencia de una temperatura de 30°C son 100% hembras, y a 25°C son 100% machos. La duración del período termosensible es de 11 a 12 días (etapa 16 antes de los 22 días de incubación para las hembras, y antes del día 21 de incubación para los machos) (127). A 35°C se requieren 6 a 7 días, observándose que la velocidad de desarrollo es la misma en ambas temperaturas (125). *Graptemys ouachitensis* y *Chrysemys picta* muestran un "primer período sensible" que es definido como "el intervalo del desarrollo en que el sexo es irreversible" (14), y un "período secundario sensible" que precede a la diferenciación gonadal, en donde "el sexo es influenciado por la temperatura pero no es irreversible" (14). El primer período sensible ocupa los estadios 16-22. El período

secundario es difícil de delimitar exactamente, pero incluye algunos o todos los estadios 9-15. A 25°C se desarrollan machos y a 31°C a hembras (14). En *Chelydra serpentina* el periodo termosensible se extiende del estadio 14 al 19 en experimentos de intercambio de 30° a 26°C y del estadio 14 al 16 en experimentos de intercambio de 20° a 26°C (226). Incubaciones a 26°C durante el estadio 14 a 19 sólo se desarrollan machos y a 30°C llevadas al cabo durante la primera o segunda mitad de este periodo, se desarrollan hembras (226). Estableciéndose un mínimo de 4 hrs por día a 30°C durante el periodo crítico en *C. serpentina* desarrollándose sólo hembras (208). Periodos menores a 4 hrs por día decrecen el porcentaje de hembras, por lo que parece ser que en esta especie, la diferenciación masculina necesita una exposición mayor a los 26°C que la diferenciación femenina que se establece a los 30°C (208).

El efecto de la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo en tortugas bajo condiciones naturales, ha sido estudiada en cinco especies de Emydidae (*Emys orbicularis*, 120; 123; 125; *Graptemys ouachitensis*, *G. pseudogeographica*, *G. geographica*, 13; 14; *Chelydra serpentina*, 208) y en cuatro de tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea*, 1; 95; 106; 164; *Chelonia mydas*, 106; *Caretta caretta*, 103; 104; 105; 228; 229; *Dermochelys*

coriacea, 105; 162; 163). En *Emys orbicularis* los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos en el laboratorio, mostrando que la relación de sexos en esta especie bajo condiciones naturales, depende de la temperatura del suelo durante el período termosensible para la diferenciación sexual gonadal. En *Graptemys ouachitensis*, *G. pseudogeographica* y *G. geographica* nidos expuestos al sol en donde la temperatura excedió los 30°C, la progenie fué femenina, y huevos colocados a la sombra, en donde la temperatura raramente excedió de los 30°C, la progenie fué masculina (13; 14). En *Chelydra serpentina* existe en los nidos un gradiente de temperatura. En los huevos situados en la parte superior del nido, sujetos a mayor temperatura durante el día que los huevos situados en el fondo del nido, se desarrollaron ambos sexos, siendo estadísticamente mayor la proporción de hembras (parte superior del nido) (208). Encontrándose que la distribución geográfica de especies de la subfamilia Emydinae en los E. U. (15) a temperaturas altas, las poblaciones en las regiones sureñas más que en las norteñas se desarrollan machos.

En tortugas marinas se sabe que huevos de *Chelonia mydas* de nidos que estuvieron bajo una temperatura fluctuante, siendo en promedio menor de los 28°C, se desarrollaron hasta un 10% de machos, en cambio en nidos cuya temperatura se mantuvo más estable, siendo en promedio arriba de 29.5°C, se

desarrollaron de 95 a 100% de hembras. Los huevos incubados a baja temperatura (< de 27.5°C) se desarrollaron tortugas intersexuadas (106). Observaciones similares han sido hechas para *Lepidochelys olivacea* (106; 164). En *Dermochelys coriacea* (105; 162; 163) durante estaciones templadas, en donde la temperatura de incubación es menor de los 29°C, la relación favorece principalmente el desarrollo de machos, mientras que en las estaciones calientes, en donde la temperatura de incubación es mayor a los 30°C se desarrollan principalmente hembras. Además se observa, que al final del período de incubación, la relación de sexos se vuelve 1:1. A partir de estos hechos, Rimblot y colaboradores (163) sugieren que bajo condiciones naturales, la temperatura de incubación no influye sobre la diferenciación gonadal en las tortugas marinas y que la diferenciación sexual está estrictamente regulada a nivel genético, por lo que la relación de 1 macho:1 hembra se establece independientemente de la temperatura de incubación prevaleciente en cada temporada. Además, estos investigadores hacen notar la influencia de otros factores sobre la determinación del sexo como serían la influencia del calor metabólico en las tortugas marinas (102; 216; 230), y la humedad del nido (63).

IV.b.- EFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES Y OTRAS
MOLECULAS SOBRE LA DIFERENCIACION SEXUAL EN
REPTILES SEXO-TERMODEPENDIENTES

Al redescubrir a principios de los años 60's el hecho de que la temperatura de incubación regulaba la diferenciación sexual en algunas especies de Reptiles (vease apartado IV.a), y tomando en consideración los resultados del efecto de las hormonas esteroides sexuales (HES) durante la diferenciación sexual gonadal como de los caracteres sexuales secundarios, se dió inicio a investigar su efecto sobre la diferenciación sexual en reptiles sexo-termodependientes. Es decir, investigar si esta variable epigenética determina el sexo al través de las HES; iniciandose con las investigaciones de Raynaud a mediados de los años 60's (136-138; 155). La estrategia experimental seguida para llevar al cabo estos estudios ha sido la de administrar andrógenos o estrógenos puros, así como de agonistas y antagonistas de HES, a huevos de reptiles sexo-termodependientes incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante o feminizante durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Al administrar estradiol o benzoato de estradiol a huevos de saurios (*Lacerta viridis* (135-138) y *Anguis fragilis* (133; 144; 155)), así como de tortugas (*Testudo graeca* (113; 114) y *Emys orbicularis*) (119; 129)), incubados a temperatura masculinizante ($26 \pm 1^{\circ}\text{C}$)

y en etapas tempranas del desarrollo o antes de la diferenciación testicular se forman ovotestes. Estas "gónadas" que en realidad son un pseudo-ovario o "hipo-ovario" según Dantchakoff (31), se desarrollan a raíz de que se lleva al cabo una reversión gonadal, por lo que los testículos presentan características de ovarios.

Si el benzoato de estradiol es administrado una vez que se han diferenciado los testículos de *T. graeca*, sólo disminuye el diámetro de los túbulos seminíferos (113; 114). Sin embargo, con la administración de testosterona a huevos de *E. orbicularis* incubados a temperatura masculinizante, se observa un patente efecto paradójico (119) (ver apartado II), demostrándose además que los conductos de Muller en machos de reptiles sexo-termodependientes sufren regresión por efecto de la testosterona secretada por la gónada masculina en diferenciación (148-150), siendo mayor el efecto a partir del establecimiento de los testículos debido al mayor metabolismo del andrógeno (3; 151). Lo anterior es congruente con los resultados histoquímicos de la actividad de la enzima A5-3B-ol-hidroxiesteroide-deshidrogenasa, que muestra variación en su actividad durante la diferenciación testicular (146; 151) (vease apartado III).

Recientemente se han confirmado los hallazgos anteriores de

que las HES exógenas son capaces de revertir el efecto de la temperatura de incubación sobre la determinación sexual en reptiles sexo-termodependientes. La administración de benzoato de estradiol a huevos de lagartija (*Eublepharis macularius*), cocodrilo (*Alligator mississippiensis*), y tortuga (*Chrysemys picta* y *Chelydra serpentina*) incubados a temperatura masculinizante, en un estadio de sensibilidad específico para la acción del estrógeno (65), condiciona únicamente el desarrollo de hembras (64; 25). Esta serie de evidencias sugieren que en los reptiles sexo-termodependientes, al igual que en las aves (171), los estrógenos participan en la regulación de la diferenciación sexual gonadal. Existen en la literatura dos evidencias a nivel experimental que apoyan la hipótesis anterior. La primera es la de Dorizzi y col. (33) quienes al administrar Tamoxifén (un antiestrógeno) a huevos de *E. orbicularis* antes de su etapa crítica e incubados a temperatura feminizante, se desarrollan ovotestes. De estas observaciones el grupo de investigadores concluyen: a) que el estradiol (u otro estrógeno) interviene en la diferenciación sexual de los ovarios bajo el efecto de la temperatura elevada (feminizante), y b) que la temperatura de incubación modifica la biosíntesis y el mecanismo de acción de los esteroides (mayor producción de estrógenos a la temperatura elevada). La segunda evidencia expuesta por Crews y col. (25), quienes al administrar a huevos de *C. serpentina* durante su etapa

crítica HES incubados a temperatura masculinizante o feminizante, también comprobaron el efecto tanto de agonistas como de antagonistas de HES sobre la diferenciación gonadal. La administración de estradiol, un agonista (R2858) o un antisuero contra testosterona a huevos incubados a temperatura masculinizante (25°C), se indujo el desarrollo de hembras exclusivamente, y huevos incubados a temperatura feminizante (30°C) a los que se les administró testosterona, un agonista de andrógenos (R1881) o un antisuero contra estradiol, sólo se desarrollaron hembras. Ambas evidencias apoyan la proposición de que los estrógenos, en efecto, participan en la regulación de la diferenciación sexual gonadal en reptiles sexo-termodependientes.

V.- HIPOTESIS SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE LA DIFERENCIACION
SEXUAL GONADAL EN REPTILES SEXO-TERMODEPENDIENTES

Para tratar de explicar como la temperatura de incubación determina el sexo en reptiles y específicamente en quelonios sexo-termodependientes (Fig. 1), se han propuesto tres hipótesis (Fig. 2).

Raynaud y Pieau (151) presentaron la primera hipótesis que implica a la temperatura de incubación como agente causal de la determinación del sexo, particularmente, de la diferenciación sexual gonadal en la tortuga *Emys orbicularis* (Fig. 2-A). Basandose en las proposiciones de Engel et al. (40), Pieau et al. (126) y Zaborski et al. (231-234) considerando la participación del antígeno H-Y, y de las hormonas esteroides sexuales (HES) en el proceso de la diferenciación sexual gonadal (128) (vease el inciso IV.b), sugieren que la temperatura de incubación podría modificar la biosíntesis de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis de HES, así como del antígeno H-Y (Fig. 2-A). El primordio gonadal H-Y⁺, se diferenciará en ovario, si la concentración de estrógenos fuese relativamente mayor durante su periodo termosensible, y si el primordio gonadal es H-Y⁻ se diferenciará en testículo si la concentración de estrógenos es baja o nula durante el mismo periodo (Fig. 2-A). La hipótesis

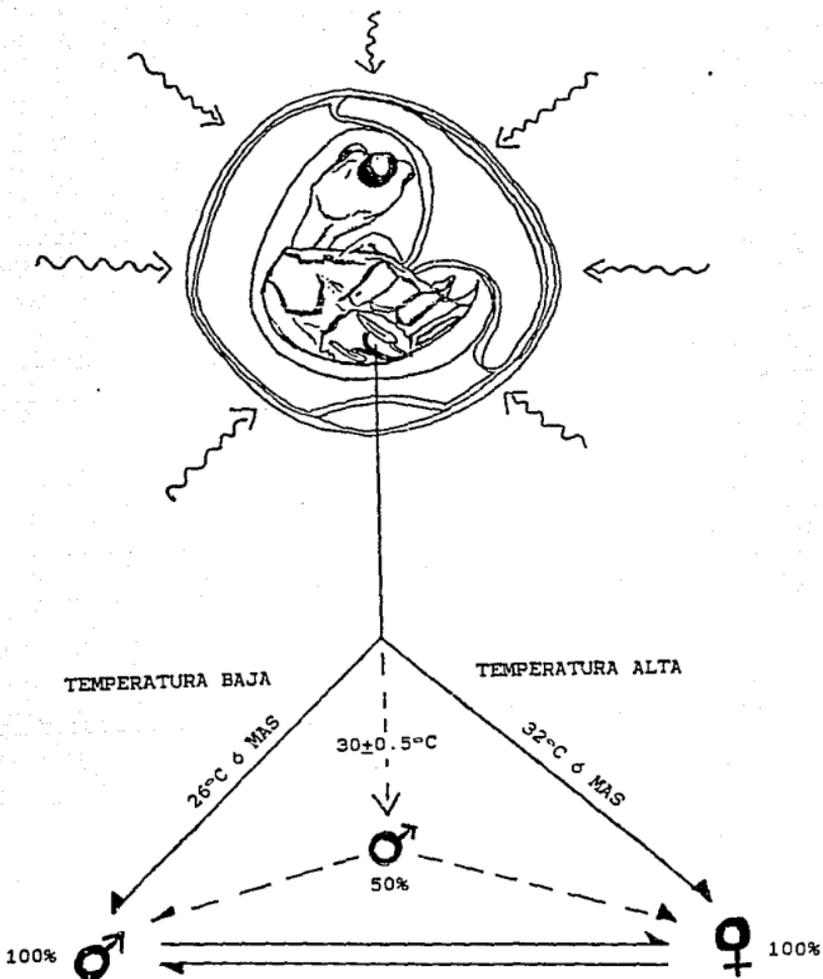


Fig. 1.- La temperatura de incubación ¿cómo actúa en la determinación del sexo gonadal en quelonios sexo-termodependientes?.

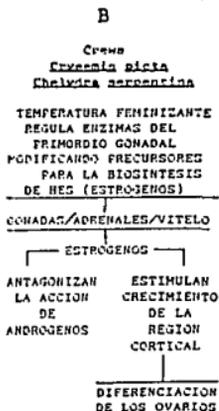
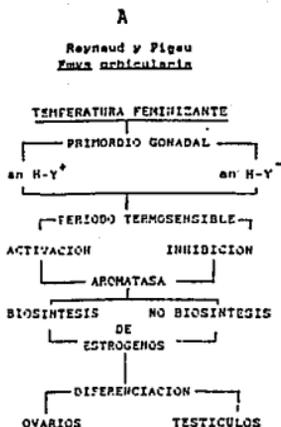


Fig. 2.- Hipótesis propuestas para explicar la determinación del sexo en reptiles (quelonios) sexo-termodependientes. Para detalles vease texto.

de estos investigadores se fortaleció la a partir de los resultados experimentales de la expresión del antígeno H-Y después de un tratamiento hormonal o de ovariectomía en anfibios y aves (para revisión 151). Para comprobar esta hipótesis Raynaud y Pieau (151) sugieren que es necesario llevar al cabo en la gónada estudios de esteroidogénesis (actividad enzimática y biosíntesis), de la expresión del antígeno H-Y, así como de biosíntesis de proteínas durante los estadios primarios del desarrollo, principalmente antes y al inicio del período termosensible gonadal en embriones de tortugas provenientes de huevos incubados a diferentes temperaturas.

Una hipótesis diferente es la propuesta por Crews y colaboradores (25) quienes sugieren que en los reptiles sexo-termodependientes, la determinación del sexo se lleva al cabo a partir de la acción de una HES mediada por la temperatura de incubación. Esta variable física al activar diferencialmente enzimas lábiles a la temperatura, favorecería la obtención de precursores de HES del vitelo, o alternativamente, de las gónadas y/o suprarrenales embrionarias (Fig. 2-B), así como de regular la biosíntesis de estrógenos y éstos al antagonizar la acción de la(s) hormona(s) masculinizante(s), favorecerían la diferenciación del ovario al través de estimular la proliferación de la región cortical de

la gónada en diferenciación (Fig. 2-B).

Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (97) proponen una tercera hipótesis para explicar el efecto de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en la tortuga marina sexo-termodependiente *Lepidochelys olivacea* (Fig. 2-C). A partir de los resultados obtenidos de una elegante serie de experimentos como fueron: el cultivo in vitro de gónadas embrionarias en diferentes estadios del desarrollo, provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante (28°C) (Fig. 3-A, 3-D) o feminizante (32°C) (Fig. 3-B, Fig.3-C), así como al intercambio de la temperatura masculinizante a la feminizante, y viceversa a huevos en diferentes etapas del desarrollo embrionario, (Fig. 4-5), y la observación que durante la fase primaria de la diferenciación sexual gonadal de este quelonio marino hay invasiones nerviosas (96), estos investigadores proponen que la diferenciación sexual gonadal por efecto de la temperatura de incubación en este quelonio es extragonadal (Fig. 2-C). La temperatura de incubación feminizante induce la biosíntesis y/o secreción de una neurohormona(s), la cual es inhibida por la temperatura masculinizante. Dichos "factores" neurohormonales, serían las moléculas morfogenéticas responsables tanto de la determinación embriológica como del mantenimiento de la diferenciación sexual gonadal femenina

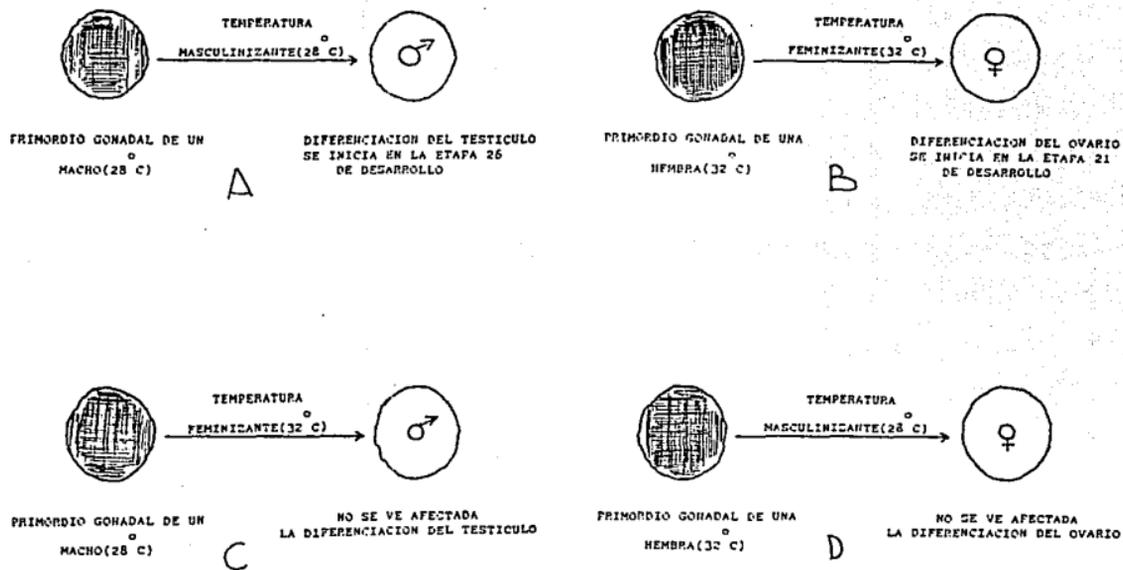


Fig. 3.- Experimentos de cultivo in vitro de gónadas de embriones de *L. olivacea*. Modificado de Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (97).

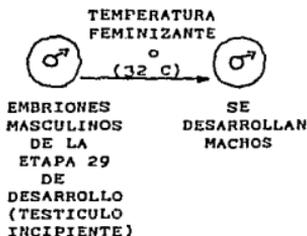
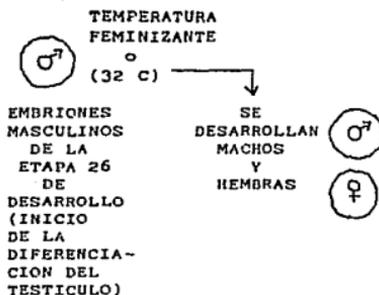
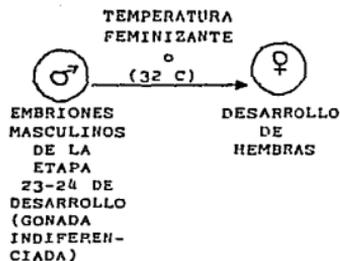


Fig. 4.- Experimentos de intercambio de huevos de *L. olivacea* de la temperatura masculinizante (27-28°C) a la feminizante (31-32°C), durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Modificado de Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (97).

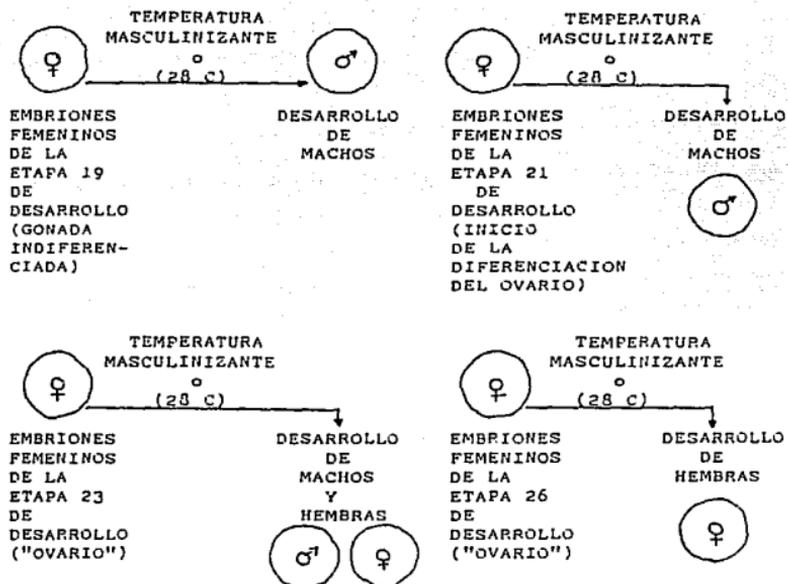


Fig. 5.- Experimentos de intercambio de huevos de *L. olivacea* de la temperatura feminizante (31-32°C) a la masculinizante (27-28°C), durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Modificado de Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (97).

(Fig. 2-C). Para que se lleve al cabo la diferenciación, estos investigadores proponen que las neurohormonas al actuar sobre el primordio gonadal femenino inducirían la biosíntesis de HES (¿estrógenos?) dando como resultado, la diferenciación de los ovarios (Fig. 2-C).

VI.- HIPOTESIS DE LA MORFOGENESIS GONADAL EN VERTEBRADOS SEXO-TERMODEPENDIENTES

La diferenciación sexual en vertebrados, como ya se mencionó anteriormente en la introducción, se establece en tres etapas (Fig. 6). Durante la segunda etapa (etapa de diferenciación gonadal) el primordio gonadal también nombrado cresta germinal, genital o gonadal sufrirá diversos procesos morfogenéticos en un estadio determinado del desarrollo que dan lugar a la diferenciación gonadal. Esta fase puede ser regulada gracias a la expresión de genes sexo-determinantes o gónada-determinantes, siendo sus productos, las moléculas gónada determinantes las que coadyubarán en las hembras la diferenciación de la cresta gonadal en ovarios y testículos en los machos. Basandose en el conocimiento de que las gónadas en los vertebrados, se desarrollan a partir del borde superior de la capa visceral del mesodermo, de la cual se forma la placa lateral, localizandose en la mitad posterior del cuerpo (Fig. 7-A). El primer esbozo de las gónadas, se observa inmediatamente a los lados del mesenterio dorsal, formando una banda longitudinal engrosada de epitelio mesodérmico que tapiza la cavidad del cuerpo. Esta banda longitudinal engrosada se llama cresta germinal o gonadal (Fig. 7-B). Esta es una estructura compacta que conforma el blastema gonadal y que está constituida por células somáticas mesenquimáticas (médula,

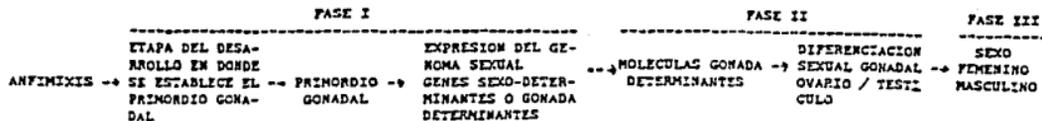


Fig. 6.- Esquema que muestra las tres fases en que se lleva al cabo la diferenciación sexual masculina como femenina en vertebrados.

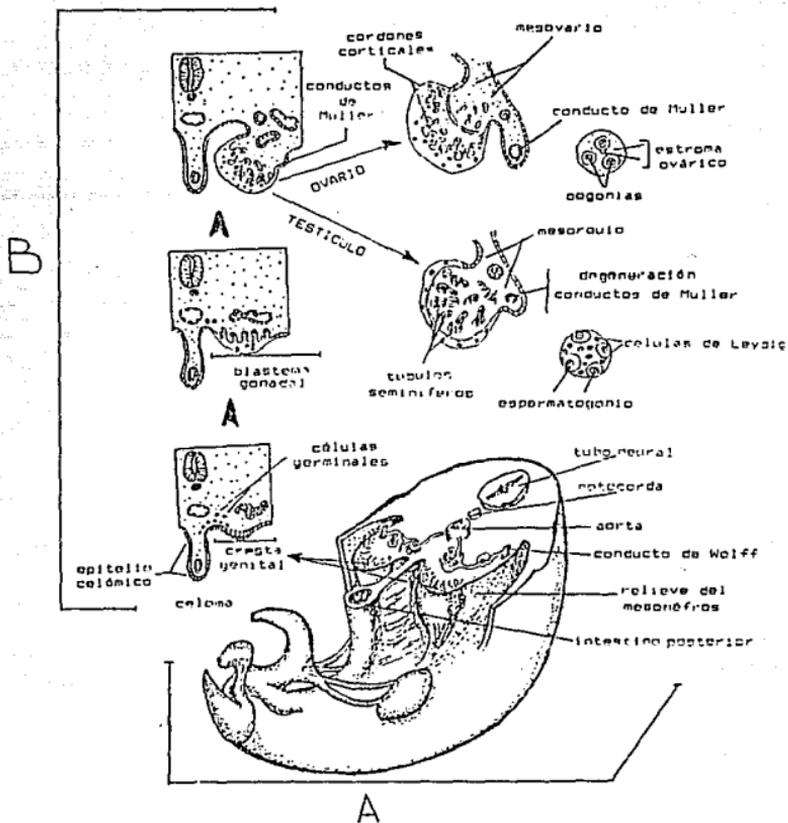


Fig. 7.- Corte transversal a nivel de la mitad posterior del cuerpo de un embrión, que muestra la localización de las crestas genitales (A). Diferentes estadios de la morfogénesis de las crestas genitales durante su diferenciación en testículos u ovarios (B).

mesenquima o estroma) rodeadas por epitelio celómico (corteza o epitelio) (83). Una vez que se ha formado el blastema gonadal, este se va constriñendo lateralmente para quedar suspendido de la pared del peritoneo (mesorquío o mesovario) (Fig. 7-B), situándose en la parte ventral del mesonefros (Figs. 7-A, B).

El blastema gonadal tiende a organizarse en dos tipos de tejidos (83): a) el tejido que contiene a las células germinales primordiales rodeadas por células somáticas precursoras de las células de Sertoli en el futuro testículo y de la granulosa en el futuro ovario, y b) el tejido estromático que dará origen al tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial esteroidogénico. Este último está representado por las células de Leydig en el futuro testículo (Figs. 7-B, 8, 9) o por las células de las tecas (interna y externa) en el futuro ovario y de la glándula interrenal (Figs. 7-B, 10, 11).

Con base morfo genética, la diferenciación gonadal masculina en vertebrados, se realiza mediante el desarrollo del mesenquima (médula) que dá origen a los cordones medulares que rodean a las células del epitelio celómico (corteza). Estas últimas al ir degenerando, dan lugar a la estructuración de los túbulos seminíferos (Fig. 8-9). Esta ontogenia morfo genética en los vertebrados sexo-termodependientes, se llevaría al cabo a partir de que la temperatura de incubación masculinizante (Fig.

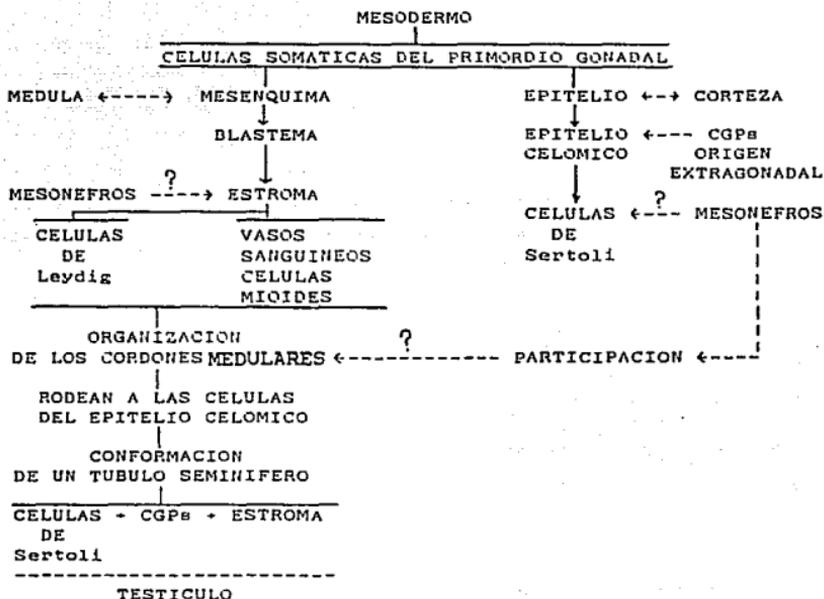


Fig. 8.- Diagrama que muestra los procesos generales de la diferenciación sexual gonadal masculina (diferenciación de los testículos) en vertebrados.

