

00343

1
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION
SOBRE LA DETERMINACION DEL SEXO EN
Crocodylus acutus y *C. moreletii*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA ANIMAL)

P R E S E N T A :

XOCHITL LAGUILAR MIGUEL

DIRECTORES

DR. GUSTAVO CASAS ANDREU

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo Casas Andreu, por incluirme dentro de su proyecto de trabajo con cocodrilos, por los conocimientos transmitidos y por su asesoría y estímulo constante.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por su asesoría y darme las facilidades para realizar el trabajo experimental en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, así como la revisión al manuscrito de este trabajo y sus valiosas críticas para mejorarlo.

A los miembros del jurado: Dr. Gustavo Casas Andreu, Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Fausto R. Mendez de la Cruz, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dra. Maricela Villagran Santacruz, y Dra. Irma Villalpando Fierro por las críticas y sugerencias al manuscrito.

Al Dr. Joaquín Herrera, por su colaboración en esta investigación con los Radioinmunoanálisis.

A mis compañeros en el trabajo de campo los Pas. de Biol. Gabriel Barrios Q., Octavio de Luna C y al Biol. Horacio Saracho V. y en el trabajo de laboratorio a los Biólogos Norma Moreno, Enrique Salas, Rosa María Viguera, al Sr. Jose Guadalupe Baltazar García, al M.en C. Arturo Salame. y por la asesoría en computo al P. A. Enrique Leyva, a todos ellos gracias por su ayuda y amistad.

Al director de la Escuela de Ciencias, de la Universidad Autónoma del Estado de México, Biol. Ulises Aguilera Reyes por brindarme su apoyo y por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, así como a mis amigos y compañeros de trabajo.

Al Dr. Gerardo Ceballos y al Biol. Andres García de la Fundación Ecológica Cuixmala A.C. por darme las facilidades de acceso a la reserva.

A mis queridos hermanos que siempre han compartido conmigo los momentos más importantes en mi vida, les agradezco su apoyo.

Por último, este trabajo fué también posible gracias al apoyo de la Dirección General de Intercambio Académico, U.N.A.M. y al Programa de Formación de Recursos Humanos de Grado en la U.A.E.M.

I N D I C E

RESUMEN	1
ANTECEDENTES		
<input type="checkbox"/> DETERMINACION DEL SEXO	2
<input type="checkbox"/> MODELOS DE RESPUESTA A LA TEMPERATURA	5
<input type="checkbox"/> DETERMINACION DEL SEXO Y DIFERENCIACION	8
*DETERMINACION GENETICA EN REPTILES		
*DIFERENCIACION GONADAL		
*DIFERENCIACION FENOTIPICA		
<input type="checkbox"/> MECANISMOS DE DIFERENCIACION SEXUAL	13
HIPOTESIS PROPUESTAS		
<input type="checkbox"/> INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION.....		16
<input type="checkbox"/> IMPLICACIONES DE LA DETERMINACION DEL SEXO.....		17
POR TEMPERATURA		
<input type="checkbox"/> ESPECIES ESTUDIADAS EN EL PRESENTE TRABAJO	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	24
METODOS		
RECOLECTA DE HUEVOS FERTILES	25
SOBREVIVENCIA DEL EMBRION	25
HISTOLOGIA	25
DETERMINACION DEL SEXO	25
HISTOQUIMICA E INMUNOHISTOQUIMICA	26
RADIOINMUNOANALISIS	27
ANALISIS ESTADISTICO	29

RESULTADOS

SOBREVIVENCIA DEL EMBRION Y DURACION DEL DESARROLLO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA	30
HISTOLOGIA	32
DETERMINACION DEL SEXO	39
HISTOQUIMICA E INMUNOHISTOQUIMICA	41
RADIOINMUNOANALISIS	43
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	52
LITERATURA CITADA	53
ANEXO	61

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura de incubación en la determinación del sexo y el desarrollo gonadal en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*, así como la actividad esteroidogénica del complejo urogenital (gónada-mesonefros-adrenal) y la cuantificación de hormonas esteroides sexuales (HES) en suero sanguíneo en cocodrilos recién nacidos.