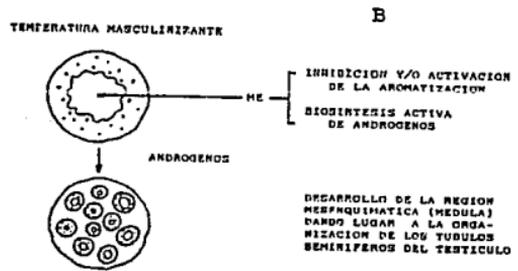
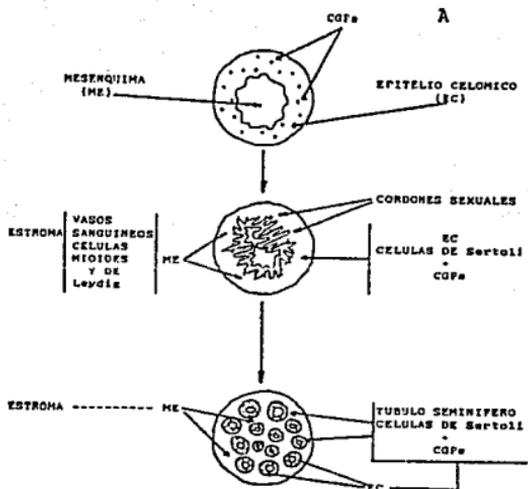


Fig. 9.- El esquema A muestra los procesos generales de la diferenciación sexual gonadal masculina (diferenciación de los testículos) en vertebrados. El esquema B muestra una hipótesis sobre la diferenciación gonadal masculina, por efecto de la temperatura de incubación masculinizante; para detalles ver texto.

9) regularia: a) la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de andrógenos inhibiendo el de la aromatasa, y b) la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de andrógenos y de estrógenos (aromatasa) a nivel medular (mesenquima). Una o ambas suposiciones, darían lugar a que la región medular (mesenquima) del primordio gonadal se desarrollará organizando los cordones medulares en túbulos seminíferos del testículo (Fig. 9).

Por su parte, la morfogénesis de la diferenciación gonadal femenina en vertebrados, se originan a partir de la disgregación de los cordones medulares del mesenquima (médula). Esta disgregación da lugar a la conformación de las tecas y el rete ovari. A partir de uno de sus compartimentos o estratos, se formarán las células foliculares (Fig. 10-11), y conjuntamente con el desarrollo activo de las células del epitelio celómico (corteza), se conformarán los folículos primordiales (Fig. 10-11). En vertebrados sexo-termodependientes esta serie de procesos morfogénéticos se llevarían al cabo, debido a que la temperatura de incubación feminizante (Fig. 11), inhibiría la diferenciación de los cordones testiculares (a mayor temperatura mayor inhibición) (124), a partir de que: a) activaría la expresión del gen de la aromatasa, principalmente a nivel de la médula (mesenquima), y b) regularía la actividad de las enzimas involucradas en la

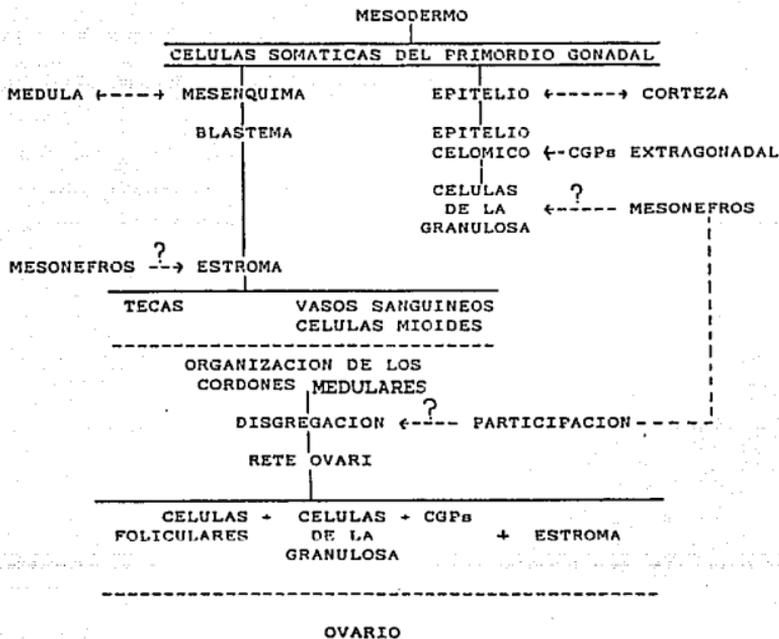


Fig. 10.- Diagrama que muestra los procesos generales de la diferenciación sexual gonadal femenina (diferenciación de los ovarios) en vertebrados.

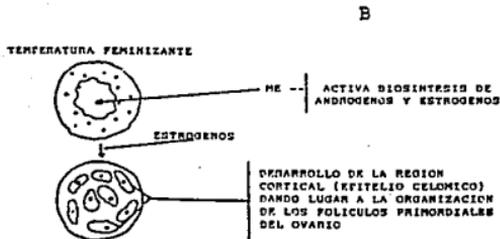
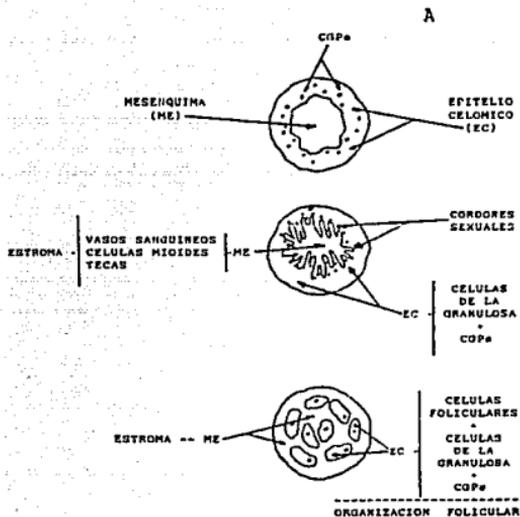


Fig. 11.- El esquema A muestra los procesos generales de la diferenciación gonadal femenina (diferenciación de los ovarios) en vertebrados. El esquema B muestra una hipótesis sobre la diferenciación gonadal femenina, por efecto de la temperatura de incubación feminizante; para detalles ver texto.

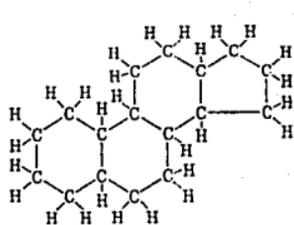
biosíntesis de andrógenos y estrógenos, principalmente a nivel de la médula (mesenquima) (Fig. 11). En conclusión, serían los estrógenos: a) los agentes causales de la regresión de los cordones medulares, b) del crecimiento de la región epitelial somática (corteza) (Fig. 11), y c) la temperatura feminizante, aceleraría el inicio de la profase meiótica, así como el crecimiento de los ovocitos (124).

VII.- BIOSINTESIS Y MECANISMO DE ACCION
DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES. GENERALIDADES

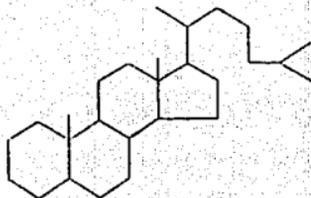
VII.a.- BIOSINTESIS

Los compuestos esteroides incluyen un elevado número de moléculas tales como los esteroides, ácidos biliares, algunos alcaloides, hormonas corticosuprarrenales, progesterona y hormonas sexuales como los andrógenos y los estrógenos. Las hormonas esteroides, son moléculas que se biosintetizan en un órgano endócrino y se secretan hacia los líquidos corporales, ejerciendo un efecto específico sobre las células que conforman un órgano blanco (6; 90).

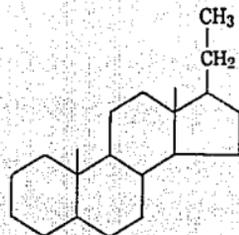
Los esteroides son lípidos no saponificables, poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos y con un núcleo común que es el ciclopentanoperhidrofenantreno, hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis carbonos cada uno totalmente saturados (perhidrofenantreno) y que se designan como anillos A, B y C, y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano) que corresponde al anillo D (Fig. 12) (32). Todos los esteroides derivan de alguno de los siguientes hidrocarburos básicos: colestano, pregnano, androstano, estrano, y gonano (Fig. 12). El colestano es un hidrocarburo de 27 átomos de carbono (C-27)



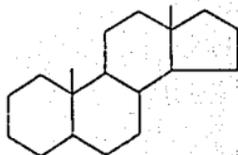
A



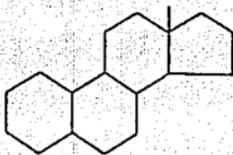
B



C



D



E



F

Fig. 12.- A) estructura química del ciclopentanoperhidro fenantreno, núcleo básico de las hormonas esteroideas; B) colestano constituido por 27 átomos de carbono (C27); C) pregnano que consta de 21 átomos de carbono (C21); D) androstano molécula que consta de 19 átomos de carbono (C19); E) estrano constituido por 18 átomos de carbono (C18), y F) gonano constituida por 17 átomos de carbono (C17).

que es la estructura química básica a la cual pertenece el colesterol que es la molécula precursora de las hormonas esteroides. El pregnano es un hidrocarburo de veintiun átomos de carbono (C-21) característico de las hormonas esteroides con actividad progestacional, glucocorticoide, y mineralocorticoide. El androstano es un hidrocarburo de diecinueve átomos de carbono (C-19) que es la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad androgénica. El estrano es un hidrocarburo de dieciocho átomos de carbono (C-18) en el cual se incluyen los esteroides con actividad estrogénica, y el gonano, es el hidrocarburo del núcleo básico de 17 átomos de carbono (ciclopentanoperhidrofenantreno) (6; 90).

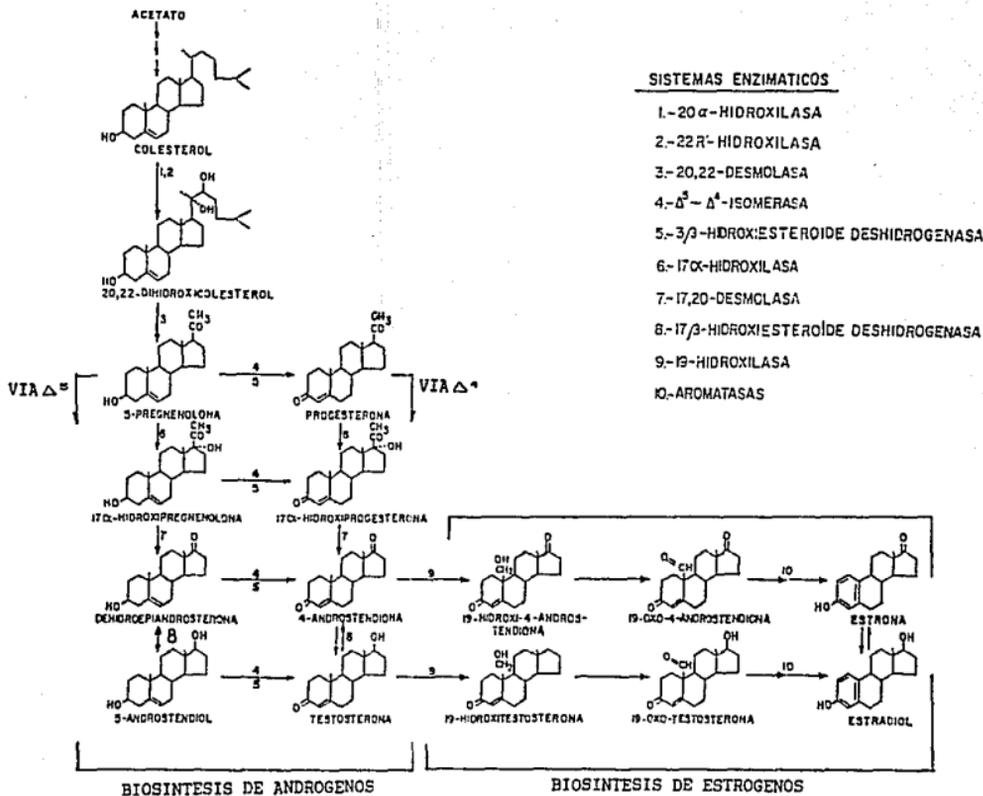
Con respecto a la actividad biológica que ejercen, las hormonas esteroides se clasifican en cinco grupos: (a) progestinas, (b) glucocorticoides, (c) mineralocorticoides, (d) andrógenos, y (e) estrógenos (90).

Dorfman y Ungar (32) propusieron el concepto unitario de la biosíntesis de los esteroides. Este postulado indica que los verdaderos tejidos endócrinos tienen la misma capacidad para biosintetizar hormonas esteroides con mecanismos similares que participan en cada una de las biotransformaciones. Las diferencias cualitativas y cuantitativas que existen con

respecto a estas biosíntesis, son reguladas por los mecanismos de control genico que determinan la identidad fisiológica particular de cada tejido. Entre estos mecanismos reguladores podemos incluir la concentración relativa de enzimas, la disponibilidad de cofactores, las afinidades enzima-sustrato, etc. Un gran número de estudios realizados a partir de los años cuarentas permitió describir las vías biosintéticas y los procesos metabólicos de las hormonas esteroides (32) (Fig. 13). A continuación se describen las principales vías involucradas en la biosíntesis de las hormonas esteroides.

BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL.- La biosíntesis de novo de colesterol es decir, a partir de precursores que no tengan la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno, puede iniciarse a partir de acetato. Este proceso de biosíntesis requiere de por lo menos 27 enzimas localizadas en las fracciones microsomal y soluble de la célula (32; 90). (Fig. 14).

BIOSÍNTESIS DE PREGNENOLONA.- Una vez que el colesterol es biosintetizado en el interior de las células esteroideogénicas, es necesario que penetre dentro de las mitocondrias, sitio en donde estará expuesto a la acción de hidroxilasas y liasas que lo transformarán en pregnenolona. La primera hidroxilación ocurre en el carbono 20 (configuración alfa) seguida de otra en el carbono 22 (configuración beta), formandose el 20a, 22B-



SISTEMAS ENZIMATICOS

- 1.-20 α -HIROXILASA
- 2.-22 β -HIROXILASA
- 3.-20,22-DESMOLASA
- 4.- Δ^5 - Δ^4 -ISOMERASA
- 5.-3 β -HIROXIOESTEROIDE DESHIROGENASA
- 6.-17 α -HIROXILASA
- 7.-17,20-DESMOLASA
- 8.-17 β -HIROXIOESTEROIDE DESHIROGENASA
- 9.-19-HIROXILASA
- 10.-AROMATASAS

Fig. 13.- Vías biosintéticas descritas para las hormonas esteroideas. Modificado de Kofman-Alfaro et al. (83).

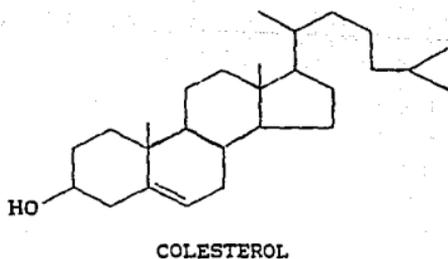
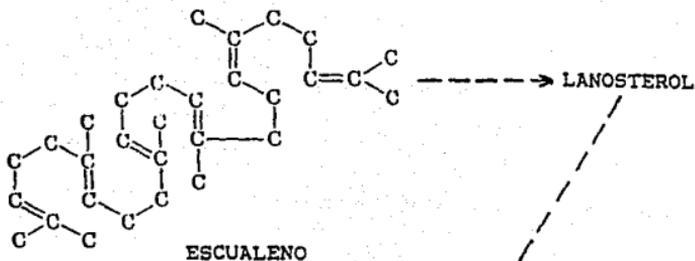
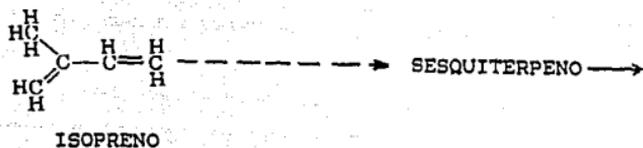
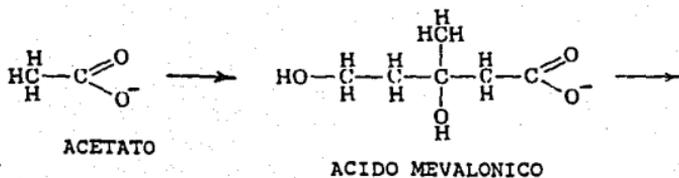


Fig. 14.- Biosíntesis de colesterol.

dihidroxi-colesterol (Fig. 13). Este proceso es catalizado por la 20a y la 22B hidroxilasas, enzimas que requieren la presencia del citocromo P450, así como de la adrenodoxina y de una flavoproteína deshidrogenasa dependiente de NADPH (90). Posteriormente se oxida el diol vecinal por un sistema enzimático mitocondrial similar (citocromo P450, adrenodoxina y flavoproteína) conocido como 20,22-esteroide liasa y que requiere NADPH y O₂, dando lugar a la ruptura de la unión entre los átomos de carbono 20 y 22, obteniéndose la pregnenolona (Fig. 13) (32; 90). La pregnenolona resultante conserva en el anillo A la misma estructura A5-3B-hidroxi (A= doble ligadura entre C-4 y C-5) del colesterol. Una vez biosintetizada la pregnenolona, esta deberá salir de la mitocondria para continuar su biotransformación por la acción de las enzimas presentes en el citoplasma.

La hidroxilación en posición alfa del C-20 del colesterol es lo que en bioquímica se conoce como "paso limitante" es decir, es un evento indispensable para la formación de la pregnenolona, y por lo tanto, de las hormonas esteroides. Este "paso limitante" es activado, dependiendo del tejido endócrino, por la acción de las hormonas tróficas: hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona luteinizante (LH), y gonadotropina coriónica humana (hCG). Es a este nivel en donde ocurre la regulación de la esteroidogénesis (6; 90).

BIOSINTESIS DE PROGESTERONA.- La biotransformación de pregnenolona a progesterona se realiza por la acción del sistema enzimático A5-3B-hidroxiesteroide deshidrogenasa/A5-A4-isomerasa, localizado en la fracción microsomal, (Fig. 13). La progesterona formada exhibe en su anillo A la estructura A4-3-cetona (A4= doble ligadura entre C-4 y C-5), característica de los esteroides con actividad biológica (90). La progesterona es una hormona que dentro del esquema de biosíntesis de los esteroides ocupa una posición "clave" ya que puede ser biosintetizada como producto terminal o bien servir como precursor de corticosteroides, andrógenos y estrógenos.

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS.- Los tejidos endócrinos que biosintetizan andrógenos utilizan tanto a la pregnenolona (A5-3B-hidroxi) como a la progesterona (A4-3-cetona) como precursores para la formación de androstendiona y testosterona que son los andrógenos más importantes (Fig. 13). La hidroxilación en el carbono 17 de la pregnenolona o de la progesterona es el primer paso para la ruptura de la cadena lateral, y es catalizado por la enzima 17a-hidroxilasa, formandose 17a-hidroxipregnenolona o 17a-hidroxiprogesterona respectivamente (Fig. 13). Posteriormente por acción de una 17, 20-esteroide liasa se romperá la unión entre los átomos de carbono 17 y 20. La acción secuencial de estas dos enzimas de localización microsomal es dependiente de NADPH y oxígeno (90).

La utilización de la pregnenolona o de la progesterona como precursores opera simultáneamente, y el predominio de una de ellas, depende de la especie (90).

La ruptura de la cadena lateral da lugar a la formación de androstendiona (A4-3=O) y dehidroepiandrosterona (A5-3B-OH). La subsecuente reducción del grupo cetónico del C-17 de la androstendiona, por la acción de la 17B-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa, enzima localizada en la fracción soluble celular y dependiente de NADP, biotransforma a este andrógeno de baja potencia biológica a testosterona que es el andrógeno biológicamente activo. Esta reacción es reversible dependiendo del pH del medio y mantiene en equilibrio a las dos hormonas (90).

La dehidroepiandrosterona por la acción de la misma 17B-hidroxiesteroide deshidrogenasa es transformada a A5-androstendiol el cual por la acción del sistema enzimático A5-3B-hidroxiesteroide deshidrogenasa/A5-A4-isomerasa es bioconvertido a testosterona.

Como se observa en la figura 13, la biosíntesis de testosterona a partir de pregnenolona involucra intermediarios con estructura A5-3B-OH designándose esta vía biosintética como "Vía de los A5" para diferenciarla de la "Vía de los A4"

como se denomina a la que utiliza progesterona como precursor, y en la cual, todos los intermediarios poseen la estructura $A4-3=0$ (6; 90; 93). Las enzimas que participan en la biosíntesis de los andrógenos, son reguladas por genes de localización autosómica (90).

BIOSÍNTESIS DE ESTROGENOS.- A partir de los andrógenos, la biosíntesis de estrógenos se efectúa a través de una secuencia de reacciones enzimáticas, genéricamente conocida como proceso de aromatización. Durante este proceso, además de la pérdida del átomo de carbono 19, el anillo A neutro de los andrógenos se transforma en un anillo aromático o fenólico característico de los estrógenos (6; 32; 75; 90) (Fig. 13).

La biotransformación de un andrógeno a un estrógeno (aromatización) requiere tres oxidaciones consecutivas (90) (Fig. 13). Este proceso, que se inicia por la hidroxilación enzimática del carbono 19, es catalizado por la 19-esteroide hidroxilasa de localización microsomal (6; 90) (Fig. 13). Posteriormente en el mismo átomo de carbono se introduce un segundo grupo hidroxilo, con la consecuente eliminación estereoespecífica de un átomo de hidrógeno, y por la pérdida de una molécula de agua, el diol formado se transforma en un 19-aldehído (Fig. 13) (32; 90). Por último, la remoción del carbono-19, que se elimina como ácido fórmico, conduce a la

aromatización del anillo A. Los complejos enzimáticos que participan en el proceso de aromatización están íntimamente relacionados con el citocromo P450 (90).

Existe una hipótesis sobre la regulación a nivel molecular de la aromatización en aves, propuesta por Wilson y colaboradores (210). La actividad de las aromatasas estaría bajo el control de tres genes: i) un gene "A" citogenéticamente localizado en un autosoma o en un cromosoma sexual de ambos sexos, que codificaría la estructura de las aromatasas, ii) un gene "B" presente sólo en el sexo femenino (heterogamético), que regula la expresión del gene A, y iii) un gene autosómico "C" localizado en ambos sexos, cuyo producto proteico inactiva al gene A. Si el ave es genotípicamente masculina (sexo homogamético) al expresarse el producto del gene C se inactivaría al gene A en todas las células del sexo masculino, dando como resultado, el que no se biosinteticen las aromatasas (Fig. 15). Por el contrario, si el ave es genotípicamente femenina (sexo heterogamético), el gene C no se activaría, dando como resultado la expresión del gene B, cuyo producto activará al gen A, es decir, se biosintetizarán las aromatasas, y como resultado, la biosíntesis de los estrógenos (Fig. 15).

MACHOS (ZZ): AUSENCIA GENE A ==> ACTIVACION ^{AUTOSOMICO} GENE B ==> BIOSINTESIS ^{REPR} REPR ==> GENE C ==> ^{AUTOSOMICO} ^{AUSENCIA} ^{BIOSINTESIS} AROMATASA ==> ^{NO} AROMATIZACION

HEMBRAS (ZW): ACTIVACION ^{SEXUAL} GENE A ==> ^{BIOSINTESIS} REPR ==> GENE B ==> ACTIVACION ^{AUTOSOMICO} ^{SEXUAL} GENE C ==> ^{BIOSINTESIS} AROMATASA ==> AROMATIZACION

Fig. 15.- Esquema que muestra la regulación del gene de la aromatasa en aves. Modificado de Wilson et al. (210).

VII.b.-

MECANISMO DE ACCION

Las hormonas esteroides son moléculas portadoras de mensajes que ejercen un número importante de acciones o efectos que requieren de mecanismos muy específicos que permitan su interacción con las células que son sensibles o dependientes de ellas, y que por lo mismo, reciben el nombre de "células blanco" (6; 112). La secuencia de eventos que ocurre entre la llegada del esteroide a la célula blanco hasta la expresión de un efecto biológico específico constituye el mecanismo de acción hormonal (112).

Los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la expresión de la actividad de las hormonas esteroides permanecieron sin ser completamente comprendidos por largo tiempo (112). La observación experimental realmente pionera en la elucidación del modo de acción hormonal, fué el descubrimiento de que el estradiol, después de su administración, es retenido por los órganos sensibles y/o dependientes de este estrógeno (112). Esta observación condujo a la demostración de la existencia de un componente intracelular de naturaleza proteica, de alta especificidad y baja capacidad, el cual fué denominado como "receptor" (112).

En 1968 (74) Jensen propuso un mecanismo de acción para las

hormonas esteroides denominado de los "dos pasos" (Fig. 16). El primer paso lo constituye la internalización celular de la hormona esteroide a través de la membrana citoplasmática por difusión pasiva, considerando las propiedades lipofílicas de los esteroides. Una vez dentro de la célula el esteroide se une con gran afinidad a moléculas de naturaleza proteica denominadas "receptores". El receptor es una unidad molecular constituida por un sitio o dominio receptor o de reconocimiento estereoespecífico, y un dominio ejecutor (6). Este complejo hormona-receptor actuaría como un segundo mensajero, siendo el primer mensajero la hormona esteroide. El segundo paso consistiría en la activación del complejo hormona-receptor a través de una reacción que propicia cambios conformacionales y de carga (78; 112), los cuales, le confieren una gran afinidad para interaccionar con los sitios aceptores de la cromatina nuclear, una vez que este complejo haya sido translocado al núcleo celular (5; 112). Los cambios moleculares que ocurren como resultado de la interacción del complejo esteroide-receptor-aceptor nuclear incluyen la activación o inactivación de la transcripción genica específica a través de moléculas de ARNm y su traducción a nivel ribosomal en proteínas específicas capaces de modificar las funciones celulares (5; 112; 180).

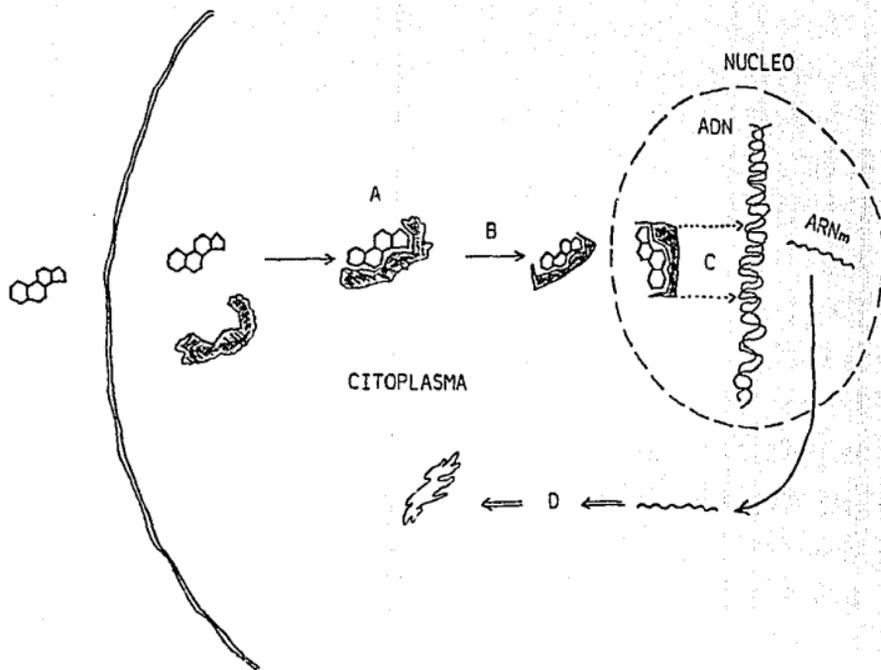


Fig. 16.- Diagrama del mecanismo de acción de hormonas esteroides. A- complejo hormona-receptor; B- proceso de activación; C- unión del complejo activado hormona-receptor a un aceptor nuclear; ADN- ácido desoxirribonucleico; ARNm- ácido ribonucleico mensajero; D- biosíntesis de proteínas.

VIII.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS DE TRABAJO

La diferenciación sexual y específicamente la diferenciación gonadal en vertebrados, es uno de los paradigmas básicos, aún por resolver, en la biología del desarrollo. Es importante conocer si durante la etapa en la que el primordio gonadal se va a diferenciar hacia un ovario o hacia un testículo si existen diferencias desde el punto de vista bioquímico y molecular, que condicionen la diferenciación de este tejido primitivo hacia una gónada determinada. Sin embargo, al querer estudiar los procesos morfogenéticos involucrados en la diferenciación gonadal con enfoques diferentes a la descripción morfológica, se tiene que salvar el obstáculo de conocer el sexo de los embriones en estudio. Por este motivo no se ha avanzado, por ejemplo, el estudio de la esteroidogénesis durante la ontogenia de la diferenciación del primordio gonadal en ovarios o testículos. Pero a partir de contar con especies sexo-termodependientes como lo son algunas tortugas marinas, se tiene la inigualable oportunidad de llevar al cabo este, y otros estudios. La relativa facilidad de obtener huevos de nidos de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, especie que arriba a las costas del Pacífico de nuestro territorio nacional, y el hecho de que su diferenciación sexual es influida por la temperatura de incubación, nos permitieron considerarla como un modelo experimental adecuado, para estudiar

los procesos involucrados en la determinación del dimorfismo sexual gonadal.