Para poder conocer si *C. acutus* y *C. moreletii* presentaban sexo-termodependencia, se utilizaron huevos fértiles de *C. acutus* y *C. moreletii*, incubándose a 30, 32 y 34° C ($\pm 0.5^\circ$ C), con humedad relativa del 95% y utilizando vermiculita como sustrato. En una primera fase, se sacrificaron a diferentes tiempos, durante el desarrollo embrionario. Para observar la estructura gonadal durante el desarrollo, se emplearon Técnicas de Microscopía de Alta Resolución. En la segunda fase, se dejaron desarrollar los embriones hasta la eclosión, sacrificándolos siete días después. Se diseccionaron las gónadas y procesándolas con la técnica antes mencionada, se determinó la proporción de sexos para cada temperatura y para cada especie.

Los resultados muestran, que para *C. acutus*, a 30 y 34° C, se producen 100% hembras, a 32° C machos y hembras (50%:50%). Para *C. moreletii* se obtuvieron 100% machos a 34° C y 100% hembras a 30 y 32° C. También se encontró que la relación de sexos varía en función de la temperatura de incubación, sin embargo, los patrones de respuesta a la temperatura son diferentes entre las dos especies.

Los mecanismos fisiológicos a través de los cuales opera la determinación del sexo por efecto de la temperatura, son prácticamente desconocidos. Una hipótesis propuesta, se refiere a que la biosíntesis de estrógenos, modulada por la temperatura, regula a su vez la diferenciación de la gónada. Para contribuir a conocer los mecanismos antes mencionados, se determinó la actividad esteroidogénica en el complejo urogenital (gónada-mesonefros-adrenal), por medio de la técnica histoquímica $\Delta 5-3 B$ hidroesteroide deshidrogenasa. Se encontró una reacción fuertemente positiva en la glándula adrenal y muy débil en el mesonefros, pero fué negativa en la gónada. De manera que en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii* la regulación metabólica de Hormonas Esteroides Sexuales (HES) parece llevarse a cabo en la glándula adrenal. La determinación y cuantificación de HES se hizo por medio de Radio Inmuno Análisis (RIA). Se encontró que la temperatura regula la actividad metabólica de estas hormonas, teniendo los niveles más altos a 34 °C, y siendo el estradiol y la testosterona más activa en machos; además, se presentaron diferencias significativas en el metabolismo de HES entre *C. acutus* y *C. moreletii*.

ANTECEDENTES

DETERMINACION DEL SEXO

En reptiles se han identificado dos mecanismos de determinación del sexo: los genotípicos (DSG) y los ambientales (DSA). Los primeros, son aquellos en donde el sexo de los descendientes es determinado en la fertilización y no está influenciado por el ambiente externo. Los ambientales, son aquellos en los que la determinación del sexo es dependiente de la temperatura (DST), los que influyen la diferenciación gonadal en el primer tercio de la incubación. La DST se ha observado en lagartijas (Sauria), tortugas (Chelonia) y cocodrilos (Crocodylia).

La primera observación, que sugirió que la temperatura de incubación de los huevos podía influenciar la relación sexual en el grupo de los reptiles fue hecha por Charnier (1966), en una lagartija del Norte de Africa (*Agama agama*).

En 1971, Pieau documentó la influencia sobre la relación de sexos entre los embriones de dos especies de tortugas, *Emys orbicularis* y *Testudo graeca*, demostrando en 1972, que la temperatura de incubación de los huevos, produce machos fenotípicos a temperaturas bajas y hembras fenotípicas a temperaturas altas. En 1976, Yntema describió otro modelo de sensibilidad a la temperatura en otro quelonio *Chelydra serpentina*.