Una de las hipótesis planteada para este proyecto de investigación se sustenta en la teoría hormonal:

La temperatura de incubación, podría actuar como modulador bioquímico directamente sobre las biosíntesis de testosterona y estradiol en la gónada indiferenciada, y de esta manera, las hormonas esteroides formadas pudieran ser los activadores moleculares que desencadenarían el posterior establecimiento de la diferenciación sexual morfológica.

Debido a diversas circunstancias suscitadas durante el proyecto, y sobre todo para abordar la hipótesis, se determinó en una primer instancia la de comprobar si los testículos de embriones desarrollados bajo el efecto de la temperatura masculinizante y los ovarios de embriones desarrollados bajo el efecto de la temperatura feminizante biosintetizaban andrógenos y estrógenos, así como el de establecer si su metabolismo era temperatura-dependiente. Lo anterior es lo que conforma este trabajo de tesis, y para abordarlo, se plantearon los siguientes objetivos:

- A) Estudiar la biosíntesis in vitro de testosterona y de estradiol en el complejo urogenital gónada-mesonefros, gónadas y mesonefros de embriones y tortugas posteclosión.
- B) Medir las concentraciones de testosterona y estradiol en suero y órganos urogenitales (gónadas, mesonefros, e interrenales) en tres estadios de la ontogenia gonadal: gónada indiferenciada, gónada diferenciada, y establecimiento gonadal, así como en tortugas recién eclosionadas y posteclosión.
- C) Establecer la presencia del receptor citosólico para estrógenos en órganos urogenitales (gónadas, mesonefros e interrenales) de embriones y tortugas posteclosión.

IX.-

MATERIALES

IX.a.1.-

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron huevos de no más de tres días de ovipositados, colectados de nidos naturales en la playa La Escobilla ($96^{\circ}27'16''W$, $15^{\circ}40'36''N$), en la costa central de Oaxaca. Las colectas se efectuaron durante los meses de Julio a Octubre por cuatro años consecutivos (1985 a 1988). Su traslado al laboratorio se hizo por vía terrestre, en cajas de unicel y con arena húmeda del sitio de la colecta. La incubación de los huevos en el laboratorio se hizo colocándolos en recipientes de plástico (Tupper Ware) conteniendo en su base arena del nido original (aprox. 5 cm de espesor), cubriéndolos posteriormente con la arena, y cerrándose los recipientes con sus tapas previamente perforadas, para permitir la circulación del aire. Los recipientes se colocaron, durante todo el periodo de desarrollo embrionario, 50 ± 3 días para los machos y 45 ± 3 días para las hembras, en incubadores bajo diferentes condiciones controladas de humedad y temperatura: (a) $27-28^{\circ}C$ para desarrollo de machos y (b) $31-32^{\circ}C$ para desarrollo de hembras. La humedad relativa fué de $46 \pm 2\%$ para ambos sexos.

IX.a.2.-

MATERIAL RADIOACTIVO

Los esteroides radiactivos Dehidroepiandrosterona-1, 2, 6, 7-3H (DHA-3H) con una actividad específica (a.e) de 65 Ci/mmola, testosterona-1, 2, 6, 7-3H (T-3H) con una a.e de 93.9 Ci/mmola, y 17B-estradiol-1, 2, 6, 7-3H (E2-3H) con a.e de 92 Ci/mmola, se obtuvieron de Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra). Se purificaron en cromatografía de partición en papel Whatman No.1, utilizando un sistema descrito por Bush (21) (benceno:metanol:agua 10:8:2 v/v). Su pureza radioquímica fué establecida por recristalizaciones sucesivas, después de agregar una cantidad extra en mg del compuesto no radiactivo, hasta la obtención de una actividad específica constante (86). Adicionalmente los sustratos radiactivos purificados se cromatografiaron en placa fina, utilizando el mismo sistema que se empleó para los extractos orgánicos obtenidos después de las incubaciones.

IX.a.3.-

ESTEROIDES NO RADIOACTIVOS

Los esteroides usados como transportadores y referencias fueron: dehidroepiandrosterona(3B-hidroxi-5-androsteno-17-ona), testosterona (17B-hidroxi-4-androsteno-3-ona), 17B-estradiol (1,3,5 (10)-estrantrieno-3,17B-diol), y estrona (1,3,5 (10)-estrantrieno-3-ol-17-ona). Los cuales fueron obtenidos de Steraloids Inc. (Wilton, New Haven, USA).

IX.a.4.-

DISOLVENTES

Los disolventes orgánicos empleados: cloroformo, diclorometano, éter etílico libre de peróxidos, hexano, metanol y tolueno, fueron de grado analítico (J. T. Baker, México). Para la solución de centelleo, se utilizó tolueno de grado de centelleo (J. T. Baker, México).

IX.a.5.- SOLUCIONES AMORTIGUADORAS (BUFFERS)

Solución Ringer para Reptiles (RR) pH 7.3 (107): 7.5 g/l de cloruro de sodio (NaCl), 0.20 g/l cloruro de potasio, 0.20 g/l cloruro de calcio, 0.02 g/l carbonato de sodio, agua bidestilada.

Buffer de Fosfatos (BF) 0.1 M, pH 7.4: 2.35 g fosfato monobásico de sodio anhidro, 11.6 g fosfato dibásico de potasio anhidro, 8.8 g NaCl, 0.1 g thiomerosal (Merthiolate), 1 g gelatina, agua bidestilada c.b.p 1 l.

Buffer de Tris-HCl, adicionado de ditiotreitól y molibdato de sodio (TEDM): Tris-HCl 20 mmolar, pH 7.4 a 4°C, EDTA 1.5 mmolar, ditiotreitól (DTT) 0.25 mmolar, molibdato de sodio 10 mmolar, agua bidestilada.

IX.a.6.- SOLUCION DE CENTELLEO

4.0 g de 2,5-difenil-oxazol (PPO), 0.001 g de 1,4-bis-2-(4-metil-5-fenil-oxazolil) (dimetil-POPOP), tolueno c.b.p 1000 ml (86).

IX.a.7.- SUSPENSION DE CARBON-DEXTRAN

0.625 g de Carbón vegetal activado y 0.0625 g de Dextrán en buffer de fosfatos c.b.p 100 ml.

Todos los reactivos fueron de grado analítico, obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.) y J. T. Baker (México).

IX.b.- ANTICUERPOS PARA TESTOSTERONA Y ESTRADIOL

Los anticuerpos para testosterona y estradiol fueron generados en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

El anticuerpo específico para testosterona se desarrolló en bovino utilizando como inmunógeno (antígeno) testosterona 3-carboximetiloxima, unida a albúmina sérica bovina (testosterona-3CMO-BSA). Después de la titulación del anticuerpo (55-60% de unión), la dilución óptima fué de 1:210,000.

Especificidad del Anticuerpo Antitestosterona (Lote K-200710)

<u>Compuesto</u>	<u>% de Reacción Cruzada</u>
Testosterona	100.0
5a-Dihidrotestosterona	14.0
5a-Androstandiol	6.0
A5-Androstendiol	2.1
A4-Androstendiona	0.8

El anticuerpo específico para estradiol fue desarrollado en conejo utilizando como inmunógeno (antígeno) estradiol-6-carboximetiloxima, unida a albúmina sérica bovina (estradiol-6CMO-BSA). Después de la titulación del anticuerpo (30-35% de unión), la dilución óptima fué de 1:210,000.

Especificidad del Anticuerpo Antiestradiol (Lote K-158330)

<u>Compuesto</u>	<u>% de Reacción Cruzada</u>
17B-estradiol	100.0
Estrona	1.7
Estriol	0.8
Testosterona	0.0002

X.-

METODOS

X.a.- BIOSINTESIS IN VITRO DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES

X.a.1.- OBTENCION DE LOS TEJIDOS

Los especímenes se sacrificaron por decapitación, disecándose de la región caudal del plastrón, junto o por separado, el complejo urogenital gónada-mesonefros (Tabla 1). Se colocaron en tubos Pyrex 9820 con 0.5 ml de solución Ringer para reptiles (RR) sin cofactores, y 5 μ M de alguno de los siguientes sustratos: DHA-3H para el estudio de la biosíntesis de testosterona o de T-3H para estudiar la biosíntesis de 17 β -estradiol. El volumen final de incubación fué de 500 μ l (Fig. 17A).

X.a.2.- PREPARACION DE LOS SUSTRATOS PARA LA INCUBACION

Dieciséis μ Ci de DHA-3H o T-3H en solución metanólica se transfirieron a tubos de vidrio de bajo contenido en potasio 40, y se evaporaron a sequedad en baño de agua a 60°C y con corriente de nitrógeno. A cada tubo se le agregó 1 ml de éter etílico libre de peróxidos y 60 μ l de propilen glicol. El éter etílico se evaporó totalmente y el esteroide radiactivo (DHA-3H o T-3H) disuelto en el propilen glicol se incorporó a 2 ml de

solución RR. La concentración final fué de 2 uCi/250 ul. Para obtener la molaridad apropiada para la incubación (5 uM) del sustrato radiactivo, fue necesario agregar a cada tubo, una cantidad extra (0.72 ug) de DHA o T radioinertes. La concentración final del sustrato en la incubación fué de: 2 uCi/2.5 nmolas de DHA o T/500 ul de solución RR (Tabla 2).

El proceso de incubación de los diferentes tejidos se realizó en un incubador Dubnoff (Precision, GCA Co., Precision Scientific) a las temperaturas masculinizante (27-28°C) o feminizante (31-32°C) en atmósfera gaseosa de 95% O₂/5% CO₂ (Infra, México) y con agitación suave durante 2 hrs. La reacción se detuvo agregando a cada tubo 1 ml de cloroformo-metanol (CM) 2:1 (v/v), manteniéndose en refrigeración (4°C) por un periodo de tiempo no mayor de 48 hrs. Se realizaron simultáneamente y en condiciones idénticas, incubaciones de los sustratos radiactivos sin tejido y con tejido cardiaco, los cuales sirvieron como controles de los experimentos.

Tabla 1. Esquema del material biológico utilizado en el estudio de la biosíntesis de testosterona y estradiol.

BIOSINTESIS DE TESTOSTERONA							
TEMPERATURA DE INCUBACION MASCULINIZANTE (27-28°C)				TEMPERATURA DE INCUBACION FEMINIZANTE (31-32°C)			
DI*	ED**	TEJIDO	n	DI	ED	TEJIDO	n
40	29	GO-ME	6	40	30	GO-ME	3
50	30	GO-ME	7	45	30	GO-ME	4
50	"	GO	6	45	"	GO	4
50	"	ME	6	45	"	ME	4

BIOSINTESIS DE ESTRADIOL							
TEMPERATURA DE INCUBACION MASCULINIZANTE (27-28°C)				TEMPERATURA DE INCUBACION FEMINIZANTE (31-32°C)			
DI	ED	TEJIDO	n	DI	ED	TEJIDO	n
40	29	GO-ME	6	40	30	GO-ME	4
50	30	GO-ME	7	45	30	GO-ME	5
50	"	GO	7	45	"	GO	5
50	"	ME	7	45	"	ME	5

* - día de incubación; días transcurridos después de la oviposición

** - etapa de desarrollo

GO-ME - gónada-mesonefros

GO - gónada

ME - mesonefros

Tabla 2.- Esquema experimental utilizado en los estudios de biosíntesis in vitro de testosterona y estradiol en tejidos urogenitales.

<u>DIAS</u> <u>INCUBACION</u>	<u>TEMPERATURA</u> <u>INCUBACION</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>SUSTRATO</u>	<u>MOLARIDAD</u>
40	27-28°C	GO-ME	DHA-3H	5 µM
	31-32°C	GO-ME	DHA-3H	5 µM
	27-28°C	GO-ME	T-3H	5 µM
	31-32°C	GO-ME	T-3H	5 µM
50		GO-ME	DHA-3H	5 µM
	27-28°C	GO	DHA-3H	5 µM
		ME	DHA-3H	5 µM
		GO-ME	T-3H	5 µM
	27-28°C	GO	T-3H	5 µM
		ME	T-3H	5 µM
45		GO-ME	DHA-3H	5 µM
	31-32°C	GO	DHA-3H	5 µM
		ME	DHA-3H	5 µM
		GO-ME	T-3H	5 µM
	31-32°C	GO	T-3H	5 µM
		ME	T-3H	5 µM

GO-ME= gónada-mesonefros

GO = gónada

M = mesonefros

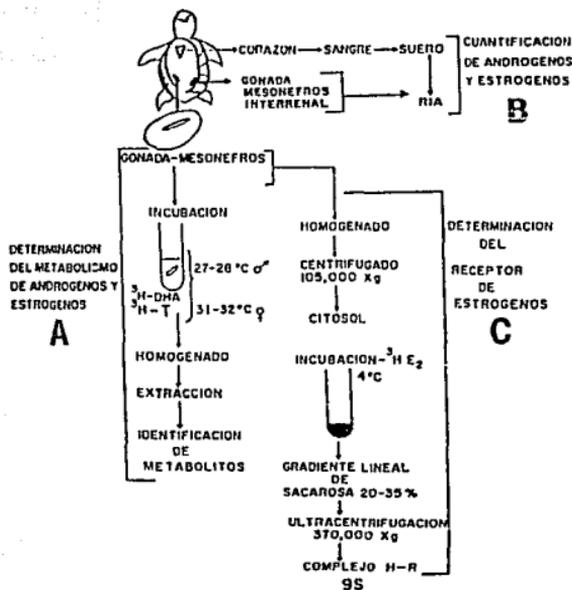


Fig. 17.- Diagrama que ilustra la secuencia de métodos empleados, para abordar los objetivos planteados en esta tesis.

**X.a.3.- EXTRACCION, PURIFICACION E IDENTIFICACION
DE LOS METABOLITOS RADIATIVOS OBTENIDOS
DESPUES DE LA INCUBACION**

X.a.3.1.- EXTRACCION

Los tejidos se separaron de los medios de incubación y se homogeneizaron en 100 ul de RR con 3 a 5 golpes (70-90 rpm) con un pistilo de Teflón. Del homogeneizado obtenido se tomaron alicuotas para determinación de proteínas por el método de Bradford (10), empleando albúmina sérica bovina para la curva patrón.

Los metabolitos formados durante la incubación se extrajeron de los tejidos homogeneizados con 3x5 volúmenes de CM. Los medios de incubación se extrajeron en forma idéntica a lo descrito anteriormente. Se determinó el contenido de radiactividad en una alicuota de los extractos orgánicos tanto de los tejidos como de los medios de incubación, en un espectrómetro de centelleo líquido Packard TRI-CARB, modelo 2660, contándose las muestras durante un tiempo suficiente para asegurar un error no mayor del 3%. La eficiencia del espectrómetro fué de 48 a 50% y la corrección para "quenching" se realizó utilizando un programa de estandarización externa.

X.a.3.2.- PURIFICACION E IDENTIFICACION DE METABOLITOS

La purificación e identificación de los metabolitos trititados formados durante el proceso de incubación, se realizó utilizando un proceso de dilución isotópica inversa que incluye el análisis de la conducta cromatográfica de los compuestos formados, así como su recristalización con una cantidad adicional del correspondiente esteroide auténtico hasta la obtención de una actividad específica constante (86; 110; 111).

Una vez establecido el contenido de radiactividad, los extractos orgánicos correspondientes a los medios y tejidos se reunieron en un solo tubo. De cada uno de éstos, se tomó una alícuota adecuada que se aplicó a cromatofolios (5x20 cm) de aluminio recubiertos con sílica gel con un grosor de 0.2 mm y con indicador para absorción de luz ultravioleta (UV) de 254 nm (Merck). Los cromatofolios se lavaron con la mezcla de los mismos disolventes que serán utilizados en el proceso cromatográfico para la separación de los metabolitos formados (cloroformo:éter etílico:diclorometano, 50:48:2 v/v). En forma paralela en cada cromatofolio, se aplicaron 5 µg de los esteroides no radiactivos que servirán como referencias: DHA, T, E2, y E1, así como una mezcla de ellos. Los esteroides de referencia se localizaron en la placa de cromatografía con una lámpara de UV (T), vapores de yodo (E2, E1) y ácido

fosfomolibdico al 5% (DHA), y se determinó su correspondiente Rf. La detección de los metabolitos radiactivos se logró haciendo pasar cada uno de los cromatofolios por un radiocromatógrafo Scanner Z-201 (Packard) con flujo continuo de gas "Q" (98.7% helio: 1.3% n-butano, Linde, México).

El Rf de cada una de las áreas radiactivas del cromatograma (gráfica) se comparó con el Rf del esteroide de referencia correspondiente y se delimitó la zona radiactiva para cortarla y eluirla con metanol. El metanol se evaporó a sequedad en un rotavapor a 35-40°C con vacío. Para establecer la cantidad de radiactividad eluida de cada uno, se tomaron alícuotas apropiadas por duplicado, agregándole a cada tubo 10 ml de solución de centelleo.

X.a.3.3.- DETERMINACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA DE LOS METABOLITOS FORMADOS DESPUES DE LA INCUBACION

De cada metabolito radiactivo identificado, se tomó una alícuota y se evaporó a sequedad en baño de agua a 60°C y con corriente de nitrógeno. Se le agregó 20-50 mg de la hormona no radiactiva correspondiente, testosterona o 17-B-estradiol, y se hicieron cristalizaciones sucesivas con metanol y hexano para testosterona, y metanol para estradiol. Efectuada las

cristalizaciones, se separaron con pipeta Pasteur las aguas madres (AM) de los cristales (CR), secándose primero con nitrógeno y baño de agua caliente, y posteriormente, en una estufa con vacío (Precision Thelco modelo 19) por 30 min a 45-50°C.

De los cristales, así como de las aguas madres, se pesó una alícuota entre 500 y 1000 ug en una electrobalanza CAHN G-2 (VENTRON CAHN Division, Ventron Instruments Co., Paramount, Cal.), agregándole 10 ml de solución de centelleo para determinar su contenido radiactivo para calcular la actividad específica de cada muestra cristalizada (86; 110; 111).

**XI.- DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES
DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL
EN SUERO Y ORGANOS UROGENITALES**

La determinación de las concentraciones de testosterona y estradiol en el suero y los órganos urogenitales de *L. olivacea* se realizó por medio de métodos radioinmunoanalíticos (RIA) utilizando anticuerpos específicos (Fig. 17B).

XI.a.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS

XI.a.1.- SUERO

A cada embrión se le eliminó la membrana amniótica y el vitelo, evitando en lo posible, provocar hemorragia y la sangre derramada de los vasos sanguíneos extraembrionarios se aspiró con jeringa. Al diseccionar el plastrón, se secó con gasa el exceso de líquido amniótico, obteniéndose la sangre por punción al corazón y por escurrimiento después de decapitación. En los animales recién eclosionados y posteclosión se obtuvo directamente del cuello después de la decapitación. La sangre se colectó en tubos sin anticoagulante, dejándose en refrigeración (2-4°C) hasta la formación del coágulo y posteriormente se centrifugó a 900 x g/10 min. El suero se guardó a -20°C hasta el momento de la medición de testosterona y 17-B-estradiol. La relación de las muestras se da en la Tabla 3.

Tabla 3.- Relación de muestras de sangre obtenidos de L. olivacea para la cuantificación en suero de testosterona y estradiol.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE (27-28°C)			TEMPERATURA FEMINIZANTE (31-32°C)		
DI*	ED**		DI*	ED**	
--	--	ID ----	30	24	
--	--		31	29	
---	34		34	ND	
GI	35		EG 35	"	
---	36		36	"	
ID ----	38		38	"	
---	40		40	"	
EG	45		45+	RE	
---	50		--	5 PE	
	55+		--	10 "	
--	15 PE		--	15 "	

* - día de incubación

** - etapa de desarrollo; cada etapa del desarrollo correspondiente a cada día de incubación se tomó de Merchant-Larios et al. (96).

GI - estadio de gónada indiferenciada

ID - estadio de inicio de la diferenciación gonadal

EG - estadio de establecimiento gonadal

ND - etapa de desarrollo no determinada

RE - recién eclosión

PE - días posteclosión

+ = ± 3 días

NOTA: Por cada día de incubación se cuantificó testosterona y estradiol en el suero de tres especímenes. La obtención de las muestras de suero se realizó en dos ocasiones, y con una diferencia de un año entre cada una de ellas (1987 y 1988).

XI.a.2.-**ORGANOS UROGENITALES**

Las concentraciones de testosterona y estradiol en tejidos urogenitales, se determinaron en 6 embriones masculinos de 40 días de incubación, 5 embriones femeninos de 30 días de incubación, 4 de 40 días de incubación, y 4 hembras recién eclosionadas.

Las gónadas, mesonefros e interrenales se obtuvieron de la misma forma descrita para los estudios de biosíntesis (IX.a). Las gónadas provenientes de todos los animales del mismo día de incubación se reunieron en un solo tubo para su homogeneización. De igual manera se procedió con los mesonefros y las interrenales. Los diferentes tejidos se homogeneizaron en 1 ml de BF con 3-5 golpes (70-90 rpm) con un pistilo de Teflón No. 0 (Thomas Co., PA., USA).

XI.a.2.a.-**EXTRACCION DE LOS ESTEROIDES
DE LOS TEJIDOS HOMOGENEIZADOS**

A cada tubo que contenía los diferentes tejidos homogeneizados se le agregaron 1-2 ml de éter etílico libre de peróxidos y se agitó en vortex por 1 min. Al separarse las dos fases, los tubos se introdujeron en un recipiente con hielo seco-acetona y una vez congelada la fase acuosa (inferior) se

decantó la fase orgánica. Este procedimiento se efectuó dos veces reuniéndose las fases orgánicas, evaporándose en baño de agua a 60°C y con corriente de nitrógeno (Infra, México).

La medición de las concentraciones de testosterona y estradiol se realizó en alícuotas apropiadas de las muestras de suero y de los extractos de los tejidos resuspendiéndose en BF.

Las concentraciones de testosterona y estradiol en las muestras se determinó a partir de los métodos radioinmuno analíticos (RIA) utilizados en el Programa Especial de Investigación, Desarrollo y Entrenamiento en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Ginebra, Suiza (1986). Todos los análisis realizados en este Programa, están sometidos a un control de calidad interno según los lineamientos del laboratorio y a un control de calidad externo por parte del Centro de Control de Radioinmunoanálisis de la OMS en Londres. Las especificaciones del control de calidad de los análisis de los esteroides se describen en la Tabla 4.

Tabla 4.- Especificaciones y parámetros de control de calidad para los RIA de testosterona y estradiol.

	<u>TESTOSTERONA</u>	<u>ESTRADIOL</u>
<u>SENSIBILIDAD</u>	2.59 pg/tubo	2.40 pg/tubo
INTERVALO DE LA CURVA PATRON	11.50-368.0 pg/tubo	6.80-217.60 pg/tubo
DOSIS-RESPUESTA		
<u>% VARIACION</u>		
INTRA-ANALISIS	5.61	8.63
INTER-ANALISIS	9.72	12.56

**XII.- DETERMINACION DE LA UNION DE ESTRADIOL TRITIADO
AL RECEPTOR DE ESTROGENOS EN LOS TEJIDOS UROGENITALES**

En este estudio (Fig. 17C) se utilizaron: i) el complejo urogenital, gónada-mesonefros, de 5 embriones de 40 días de incubación (etapa 29) y 3 embriones de 45 días de incubación (etapa 30) desarrollados bajo el efecto de la temperatura masculinizante, ii) 6 embriones de 26 días de incubación (etapa de desarrollo no determinada) desarrollados bajo el efecto de la temperatura feminizante y 4 de 40 días de incubación (etapa 30), y iii) se estudiaron en forma independiente las gónadas, mesonefros, e interrenales de 6 tortugas macho de 15 días posteclosión. Los tejidos se obtuvieron en la misma forma como se describió en el inciso X.a.1 y se colocaron en una solución amortiguadora TEDM pH 7.4 a 4°C (relación p/v 3:1) con 5000 UK de aprotinina (Sigma Chem. Co) por ml como inhibidor de proteasas. Se homogeneizaron con un pistilo de Teflón No 0 (3-5 golpes a 70-90 rpm) empleando un homogeneizador 4554 de Cole Palmer (Cole Palmer Instrument Co., USA) (193).

De cada homogeneizado se colocaron alícuotas de 600-800 μ l en tubos de polialómero de 5 x 4 mm (Beckman) y se centrifugaron en una ultracentrifuga Beckman LB-70 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) utilizando un rotor SW 50.1 a 105,000 x g/1 hr a 4°C en una ultracentrifuga Beckman LB-70

(193). De cada citosol obtenido se tomaron alícuotas para determinar, por el método de Bradford (10), la concentración de proteínas, empleando albúmina sérica bovina (BSA) para la curva patrón.

Se incubaron 400 ul de cada citosol con estradiol tritiado (E2-3H) durante 4-6 hrs a 4°C. Terminado el tiempo de incubación el esteroide libre (no unido al receptor) se separó del complejo hormona-receptor adicionando a cada tubo 500 ul de una suspensión de carbón-dextrán incubándose durante 5 min a 4°C (193). Posteriormente se centrifugaron a 800 x g/10 min a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de polialómero que contenian un gradiente lineal de sacarosa (20-35%), se sellaron los tubos con calor (Tube Sealer, Beckman) y se centrifugaron a 370,000 x g/2.5 hrs a 2°C en un rotor vertical VTI-65 (193) (Fig. 6). Posteriormente el fondo de cada tubo se perforó por punción y los gradientes se colectaron en fracciones de 150 ul en tubos de vidrio con bajo contenido de potasio 40. A cada uno se les agregaron 10 ml de Instagel (Packard) y se contaron en un espectrómetro de centelleo TRI-CARB modelo 2660 (Packard) el tiempo necesario para tener un error no mayor de 3%. Se utilizaron gradientes adicionados con BSA-naftol azul-negro (Sigma) como marcador interno para determinar el coeficiente de sedimentación (85; 193).

XIII.-

ANALISIS ESTADISTICOS

De los resultados obtenidos de la cuantificación por RIA de testosterona y estradiol en suero de ambos sexos de embriones, tortugas recién eclosionadas, y posteclosión de *L. olivacea*, se realizaron análisis de varianza (ANOVAS) utilizando modelos desbalanceados e incompletos, denominados Modelo Lineal General (GLM), así como de llevar al cabo análisis de regresión. Para ambos estudios se utilizó el paquete estadístico SAS (168; 169).

XIV.-

RESULTADOS

XIV.a.-

BIOSINTESIS

Una vez realizado el proceso de extracción de los tejidos y los medios de incubación con cloroformo-metanol, la recuperación del material radiactivo en los extractos orgánicos, fué del 95 al 98%.

XIV.a.1.- BIOSINTESIS IN VITRO DE TESTOSTERONA

Después de someter a los extractos orgánicos de los diferentes tejidos incubados con DHA-3H al proceso de separación cromatográfica, se detectó por medio del radiocromatógrafo "scanner" la presencia de varias zonas radiactivas (Fig. 18).

Zona 1.- Esta zona que presentó un Rf de 0.14 fué la zona de mayor polaridad y su movilidad cromatográfica no correspondió con los esteroides de referencia empleados, por lo que no se consideró de interés establecer su identificación en vista de los objetivos específicos del estudio.

Zona 2.- La zona dos, exhibió un Rf de 0.32 que correspondió

exactamente al Rf de la testosterona radioinerte utilizada como referencia. Esta zona radiactiva fué eluida con metanol y se determinó su contenido radiactivo. Posteriormente se agregó una cantidad extra de testosterona no marcada para realizar las recristalizaciones sucesivas hasta la obtención de una actividad específica constante (Tabla 5, 6), con lo cual, se pudo establecer la pureza radioquímica del metabolito radiactivo formado, y por lo tanto, su identificación como testosterona (Fig. 22).

Zona 3.- Esta zona radiactiva con un Rf igual a 0.44, correspondió al precursor DHA-3H no metabolizado, por lo que no se consideró necesario verificar su pureza radioquímica.

Zona 4.- La cuarta zona radiactiva presentó un Rf de 0.51, idéntico al de la androstendiona de referencia, y la única evidencia para establecer su identidad, fué su movilidad cromatográfica.

La presencia de las cuatro zonas radiactivas anteriormente descritas, fué constante en todos los tejidos urogenitales utilizados en las diferentes etapas del desarrollo (Fig. 18).

El análisis del extracto orgánico de las incubaciones de control en las que se utilizó como preparación tisular el

corazón de los mismos animales, únicamente mostró la zona radiactiva correspondiente al precursor DHA-3H (Fig. 20B), y la cromatografía del extracto cloroformo-metanol de la incubación del precursor tritiado, en ausencia de tejido, sólo presentó una zona radiactiva correspondiente a la DHA-3H (Fig. 20A). El contenido radiactivo de esta zona se determinó y se utilizó para calcular el porcentaje de las pérdidas ocurridas al través de los procesos de incubación, extracción y cromatografía. Este porcentaje de pérdidas fué de 58%.

Fig. 18.- Gráficas obtenidas del radiocromatógrafo (scanner) que muestran las zonas radiactivas presentes en las placas de gel de sílica después de aplicarles una alícuota de los extractos orgánicos de cada uno de los experimentos de biosíntesis de testosterona a partir del precursor tritiado dehidroepiandrosterona (DHA-3H). Las gráficas del panel izquierdo (A, B, C, D) corresponden a los experimentos llevados al cabo a la temperatura masculinizante (27-28°C) y las del panel izquierdo (E, F, G, H) a la temperatura feminizante (31-32°C).

A y E= gónada-mesonefros de embriones masculinos y femeninos de 40 d.i. respectivamente.

B y F= gónada-mesonefros de embriones masculinos de 50 d.i y femeninos de 45 d.i respectivamente.

C y G= gónadas de embriones masculinos de 50 d.i y femeninos de 45 d.i respectivamente.

D y H= mesonefros de embriones masculinos de 50 d.i y femeninos de 45 d.i respectivamente.

L. APLI.= línea de aplicación o zona radiactiva correspondiente al área de aplicación en la placa de gel de sílica de la muestra (alícuota) del extracto orgánico a ser analizado en el escanner.

1= zona radiactiva muy polar que no correspondió a ninguno de los estándares utilizados como referencia.

2= zona radiactiva correspondiente a la testosterona (T).

3= zona radiactiva correspondiente a la dehidroepiandrosterona (DHA).

4= zona radiactiva correspondiente a la A-4-androstendiona (A⁴A).

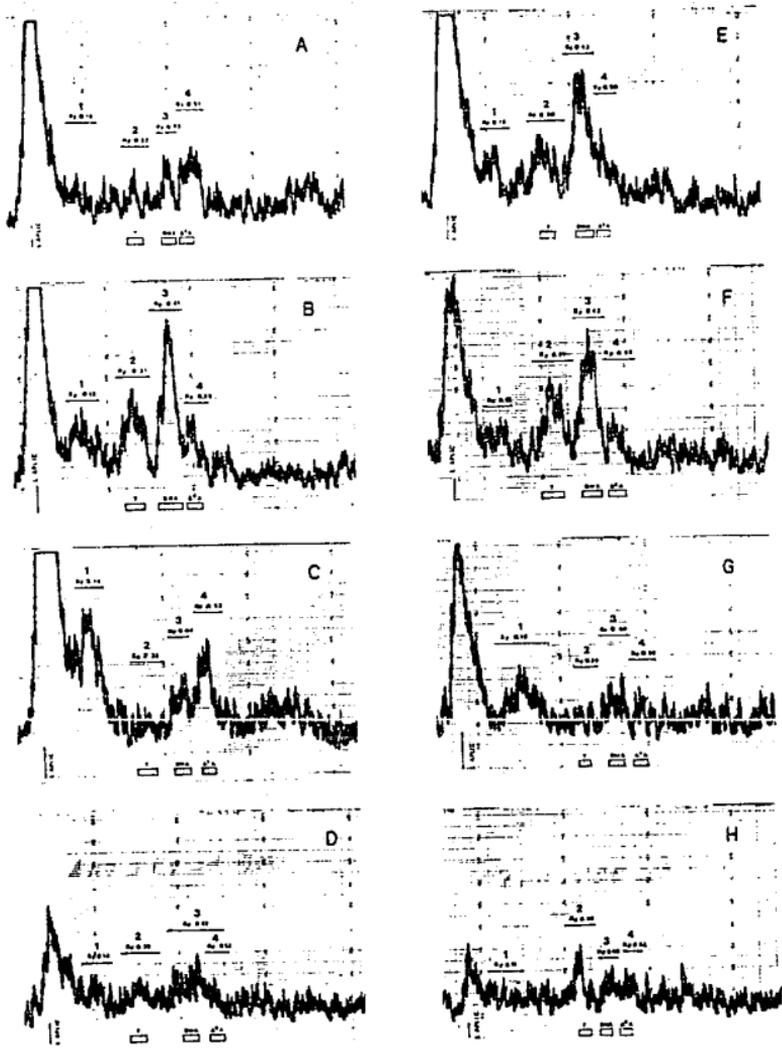


Fig. 18.

Tabla 5.- Pureza radioquímica de la Testosterona-3H biosintetizada durante la incubación con DHA-3H de los órganos urogenitales de la tortuga marina *L. olivacea*.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE 27-28°C			
40 DI* ED**29 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS			
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)***	AGUAS MADRES (a.e)	
	dpm/mg	dpm/mg	
1	1245	1406	
2	326	508	
3	278	428	
4	232	258	
50 DI ED 30 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS			
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)	
	dpm/mg	dpm/mg	
1	434	940	
2	271	694	
3	224	292	
50 DI ED 30 TEJIDO: GONADA			
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)	
	dpm/mg	dpm/mg	
1	119	261	
2	194	195	
3	159	142	
50 DI ED 30 TEJIDO: MESONEFROS			
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)	
	dpm/mg	dpm/mg	
1	168	183	
2	249	187	
3	172	178	

*- día de incubación; **- etapa de desarrollo embrionario;
 ***- actividad específica.

Tabla 6.- Pureza radioquímica de la Testosterona-3H biosintetizada durante la incubación con DHA-3H de los órganos urogenitales de la tortuga marina *L. olivacea*.

TEMPERATURA FEMINIZANTE 31-32°C

40 DI* ED**29 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)***	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	66	1351
2	217	266
3	120	131
4	109	114

45 DI ED 30 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	487	939
2	251	451
3	275	274
4	240	245

50 DI ED 30 TEJIDO: GONADA

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	175	205
2	131	200
3	127	139

50 DI ED 30 TEJIDO: MESONEFROS

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	334	426
2	254	303
3	201	272
4	250	200

*- día de incubación; **- etapa de desarrollo embrionario;
***- actividad específica.

XIV.a.2.- BIOSINTESIS IN VITRO DE ESTRADIOL

Los metabolitos formados durante la incubación de los tejidos urogenitales con T-3H, y extraídos con cloroformo-metanol, se separaron utilizando métodos de cromatografía en capa fina. El análisis de los cromatogramas, empleando un radiocromatógrafo "scanner", reveló la presencia de cuatro zonas radiactivas (Fig. 19).

Zona 1.- La zona uno, con una movilidad cromatográfica idéntica a la testosterona empleada como referencia (Rf 0.39), correspondió al precursor tritiado no metabolizado (testosterona), por lo que no se consideró necesario verificar por medio de recristalizaciones su identidad y pureza radioquímica.

Zona 2.- Esta zona que coincidió exactamente con la zona del estradiol de referencia (Rf 0.48) fué eluida y después de agregar una cantidad extra de estradiol radioinerte se recristalizó hasta obtener una actividad específica constante, demostrándose plenamente la pureza radioquímica del estradiol tritiado formado durante el proceso de incubación *in vitro* (Tabla 7, 8) (Fig. 22).

Zona 3.- La zona radiactiva localizada en el cromatograma

como la zona de menor polaridad, con un Rf de 0.56, presentó durante la purificación cromatográfica, una movilidad idéntica a la de androstendiona.

Zona 4.- Zona correspondiente a la estrona de referencia, presentando un Rf de 0.66.

La formación de androstendiona y de ambos estrógenos tritiados se observó en todos los tejidos incubados con T-3H (Fig. 19). La cromatografía de los extractos de las incubaciones utilizadas como controles (Fig. 21), sólo reveló la presencia del precursor no metabolizado, el cual fué eluido con metanol y la cantidad de T-3H recuperadas se empleó para la corrección de pérdidas que normalmente ocurren durante el proceso experimental. Siendo este de 55%.

Fig. 19.- Gráficas obtenidas del radiocromatógrafo (scanner) que muestran las zonas radiactivas presentes en las placas de gel de sílica después de aplicarles una alicuota de los extractos orgánicos de cada uno de los experimentos de biosíntesis de estradiol a partir del precursor tritiado testosterona (T-3H). Las gráficas del panel izquierdo (A, B, C, D) corresponden a los experimentos llevados al cabo a la temperatura masculinizante (27-28°C) y las del panel izquierdo (E, F, G, H) a la temperatura feminizante (31-32°C).

A y E= gónada-mesonefros de embriones masculinos y femeninos de 40 d.i. respectivamente.

B y F= gónada-mesonefros de embriones masculinos de 50 d.i y femeninos de 45 d.i respectivamente.

C y G= gónadas de embriones masculinos de 50 d.i y femeninos de 45 d.i respectivamente.

D y H= mesonefros de embriones masculinos de 50 d.i y femeninos de 45 d.i respectivamente.

L. APLI.= línea de aplicación o zona radiactiva correspondiente al área de aplicación en la placa de gel de sílica de la muestra (alícuota) del extracto orgánico a ser analizado en el escanner.

1= zona radiactiva correspondiente al precursor testosterona (T).

2= zona radiactiva correspondiente al estradiol (E2).

3= zona radiactiva correspondiente a la A-4-androstendiona (A⁴A).

4= zona radiactiva correspondiente a la estrona (E1).

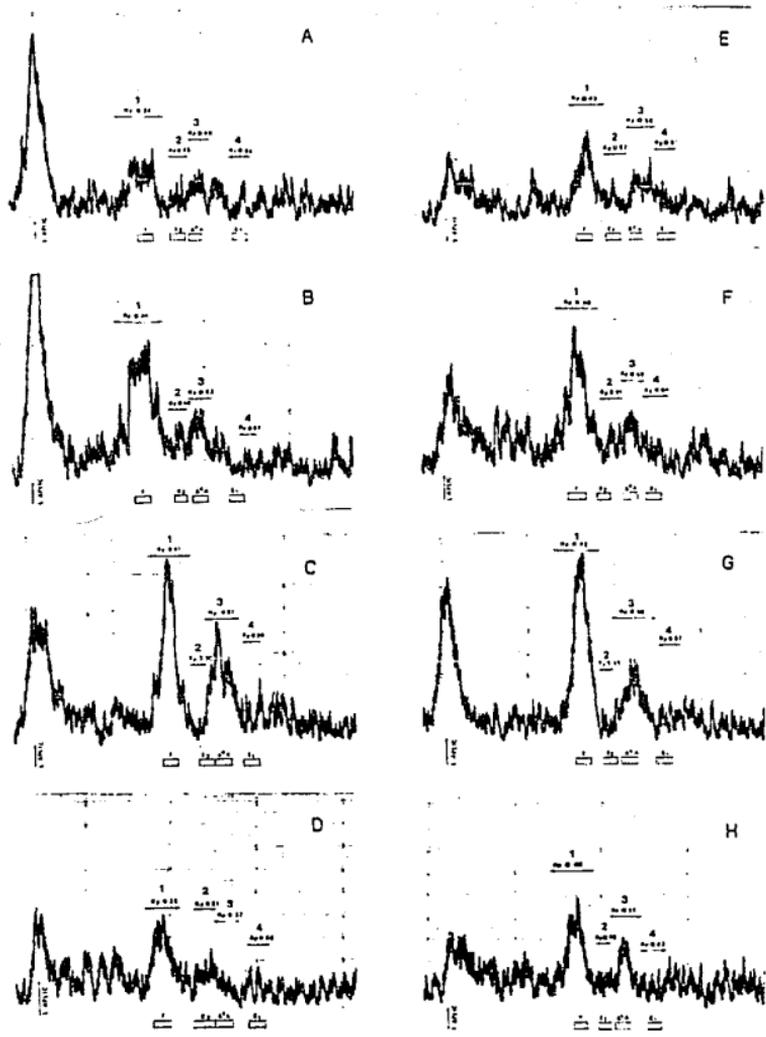


Fig. 19.

Tabla 7.- Pureza radioquímica del Estradiol-3H biosintetizado durante la incubación con T-3H de los órganos urogenitales de la tortuga marina *L. olivacea*.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE 27-28°C		
40 DI* ED**29 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS		
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)***	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	110	1285
2	36	206
3	100	65
50 DI ED 30 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS		
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	157	796
2	106	184
3	111	115
50 DI ED 30 TEJIDO: GONADA		
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	246	674
2	177	133
3	146	146
50 DI ED 30 TEJIDO: MESONEFROS		
CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	207	1095
2	266	286
3	157	216
4	164	124

*- día de incubación; **- etapa de desarrollo embrionario;
 ***- actividad específica.

Tabla 8.- Pureza radioquímica del Estradiol-3H biosintetizado durante la incubación con T-3H de los órganos urogenitales de la tortuga marina *L. olivacea*.

TEMPERATURA FEMINIZANTE 31-32°C

40 DI* ED**29 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)***	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	93	1126
2	46	239
3	34	62

45 DI ED 30 TEJIDO: GONADA-MESONEFROS

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	181	1408
2	127	389
3	118	142
4	114	117

45 DI ED 30 TEJIDO: GONADA

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	249	1777
2	181	436
3	150	144

45 DI ED 30 TEJIDO: MESONEFROS

CRISTALIZACION No.	CRISTALES (a.e)	AGUAS MADRES (a.e)
	dpm/mg	dpm/mg
1	195	608
2	222	231
3	125	171

= día de incubación; *= etapa de desarrollo embrionario;
 ****= actividad específica.

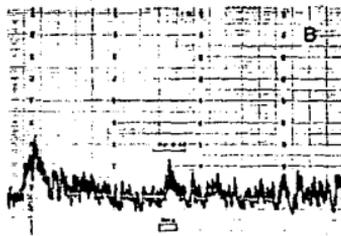
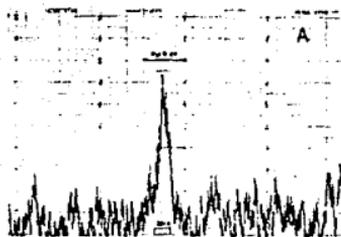


Fig. 20.- Gráficas que muestran los radiocromatogramas de placas de gel de sílica, conteniendo una alícuota de los extractos orgánicos de las incubaciones control llevados al cabo en los experimentos de biosíntesis de testosterona utilizando como precursor, dehidroepiandrosterona tritizada (DHA-3H). A= gráfica del extracto orgánico de la incubación control en ausencia de tejido. B= gráfica del extracto orgánico de la incubación control en presencia de tejido cardíaco. L. APLI= línea de aplicación o zona radiactiva correspondiente al área de aplicación en la placa de gel de sílica de la muestra (alícuota) del extracto orgánico a ser analizado en el radiocromatógrafo (scanner).

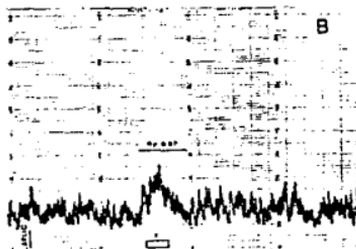
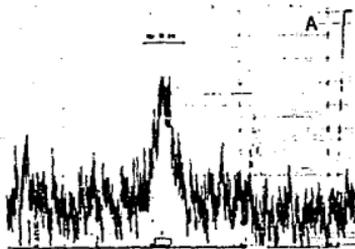


Fig. 21.- Gráficas que muestran los radiocromatogramas de placas de gel de sílica, conteniendo una alícuota de los extractos orgánicos de las incubaciones control llevados al cabo en los experimentos de biosíntesis de estradiol utilizando como precursor, testosterona tritizada (T-3H). A= gráfica del extracto orgánico de la incubación control en ausencia de tejido. B= gráfica del extracto orgánico de la incubación control en presencia de tejido cardíaco. L. APLI= línea de aplicación o zona radiactiva correspondiente al área de aplicación en la placa de gel de sílica de la muestra (alícuota) del extracto orgánico a ser analizado en el radiocromatógrafo (scanner).

Para calcular la cantidad de testosterona y estradiol trititados biosintetizados durante los experimentos, se consideraron las dpm de las recristalizaciones una vez que la actividad específica en los cristales permaneció constante e idéntica a la de las aguas madres. El resultado se multiplicó por los mg del esteroide radioinerte agregados para realizar las recristalizaciones, y las cifras obtenidas se corrigieron de acuerdo al porcentaje de recuperación de los controles incubados sin tejido, diseñados para este objetivo. La cantidad de dpm de tritio se transformó a pmoles, considerando la actividad específica de los substratos trititados incubados y el resultado final se expresó en pmoles del esteroide trititado formado por cada uno de los especímenes (embrión) utilizados en cada experimento (Tablas 9-10).

Tabla 9.- Fentomolas por embrión de Testosterona-3H formadas durante 2 horas de incubación, empleando DHA-3H como sustrato.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE 27-28°C				TEMPERATURA FEMINIZANTE 31-32°C			
DI	ED	TEJIDO	fmo/emb	DI	ED	TEJIDO	fmo/emb
40	29	GOME	2500 (n=6)	40	30	GOME	2000 (n=3)
50	30	GOME	2143 (n=7)	45	30	GOME	3250 (n=4)
50	30	GO	1500 (n=6)	45	30	GO	1250 (n=4)
50	30	ME	2167 (n=6)	45	30	ME	3250 (n=4)

DI - días de incubación
 ED - etapa de desarrollo
 GOME - gónada-mesonefros
 GO - gónada
 ME - mesonefros
 fmo/emb - fentomolas por embrión
 n - número de especímenes estudiados

Tabla 10.- Fentomolas por embrión de Estradiol-3H formadas durante 2 horas de incubación, empleando T-3H como sustrato.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE 27-28°C				TEMPERATURA FEMINIZANTE 31-32°C			
DI	ED	TEJIDO	fmo/emb	DI	ED	TEJIDO	fmo/emb
40	29	GOME	833 (n=6)	40	30	GOME	1667 (n=4)
50	30	GOME	714 (n=7)	45	30	GOME	1200 (n=5)
50	30	GO	1000 (n=6)	45	30	GO	1600 (n=5)
50	30	ME	3600 (n=6)	45	30	ME	3600 (n=5)

DI - días de incubación
 ED - etapa de desarrollo
 GOME - gónada-mesonefros
 GO - gónada
 ME - mesonefros
 fmo/emb - fentomolas por embrión
 n - número de especímenes estudiados

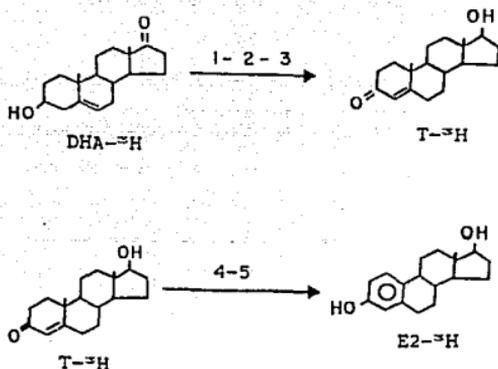


Fig. 22.- Biotransformación in vitro del precursor tritiado dehidroepiandrosterona (DHA-³H) en testosterona tritlada (³H-T), así como del precursor tritlado testosterona en estradiol tritlado (E2-³H), por el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones masculinos y femeninos de 40 días de incubación (etapa 29 y 30 respectivamente). Así como, por las gónadas y mesonefros de tortugas masculinas de 50 días de incubación (etapa de desarrollo 30), y hembras de 45 días de incubación (etapa 30; no eclosionadas). 1= A4-A5-isomerasa; 2= 3-B-ol-hidroxisteroide-deshidrogenasa; 3= 17- α -hidroxisteroide-deshidrogenasa; 4= 19-hidroxilasa; 5= aromatasas.

XIV.b.- RADIOINMUNOANALISIS (RIA)**XIV.b.1.- DETERMINACION EN SUERO****XIV.b.1.1.- TESTOSTERONA**

La cuantificación sérica de testosterona durante las tres etapas estudiadas: embrionaria, recién eclosión y posteclosión, del desarrollo de *L. olivacea*, los animales que se desarrollaron bajo el efecto de la temperatura masculinizante, la concentración de este andrógeno (Tabla 11) sigue un patrón discontinuo (Fig. 23).

Durante la etapa embrionaria se presentó un incremento gradual hasta el día 36 (etapa 24). Aumentando considerablemente (16 pg/ml más que el día 36, etapa 24) en el día 38 (etapa 27). Disminuyendo dramáticamente en embriones de 40 d.i (etapa 29), de 47 pg/ml a 28 pg/ml comparada con la de embriones de 38 d.i (etapa 27) (Fig. 23). Volviendo a incrementarse a partir de los 45 d.i (etapa 30); culminando en el día 50 (etapa 30) (Fig. 23).

En las tortugas masculinas de recién eclosión, la concentración del andrógeno baja ligeramente (2 pg/ml) comparada con el último día de desarrollo embrionario (etapa

30); aumentando (7 pg/ml) en tortugas masculinas jóvenes de 15 dpe (Fig. 23).

La concentración sérica de testosterona en los animales que se desarrollaron bajo el efecto de la temperatura feminizante (Tabla 11), se incrementa en forma lineal en las tres etapas estudiadas (embrionaria, recién eclosión y posteclosión) (Fig. 24).

Apreciándose en ambos sexos un hecho muy interesante. Los embriones masculinos muestran dos fases durante su última etapa del desarrollo embrionario (etapa 30). Una fase inicial que corresponde a animales de 45 d.i y una fase intermedia, que corresponde a embriones de 50 d.i (Fig. 23). Por su parte, en los embriones que se desarrollaron bajo el efecto de la temperatura feminizante, se aprecia una clara etapa de transición entre la penúltima y última etapa de su desarrollo embrionario (etapa 29 y 30, respectivamente). Conformada por animales de 34, 35 y 36 d.i (Fig. 24). Apareciendo también una fase transitoria en su etapa 30. La inicial, correspondiente a embriones de 38 d.i y la intermedia a embriones de 40 d.i (Fig. 24).

Al comparar la concentración del andrógeno entre ambos sexos en días de incubación, es mayor en las hembras de 40 y 45 d.i;

aumentando sensiblemente en los machos de recién eclosión (Tabla 11). Por su parte, en las hembras jóvenes de 15 dpe se incrementa considerablemente (Tabla 11).

Al comparar la concentración de este andrógeno entre ambos sexos en etapas de desarrollo, es mayor en los machos a excepción de las tortugas femeninas de 15 dpe (Tabla 12).

XIV.b.1.2.-

ESTRADIOL

La concentración sérica de 17-B-estradiol durante las tres etapas estudiadas (embrionaria, recién eclosión y posteclosión), en los animales cuyos huevos se desarrollaron bajo el efecto de la temperatura masculinizante (Tabla 11), se presentó un patrón similar al descrito para testosterona. Manteniéndose la misma concentración entre embriones de 50 d.i (etapa 30 intermedia) y tortugas masculinas de recién eclosión (Fig. 23). Disminuyendo dramáticamente en tortugas masculinas jóvenes de 15 dpe (Fig. 23).

En animales provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante, la concentración del estradiol durante las tres etapas estudiadas (embrionaria, recién eclosión y posteclosión) (Tabla 11), se presentó un patrón similar al descrito para testosterona (Fig. 24). Disminuyendo

la concentración del estrógeno, en las tortugas femeninas jóvenes de 10 dpe; haciéndose patente esta baja en las hembras jóvenes de 15 dpe (Fig. 24).

Al comparar la concentración del estrógeno entre ambos sexos en días de incubación, es mayor en las hembras, haciéndose muy patente en el día 40 (Tabla 11).

Al comparar entre ambos sexos la concentración de 17-B-estradiol en etapas de desarrollo, el estrógeno es mayor en los machos, emparejándose en las etapas 30 inicial e intermedia como en tortugas recién eclosión (Tabla 12). Cambiando la relación en las tortugas de 15 días posteclosión.

XIV.b.1.3.- RELACION ENTRE AMBOS SEXOS EN LA CONCENTRACION DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL

En ambos sexos, se observa una interesante relación entre la concentración de estradiol con la de testosterona (Fig. 23-24); además, al comparar en ambos sexos la concentración de ambas hormonas esteroides sexuales durante las tres etapas estudiadas: embrionaria, recién eclosión, y posteclosión, el estrógeno es mayor, a excepción de los machos y hembras jóvenes de 15 dpe, en donde baja drásticamente (Fig. 23-24).

Tabla 11.- Concentración (pg/ml) de testosterona y estradiol en suero de *L. olivacea* durante su etapa embrionaria, recién eclosión y posteclosión.

		TEMPERATURA MASCULINIZANTE (27-28°C)					
		TESTOSTERONA			ESTRADIOL		
DI	ED	1	2	X	1	2	X
	30 ND	---	---	---	---	---	---
	31 ND	---	---	---	---	---	---
	34 22	31.40	30.70	31	38.40	41.60	40
GI	35 ND	33.30	32.80	33	41.80	42.20	42
	36 24	31.80	34.20	33	43.20	44.80	44
ID	38 27	49.20	44.80	47	51.70	52.30	52
	40 29	29.30	26.70	28	31.70	34.30	33
EG	45 30	35.80	38.20	37	48.40	43.60	46
	50 30	45.60	46.40	46	48.30	53.70	51
	55 RE	43.70	44.30	44	52.80	49.20	51
	60 ND	---	---	---	---	---	---
	70 15 PE	46.60	51.40	50	32.50	27.50	30

		TEMPERATURA FEMINIZANTE (31-32°C)					
		TESTOSTERONA			ESTRADIOL		
DI	ED	1	2	X	1	2	X
ID	30 24	11.70	14.30	13	12.30	15.70	14
	31 29	13.60	12.40	13	14.20	13.80	14
	34 T	21.70	22.30	22	33.20	30.80	32
EG	35 T	29.40	24.60	27	35.60	34.40	35
	36 T	26.70	23.30	25	35.70	30.30	33
	38 30	29.30	34.70	32	40.30	41.70	41
	40 30	36.30	41.70	39	52.60	47.40	50
	45 RE	37.80	42.20	40	51.70	54.30	53
	50 5 PE	44.50	47.50	46	56.80	57.20	57
	55 10 PE	53.20	50.80	52	53.30	56.70	55
	60 15 PE	65.70	60.30	63	41.70	39.30	41
	70 ND	---	---	---	---	---	---

GI= estadio de gónada indiferenciada; ID= estadio de inicio de la diferenciación gonadal; EG= estadio de establecimiento gonadal; DI= día de incubación; ED= etapa de desarrollo; ND= etapa del desarrollo no determinada; T= etapa del desarrollo embrionario determinada como etapa de transición (etapa 29/30); RE= recién eclosión; PE= días posteclosión; 1= primera cuantificación (1987); 2= segunda cuantificación (1988); X= media.

Tabla 12.- Comparación de la concentración (pg/ml) de testosterona y estradiol en suero de embriones masculinos y femeninos de *L. olivacea* durante algunas etapas de su desarrollo.

	EMBRIONES MASCULINOS				EMBRIONES FEMENINOS			
	TEMPERATURA DE INCUBACION				TEMPERATURA DE INCUBACION			
	27-28°C				31-32°C			
	ED	DI	T	E2	ED	DI	T	E2
ID	27	38	47	52	24	30	13	14
EG	29 30* 30**	40 45 50	28 37 46	33 46 51	29 30* 30**	31 38 40	13 32 39	14 41 50
RE		55	44	51	45	40	53	
PE		15	50	30	15	63	41	

ID= estadio de inicio de la diferenciación; EG= estadio de establecimiento gonadal; RE= recién eclosión; PE= posteclosión; ED= etapa de desarrollo embrionario; DI= día de incubación; T= testosterona; E2= estradiol; *= inicio de la última etapa de desarrollo embrionario; **= fase intermedia de la última etapa de desarrollo embrionario.

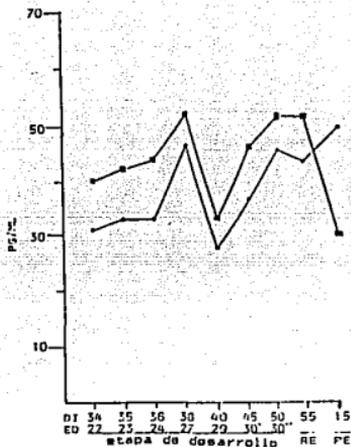


Fig. 23.- Gráfica que muestra la concentración en suero de testosterona (●) y estradiol (■) durante las tres etapas estudiadas de la ontogenia de machos (temperatura de incubación 27-28°C) de *L. olivacea*. d.i.= día de incubación; e.d.= etapa de desarrollo embrionario; r.e.= recién eclosión; p.e.= posteclosión; 30= inicio de la etapa de desarrollo 30; 30= fase intermedia de la etapa de desarrollo 30.

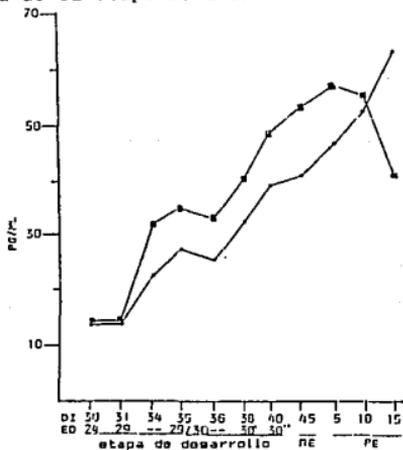


Fig. 24.- Gráfica que muestra la concentración en suero de testosterona (●) y estradiol (■) durante las tres etapas estudiadas de la ontogenia de hembras (temperatura de incubación 31-32°C) de *L. olivacea*. d.i.= día de incubación; e.d.= etapa de desarrollo embrionario; r.e.= recién eclosión; p.e.= posteclosión; 29/30= etapa de transición; 30= inicio de la etapa de desarrollo 30; 30= fase intermedia de la etapa de desarrollo 30.

XIV.b.1.4.- ESTABLECIMIENTO DE LOS ESTADIOS DE LA
DIFERENCIACION GONADAL DE L. olivacea
PARA DESARROLLAR LOS ANALISIS ESTADISTICOS

A partir de los resultados de las determinaciones en suero de testosterona y estradiol por RIA (Tabla 13), se estableció que la etapa embrionaria en machos y hembras está conformada por tres estadios de la diferenciación gonadal: estadio de gónada indiferenciada, estadio de iniciación de la diferenciación gonadal, y establecimiento gonadal, así como estadio de recién eclosión y posteclosión. Estos estadios se designaron con base a la descripción morfológica de la diferenciación gonadal de L. olivacea realizada por Merchant-Larios y col. (96). Cada uno de estos estadios se muestra en la Tabla 13.

Con el objeto de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los estadios determinados en: i) cada sexo, y ii) entre ambos sexos, se hicieron análisis de varianza (ANOVAS) con modelos GLM, y con el objeto de establecer si las concentraciones de testosterona y estradiol, durante la ontogenia (días de incubación) de L. olivacea, tenían un comportamiento que pudiese describirse matemáticamente con una función lineal, se llevaron al cabo análisis de regresión.

Tabla 13.- Establecimiento de los estadios de la diferenciación gonadal de *L. olivacea* para llevar al cabo los análisis estadísticos.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE (27-28°C)						TEMPERATURA FEMINIZANTE (31-32°C)											
EGI		EID		EEG		RE	PE	EGI		EID		EEG		RE	PE		
DI	ED	DI	ED	DI	ED	DI	--	DI	ED	DI	ED	DI	ED	DI	--		
34	22																
35	23																
36	24																
		38	27					30	24								
				40	29					31	29						
										34	T						
										35	T						
										36	T						
		45	30					38	30								
		50	30					40	30								
						55						45					
																5	
														10			
						15										15	

EGI= estadio de gónada indiferenciada; EID= estadio de inicio de la diferenciación gonadal; EEG= estadio de establecimiento gonadal; RE= estadio de recién eclosión; PE= estadio de posteclosión (días posteclosión); DI= día de incubación; ED= etapa de desarrollo embrionario; T= etapa del desarrollo embrionario denominada de transición (29/30).

XIV.b.1.5.- ANALISIS ESTADISTICOS**XIV.b.1.5.1.- ANALISIS DE VARIANZA**

Las clases sexo y estadio en ambos ANOVAS fueron con 2 y 5 niveles respectivamente. Como los tamaños de muestra no son iguales en todos los niveles de estadio y además no hay datos de ambas hormonas esteroides en el nivel 1 de estadio (estadio de gónada indiferenciada) para hembras (nivel 2 de sexo), los dos modelos son desbalanceados e incompletos. Por lo anterior dichos modelos se realizaron con el procedimiento de Modelo Lineal General (GLM) con el paquete estadístico SAS.

Modelo para testosterona: la variable aleatoria es la concentración en suero de testosterona (TE). Los criterios de clasificación son: el sexo (SE), los estadios de la diferenciación gonadal (ED) y la interacción de sexo y estadios de la diferenciación gonadal (SE*ED).

Modelo para estradiol: la variable aleatoria es la concentración en suero de estradiol (ES). Los criterios de clasificación son: el sexo (SE), los estadios de la diferenciación gonadal (ED) y la interacción de sexo y estadios de la diferenciación gonadal (SE*ED).

Los análisis fueron los siguientes:

XIV.b.1.5.1.a.- CONCENTRACION DE TESTOSTERONA

Del listado de SAS se tomaron los análisis de varianza con sumas de cuadrados tipo III, en el que se prueban los efectos de cada una de las fuentes de variación (SE, ED, y SE*ED) en presencia de las otras.

Las hipótesis involucradas son:

1.- H_0 : Las medias de concentración de testosterona en machos y hembras son iguales.

VS

H_a : Dichas medias son distintas.

Lo cual en términos estadísticos suele denotarse:

$H_0: \mu_m = \mu_h$ VS $H_a: \mu_m \neq \mu_h$

2.- Ho: Las medias de cantidades de testosterona son iguales en los cinco estadios.

VS

Ha: Al menos para uno de los estadios la media difiere.

Lo cual en términos estadísticos se denota:

Ho: $\mu e_1 = \mu e_2 = \dots = \mu e_5$ VS Ha: al menos una es diferente

3.- Ho: Las medias de las interacciones de sexo y estadio son iguales.

VS

Ha: Para al menos un sexo y un estadio la media difiere.

Lo cual en términos estadísticos se denota:

Ho: $\mu me_1 = \mu e_2 = \dots = \mu e_5 = \mu he_1 = \dots = \mu he_5$

VS

Ha: al menos una es distinta

La siguiente tabla de análisis de varianza (ANOVA) muestra en su última columna las probabilidades de rechazar H_0 en cada uno de los tres contrastes de hipótesis planteados anteriormente.

FUENTE	G.L.	TIPO III SS	χ^2	VALOR F	PR > F
SE	1	391.418803	391.418803	8.73	0.0064
ED	4	2572.582069	643.145517	14.35	0.0001
SE*ED	3	1142.0	380.666667	8.49	0.0004

Estos niveles de significancia son tan pequeños que se puede concluir:

a.- Si hay un efecto de sexo sobre las concentraciones de testosterona. Es decir, las concentraciones promedio de testosterona son significativamente distintas en cada sexo, a un nivel de 0.0064.

b.- Si hay un efecto de estadio sobre la concentración de testosterona. Es decir, en al menos uno de los cinco estadios el promedio de concentración de testosterona difiere de los demás, a un nivel de significancia de 0.0001.

c.- Si hay un efecto de la interacción sobre la concentración de testosterona. Es decir, que en alguno de los sexos y al menos en un nivel de estadio, la concentración promedio de testosterona difiere significativamente con un nivel de 0.0004.

XIV.b.1.5.1.b.- CONCENTRACION DE ESTRADIOL

Del listado de SAS se tomaron los análisis de varianza con sumas de cuadrados tipo III, en el que se prueban los efectos de cada una de las fuentes de variación (SE, ED, y SE*ED) en presencia de las otras.

Las hipótesis involucradas son:

1.- H_0 : Las medias de concentración de estradiol en machos y hembras son iguales.

VS

H_a : Dichas medias son distintas.

Lo cual en términos estadísticos suele denotarse:

$H_0: \mu_m = \mu_h$ VS $H_a: \mu_m \neq \mu_h$

2.- H_0 : Las medias de cantidades de estradiol son iguales en los cinco estadios.

VS

H_a : Al menos para uno de los estadios la media difiere.

Lo cual en términos estadísticos se denota:

$H_0: \mu_{e1} = \mu_{e2} = \dots = \mu_{e5}$ VS H_a : al menos una es diferente

3.- Ho: Las medias de las interacciones de sexo y estadio son iguales.

VS

Ha: Para al menos un sexo y un estadio la media difiere.

Lo cual en términos estadísticos se denota:

Ho: $\mu_{e1} = \mu_{e2} = \dots = \mu_{e5} = \mu_{h1} = \dots = \mu_{h5}$

VS

Ha: al menos una es distinta

La siguiente tabla de análisis de varianza (ANOVA) muestra, como en el caso de la testosterona, niveles de significancia muy adecuados para rechazar las hipótesis nulas (Ho), correspondientes a los contrastes planteados para la variable concentración estradiol (última columna).

FUENTE	G.L.	TIPO III SS	χ^2	VALOR F	PR > F
SE	1	369.777778	369.777778	5.30	0.0292
ED	4	885.549809	221.387452	3.17	0.0292
SE*ED	3	1342.6261905	447.420635	6.42	0.0020

A partir de estos niveles de significancia se puede concluir:

a.- Hay un efecto de sexo sobre las concentraciones de estradiol. Es decir, las medias de las concentraciones son distintas en machos y hembras, a un nivel de significancia de 0.0292.

b.- Hay un efecto de estadio sobre las concentraciones de estradiol. Es decir, que no es cierto que las medias de concentración de estradiol en los cinco estadios son iguales, a un nivel de significancia de 0.0292.

c.- Hay un efecto de la interacción de sexo con estadio sobre los niveles de concentración de estradiol. Es decir, las medias de dichas concentraciones, en los diez cruces posibles de los niveles de sexo y estadio, no son iguales, a una significancia se 0.002.

XIV.b.1.5.2.- ANALISIS DE REGRESION

Una vez que se probó que las concentraciones promedio de testosterona y estradiol (Tabla 3) son distintas en machos y hembras, se investigó si esas concentraciones durante la ontogenia del quelonio en días de incubación y en ambos sexos, tenían un comportamiento que pudiese describirse matemáticamente con una función lineal. Es decir, si se podían ajustar modelos de regresión lineal a las observaciones de testosterona (TE) y de estradiol (ES) en el tiempo (días de incubación) para machos, y hembras.

De una serie de ajustes investigados, se presentan los mejores ajustes obtenidos.

XIV.b.1.5.2.a.- TESTOSTERONA

En el caso de los machos y la variable concentración de testosterona, se tiene el modelo $TE_m = B_0m + B_1m Di + e$ con una $R^2 = 0.5248$. Lo que significa, que este modelo explica el 52.48 % de la variabilidad de TE.

Con los datos se ajustó el modelo:

$$TE_m = 16.529295 + 0.497113 Di$$

Se probó la hipótesis alternativa de que no hay regresión, esto es:

$$H_0 : B_{1m} = 0 \quad \text{VS} \quad H : B_{1m} \neq 0$$

rechazándose la hipótesis H_0 a un nivel de significancia de 0.0007. Concluyéndose que sí hay regresión o bien que la variable D_i sí explica la variabilidad de TE con el modelo:

$$TE_m = B_{0m} + B_{1m} D_i + e$$

En el caso de las hembras y la variable concentración de testosterona, hubo muy poca diferencia entre ajustar el modelo rectilíneo $TE_h = B_{0h} + B_{1h} D_i + e$ ó el modelo parabólico $TE_h = B_{0h} + B_m D_i + B_{2h} D_i^2 + e$ ya que los valores de R^2 son 0.9382 y 0.9519 respectivamente. Se optó por el modelo rectilíneo, que nos explica el 93.82% de la variabilidad de TE, cuyo modelo ajustado es:

$$TE_h = -30.468544 + 1.557608 D_i$$

Se realizó la prueba de regresión con la hipótesis:

$$H_0 = B_m = 0 \quad \text{VS} \quad H : B_m \neq 0$$

rechazandose H_0 al 0.0001, lo que significa que la variable D_i explica bajo el modelo $TE = B_0 + B_1 D_i + e$ la variabilidad de TE .

Haciendo notar que la concentración de testosterona en hembras durante el tiempo (días de incubación), es decir durante la ontogenia de su desarrollo, es mucho más ajustable (comparese los valores R^2), por lo que se presta más a hacer predicciones que en los machos.

A continuación se hace una prueba para comparar las pendientes de las rectas que fueron los modelos propuestos para testosterona (TE):

$$H_0 : B_{1m} = B_{1h} \quad \text{VS} \quad H : B_{1m} \neq B_{1h}$$

$$t_c = \frac{0.497113 - 1.557608}{\sqrt{(0.118239)^2 + (0.08936696)^2}} = -7.155238163$$

Con este valor calculado la hipótesis H_0 se rechaza a un nivel de significancia menor que 0.001. Concluyendose que las pendientes o bien los pesos que tiene D_i para explicar la variabilidad de TE en machos y hembras son diferentes; es decir, que las rectas no son paralelas.

Dado el no paralelismo, se buscó el punto de intersección de las rectas ajustadas, siendo: 44.31688787, 38.559795. Lo anterior significa que aproximadamente al 44avo día de incubación los machos y hembras alcanzan la misma concentración de testosterona (38.56 pg/ml aproximadamente) (Fig. 25). Además, a partir de este punto las concentraciones de TE son mayores para las hembras con respecto a la de los machos (Fig. 25). De hecho este resultado no es de sorprender, ya que las pendientes estimadas son muy distintas. Para los machos es de 0.497113, lo que significa que es una recta con pendiente menor a los 45° (con pendiente 1), y para las hembras la pendiente estimada es de 1.55 es decir que es una recta con pendiente mayor que la de 45° .

ux = 4.00 uy = 7.86

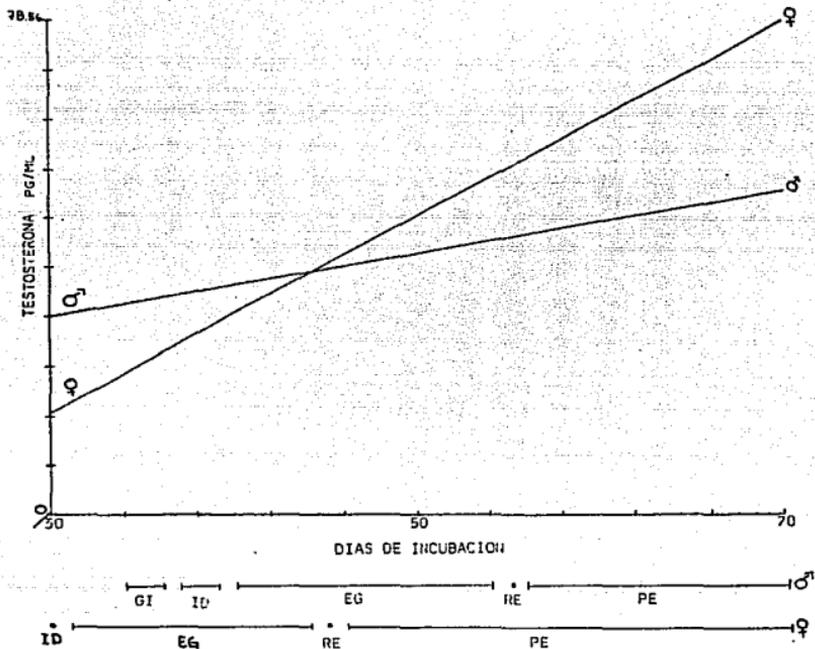


Fig. 25.- Gráfica que muestra el comportamiento en machos (♂) y hembras (♀) de la concentración de testosterona en suero, durante los tres estadios de la diferenciación gonadal determinados en la etapa embrionaria como de recién eclosión y posteclosión de la tortuga *L. olivacea*. GI- estadio de gónada indiferenciada; ID- estadio de inicio de la diferenciación gonadal; EG- estadio de establecimiento gonadal; RE- estadio de recién eclosión; PE- estadio de posteclosión.

XIV.b.1.5.2.b.-

ESTRADIOL

Para la variable concentración de estradiol se ajustaron varios modelos con el fin de explicarla como una función de D_i . Tanto para machos como para hembras, el modelo que mejor se ajustó fué el parabólico con término lineal (D_i) y término cuadrático (D_i^2). Estadísticamente definida como:

$$ES_m = B_{0m} + B_{1m} D_i + B_{2m} D_i^2 + e \quad (1)$$

y

$$ES_h = B_{0h} + B_{1h} D_i + B_{2h} D_i^2 + e \quad (2)$$

Teniendo ambas ecuaciones valores de R^2 de 0.4787 y 0.9664 respectivamente. Lo anterior significa que D_i y D_i^2 explican el 46.87 % de la variabilidad de ES en los machos bajo el modelo (1). Por su parte, D_i y D_i^2 explican el 96.64 % de la variabilidad de ES en hembras bajo el modelo (2).

En el modelo (1) se probó que hay regresión, siendo las hipótesis:

$H_0 : B_{1m} = B_{2m} = 0$ VS $H =$ al menos una es diferente de cero

rechazandose H_0 a un nivel de significancia de 0.0087.

También se hicieron pruebas parciales con la siguientes hipótesis:

$$H_0 : B_{1m}/D_i^2 = 0 \quad VS \quad H : B_{1m}/D_i = 0$$

y

$$H_0 : B_{2m}/D_i = 0 \quad VS \quad H : B_{2m}/D_i = 0$$

rechazandise en ambos casos H_0 con niveles de significancia de 0.0053 y 0.0039 respectivamente. Concluyendose que tanto la variable D_i como D_i son significativas en el modelo (1), ya que los pesos con los que entran al modelo B_{1m} y B_{2m} respectivamente, son distintos de cero.

De manera similar se realizaron las pruebas de regresión y parciales para el modelo (2) (hembras).

La hipótesis de regresión fue:

$$H_0 : B_{1h} = B_{2h} = 0 \quad VS \quad H : \text{al menos una es diferente a cero}$$

Rechazandose H_0 a un nivel de significancia de 0.0001, lo que significa que si hay regresión en el modelo (2).

Las pruebas parciales fueron con las siguientes hipótesis:

$$H_0 : B1h/Di^2 = 0 \quad VS \quad H : B1h/Di^2 = 0$$

y

$$H_0 = B2h/Di = 0 \quad VS \quad H : B2h/Di = 0$$

Rechazandose en ambas H_0 con un nivel de significancia de 0.0001 en ambos casos. Concluyendose que D_i y D_i son significativas en el modelo parabólico (modelo (2)) para hembras.

Los modelos ajustados con los datos son:

$$ESm = -47.553086 + 3.942638 D_i - 0.040264 D_i^2$$

$$ESh = -243.675252 + 12.312244 D_i - 0.125929 D_i^2$$

Puede notarse que dados los valores de R en ambos modelos, es mejor el ajuste en el modelo de hembras, ocurriendo lo mismo para el caso de la concentración de testosterona. Un resultado importante, es que tanto en la concentración de TE y ES, los datos obtenidos para hembras en esta tesis, mostraron una tendencia que puede describirse con mayor exactitud que en los machos, con una función lineal. Lo cual facilita hacer seguimientos en el futuro como de estimaciones previas.

Por último, notese que las parábolas ajustadas están una sobre la otra (aunque una sea más abierta) y aun cuando aproximadamente al 49avo día alcanzan ambas su máximo, el nivel de estradiol en ese día es mayor en las hembras (57.30 pg/ml) (Fig. 26). Las cuales ya pasaron de su etapa de recién eclosión (Fig. 26). Por su parte, los machos todavía están en la última etapa de su desarrollo (etapa 30; Figs. 19, 29) presentando además, un nivel de estradiol menor (48.96 pg/ml) (Fig. 26).

Coincidiendo ambas parábolas en aproximadamente el 39avo día y el 58.7avo día, siendo los puntos en que se cortan las parábolas correspondientes a los puntos de intersección (Fig. 26):

(39.00, 45.00) y (58.70, 45.14)

ux =4.00 uy=5.73

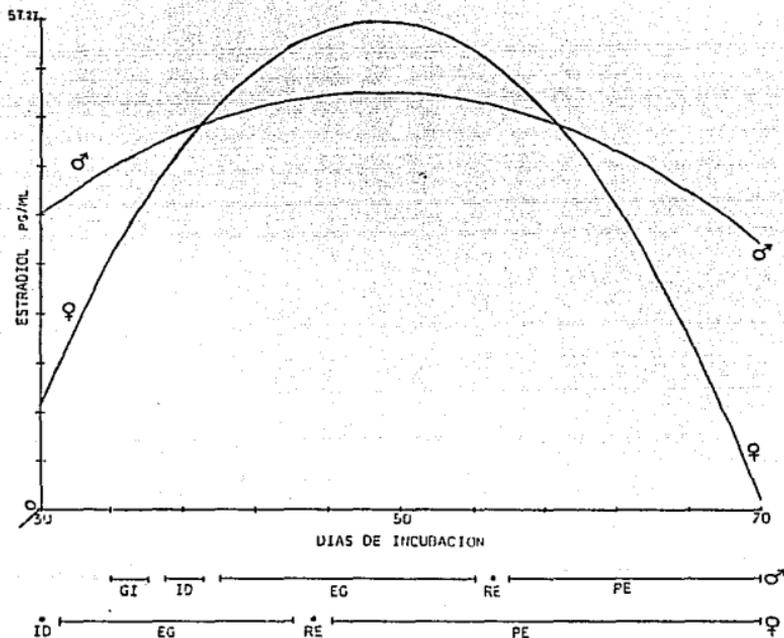


Fig. 26.- Gráfica que muestra el comportamiento en machos (♂) y hembras (♀) de la concentración de estradiol en suero, durante los tres estadios de la diferenciación gonadal determinados en la etapa embrionaria como de recién eclosión y posteclosión de la tortuga *L. olivacea*. GI- estadio de gónada indiferenciada; ID- estadio de inicio de la diferenciación gonadal; EG- estadio de establecimiento gonadal; RE- estadio de recién eclosión; PE- estadio de posteclosión.

**XIV.b.2.- DETERMINACION RADIOINMUNOLITICA DE TESTOSTERONA Y
ESTRADIOL EN ORGANOS UROGENITALES**

XIV.b.2.1.- TESTOSTERONA

La concentración de testosterona a nivel de órganos urogenitales de embriones de 40 d.i (etapa 29) provenientes de huevos incubados a la temperatura masculinizante es mayor en gónada (27 pg/ml), seguido por la glándula interrenal (22 pg/ml) y mesonefros (8 pg/ml) (Tabla 14) (Fig. 28).

Los embriones de 30 d.i (etapa 24) provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante, el andrógeno es mayor en la glándula interrenal (59 pg/ml), seguido por la gónada (56 pg/ml) y mesonefros (51 pg/ml) (Tabla 14) (Fig. 27). A los 40 d.i (etapa 30) tiende a disminuir (Tabla 14) (Fig. 27), incrementándose en el mesonefros e interrenal de hembras recién eclosionadas (Tabla 14) (Fig. 27). En la glándula interrenal 12 pg/ml más comparada con la de embriones femeninos de 40 d.i (etapa 30) y en forma aguda en el mesonefros (38 pg/ml más) comparado con el de 40 d.i (etapa 30). Disminuyendo en la gónada (12 pg/ml menos) comparada con la de embriones de hembras de 40 d.i (etapa 30) (Fig. 27).

Comparando la concentración de este andrógeno entre los órganos urogenitales de embriones provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante de 40 d.i (etapa 29) con los de embriones provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante de 40 d.i (etapa 30), el andrógeno es mayor en la gónada y mesonefros de las hembras (dos y cuatro veces respectivamente (Tabla 14).

XIV.b.2.2.-

ESTRADIOL

En los órganos urogenitales de embriones de 40 d.i (etapa 29) provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante se detectaron trazas (<4 pg/ml) de 17-B-estradiol (Fig. 28).

En embriones de 30 d.i (etapa 23) provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante, este estrógeno se encuentra muy alto en mesonefros (96 pg/ml), seguido por la gónada (29 pg/ml) y glándula interrenal (25 pg/ml) (Tabla 14) (Fig. 27). Disminuyendo drásticamente en los órganos urogenitales de los embriones de 40 d.i (etapa 30) (Tabla 14) (Fig. 27). En el mesonefros 74 pg/ml menos; gónadas temperatura masculinizante de 40 d.i (etapa 29) con embriones provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante de 40 d.i (etapa 30), es mayor a nivel

de gónada y mesonefros en los embriones femeninos, y en los embriones masculinos se encuentra en concentración traza (< 6 pg/ml) (Tabla 14) (Fig. 24). En ambos sexos, la glándula interrenal presenta trazas de este estrógeno (Tabla 14) (Fig. 27-28).

Tabla 14.- Concentración de testosterona y estradiol en órganos urogenitales de embriones masculinos y femeninos, así como de hembras recién eclosionadas de la tortuga marina *L. olivacea*.

TEMPERATURA MASCULINIZANTE					TEMPERATURA FEMINIZANTE				
(27-28°C)					(31-32°C)				
<u>pg/ml</u>					<u>pg/ml</u>				
<u>DI</u>	<u>ED</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>T</u>	<u>E2</u>	<u>DI</u>	<u>ED</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>T</u>	<u>E2</u>
--	--	--	-	--	30		GO	56	29
--	--	--	-	--	"	"	ME	51	96
--	--	--	-	--	"	"	IN	59	25
40	29	GO	27	*	40	30	GO	49	15
"	"	ME	8	*	"	"	ME	31	23
"	"	IN	22	*	"	"	IN	19	*
					RE		GO	37	40
					"		ME	69	22
					"		IN	31	6

DI - día de incubación; ED- etapa del desarrollo; GO- gónada; ME- mesonefros; IN- interrenal; pg/ml- picogramos por mililitro; T- testosterona; E2- estradiol; * - concentración del estrógeno sobre los límites de la sensibilidad del ensayo (2.4 pg/tubo).

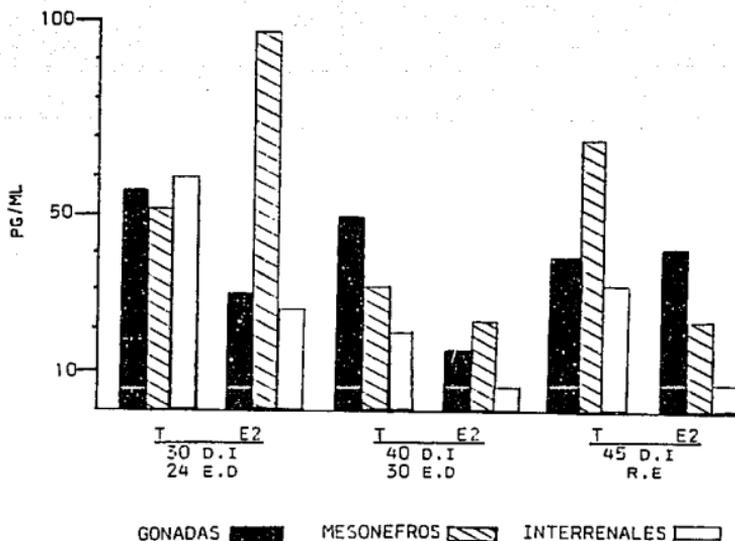


Fig. 27.- Gráfica que muestra la concentración de testosterona (T) y estradiol (E2) en órganos urogenitales de embriones y tortugas recién eclosionadas de *L. olivacea* desarrollados bajo el efecto de la temperatura feminizante (31-32°C). d.i.- día de incubación; e.d.- etapa de desarrollo embrionario; r.e.- recién eclosión.

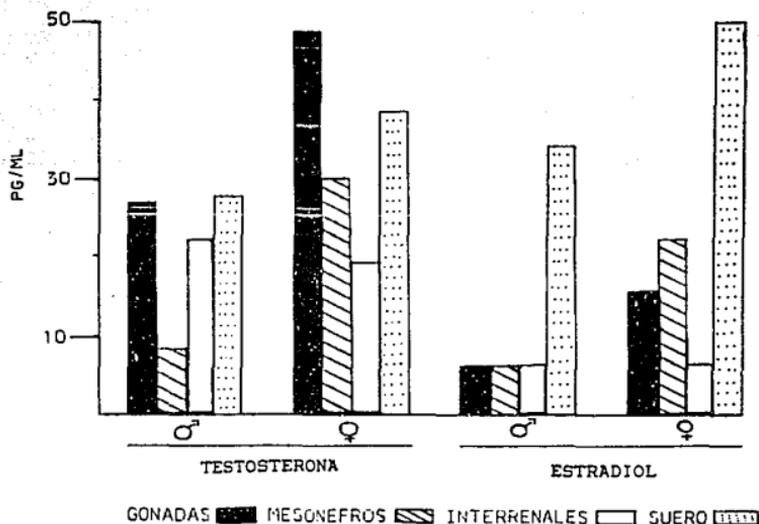


Fig. 28.- Gráfica que muestra la relación en la concentración de testosterona y estradiol en órganos urogenitales y suero, entre embriones masculinos (♂) y femeninos (♀) de 40 días de incubación (etapa de desarrollo 29 y 30 respectivamente) de *L. olivacea*.

XIV.c.- DETERMINACION DEL RECEPTOR PARA ESTROGENOS

Los resultados del análisis de los gradientes de sacarosa utilizados para estudiar la presencia del receptor intracelular a estradiol de los tejidos urogenitales de embriones incubados a la temperatura masculinizante, durante las etapas 29 y 30, que forman parte del estadio de establecimiento gonadal masculino, así como en las gónadas, mesonefros e interrenales de machos de 15 dpe, se muestran en las figuras 29 y 31 respectivamente. En los embriones incubados a la temperatura feminizante de 26 d.i (estadio de gónada indiferenciada?) y de la etapa 30, que forma parte del estadio de establecimiento gonadal femenino, se muestran en la figura 30. En todos los casos, se representa el análisis del contenido de tritio en los gradientes lineales de sacarosa de cada complejo urogenital (gónada-mesonefros), así como en los testículos incipientes, mesonefros e interrenales. Apreciándose una zona bien definida con contenido de tritio que se localiza entre las fracciones colectadas 13-20. El coeficiente de sedimentación correspondiente a esta zona radiactiva se calculó aplicando la fórmula siguiente:

$$\begin{array}{l} \text{coeficiente} \\ \text{de} \\ \text{sedimentación (S)} \end{array} = \begin{array}{l} \text{coeficiente de sedimentación} \\ \text{del} \\ \text{marcador interno X F} \\ \text{(BSA-naftol-azul-negro)} \end{array}$$

$$F = a/b$$

En donde:

a= número de fracciones totales menos el número de fracciones correspondientes a la zona del receptor marcado radiactivamente.

b= número de fracciones totales menos el número de las fracciones correspondientes al marcador interno (BSA-naftol-azul-negro).

Demostrandose la presencia de un sitio de unión de alta afinidad (receptor) para estradiol en la fracción soluble (citosol) en el complejo urogenital gónada-mesonefros de los embriones provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante (Fig. 29) y en los desarrollados a la temperatura feminizante (Fig. 30), así como en las gónadas (testículos incipientes), mesonefros e interrenales de los machos de 15 dpe (Fig. 31). El coeficiente de sedimentación obtenido para este receptor citoplasmático fué de 9 unidades Sdverberg (9S), el cual corresponde (dentro de los límites aceptados) al coeficiente de sedimentación informado en la literatura para el receptor citoplasmático para estrógenos.

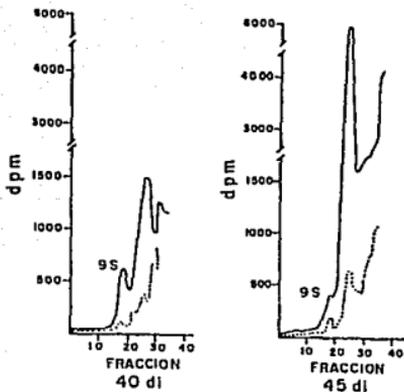


Fig. 29.- Gráficas que muestran la presencia del receptor para estradiol en el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones masculinos (temperatura de incubación 27-28°C) de *L. olivacea*. 40 di= 40 días de incubación (etapa de desarrollo 29); 45 di= 45 días de incubación (inicio de la etapa de desarrollo 30); 9S- 9 unidades Svedberg; dpm- desintegraciones por minuto.

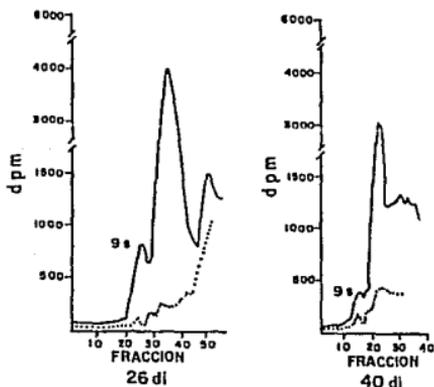


Fig. 30.- Gráficas que muestran la presencia del receptor para estradiol en el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones femeninos (temperatura de incubación 31-32°C) de *L. olivacea*. 26 di= 26 días de incubación (etapa de desarrollo 15); 40 di= 40 días de incubación (fase intermedia de la etapa de desarrollo 30); 9S- 9 unidades Svedberg; dpm- desintegraciones por minuto.

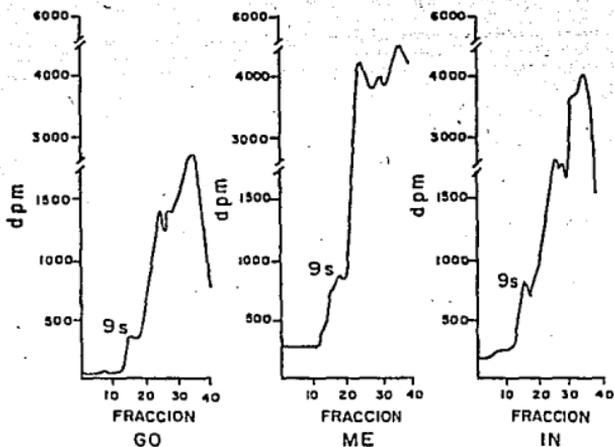


Fig. 31.- Gráfica que muestra la presencia del receptor para estradiol en gónadas (GO), mesonefros (ME), e interrenales (IN) en tortugas masculinas de 15 días posteclosión. 9S= 9 unidades Svedberg; dpm= desintegraciones por minuto.

Cuadro que resume los resultados obtenidos en esta tesis sobre machos, mostrando además los resultados morfológicos de la diferenciación gonadal masculina de *L. olivacea* reportados por Merchant-Larios et al. (96).

DÍA DE INCUBACIÓN	ETAPA DE DESARROLLO	DIFERENCIACIÓN GONADAL	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	BIOSÍNTESIS	RIA GONADA UROGENITAL	RIA SUELO	RECEPTOR A ESTROGENOS
34	22	ESTADIO TÍPICO DE GONADA INDETERMINADA	SUPERFICIE EPITELIAL FORMADA POR UNA SIMPLE CAPA DE CELULAS CUBICODALES QUE MODEAN A LAS CELULAS GERMINALES. LOS CONDONOS REGULARES (SEXUALES) PERMANECEN UNIDOS A LA SUPERFICIE DEL EPITELIO CONFORMANDO UN EPITELIO CONTINUO ENVUELTO POR UNA LAMINA BASAL COMUN			AUMENTO GRADUAL DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL E2 >> T	
35	23						
36	24						
38	27	ESTADIO DE DIFERENCIACIÓN DEL TESTÍCULO	EL "TESTÍCULO" AUN NO PRESENTA UNA NOTABLE DIFERENCIACIÓN ESTRUCTURAL PRESENTA TAN SOLO UNA MAYOR PENETRACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS Y DE ESTROMA PROVENIENTE DE LA REGIÓN MESO NEFRICA ESTO PROVOCA QUE LOS CONDONOS MEDULARES (SEXUALES) SE HAGAN COMPLICADOS SIN EMBAURGO LA MAYORÍA DE LAS CELULAS GERMINALES PERMANECEN SOBRE LA SUPERFICIE DEL EPITELIO CILÍNDICO (CORTEZA) NO DIFERENCIANDO EN TUBULOS SEMINÍFEROS	TESTOSTERONA GONADA-MESO NEFROS AROMATIZAR	TESTOSTERONA GONADA >> MESO NEFROS EN AMBOS ESTRADIOL T >> E	AUMENTO MUY CONSIDERABLE DE AMBOS ESTROGENOS E2 > T	
40	29					BAJAS DRAMÁTICAS GONADA-MESO NEFROS ROIDES T >> E2	
45	30 INICIAL					AUMENTO GRADUAL DE AMBOS ESTROGENOS E2 > T	GONADA-MESO NEFROS
50	30 INTERMEDIA			TESTOSTERONA Y ESTRADIOL POR LA GONADA Y MESONEFROS Y GO-ME		AUMENTO PATEM DE AMBOS ESTROGENOS E2 > T	
55	RECIENTE ECLOSION					BAJA TESTOSTERONA ESTRADIOL IGUAL QUE LA ETAPA 30 INTERMEDIA E2 < T	
15	POST ECLOSION					BAJA DRAMÁTICA DEL ESTRADIOL AUMENTA TESTOSTERONA A PARTIR DEL DÍA 55	GONADA MESONEFROS INTERRENAL

Cuadro que resume los resultados obtenidos en esta tesis sobre hembras, mostrando además los resultados morfológicos de la diferenciación gonadal femenina de *L. olivacea* reportados por Merchant-Larios et al. (96).

DÍA DE INCIUBACION	ETAPA DE DESARROLLO	DIFERENCIACION GONADAL	CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	BIOINTERIS	RIA ORGANO UROGENITAL	RIA SUERO	RECEPTOR A ESTROGENOS
26	15	ESTADIO TIPICO DE GONADA INICIADA					GONADA-MEDD NEFROS
30	24	PRIMER ESTADIO DE LA DIFERENCIACION GONADAL FEMENINA: OVARIO	ENGROSAMIENTO DE LA SUPERFICIE EPITELIAL SOMATICA (CORTEZA) LOS CORDONES MEDULARES (SEXUALES) INICIAN UN PROCESO DE REGRESION HAY PRESENCIA DE TERMINACIONES NERVIOSAS CON AXONES NO MYELINIZADOS Y VESICULAS SEMI-SINAPTICAS QUE RODEAN A LOS CORDONES MEDULARES EN REGRESION		TESTOSTERONA MUY ALTA EN: GO-ME-IN ESTRADIOL ME > GO > IN	TESTOSTERONA Y ESTRADIOL SE MANTIENEN BAJOS E2 > T	
31	29	CONTINUAN LOS PROCESOS DE DIFERENCIACION PROCESO DE MADURACION				AUMENTO GRADUAL DE AMBAS HORMONAS ESTEROIDES E2 > T	
34-36	29-30	ETAPA DE TRANSICION DILUCIONADA POR LA CONCENTRACION DE T Y E2				AUMENTO MUY CONSIDERABLE DE AMBAS HORMONAS ESTEROIDES E2 >> T	
36	30 INICIAL	CONTINUAN LOS PROCESOS DE MADURACION	ANTES DE LA ECLOSION ALGUNAS GONADAS PRESENTAN CONDENACION CROMOSOMICA OBSERVANDOSE QUE LA PRIMERA PROFASE MEIOTICA NO AVANZA MAS ALLA DEL ESTADIO DE PRELEPTOTENE			AUMENTO GRADUAL DE AMBAS HORMONAS ESTEROIDES E2 > T	
40	30 INTERMEDIA			TESTOSTERONA POR GONADA-ME SONIFROS AMBOS AROMATIZAN	GO > ME > IN ESTRADIOL ME >> GO IN TRACA		GONADA-MEDD NEFROS
45	RECIENTE ECLOSION		NO HAY AUN FORMACION FOLICULAR DESPUES DE LA ECLOSION PERMANECIENDO ASI EL OVARIO EN TORTUGAS JUVENILES DE HASTA 88 DIAS POSTECLOSION	TESTOSTERONA Y ESTRADIOL POR LA GONADA Y MESSONEFROS Y GO-ME	TESTOSTERONA IN > GO > ME ESTRADIOL GO > ME IN TRACA		
5-15	POST ECLOSION					A LOS 5 dpe ESTRADIOL BAJA DRAMATICAMENTE A LOS 15 dpe ME INVIERTE LA RELACION ENTRE AMBAS HORMONAS ESTEROIDES T >> E2	

XV.- DISCUSION**XV.a.- BIOSINTESIS****XV.a.1.- BIOSINTESIS DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL EN EL
COMPLEJO UROGENITAL GONADA-MESONEFROS
DE EMBRIONES**

En reptiles la capacidad de biosintetizar hormonas esteroides sexuales (HES) por las gónadas y órganos adyacentes (mesonefros e interrenales) durante la ontogenia de su diferenciación sexual, ha sido dilucidada de forma indirecta a partir de utilizar técnicas histoquímicas (vease inciso II.c). Las primeras evidencias que sugerían que las gónadas embrionarias tenían una probable capacidad de biosintetizar HES, fué la detección de gránulos de lípidos. En *Anguis fragilis* se detectaron poco después de la diferenciación testicular (152; 153), así como en el estroma y células somáticas de los túbulos seminíferos de embriones de 15 días de incubación (d.i) de *Podarcis sicula* (29).

A partir de la detección hitoquímica de enzimas involucradas en la esteroidogénesis, se postuló que las gónadas embrionarias tenían capacidad de biosintetizar HES. En testículos (células

somáticas de los túbulos seminíferos) y ovarios (región medular) de embriones de *Podarcis sicula* se detectó actividad de la enzima 3-B-ol-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3BOLEDH), enzima involucrada en la biosíntesis de HES (inciso VII.a ; 29). Durante la diferenciación del testículo como del ovario en *Lacerta viridis* no se detecta su actividad, sino una vez diferenciadas y sólo a nivel medular (39; 101). En el testículo, pero no en el ovario de embriones de *Vipera aspis* es evidente su actividad (101). Por su parte, en reptiles sexo-termodependientes, la actividad de la enzima 3BOLEDH ha sido determinada en gónadas embrionarias (región medular) de *Emys orbicularis* (119), y en la glándula interrenal de *Lepidochelys olivacea* durante su diferenciación sexual (96). Sin embargo, en reptiles se adolece de estudios que demuestren que las gónadas, el mesonefros y las interrenales durante la diferenciación sexual gonadal, biosinteticen hormonas esteroides sexuales.

Las evidencias arriba mencionadas sugieren: i) la región gonadal embrionaria activa en biosíntesis de HES es la médula (mesenquima o estroma) y ii) la temperatura de incubación al regular el metabolismo de andrógenos y/o estrógenos, la diferenciación sexual gonadal en *E. orbicularis* se da directamente a nivel gonadal y en *L. olivacea* al través de las HES provenientes de la glándula interrenal.

En esta tesis el haber utilizado dehidroepiandrosterona (DHA) como precursor en la biosíntesis de andrógenos (testosterona), estribó en los siguientes hechos: i) este esteroide es un metabolito en la ruta de biosíntesis de esteroides sexuales denominada vía de los A5. Los cuales son considerados como precursores de esteroides sexuales con actividad biológica, por ejemplo, testosterona (vease inciso V; Fig. 13), y ii) como uno de los objetivos de esta tesis era analizar la capacidad de biotransformar precursores radiactivos para biosintetizar andrógenos (testosterona) y estrógenos (estradiol) de manera natural, y por ser el primer estudio a este respecto a nivel embrionario, no se utilizaron cofactores energéticos (v.gr. DPNH). Por tal motivo, se utilizó DHA-3H como precursor en la biosíntesis de testosterona, ya que sólo tiene que pasar por dos pasos metabólicos para su conversión a testosterona (vease inciso V; Fig. 13). Por su parte, el haber utilizado testosterona como precursor en la biosíntesis de estrógenos (estradiol), es que es el precursor esencial para que se efectúe su biosíntesis (vease inciso V; Fig. 13).

Embriones de 40 y 50 días de incubación (d.i) desarrollados a la temperatura masculinizante (27-28°C) y que corresponden a la etapa 29 y 30 del desarrollo embrionario respectivamente, conforman el estadio denominado establecimiento gonadal (vease

inciso XIV.b.1.4), su complejo urogenital gónada-mesonefros tiene capacidad de biosintetizar testosterona y estradiol. Favoreciendose de manera significativa en ambas etapas del estadio de establecimiento gonadal, la biosíntesis del andrógeno sobre la del estrógeno (Tabla 9, 10). Por su parte, los embriones de 40 y 45 d.i desarrollados a la temperatura feminizante (31-32°C) y que corresponden a la etapa 30 del desarrollo embrionario que es la última etapa que forma parte del estadio de establecimiento gonadal femenino (Tabla 13), en las hembras de 45 d.i hay una diferencia significativa entre su capacidad de biosintetizar testosterona (Tabla 9) con la del estradiol (Tabla 10), favoreciendose la del andrógeno. Los hechos anteriores sugieren que el metabolismo de andrógenos se favorece más que el de los estrógenos en el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones masculinos de la etapa 29 y 30, así como en el de las embras de la etapa 30.

Al comparar la capacidad de biosíntesis del complejo urogenital entre ambos sexos de la etapa 29, no hay diferencia significativa en la de testosterona, sin embargo la del estrógeno es mayor (el doble) en las hembras (Tabla 10). Por su parte, los embriones masculinos y femeninos de la etapa 30, sólo la biosíntesis de la testosterona es significativamente mayor en las hembras (Tabla 9). Sugiriendose que en las hembras de la etapa 29 se favorece la biosíntesis de estradiol,

mientras que en las hembras de la etapa 30 se favorece el metabolismo de andrógenos.

A partir de estos resultados, se comprueba que el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones de ambos sexos de *L. olivacea* durante las dos últimas etapas del estadio de establecimiento gonadal, tiene la capacidad de biotransformar dehidroepiandrosterona (DHA) a testosterona (T), el andrógeno por antonomasia en reptiles, aves y mamíferos. Además de tener la capacidad de aromatización, es decir de biosintetizar estrógenos (v.gr. estradiol). Por tal motivo, se demuestra la presencia de tres enzimas involucradas en la biosíntesis de testosterona (los números entre paréntesis corresponden a la ubicación dentro de la nomenclatura internacional de enzimas (4)): A4-A5-isomerasa (5.3.3.1); 3- β -ol-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (1.1.1.51), y 17- α -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (1.14.1.7). Así como de la presencia de las enzimas involucradas en la biotransformación de testosterona en estradiol: 19-hidroxilasa y aromatasas (Fig. 22). Sugiriéndose que todas las enzimas arriba mencionadas, están presentes tanto en el estroma de los testículos como de los ovarios.

**XV.a.2.- BIOSINTESIS DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL
EN GONADAS Y MESONEFROS DE EMBRIONES**

Los embriones de *L. olivacea* que se desarrollaron bajo la influencia de la temperatura feminizante (31-32°C), a los 45 días de incubación (d.i) están en la etapa 30 del desarrollo. Estos embriones presentan un ovario en donde las células germinales aún no han iniciado su primera profase meiótica y nula presencia de folículos; estadio que perdura cerca de tres meses posteclosión (96). Por su parte, los embriones de 50 d.i desarrollados a la temperatura masculinizante (27-28°C), corresponden a la etapa 30 del desarrollo embrionario masculino y que forma parte del estadio denominado establecimiento gonadal (vease inciso XIV.b.1.4). Haciendo notar que los testículos de estos animales aún son incipientes (96). En ambos casos, se tiene la ventaja de aislar con relativa facilidad cada órgano que conforma al complejo urogenital gónada-mesonefros, lo cual ayudó a analizar la capacidad de biosíntesis de las gónadas y mesonefros, descartando así la posibilidad de enmascaramiento.

Demostrándose que la biosíntesis de testosterona y de estradiol se favorece en el mesonefros más que en los testículos de embriones de 50 d.i (etapa 30) (Tabla 9, 10). Siendo la biosíntesis del andrógeno (testosterona) mayor que la

del estrógeno (estradiol) sólo en el mesonefros (Tabla 9, 10). Por su parte, en las hembras de 45 d.i la biosíntesis de testosterona y de estradiol muestra una diferencia significativa entre el ovario y el mesonefros; siendo mayor en este último tejido (Tabla 9, 10). Sin embargo, no hay una diferencia significativa entre la biosíntesis del estrógeno sobre la del andrógeno entre ambos órganos urogenitales (Tabla 9, 10). Demostrándose que los testículos y los ovarios, así como el mesonefros de ambos sexos, tienen la capacidad de biotransformar *in vitro* dehidroepiandrosterona a testosterona (DHA --> T) y testosterona a estradiol (T --> E2) (Fig. 22), descartándose así: i) el enmascaramiento del mesonefros para con la capacidad de biosíntesis de andrógenos y estrógenos por las gónadas de ambos sexos, y ii) la discrepancia con lo descrito por Merchant-Larios et al. (96) de la nula presencia de tejido esteroideogénico en gónadas, ya que durante la diferenciación gonadal de *L. olivacea* a nivel histoquímico sólo se detecta actividad esteroideogénica en la glándula interrenal (96), por lo que más que un hecho discrepante con los resultados de biosíntesis obtenidos en esta tesis, podría explicarse por un metabolismo complementario por parte de los tres órganos urogenitales.

Por otra parte, se comprueba la presencia en las gónadas y mesonefros de embriones en las etapas 29 y 30 del estadio de

establecimiento gonadal de *L. olivacea* de las siguientes enzimas involucradas en la biosíntesis de testosterona y de estradiol: A4-A5-isomerasa (5.3.3.1); 3-B-ol-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (1.1.1.51); 17-a-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (1.14.1.7); 19-hdroxilasa, y aromatasas (Fig. 22). Sugiriendose que la capacidad esteroidogénica y por ende la presencia de las enzimas arriba mencionadas, se da a nivel del estroma (mesenquima = médula) gonadal.

En resumen, se aprecia que durante las dos etapas del desarrollo embrionario masculino estudiadas, 29 y 30 respectivamente, las cuales forman parte de la etapa de establecimiento gonadal, el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones de la etapa 29 y 30, no se aprecia diferencia significativa en la biosíntesis de testosterona y de estradiol. Por otro lado, la biosíntesis de testosterona se favorece más en el mesonefros que en los testículos, sin embargo tampoco hay una diferencia significativa entre la biosíntesis del andrógeno con la del estrógeno. En los embriones femeninos durante la etapa de establecimiento gonadal estudiado (etapa 30), la capacidad de biosíntesis del complejo urogenital gónada-mesonefros, es mayor para la de testosterona. Sin embargo, no hay diferencias significativas en la biosíntesis de testosterona y de estradiol entre los ovarios y el mesonefros.

De lo arriba descrito se desprenden dos hechos relevantes. El primero corresponde a la biosíntesis de testosterona y de estradiol a nivel del complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones de ambos sexos en las etapas 29 y 30 del desarrollo de *L. olivacea*, en donde la biosíntesis del andrógeno se favorece. El segundo, es que la biosíntesis de testosterona y de estradiol a nivel gonadal durante los estadios finales (29 y 30 respectivamente) del desarrollo embrionario que conforman la etapa de establecimiento gonadal masculino y femenino de este quelonio marino, no hay un metabolismo diferencial de HES (andrógenos y estrógenos), por lo que no se hace evidente una regulación diferencial de su biosíntesis por la temperatura de incubación.

Cabe hacer notar, que estos son los primeros resultados reportados en embriones de reptiles sobre la biosíntesis de testosterona y estradiol. Además, los hallazgos obtenidos de este estudio, están acorde con las evidencias en otros vertebrados: anfibios (194; 195), aves (70-73; 203; 205) y mamíferos (cuyo (178); conejo (54; 89; 98; 209); humano (177; 179)), en donde se sabe que las gónadas embrionarias tienen la capacidad de biosintetizar HES (v.gr testosterona y estradiol).

**XV.b.- CONCENTRACION DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL
EN SUERO Y ORGANOS UROGENITALES**

Durante las tres etapas de la ontogenia de *L. olivacea* estudiadas: etapa embrionaria, etapa de recién eclosión y etapa de posteclosión, hay diferencia de un sexo con respecto al otro en la concentración sérica de testosterona y estradiol, así como de ser diferentes ambos esteroides sexuales entre si como entre cada sexo. El comportamiento lineal de la concentración en suero de testosterona durante la ontogenia de machos y hembras de este quelonio, sugiere una secreción continua del andrógeno (Fig. 25). Siendo el incremento en los machos poco acentuado, y en las hembras más acentuado (Fig. 25). En la etapa embrionaria durante el estadio de inicio de la diferenciación gonadal y de establecimiento gonadal, así como en la etapa de recién eclosión, la concentración del andrógeno es mayor en los machos que en las hembras (Tabla 11), invirtiéndose dicha relación en la etapa de posteclosión (Tabla 11; Fig. 28).

El comportamiento curvilíneo (parabólico) del estradiol en suero, indica que durante las tres etapas estudiadas de la ontogenia del quelonio, la secreción del estrógeno presenta tres fases: incremento, máximo y decremento (Fig. 26). En los machos el incremento abarca las etapas de gónada indiferenciada

(estadios 22-24), inicio de la diferenciación testicular (etapa 27) y de establecimiento gonadal pero sólo hasta el inicio del estadio 30 (Fig. 26). La fase de máxima concentración se da en las dos terceras partes de la etapa de establecimiento gonadal, abarcando el último estadio del desarrollo embrionario (Fig. 26). Por su parte, la etapa de decremento abarca los estadios de establecimiento gonadal, recién eclosión y posteclosión. Siendo tanto el incremento como el decremento del estrógeno en los machos poco acentuado, sobre todo durante el estadio de establecimiento gonadal (Fig. 26). En las hembras la fase de incremento abarca desde el período de inicio de la diferenciación gonadal (día 30, etapa 24), hasta el período de posteclosión (día 48, 3 días posteclosión) (Fig. 26), el cual es muy acentuado. El máximo se encuentra en el período de posteclosión (día 49, 4 días posteclosión), y el mínimo abarca el período de posteclosión (de los 5 a los 15 días respectivamente) (Fig. 26). Al comparar la concentración del estrógeno entre ambos sexos, este es mayor en los machos durante las etapas de inicio de la diferenciación gonadal, de establecimiento gonadal y de recién eclosión (Tabla 11; Fig. 26).

Con respecto a la concentración de estradiol en los órganos urogenitales de embriones femeninos de la etapa de desarrollo 24, 29 y de hembras recién eclosionadas, los resultados

sugieren que las gónadas y el mesonefros biosintetizan estrógenos en etapas del desarrollo tan tempranas como la correspondiente a la etapa 24. Etapa en que se diferencia el primordio gonadal en un ovario (96). Al comparar la concentración de ambas hormonas esteroides entre los machos de la etapa 29 con las hembras de la etapa 30, es mayor en los machos. Sugiriendose que la concentración del estrógeno sea menor en las hembras, debido a que el estrógeno sea rápidamente secretado y acumularse en el vitelo o que sea catabolizado rápidamente debido a su corta vida media (34 min en *Chrysemys picta* (22)). El hecho de que la concentración de testosterona sea mayor en los órganos urogenitales más que en el suero puede deberse: i) a que el andrógeno es rápidamente secretado y se acumula en el vitelo; ii) que sea muy rápido su catabolismo o iii) ser rápidamente aromatizado extragonadalmente (79; 191).

El hecho de que en embriones masculinos la concentración de estradiol sea mayor que en los femeninos, no nulifica la hipótesis sugerida en esta tesis, en la que se esperaba tener en los embriones de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante, mayor concentración de estrógenos que en los embriones provenientes de huevos incubados a la temperatura masculinizante. Como ya se hizo mención, la elevada concentración de estradiol en los machos, puede deberse a una aromatización extragonadal (79; 191) de la testosterona

biosintetizada por los órganos urogenitales como de la proveniente del líquido amniótico (108), alantoides (108) y/o del vitelo (2). Cabe hacer notar el importante hecho, de que en la etapa 29 de embriones masculinos la concentración en suero y órganos urogenitales de testosterona y estradiol bajan drásticamente; aumentando apreciablemente en los embriones femeninos. Lo anterior sugiere que a partir de la etapa 29 del desarrollo embrionario, la temperatura de incubación feminizante regula el metabolismo de estrógenos o tan sólo favorece su secreción, razón por la cual, la concentración de estradiol en suero, y sobre todo, en los órganos urogenitales en los embriones provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante es muy baja (<5 pg/ml) (Fig. 27).

El hecho de que durante la etapa de inicio de la diferenciación gonadal masculina, la concentración de ambos esteroides sexuales es mayor comparada con la etapa de diferenciación gonadal femenina, sugiere la existencia de una relación entre la diferenciación testicular y el efecto de la temperatura de incubación sobre el metabolismo de esteroides sexuales. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Pieau et al. (128) quienes al cuantificar HES a nivel gonadal de la tortuga *Emys orbicularis*, encuentran mayor concentración de esteroides durante la diferenciación del

primordio gonadal en testículos más que en la diferenciación de los ovarios. Cabe hacer notar, que la gónada primero en diferenciarse en *L. olivacea* es el ovario (96) a diferencia del testículo en *E. orbicularis* (128). Sin embargo, la sugerencia de la existencia de una relación entre metabolismo de HES y temperatura de incubación sobre la diferenciación sexual gonadal en quelonios sexo-termodependientes aún no está comprobada. Sugiriéndose que la capacidad de biosíntesis de HES en quelonios sexo-termodependientes se debe a un evento a posteriori de la etapa de inicio de la diferenciación gonadal. Es decir, que la etapa de inicio de la diferenciación gonadal es un evento de regulación del genoma gónada-determinante como a nivel postranscripcional que se da en un rango del desarrollo específico, en *L. olivacea* está entre las etapas 20-27, iniciándose más pronto en los embriones desarrollados a temperaturas altas (feminizante) debido a que el metabolismo intermediario se ve favorecido por este factor epigenético, siendo lo contrario en los embriones que se desarrollan bajo temperaturas bajas (masculinizante). Sin embargo, la biosíntesis de HES (andrógenos y estrógenos) a nivel de órganos urogenitales, así como la secreción a este nivel como a la debida extragonadalmente, es mayor y de manera constante, durante la ontogenia de los machos. En cambio, en las hembras la temperatura feminizante regula ambos procesos de manera gradual a partir del estadio de establecimiento gonadal.

Por tal motivo, el metabolismo de HES no es un reflejo bioquímico del evento morfológico de la diferenciación del primordio gonadal en este quelonio sexo-termodependiente.

Lo anteriormente sugerido sobre la diferenciación gonadal femenina en *L. olivacea*, de que no hay una relación entre el metabolismo de estrógenos y la diferenciación del ovario en los embriones provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura feminizante, tal sugerencia se apoya en el siguiente hecho: la concentración del estrógeno aumenta considerablemente a partir del estadio de establecimiento gonadal. Iniciándose en la etapa 29 del desarrollo, aumentando en forma gradual durante la etapa de transición (29-30), así como en las dos fases de la etapa 30 (Fig. 26). Lo anterior, no coincide con el proceso morfogenético de la diferenciación del ovario, la cual se inicia a partir de la etapa 21 concluyendo en la 23 (Fig. 26) (96, 97). Sin embargo, Raynaud y Picau (151) sugieren que la temperatura feminizante al regular la biosíntesis de estrógenos en el primordio gonadal del sexo heterogamético, su concentración será mayor a partir del período termosensible, siendo estos estrógenos los que provocarían el aumento en el controvertido sistema sexo determinante antigénico H-Y. Un hecho que apoya su hipótesis, es que los estrógenos en *E. orbicularis* son los únicos esteroides encontrados en mayor concentración (estrona >>

estradiol) durante la etapa 24, que corresponde a una etapa en que la gónada masculina como femenina ya se ha diferenciado en testículo u ovario respectivamente (128). Lo anterior apoyaría en parte, la proposición de que los estrógenos no son los responsables per se de la diferenciación sexual gonadal femenina por mediación de la temperatura de incubación en *L. olivacea*, sino de ser moduladores del establecimiento sexual femenino.

Por otro lado, la hipótesis de Crews y colaboradores (25) (vease apartado V; Fig. 2-B), que sugiere que la determinación del sexo en reptiles sexo-termodependientes se da a través de que la temperatura de incubación feminizante, al regular la actividad de enzimas termosensibles, repercute en la biosíntesis de precursores de estrógenos, así como en su aromatización. Ambos hechos, darían lugar a que los estrógenos al antagonizar la acción de los andrógenos, estimularían la diferenciación del primordio gonadal en un ovario a partir de la proliferación de la región cortical, así como dar lugar a su establecimiento. Esta hipótesis, basada en la teoría hormonal de la diferenciación sexual gonadal propuesta por Wolff y Ginglinger (vease el apartado I.a; 219; 220), queda muy acorde con la hipótesis de esta tesis. Sin embargo, no queda aún plenamente apoyada, tanto por las evidencias encontradas por el grupo de Pieau y de Crews, así como con los de esta tesis. Ya

que se tiene que comprobar, que en efecto, por mediación de la temperatura de incubación feminizante, los estrógenos sean los mediadores a nivel molecular de la diferenciación gonadal femenina en estadios muy específicos de la diferenciación gonadal, como por ejemplo, durante la etapa termosensible del primordio gonadal.

Si lo anterior fuese comprobado plenamente, estamos frente a un excelente modelo experimental para estudiar los procesos implicados en la diferenciación sexual en vertebrados. Abordandola, en principio, a partir de la Teoría Hormonal de la Diferenciación Sexual Gonadal, además de que este modelo tiene implicaciones filogenéticas de relevante importancia, por ejemplo, con las aves. En esta Clase, se sabe que la gónada primero en diferenciarse es el ovario. Sugiriendose que su diferenciación puede ser mediada a través de los estrógenos endógenos (vease por ejemplo, 171; 221). Esta implicación se apoya en una serie de hechos, que se hacen patentes en diversas especies de esta Clase. La actividad esteroidogénica, detectada histoquímicamente a partir de la enzima 3 β OLEDH, coincide con el inicio de la diferenciación gonadal femenina (173). En patos (*Anas platyrhynchos*), codornis (*Coturnix coturnix japonica*) y pollos (*Gallus domesticus*), la biosíntesis de estrógenos (estrona y estradiol) se lleva a cabo primero por la gónada embrionaria femenina (ovario izquierdo) que por las masculinas

(testículos). Siendo mayor su concentración, en el ovario que en los testículos durante la ontogenia de su diferenciación sexual (48; 49; 58-62; 66; 71-73; 109; 175; 187-190; 203-205; 217). Ambos hechos, concuerdan con la actividad de las aromatasas (citocromo P450 citosólico) durante la diferenciación gonadal, siendo mayor (100 veces más) en el ovario que en los testículos (71-73). También ha sido determinada la presencia del receptor a estradiol en el epitelio germinal y región medular de gónadas embrionarias de pollo (52; 53), así como el determinar su organización estructural como de su regulación (94). Se ha constatado que si se bloquea este receptor con Tamoxifén, se altera la asimetría gonadal femenina. La gónada izquierda (ovario) de hembras de pollo (165; 207; 206) como de codornís (172), su región cortical se reduce, y por ende, la gónada. Reflejándose este hecho, en una baja en la concentración de proteínas. La gónada derecha, por su parte, aumenta considerablemente de tamaño, desarrollándose la médula, tanto como el de la gónada izquierda. Lo cual da lugar a la organización de cordones medulares. Por último, al correlacionar la capacidad esteroideogénica a nivel ultraestructural (170), así como con la capacidad de biosíntesis y concentración de testosterona y estradiol de embriones de pollo (207) y codornís (171; 176) previamente tratados con Tamoxifén, no hay alteración. Lo cual da apoyo, a que la proliferación de la corteza, es estrógeno dependiente (171).

**XV.c.- DETERMINACION DEL RECEPTOR A ESTRADIOL
EN ORGANOS UROGENITALES**

La presencia del receptor a estrógenos en gónadas embrionarias de reptil, ha sido dilucidado de manera indirecta en sólo una especie, la cual es una tortuga sexo-termodependiente: *Emys orbicularis* (33), demostrandose plenamente en esta tesis, su presencia en órganos urogenitales de embriones masculinos y femeninos, así como en los de tortugas jóvenes del quelonio marino sexo-termodependiente *L. olivacea* (Figs. 29-31).

Al detectar el receptor citosólico a estrógenos en el complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones femeninos antes de su diferenciación gonadal (estadio de gónada indiferenciada) (26 d.i, etapa 15 del desarrollo) (Fig. 30) en este quelonio marino, queda la duda de que el receptor esté presente en el primordio gonadal o solamente en el mesonefros. Si se confirmara su presencia en el primordio gonadal, se estaría en posibilidad de apoyar la Teoría Hormonal de la Diferenciación Sexual, y por ende, la hipótesis planteada en este proyecto. Esta postula que la temperatura de incubación al regular diferencialmente el metabolismo de hormonas esteroides sexuales en la gónada indiferenciada, sería el pivote molecular que desencadenaría el posterior establecimiento en su

diferenciación sexual morfológica. Es decir, que en los embriones incubados a la temperatura masculinizante su capacidad de biosintetizar estrógenos sería baja o nula, y la temperatura de incubación feminizante lo estimularía, regulando además la expresión del gene para el receptor a estrógenos y/o de su activación durante la diferenciación de los ovarios como lo sugerido por Wilson et al. (210) en las aves (vease apartado V; Fig. 15). Mientras que en los embriones desarrollados bajo el efecto de la temperatura masculinizante no estaría presente, o si lo estuviese, su activación sería baja o nula en la gónada masculina en diferenciación.

La presencia del receptor a estrógenos en el complejo urogenital de embriones femeninos de 40 d.i (etapa de desarrollo 30) que pertenece al estadio de establecimiento gonadal, y en base a los resultados de la cuantificación de estradiol en suero y órganos urogenitales, se sugiere que la temperatura de incubación feminizante al regular el metabolismo de estrógenos durante el estadio de establecimiento gonadal, estos jugarían el papel de mensajeros que indicarian al organismo del establecimiento de la gónada femenina, así como de la integración del sexo femenino (Figs. 10, 11). Apoyando lo anterior en el hecho de que durante la etapa 30 del desarrollo que forma parte de la etapa de establecimiento del ovario, baja el número de receptores 9S a estradiol (E2) en el complejo

gónada-mesonefros (Fig. 30). Debido probablemente a que al biosintetizarse como secretarse considerablemente más E2 durante la etapa de establecimiento ovárico, el estrógeno ocuparía un mayor número de estos, y por consecuencia, a través de su prevaeciente activación por el efecto de la temperatura feminizante, se daría lugar al establecimiento del ovario, así como del sexo femenino como tal (Figs. 10, 11). Por tal motivo, la presencia del receptor 9S de estrógenos en el complejo gónada-mesonefros de embriones masculinos durante su etapa de establecimiento testicular a pesar de su presencia, los estrógenos presentes no repercutirían sobre la diferenciación testicular, debido a que el estrógeno al unirse a un escaso número de receptores y/o al no ser activado en seguida, no ejercería una acción fisiológica inmediata.

El haber determinado la presencia del receptor de estrógenos en el complejo urogenital de embriones masculinos de *L. olivacea* de 40 días de incubación (d.i) (etapa 29) y 45 d.i (etapa 30) (Fig. 29-31), pertenecientes al estadio de establecimiento gonadal masculino, explicaría el hecho de la reversión sexual provocada en estadios específicos del desarrollo embrionario en especies sexo-termodependientes. Ya por la administración exógena de estrógenos, moléculas antiestrogénicas como de la propia temperatura de incubación (25; 33; 97; 128; 151). Ocasionando, la parcial o total

reversión como alteración de sus caracteres sexuales secundarios (veanse apartados I.b.2 y IV.b).

Por último, el considerar que los estrógenos fuesen los agentes causales per se de la diferenciación sexual gonadal en reptiles sexo-termodependientes, como lo proponen Raynaud y Pieau (151), Dorizzi et al. (33) y Crews et al. (25), y en las aves por Wolff y Ginglinger (219; 220), Weniger et al. (207) e Imataka et al. (71-73), aún sigue en tela de juicio, y por ende, la Teoría Hormonal de la Diferenciación Sexual Gonadal.

XVd.- PROPOSICION DE UNA HIPOTESIS SOBRE LA DIFERENCIACION
GONADAL EN LA TORTUGA MARINA L. olivacea

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis e integrandolos con las observaciones hechas por otros autores en esta y en otras especies de quelonios sexo-termo dependientes, se propone la siguiente hipótesis sobre la diferenciación sexual gonadal en estos quelonios. La diferenciación gonadal femenina en *Lepidochelys olivacea* sería mediada por su correspondiente temperatura de incubación (31-32°C), indirecta y/o directamente a partir del estadio de gónada indiferenciada. Indirectamente, a partir de regular a nivel del sistema nervioso central la secreción de neurohormonas. Estas activarían el gen de la aromatasa a nivel medular del primordio gonadal en diferenciación (Fig. 32). Directamente, sería que la temperatura de incubación feminizante activara el gen de la aromatasa, a partir de activar moléculas termosensibles que regularían la expresión del gen de la aromatasa y/o regulando su actividad (Fig. 32). En ambos casos, el producto de la aromatización, los estrógenos, actuarían directa y/o indirectamente a partir de otras moléculas ovario-determinante, en la regresión de los cordones medulares (sexuales), así como el desarrollo de la región cortical (Fig. 32). Una vez diferenciado el primordio gonadal en ovario, seguiría un proceso de "maduración" correspondiente al estadio de establecimiento gonadal (Fig.

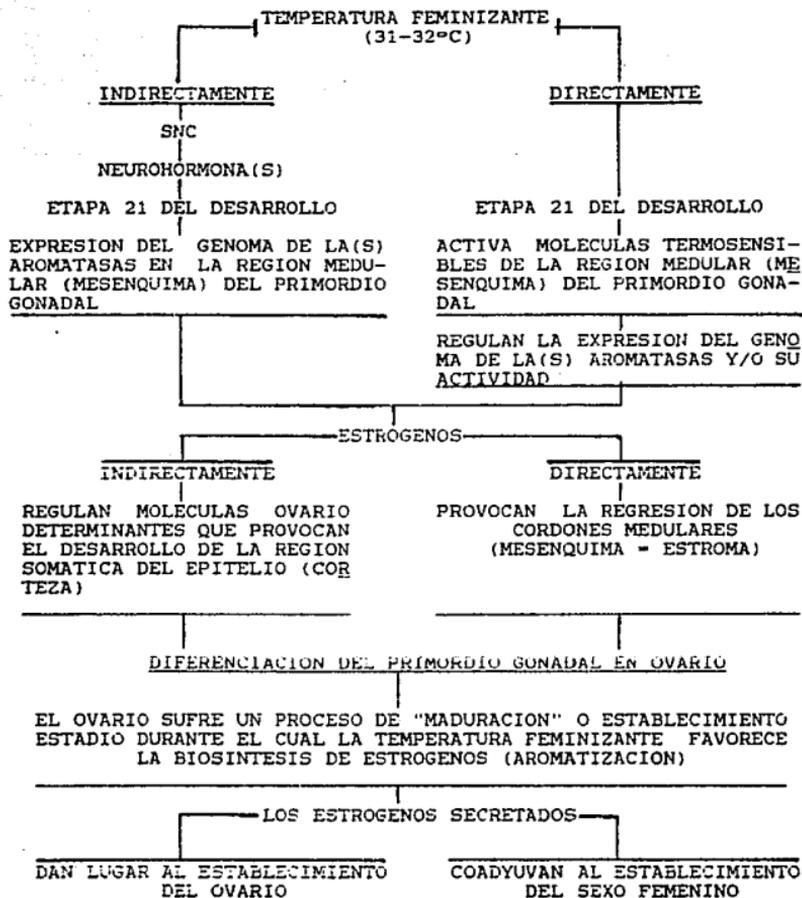


Fig. 32.- Diagrama que muestra la hipótesis propuesta a partir de los resultados obtenidos en esta tesis, así como por otros autores sobre cómo la temperatura de incubación feminizante puede intervenir en la diferenciación del sexo femenino en la tortuga marina *L. olivacea*.

32), siendo regulado por los estrógenos. Llevandose al cabo esta fase de "establecimiento ovárico" a partir de que la temperatura de incubación feminizante regula el metabolismo de estrógenos en la región medular que conforma el estroma del ovario (Fig. 32). Actuando los estrógenos: i) regulando el establecimiento del ovario y ii) ser los responsables de concretar el estadio de establecimiento del sexo femenino (Figs. 32, 33).

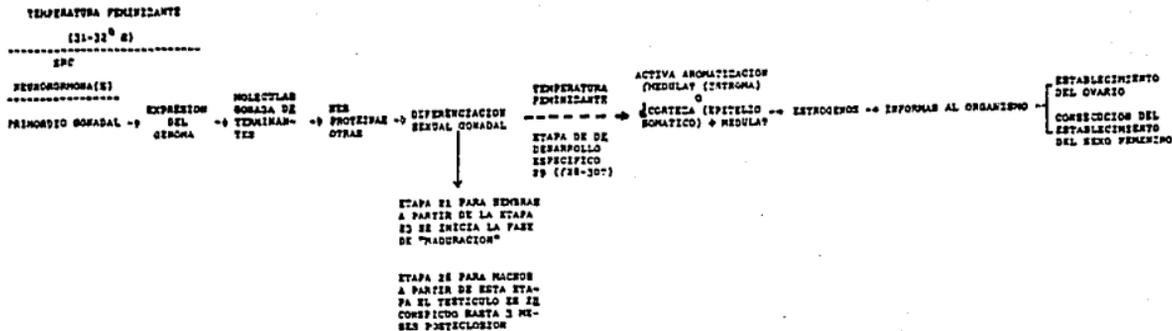


Fig. 33.- Diagrama que muestra la ubicación de los resultados de esta tesis sobre la diferenciación sexual gonadal de *L. olivacea*, en las tres fases de la diferenciación sexual en vertebrados.

XVI.-

CONCLUSIONES

En la tortuga marina sexo-termodependiente *Lepidochelys olivacea*:

1.- El complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones masculinos y femeninos de la etapa 29 y 30 biosintetizan testosterona a partir de biotransformar DHA-3H, y estradiol a partir de aromatizar T-3H. Favoreciendose la biosíntesis del andrógeno en ambos sexos.

2.- Los testículos y los ovarios, así como el mesonefros de embriones de ambos sexos de la etapa 29 y 30, biosintetizan testosterona y estradiol a partir de biotransformar precursores radiactivos.

3.- En las gónadas no hay un metabolismo diferencial de hormonas esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos) mediado por la temperatura de incubación durante las dos últimas etapas del desarrollo embrionario que abarcan el estadio de establecimiento gonadal.

4.- A nivel de la concentración en suero de testosterona y estradiol, se aprecia una fase de transición durante las etapas 29-30 del estadio de establecimiento del ovario, y durante

la última etapa del desarrollo embrionario en ambos sexos, se aprecian dos fases (inicial e intermedia).

5.- El complejo urogenital gónada-mesonefros de embriones femeninos de las etapas 15 y 30, así como de embriones masculinos en su última etapa de desarrollo y los testículos, mesonefros e interrenales de tortugas posteclosión, presentan el receptor citoplasmático 9S para estrógenos (estradiol).

XVII.-

LITERATURA CITADA

- 1.- AGUILAR, R., HERRERA, A. O. P., ELIZALDE, A. C., y ROGRIGUEZ, C. D. E. (1988). Periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo en la tortuga golfina (*L. olivacea* Eschscholtz, 1829). Cuadernos de Investigación. IPN-CIIDIR-Oaxaca, 8:1-21.
- 2.- ARCOS, M. (1972). Steroids in egg yolk. *Steroids*, 19: 25-33.
- 3.- AUSTIN, H. B. (1990). The effects of estradiol and testosterone on Mullerian-duct regression in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76:461-472.
- 4.- BARMAN, T.E. (1969). *Enzyme Handbook*. vol.I. Pp. 499. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- 5.- BARRACK, E. R. (1987). Specific association of androgen receptors and estrogen receptors with the nuclear matrix: summary and perspectives. Pp. 86-107. In: *Recent Advances in Action Hormone* (V. K. Moudgil, ed.). Walter de Gruyter, Berlin.
- 6.- BAULIEU, E. E. (1978). Les hormones. Capítulo I. Pp. 3-93. In: *Hormones: Aspects Fondamentaux et Physio-Pathologiques*. Herman, Lecouber, Paris.
- 7.- BAYLISS, W. M., and STARLING, E. H. (1902). The mechanism of pancreatic secretion. *J. Physiol.*, 28:325-353.

- 8.- BERNARD, C. (1859). *Lecons sur les propietes physiologiques et les alterations pathologiques de liquidos de l'organism*. Dos Tomos. J. B. Bailliére et Fils., Paris.
- 9.- BOUIN, P. et ANCEL, P. (1903). Sur la signification de la glande interstitielle du testicule embryonnaire. *Comp. rend. Soc. biol.*, 55:1682-1684.
- 10.- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, 72: 248-254.
- 11.- BULL, J. J. (1980). Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.*, 55 (1):3-21.
- 12.- _____. (1983). *Evolution of Sex Determining Mechanism*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, Cal. USA.
- 13.- BULL, J. J., and VOGT, R. C. (1979). Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 206:1186-1188.
- 14.- _____. (1981). Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. *J. exp. Zool.*, 218:435-440.
- 15.- BULL, J. J., VOGT, R. C., and MCCOY, C. J. (1982a). Sex determining temperature in turtles: a geographic compareson. *Evolution*, 36:326-332.
- 16.- BULL, J. J., VOGT, R. C., and BULMER, M. G. (1982b). Heritability of sex ratios in turtles with enviromental sex determination. *Evolution*, 36:333-341.
- 17.- BULL, J. J., GUTZKE, W. H. N., and CREWS, D. (1988). Sex

reversal by estradiol in three reptilian orders. Gen. Comp. Endocrinol., 70:425-428.

18.- BURNS, K. R. (1924). The sex of parabiotic twins in amphibians. Anat. Rec., 27:198 (resumen).

19.- _____. (1925). The sex of parabiotic twins in Amphibia. J. exp. Zool., 42:31-89.

20.- _____. (1961). Role of hormones in the differentiation of sex. Pp. 76-158 In: Sex and Internal Secretions (E. Allen, ed.). 1a ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.

21.- BUSH, I. E. (1952). Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues. Biochem. J., 50:370-378.

22.- CALLARD, I. P., CALLARD, G. V., LANCE, V., and ECCLES, S. (1976). Seasonal changes in testicular structure and function and the effects of gonadotropins in the freshwater turtle *Crysemys picta*. Gen. Comp. Endocrinol., 30:347-356.

23.- CONOVER, D. O., and HEINS, S. W. (1987). Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. Nature, 326:496-498.

24.- CREWS, D., BULL, J. J., and BILLY, A. J. (1988). Sex determination and sexual differentiation in reptiles. Capítulo 5. Pp. 98-121 In: Handbook of Sexology. vol. 6: The Pharmacology and Endocrinology of Sexual Function (J. M. A. Sitsen, ed.) Elsevier Science Publishers.

25.- CREWS, D., WIBBELS, T., and GUTZQUE, W. H. N. (1989).

Action of sex stéroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). Gen Comp. Endocrinol., 76:159-166.

26.- CHAN, S. T. H., and WAI-SUM, O. (1981). Environmental and non-genetic mechanisms in sex determination. Capitulo 2. Pp 55-101 In: Mechanisms of Sex Differentiation in Animals and Man (C. R. Austin and R. G. Edwards, eds.) Academic Press.

27.- CHARNIER, M. (1963). Action de l'hormone mâle (hexahydrobenzoate de testostérone) sur les femelles d'Agama agama, Saurien, Agamidae. C. r. Séanc. Soc. Biol., 157: 1470-1472.

28.- _____. (1966). Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'Agama agama (Agamidae Lacertilien). C. r. Séanc. Soc. Biol., 160:620-622.

29.- CHIEFFI, G. (1965). Onset of steroidogenesis in the vertebrate embryonic gonads. In: Organogenesis (R. L. Dehaan y H. Ursprung, eds.) Holt, Rinehart and Winston, New York.

30.- DANTCHAROFF, V. (1935). Sur les différences de sensibilité des récepteurs tissulaires envers la folliculine, à divers stades embryonnaires. C. r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris, 201:161-163.

31.- _____. (1937). Sur l'action de l'hormone sexuelle chez les Reptiles. C. r. heb. Séanc. Sci., Paris, 205:424-427.

32.- DORFMAN, R. I., and UNGAR, F. (1965). Metabolism of Steroid Hormones. 2a ed. Academic Press, New York.

33- DORIZZI, M., DESUAGES, G. et PIEAU, C. (1986-1987). Effets

de la température, de l'oestradiol et du tamoxifène sur la différenciation sexuelle des gonades chez les tortues. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 73(3):204 (resumen).

34.- DOURNON, Ch., HOUILLOU, Ch., and PIEAU, C. (1990). Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. Int. J. Dev. Biol. 34:81-92.

35.- DUFAURE, J. P. (1964a). Sur la réceptivité aux hormones sexuelles des tubercules génitaux de l'embryon de lézard vivipare (*Lacerta vivipara*, Jacquin). C. r. Séanc. Soc. Biol., 158: 521-523.

36.- _____. (1964b). Croissance et différenciation des canaux de Muller chez l'embryon de lézard vivipare (*Lacerta vivipara*, Jacquin) C. r. Séanc. Soc. Biol., 158:1501-1503.

37.- _____. (1965). La destruction précoce des gonades de l'embryon de lézard vivipare par irradiation (rayons X) et son effet sur le développement des tubercules génitaux. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 261:1735-1737.

38.- _____. (1966). Recherches descriptives et expérimentales sur les modalités et facteurs du développement de l'appareil génital chez le lézard vivipare (*Lacerta vivipara*, Jacquin). Archs. Anat. microsc. Morph. exp., 55:437-537.

39.- DUFAURE, J. P. et MESURE, M. (1967). Données préliminaires sur l'activité stéroïdo-3 β - α -deshydrogénasique chez l'embryon de lézard vivipare (*Lacerta vivipara*, Jacquin). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 265:1215-1218.

- 40.- ENGEL, W., KLEMME, B., and SCHMID, M. (1981). H-Y antigen and sex-determination in turtles. *Differentiation*, 20:152-156.
- 41.- EVANS, L. T., and CLAPP, M. L. (1940). The effects of ovarian hormones and seasons on *Anolis carolinensis*. II. The genital system. *Anat. Rec.*, 77:57-75.
- 42.- FORBES, T. R. (1938a). Studies on the reproductive system of the alligator. II. The effects of prolonged injections of oestrone in the immature alligator. *J. exp. Zool.*, 78:335-367.
- 43.- _____. (1938b). Studies on the reproductive system of the alligator. III. The action of testosterone on the accessory sex structures of recently hatched female alligators. *Anat. Rec.*, 72: 87-95.
- 44.- _____. 1939. Studies on the reproductive system of the alligator. V. The effects of injections of testosterone propionate in immature alligators. *Anat. Rec.*, 75:51-57.
- 45.- _____. (1961). Endocrinology of reproduction in cold-blooded vertebrates. 2, Pp. 1035-1087 In: *Sex and Internal Secretions* (W. C. Young and G. W. Corner, eds). 3th ed. 1973. Robert E. Krieger Publishing Co., Huntington, New York.
- 46.- FOX, H. (1977). The urogenital system of reptiles. Vol. 6. Pp. 1-157 In: *Biology of the Reptilia* (C. Gans and T. S. Parsons, eds.). Academic Press, London.
- 47.- FRAENKEL, L. et MARTINS, T. (1938). Sur le corps jaune des serpents vivipares. *C. r. Soc. Biol.*, 127:466-468.
- 48.- GALLI, F. E., and WASSERMANN, G. F. (1972). Steroid

biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol., 19:509-515.

49.- _____. (1973). Steroid biosynthesis by gonads of 7 and 10 day-old chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol., 21:77-83.

50.- GALLIEN, L. (1962). Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. Gen. Comp. Endocr., Suppl. 1:346-355.

51.- _____. (1973). Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires. Maitreses de Biologie, 250 pp. Masson et. C, editores. Paris.

52.- GASC, J.-M. (1980a). Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. J. Embryol. exp. Morph., 55:331-342.

53.- _____. (1980b). Androgen and estrogen target cells in embryonic tissues: Autoradiographic studies during the development of the chicken embryo. Pp. 51-199 In: Steroids and Their Mechanisms of Action in Nonmammalian Vertebrates (G. Delrio and J. Brachet, eds.) Raven Press, New York.

54.- GEORGE, F. W., E. R. SIMPSON, L. MILEWICH, and J. D. WILSON. (1979). Studies on the regulation of the onset of steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads. Endocrinology, 105:1100-1106.

55.- GODET, R. (1961). Action du propionate de testostérone sur les jeunes crocodiles (*Crocodilus niloticus*) de sexe femelle. C. r. Séanc. Soc. Biol., 155:394-395.

56.- GORBMAN, A. (1939). Action of mammalian sex hormones in the lizard, *Sceloporus occidentalis*. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 42:811-813.

57.- GORBMAN, A., DICKHOFF, W. W., VIGNA, S. R., CLARK, N. B., and RALPH, C. L. (1983). Comparative Endocrinology. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons, New York.

58.- GUICHARD, A., CEDARD, L. et HAFFEN, K. (1973a). Aspect comparatif de la synthèse des stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet à différents stades du développement. Etude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs. Gen. Comp. Endocrinol., 20:16-28.

59.- GUICHARD, A., CEDARD, L., HAFFEN., K. et SCHEIB, D. (1973b). Métabolisme de la prégnénolone et de la progestérone radioactives par les gonades embryonnaires de Caille (*Coturnix coturnix japonica*) en culture organotypique. Gen. Comp. Endocrinol., 21:478-484.

60.- GUICHARD, A., CEDARD, L., MIGNOT, Th. M., SCHEIB, D., and HAFFEN, K. (1977a). Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryo gonads: Differences according to age, sex and size. Gen. Comp. Endocrinol., 32:255-265.

61.- GUICHARD, A., SCHEIB, D., HAFFEN, K., and CEDARD, L. (1977b). Radioimmunoassay chick gonads during organ culture. J. Steroid Biochem., 8:599-602.

62.- GUICHARD, A., CEDARD, L., MIGNOT, Th.-M., SCHEIB, D., and HAFFEN, K. (1979). Radioimmunoassays of steroids produced by

- chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 39:9-19.
- 63.- GUTZKE, W. H. N., and PAUKSTIS, G. L. (1983). Influence of hydric-environment on sexual differentiation in turtles. *J. exp. Zool.*, 226:467-469.
- 64.- GUTZKE, W. H. N., and J. J. BULL. (1986). Steroid hormone reverse sexin turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 64:368-372.
- 65.- GUTZKE, W. H. N., and D. B. CHYMIY. (1988). Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71:267-270.
- 66.- HAFFEN, K. et CEDARD, L. (1968). Etude en culture organotypique in vitro du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testostérone radioactive par les gonades normales intersexuées de l'embryon de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11:220-234.
- 67.- HARRINGTON, R. W. Jr. (1967). Environmental controlled induction of primary male gonochoris from eggs of the self-fertilizing hermaphroditic fishe *Rivulus marmoratus* P. *Bioll. Bull.*, 132:179-199.
- 68.- HARTLEY, R. T. (1945). Effects of sex hormones on the development of the urogenital system in the garter snake. *J. Morphol.*, 76:115-137.
- 69.- HUTSON, J., DONAHOE, P., and MACLAUGHLIN, D. (1985). Steroid modulation of mullerian duct regression in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57:88-102.

- 70.- IKAWA, H., HUTSON, J., BUDZIK, G., MACLAUGHLIN, D., and DONAHOE, P. (1982). Steroid enhancement of mullerian duct regression. *J. Pediatr. Surg.*, 17(5):453-458.
- 71.- IMATAKA, H., SUZUKI, K., INANO, H., KOHMOTO, K., and TAMAOKI, B. (1988a). Sexual differences of steroidogenic enzymes in embryonic gonads of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 69:153-162.
- 72.- _____. (1988b). Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: the sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71:413-418.
- 73.- _____. (1989). Biosynthetic pathways of testosterone and estradiol 17B in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 73:69-79.
- 74.- Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblot, P. W., and De Sombre, E. R. (1968). A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 59:632-638.
- 75.- _____. (1979). The oestrogens. *Capitulo 5*. Pp. 157-184. In: *Reproduction in Mammals 7. Mechanism of Hormone Action* (C. R. Austin and R. V. Short, eds). Cambridge University Press, Cambridge. USA.
- 76.- JOSSO, N., and PICARD, J. (1986). Anti-mullerian hormone. *Physiol. Rev.*, 66(4):1038-1090.
- 77.- JOST, A. (1946). Castration de l'embryon mâle de lapin. *Données préliminaires*. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 140:938.

- 78.- KANURY, V. S., and FOX, C. F. (1987). Steroid hormone receptor phosphorylation. Pp. 337-366. *Ibid.* 5.
- 79.- KEHL, R. (1930). Action de la folliculine de mammifère sur l'oviducte de la Tortue. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 105:512-513.
- 80.- _____. (1938). Action de l'androstérone sur le "segment sexuel" urinaire de l'Uromastix femelle. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 127:142-144.
- 81.- KEHL, R., LEPORTOIS, M. et BENOIT, J. (1941). Biométrie du cycle génital normal et expérimental de l'Uromastix femelle. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 136:520-522.
- 82.- KELLER, K., and TANDER, J. (1916). Über des verhalten der eihaute bei der zwillingsstrachtigkeit des rundes. Untersuchungen über die enste hungsursache der geschlecht lichen unterentwicklung von weiblichen zwillingskalbern, welche neben einem mannlichen kalbe zur enwicklung gelangen. *Wien Tieraztl. Wchnschr.*, 3:513.
- 83.- KOFMAN-ALFARO, S., MERCHANT-LARIOS, H. y PEREZ-PALACIOS, G. (1982). Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev. Invest. Clin. (Méx.)* 34:349-359.
- 84.- KLEIN, M. (1968). Sur l'article de Berthold: transplantation des testicules (1849). *Arch. Anat. Histol. Embryol (Strasb.)*, 51:381-386.
- 85.- KOUVONEN, J., PETERSON, K., and LOVGREN, T. (1978). Amido black 10-b-stained bovine serum albumin (BSA) in density gradien centrifugation. *Analytical Biochem.*, 89:306-308.

- 86.- LEMUS-BRAVO, A. E. (1963). El uso de isótopos radioactivos en el estudio de los procesos de biosíntesis de las hormonas androgénicas. 111 pp. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Motolinía.
- 87.- LILLIE, F. R. (1916). The theory of freemartin. *Science*, 43:611-613.
- 88.- _____. (1917). The freemartin: a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle. *J. exp. Zool.*, 23: 371-452.
- 89.- LIPSETT, M. B., and TULLNER, W. W. (1965). Testosterone synthesis by the fetal rabbit gonad. *Endocrinology*, 77:273-277.
- 90.- LOZA, Ma. C., LEMUS, A. L., y PEREZ-PALACIOS, G. (1988). Metabolismo de hormonas esteroides. Pp. 53-92. In: *Bioquímica e Inmunología vol. II*. (Juan José Hicks y Juan C. Díaz Zagoya, eds.). Facultad de Medicina, UNAM. primera edición.
- 91.- LONGCOPE, Ch. (1987). Peripheral aromatization: studies on controlling factor. *Steroids*, 50 (1-3):253-267.
- 92.- MACLAUGHLIN, D. T., HUTSON, J., and DONAHOE, P. (1983). Specific estradiol binding in embryonic müllerian ducts: A potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology*, 113 (1):141-145.
- 93.- MAINWARING, W. I. P. (1979). The Androgens. Capítulo 4. Pp. 117-156. *Ibid.* 78.
- 94.- MAXWELL, B. L., McDONNELLI, D. P., CONNEELY, O. M., SCHULZ, T. Z., GREENE, G. L., and O'MALLEY, B. W. (1987).

Structural organization and regulation of the chicken estrogen receptor. *Mol. Endocr.*, 1:25-35.

95.- MCCOY, C. J., VOGT, R. C., and CENSKY, E. J. (1983). Temperature controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Herpetol.*, 17:404-406.

96.- MERCHANT-LARIOS, H., VILLALPANDO-FIERRO, I., and CENTENO-URRUIZA, B. (1989). Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Hepetological Monographs*, 3:43-61.

97.- MERCHANT-LARIOS, H., and VILLALPANDO, I. (1990). Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *J. exp. Zool.* 254:327-331.

98.- MILEWICH, L., GEORGE, F. W., and WILSON, J. D. (1977). Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology*, 100:187-196.

99.- MINOURA, T. (1921). A study of testis and ovary grafts on the hen's egg and their effects on the embryos. *J exp. Zool.*, 33: 1-61

100.- MORAT, M. (1969). Sur l'activité stéroïde-3B-hydroxystéroïde déshydrogénasique au cours de l'organogenèse de la gonade chez la Vipère (*Vipera aspis* L.). *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 268:546-549.

101.- _____. (1971). Activité A5-3B-hydroxystéroïde déshydrogénasique au cours de l'organogenèse des glandes

- génitales et interrénales chez deux reptiles: *Lacerta vivipara* Jacquin et *Vipera aspis* L. Ann. Embryol. Morph., 4:5-17.
- 102.- MROSOVSKY, N. (1980). Thermal biology of sea-turtles. Amer. Zool., 20:531-547.
- 103.- _____. (1982). Sex ratio bias in hatchling sea-turtles from artificially incubated eggs. Biol. Conserv., 23:309-314.
- 104.- MROSOVSKY, N., and YNTEMA, C. L. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implication for coservation practices. Biol. Conserv., 18:271-280.
- 105.- MROSOVSKY, N., HOPKINS-MORPHY, S. R., and RICHARDSON, J. I. (1984). Sex ratios of sea turtles seasonal changes. Science, 225:739-747.
- 106.- MORREALE, S. J., RUIZ, G. J., SPOTILA, J. R., and STANDORA, E. A. (1982). Temperature-dependent sex determination: current practices treaten conservation of sea turtles. Science, 216:1245-1247.
- 107.- NEW, D. A. T. (1966). The culture of vertebrate embryos. Logos Press Limited of Academic Press.
- 108.- OZON, R. (1969). Steroid biosynthesis in larval and embryonic gonads of lower vertebrayes. Gen. Comp. Endocrinol., Suppl. 2:135-140.
- 109.- PADGETT, C. S., and IVY, W. D. (1960). The normal embryology of the coturnix quail. Anat. Rec., 137:1-11.
- 110.- PEREZ-PALACIOS, G., PEREZ, A. E., and JAFFE, R. B. (1968). Conversion of pregnenolone-7a-3H-sulfate to other

A5-3B-hydroxysteroid sulfates by the human fetal adrenal in vitro. J. Clin. Endocr. 28:19-25.

111.- PEREZ-PALACIOS, G., LAMONT, K. G., PEREZ, A. E., JAFFE, R. B., and PIERCE, G. B. (1969). De novo formation and metabolism of steroid hormones in feminizing testes: biochemical and ultrastructural studies. J. Clin. Endocr., 29:786-800.

112.- PEREZ-PALACIOS, G., LARREA, F., CERBON, M. A., y VILCHIS, F. Mecanismo de Acción de Hormonas Esteroides. Capitulo 6. Pp. 93-125. Ibid. 96.

113.- PIEAU, C. (1969). Sur une anomalie des conduits génitaux observée chez les embryon de tortue grecque (*Testudo graeca* L.) traités par le benzoate d'oestradiol. C. r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris, 268:364-367.

114.- _____. (1970). Effets de l'oestradiol sur l'appareil génital de l'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). Arch. Anat. microsc. Morph. exp., 59:295-318.

115.- _____. (1971). Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux chéloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'oeufs incubés artificiellement. C. r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 272:3071-3074.

116.- _____. (1972). Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux chéloniens *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. C. r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 274:719-722.

117.- _____. (1973a). Variation de l'activité enzymatique

A5-3B-hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les glandes génitales d'embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien), en fonction de la température d'incubation. C. r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 276:197-200.

118.- _____. (1973b). Nouvelles données expérimentales concernant les effets de la température sur la différenciation sexuelle chez les embryons de chéloniens. C. r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 277:2789-2792.

119.- _____. (1974a). Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryon d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien); effets des hormones sexuelles. Annls. Embryol. Morph., 7: 365-394.

120.- _____. (1974b). Sur la différenciation sexuelle chez des embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien) issus d'oeufs incubés dans le sol au cours de l'été 1973. Bull. Soc. zool. Fr., 99:363-376.

121.- _____. (1975a). Temperature and sex differentiation in embryos of two chelonians, *Emys orbicularis* L. and *Testudo graeca* L. Pp. 332-339 In: Intersexuality in the Animal Kingdom (R. Reinboth, ed.) Spring-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

122.- _____. (1975b). Effets des variations thermiques sur la différenciation du sexe chez les vertébrés. Boll. Soc. zool. Fr., 100:67-76.

123.- _____. (1976). Données récentes sur la différenciation

sexuelle en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). Bull. Soc. zool. Fr., 101 (suppl. 4):46-53.

124.- _____. (1978). Effets de températures d'incubation basses et élevées sur la différenciation sexuelle chez des embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). C. r. hebdomadaire. Séances Acad. Sci., Paris, Série D, 286:121-124.

125.- _____. (1982). Modalities of the action of temperature on sexual differentiation in field-developing embryos of the European pond turtle *Emys orbicularis* (Emydidae). J. exp. Zool., 220:353-360.

126.- PIEAU, C., DORIZZI, M., and ZABORSKI, P. (1979). Expression of H-Y antigen in young turtles (*Emys orbicularis* L.) issued from eggs incubated at different temperatures. Archs. Anat. microsc. Morph. exp., 68:222 (resumen).

127.- PIEAU, C., and DORIZZI, M. (1981). Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle *Emys orbicularis* L. J. Morph., 170:373-382.

128.- PIEAU, C., MIGNOT, Th. M., DORIZZI, M., and GUICHARD, A. (1982). Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L.: A preliminary study in embryos, hatchling, and young as a function of the incubation temperature of eggs. Gen. Comp. Endocrinol., 47:392-398.

129.- PIEAU, C., DORIZZI, M. et DESVAGES, G. (1987). Une

hypothèse sur l'implication des hormones oestrogènes dans la différenciation sexuelle des gonades chez les amphibiens, les reptiles et les oiseaux. J. Physiol., 30A (resumen).

130.- PIEAU, C. et RAYNAUD, A. (1966). L'établissement des connexions urogénitales chez l'orvet (*Anguis fragilis* L.). II. Evolution postnatale du rete, formation de l'épididyme et action des hormones androgène sur les structures. Archs. Anat. microsc. Morph. exp., 55:311-343.

131.- PIQUET, J. (1930). Détermination du sexe chez les Batraciens en fonction de la température. Rev. Suisse Zool., 37: 173-281.

132.- RAYNAUD, A. (1964a). Effets du propionate de testostérone sur le développement des conduits génitaux de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 259:3628-3631.

133.- _____. (1964b). Effets du benzoate d'oestradiol sur le développement des conduits génitaux de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r. hebd. Séanc. Sci., Paris, 259: 4134-4137.

134.- _____. (1964c). Culture, sur milieu synthétique, de la partie postérieure de l'appareil urogenital de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis*). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 259: 4822-4825.

135.- _____. (1965). Effets d'une hormone oestrogène sur le différenciation sexuelle de l'embryon de lézard vert (*Lacerta*

- viridis Laur.). C. r. hebd. Séanc Acad. Sci., Paris, 260: 4611-4614.
- 136.- _____. (1967a). Nouvelles observations concernant les effets d'une hormone oestrogène sur le développement de l'appareil génital de l'embryon de lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). C. r. hebd. Séanc Acad. Sci., Paris, Série D, 264: 2203-2206.
- 137.- _____. (1967b). Données préliminaires concernant les effets des hormones gonadotropes, agissant seules ou en association avec une hormone oestrogène, sur le développement de l'appareil génital de l'embryon de lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 264: 2329-2332.
- 138.- _____. (1967c). Effets d'une hormone oestrogène sur le développement de l'appareil génital de l'embryon de lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). Arch. Anat. microsc. Morph. exp., 56: 63-122.
- 139.- _____. (1969a). Effets du propionate de testostérone administré précocement, sur le développement de l'appareil urogénital de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 269: 2570-2573.
- 140.- _____. (1969b). Effets de la testostérone sur les rein embryonnaires de l'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r. Séanc. Soc. Biol., 163:2509.
- 141.- _____. (1970). Effets de la testostérone sur l'appareil

urogénital de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). Archs. Anat. microsc. Morph. exp., 59:125-166.

142.- RAYNAUD, A. et FRILLEY, M. (1947). Destruction des glandes génitales de l'embryon de souris par une irradiation au moyen des rayons X, à l'âge de 13 jours. Ann. Endocrinol., 8:400-419.

143.- RAYNAUD, A. et FRILLEY, M. (1965). Le développement des organes génitaux externes de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.) en l'absence des glandes génitales. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 261:5641-5644.

144.- RAYNAUD, A. et PIEAU, C. (1966a). Effets de l'oestradiol chez l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r Séanc. Soc. Biol., 160:55-59.

145.- _____. (1966b). Nouvelles observations sur la formation des glandes génitales chez l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). Bull. Soc. zool. Fr., 91:83-98.

146.- _____. (1971). Evolution des canaux de Muller et activité enzymatique A5-3B-hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les glandes génitales, chez les embryons de lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 273:2335-2338.

147.- _____. (1972). Effets de diverses températures d'incubation sur le développement somatique et sexuel des embryons de lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). C. r. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 275:2259-2262.

148.- _____. (1973a). Action de la testostérone sur les

- conduits génitaux des embryons de reptiles. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 276:3195-3198.
- 149.- _____. (1973b). Nouvelles observations relatives à l'action de la testotérone sur les conduits génitaux explantés in vitro, d'embryons de reptiles. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 277:2545-2548.
- 150.- _____. (1974). Effets de la testotérone sur les conduits génitaux, explantés in vitro, d'embryons de reptiles. Archs. Anat. microsc. Morph. exp., 63:1-21.
- 151.- _____. (1985). Embryonic development of the genital system. Capitulo 4. Pp. 149-299 In: Biology of the Reptilia, vol. 15. Development. B (Gans, S. and Billeu, F., eds.) John Wiley and Sons., New York.
- 152.- RAYNAUD, A. et RAYNAUD, J. (1961). L'activité sécrétoire précoce des glandes endocrines de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 253: 2254-2256.
- 153.- RAYNAUD, J. et RAYNAUD, A. (1963). Données histologiques et histochimiques relatives à l'épithélium de la paroi de l'urodaum de l'embryon d'orvet (*Anguis fragilis* L.). C. r. Séanc. Soc. Biol., 157:8-13.
- 154.- _____. (1965). Sur les reaction aux hormones sexuelles, des ébauches phalliques de l'embryon des reptiles. C. r. Séanc. Acad. Sci., Paris, 261:4853-4856.
- 155.- RAYNAUD, A., RAYNAUD, J., COLLENOT, G. et COLLENOT, A.

(1967). Sur les effets précoces de l'oestradiol chez le jeune embryon de lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). C. r. Séanc. Acad. Sci., Paris, 265:1729-1732.

156.- REGAMEY, J. (1935). Les caractères sexuels du Lézard (*Lacerta agilis* L.). Rev. Suisse Zool., 42:87-168.

157.- RISLEY, P. L. (1932). Observations on the natural history of the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). Pap. Mich. Acad. Sci. Arts. Lett., 17:685-711.

158.- _____. (1933). Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 18:459-543.

159.- _____. (1937). A preliminary study of sex development in turtles embryos following administration of testosterone. Anat. Rec., 70 (Suppl.):104.

160.- _____. (1940). Intersexual gonads of turtle embryos following injection of male sex hormone. J. Morphol., 67: 439-453.

161.- _____. (1941). A comparison of effects of gonadotropic and sex hormones on the urogenital systems of juvenile terrapins. J. exp. Zool., 87:477-515.

162.- RIMBLOT, B. F., FRETEY, J., MRSOVSKY, N., LESIURE, J., and PIEAU, C. (1985). Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea-turtle *Dermodochelys coriacea* (Vandelli, 1761). Amphibia-Reptilia, 6: 83-92.

- 163.- RIMBLOT, B. F., LESIURE, J., PRETEY, J. et PIEAU, C. (1986-1987). Sesibilité à la température de la différenciation sexuelle chez la tortue luth, *Dermodochelys coriacea* (Vandelli, 1761); application des données de l'incubation artificielle à l'étude de la sex-ratio dans la nature. Ann. Scien. Nat., Zool., Paris. 13 Série, 8: 277-290.
- 164.- RUIZ, G. J., STANDORA, E. A., SPOTILA, J. R., MORREALE, S. J., CAMHI, M., and EHRENFEELD, D. (1981). Artificial incubation of sea turtle eggs affects sex ratio of hatchlings. Proc. Ann. Meet. Herp. League, Memphis, TN, p. 68.
- 165.- SALZGEBER, B., REYSS-BRION, M. et BAULIEU, E. E. (1980). Effets d'un anti-oestrogène (Tamoxiféne) sur la différenciation sexuelle de Poulet. C. r. Sci. Acad. Sci., Paris, Série D. 293: 133-138.
- 166.- _____. (1981). Modifications des gonades femelles de l'embryon de Poulet, après action du tamoxiféne. C. r. Acad. Sci., Paris, Série III. 293:133-138.
- 167.- SANYAL, M. K., and PRASAD, M. R. N. (1966). Sexual segment of the kidney of the Indian house lizard *Hemidactylus flaviviridis* Ruppel. J. Morph., 118:511-528.
- 168.- SAS Institute Inc. 1985. SAS user's guide: Basics. ver. 5. Edition. Cary, North Carolina.
- 169.- _____. SAS user's guide: Statistics. ver. 5. Edition. Cary, North Carolina.
- 170.- SCHEIB, D. (1982). Ultrastructural features in female

gonads of quail embryos treated with an anti-estrogen (Tamoxifen). Biol. Cell., 45:185 (resumen).

171.- _____. (1983). Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. Differentiation, 23 (Suppl.):S87-S92.

172.- SCHEIB, D. et BAULIEU, E.-E. (1981). Action antagoniste du tamoxifene sur la differenciation normale des gonades femelles de l'embryon de Caille. C. r. Acad. Sci., Paris, Serie III. 293: 513-518.

173.- SCHEIB, D., and HAFFEN, K. (1969). Apparition et localisation des hydroxystéroïde déshydrogenases (A5-3B-et 17B) dans les gonades de l'embryon et du poussin chez la caille (*Coturnix coturnix Japonica*). Etude histoenzymologique et comparaison avec le poulet (*Gallus gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol., 12:586-597.

174.- _____. (1974). La glande interstitielle de l'oiseau: différenciation, évolution et potentialités sécrétrices. Année. Biol., 13:197-212.

175.- SCHEIB, D., HAFFEN, K., GUICHARD, A. et CEDARD, L. (1974). Transformation de la déhydroépiandrostérone 4-14C par les gonades embryonnaires de la Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) explantées in vitro. Gen. Comp. Endocrinol., 23:453-459.

176.- SCHEIB, D., MIGNOT, Th. M., and GUICHARD, A. (1984). Effects of early Tamoxifen treatment on hormonal content of 15-day quail embryo gonads. Gen. Comp. Endocrinol., 56: 425-432.

- 177.- SERRA, G. B., PEREZ-PALACIOS, G., and JAFFE, R. B. (1970). De novo testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 30:128-130.
- 178.- SHOLL, S. A., and GOY, R. W. (1978). Androgen and estrogen synthesis in the fetal guinea pig gonad. *Biol. Reprod.*, 18:160-169.
- 179.- SITTERI, P. K., and WILSON, J. D. (1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38:113-125.
- 180.- SPELBERG, T. C., HORTON, M., FINK, K., GOLDBERG, A., RORIES, C., GOSSE, B., and RASMUSSEN, K. (1987). A new model for steroid regulation of gene transcription using chromating acceptor sites and regulatory genes and their products. Pp. 59-83. *Ibid.* 5.
- 181.- STANDORA, E. A., and SPOTILA, J. R. (1985). Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, 1985 (3): 711-722.
- 182.- STARLING, E. H. (1905a). The chemical control of the functions of the body. *Lancet*, II:339-341.
- 183.- _____. (1905b). The chemical reflexes of the alimentary tract. *Lancet*, II:423-425; 501-503.
- 184.- _____. (1905c). The chemical correlations involving growth of organs. *Lancet*, II:579-583.
- 185.- STEPHAN, Y. (1963). Contribution à l'étude expérimentale de l'intersexualité chez un chélonien, *Emys leprosa* S. *Bull.*

biol. Fr. Belg., 97:363-467.

186.- SUFI, S. B., DONALDSON, A., and JEFFCOATE, S. L. (1990). Method Manual. 100 pp. W. H. O. Special Program of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay of Hormones in Reproductive Physiology. 14TH. Edition.

187.- TANABE, Y., NAKAMURA, T., FUJIOKA, K., and DOI, O. (1979). Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary, and the adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol., 39: 26-33.

188.- TANABE, Y., YANO, T., and NAKAMURA, T. (1983). Steroid hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic ducks. Gen. Comp. Endocrinol., 49: 144-153.

189.- TANABE, Y., SAITO, N., and NAKAMURA, T. (1986). Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol., 63:456-463.

190.- TENG, C. T., and TENG, C.-S. (1977). Studies of sex organ development. The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in embryonic-chick ovary. Biochem. J., 162:123-124.

191.- _____. (1979). Prenatal effects of the estrogenic hormone

on embryonic genital organ differentiation. Pp. 421-440 In: Ontogeny of Receptors and Reproductive Hormone Action (T. H. Hamilton, J. H. Clark, and W. A. Sadler, eds.). Raven Press, New York.

192.- UCHIDA, T. (1937). Studies on the sexuality of Amphibia. III. Sex transformation in *Hynobius retardatus* by the function of high temperature. J. Fac. Hokkaido Univ., ser. VII, 6:59-70.

193.- VILCHIS, F., HERNANDEZ, A., PEREZ, A. E., and PEREZ-PALACIOS, G. (1987). Hormone regulation of the rodent Harderian gland: binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. J. Endocr., 112:3-8.

194.- VILLALPANDO-FIERRO, I. (1989). Papel de las hormonas esteroides en la diferenciación de la gónada de *Xenopus leavis*. 99 pp. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.

195.- VILLALPANDO-FIERRO, I., and MERCHANT-LARIOS, H. (1990). Determination of the critical period for gonadal sex-reversal in *Xenopus leavis* tadpoles. Int. J. Devl Biol., 32:281-285.

196.- VIVIEN, J. H. (1959). Réactivité particulière du cortex gonadique et de l'épithélium du canal de Muller à l'action des hormones sexuelles chez le jeune mâle d'*Emys leprosa* S., traité après l'éclosion. Archs. Anat. microsc. Morph. exp., 48 bis: 297-311.

197.- VIVIEN, J. H. et STEPHAN, Y. (1956). Action stimulante des androgènes sur les ébauches femelles du tractus génital de la tortue d'eau, *Emys leprosa* S. C. r. Séanc. Biol., 150:

1436-1438.

198.- _____. (1958). Féminisation des gonades de jeunes tortues d'eau Emys leprosa mâles par action du diéthylstilboestrol. C. r. Séanc. Biol., 152:649-652.

199.- VOGT, R. C., and BULL, J. J. (1982). Temperature controlled sex-determination in turtles: Ecological and behavioral aspects. Herprtoologica, 38: 156-164.

200.- VOGT, R. C. y FLORES-VILLELA, O. A. (1986). Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. Ciencia, 37:21-32.

201.- VOGT, R. C., BULL, J. J., MccOY, C. J., and HOUSEAL, T. W. (1982). Incubation temperature influences sex-determination in Kinosternid turtles. Copeia, 1982:480-482.

202.- WATERS, A. J. (1940). Some hormonal effects on the sexually dimorphic kidneys of *Thamnophis r. radix*. J. Tennessee Acad. Sc., 15:412.

203.- WENIGER, J. P. (1968). Sur la précocité de la sécrétion d'oestrogènes par les gonades embryonnaires de Poulet cultivées in vitro. C. r. Acad. Sci., Paris, Série D. 266:2277-2279.

204.- _____. (1969). Recherche sur la nature chimique des hormones sexuelles embryonnaires de Poulet. Ann. Embryol. Morphol., 2:433-444.

205.- WENIGER, J. P., EHRHARDT, J. D. et FRITIG, B. (1967). Sur la formation d'oestrone et d'oestradiol par les gonades de l'embryon de Poulet femelle cultivées in vitro. C. r. Acad. Sc.,

Paris, Série D. 264:838-841.

206.- WENIGER, J. P., CHOURAQUI, J., ZEIS, A. et SAMSEL, J. (1981). Action anti-oestrogène du tamoxifène chez l'embryon de Poulet. C. r. Acad. Sc., Paris, Série III. 292:927-928.

207.- WENIGER, J. P., SAMSEL, J., CHOURAQUI, J. et ZEIS, A. (1983). Action du Tamoxifène sur la féminisation du testicule embryonnaire de Poulet. Ann. Endocrinol., 44: 139-142.

208.- WILHOFT, D. C., HOTALING, E., and FRANKS, P. (1983). Effects of temperature on sex determination in embryos of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. J. Herpetol., 17:38-42.

209.- WILSON, J. D., and SIITERI, P. K. (1973). Developmental pattern of testosterone synthesis in the fetal gonad of the rabbit. Endocrinology, 92:1182-1191.

210.- WILSON, J. D., GEORGE, F. W., and LSHIN, M. (1987). Genetic control of extraglandular aromatase activity in the chicken. Steroids, 50 (1-3):235-244.

211.- WILLIERS, B. H. (1939). Embryonic development of sex. Cap. III. Pp. 64-144 In: Sex and Internal Secretions (E. Allen, ed.). 2nd ed. Baillière, Tindall and Cox, London.

212.- WILLIERS, B. H., GALLAGHER, T. F., and KOCH, F. C. (1935). Sex modification in the chick embryo resulting from injection of male and female hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 21: 625-631.

213.- WITSCHI, E. (1914a). Experimentelle untersuchungen ueber die entwicklungsgeschichte der keimdruesen von Rana

- temporaria. Arch. mikr. Anat. Entw., 85:9-113.
- 214.- _____. (1914b). Studien ueber die geschlechtsbestimmung bei froeschen. Arch. mikr. Anat. Entw., 86:1-50.
- 215.- _____. (1929). Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. II. Sex reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. J. exp. Zool., 52:267-292.
- 216.- WOOD, F. E., and WOOD, J. R. (1982). Sex-ratios in captive-reared green turtles, *Chelonia mydas*. Copeia, 1982: 482-485.
- 217.- WOODS, J. E., and BRAZZIL, D. M. (1981). Plasma 17-B-estradiol levels imn the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol., 44:37-43.
- 218.- WOLFF, Et. (1947). Recherches sur l'intersexualité expérimentale produite par la méthode des greffes de gonades á l'embryon de Poulet. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 36:69-91.
- 219.- WOLFF, Et. et GINGLINGER, A. (1935a). Sur la transformation des poulets mâles en intersexués par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. Arch. Anat. His. Embr., 20:219-278.
- 220.- _____. (1935b). Sur la production expérimentale d'intersexués par l'injection de folliculine á l'embryon de Poulet. C. r. hebd. Acad. Séanc., Paris, 200:2118.
- 221.- WOLFF, Et., and WOLFF, Em. (1951). The effects of castration on bird embryos. J. exp. Zool. 116:59-97.

- 222.- YOUNG, F. G. (1970). Evolución de las ideas acerca de las hormonas animales. Capítulo 5. Pp. 217-260 In: La Química de la Vida (Joseph Needham, recopilador). Fondo de Cultura Económica, México. 1974. Primera reimpression 1987.
- 223.- YNTEMA, C. L. (1968). A series of stages in the embryonic developments of *Chelydra serpentina*. J. Morph., 125:219-251.
- 224.- _____. (1976). Effects of incubation temperatures in the turtle *Chelydra serpentina*. J. Morph., 150:453-462.
- 225.- _____. (1978). Incubation times for the eggs of the turtle *Chelydra serpentina* (Testudines: Chelydridae), at various temperatures. Herpetologica, 34:274-277.
- 226.- _____. (1979). Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. J. Morph., 159:17-28.
- 227.- _____. (1981). Characteristics of gonads and oviducts in hatchlings and young of *Chelydra serpentina* resulting from three incubation temperatures. J. Morph., 167:297-304.
- 228.- YNTEMA, C. L., and MROSOVSKY, N. (1979). Incubation temperature and sex ratio in hatching loggerhead turtles: A preliminary report. Marine Tur. Newlr., 11:9-10.
- 229.- _____. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. Herpetologica, 36:33-36.
- 230.- _____. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. Canad. J.

Zool., 60:1012-1016.

231.- ZABORSKI, P., DORIZZI, M. et PIEAU, C. (1979). Sur l'utilisation de sérum anti H-Y de souris pour la détermination du sexe génétique chez *Emys orbicularis* L. (Testudines, Emydidae). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 288: 351:354.

232.- _____. (1982). H-Y antigen expression in temperature sex-reversed turtles (*Emys orbicularis*). Differentiation, 21: 73-78.

233.- _____. (1988). Temperature-dependent gonadal sex differentiation in the turtle *Emys orbicularis*: concordance between sexual genotype and serological H-Y antigen expression at threshold temperature. Differentiation, 38:17-20.

234.- ZABORSKI, P., GUICHARD, A., and REYSS-BRION, M. (1980). H-Y antigen ovariectomized chicks: Disappearance of its expression during the transformation of the right gonad into a testis, Biol. Cell., 39:291-294.