Después, se estableció que la temperatura influenciaba la diferenciación sexual en otras especies de tortugas Emydidae (Bull y Vogt, 1979) y en una marina *Caretta caretta* (Yntema, 1979; Yntema and Mrosovsky, 1980), pero que la incubación de los huevos a diferentes temperaturas no modificaba significativamente la proporción de sexos en *Trionyx spiniferus* (Bull and Vogt, 1979, Vogt y Bull, 1982).

En 1980, Bull publica la primera revisión de determinación del sexo en reptiles, y distingue especies con determinación del sexo genotípica (DSG), de especies con determinación del sexo dependiente de la temperatura (DST) y recientemente se ha

puesto más atención en dos taxa *Crocodylia* y *Chelonia*.

Actualmente, de las 6551 especies vivientes de reptiles, arriba de 1000 han sido cariotipificadas. Menos del 27% de ellas muestran DSG en la forma de cromosomas sexuales heteromórficos. Sólo 94 especies han sido examinadas para la presencia o ausencia de DSA, de estas 72 han presentado DSA (Janzen y Paukstis, 1991).

Los estudios que se han realizado para investigar la DST en el laboratorio pueden ser divididos en tres tipos: (1) temperatura constante, (2) temperatura fluctuante y (3) experimentos de cambio de temperatura. La mayoría han sido efectuados con temperatura constante, aunque los que simulan mejor el medio ambiente son los de fluctuaciones de temperaturas. Sin embargo, en este último caso la interpretación es difícil, debido a la cantidad de variables que manejan.

Los estudios de cambio de temperatura han sido diseñados específicamente para averiguar el período crítico de la determinación sexual de las gónadas en especies con DST, además de inferir sobre los mecanismos que controlan el proceso de diferenciación sexual (Paukstis y Janzen, 1990).

En particular para los cocodrilos, la determinación sexual dependiente de la temperatura de incubación ha sido citada para cinco especies de *Crocodylus* y en tres de *Alligatoridae*, en trabajos que se han realizado, tanto en nidos naturales como en condiciones de laboratorio (Esq. 1).

Respecto de los trabajos realizados en nidos naturales, se han registrado las temperaturas de incubación en el nido, valorando de que manera influyen sobre las proporciones sexuales (Webb y Smith, 1984; Webb et al., 1987), y con trasplantes de huevos para determinar cómo la localización del nido y el tiempo de anidación influye sobre las proporciones sexuales en función de la temperatura de incubación (Lang, 1989).

DST en CROCODYLIA

	INCUBACION	AUTORES
ALLIGATORIDAE		
<i>Alligator mississippiensis</i>	L	Ferguson y Joanen (1982). Ferguson y Joanen (1983). Joaanen et al, (1987). Bull et al, (1988). Joaanen y Mc Nease (1989).
<i>Caiman crocodilus</i>	L	Lang et al, (1989).
<i>Paleosuchus trigonatus</i>	L	Yamakoshi et al, (1987).
CROCODYLIDAE		
<i>Crocodylus johnstoni</i>	L N	Webb y Smith (1984). Webb et al, (1987). Webb et al, (1987).
<i>Crocodylus niloticus</i>	L	Hutton (1987).
<i>Crocodylus palustris</i>	L N	Lang et al, (1989).
<i>Crocodylus porosus</i>	L N	Joss y Cuff (1987). Webb et al, (1987).
<i>Crocodylus siamensis</i>	L	Lang (1985). Lang (1987).

L. Incubacion en Laboratorio.

N. Incubacion en nidos naturales.

Esquema 1. Tomado de Revision de Paukstis, G. L. y Janzen F. J. (1990).

MODELOS DE RESPUESTA A LA TEMPERATURA

Con respecto a la relación de sexos como una función de la temperatura de incubación, Douvrnon (1990), propuso 5 tipos de respuesta en diferentes especies de reptiles (Esq. 2).

MODELO 1

Ambos sexos son obtenidos dentro de un solo grado de temperatura, entre 28 °C y 29 °C. Por arriba de este "intervalo crítico" los individuos nacen hembras fenotípicas en un 100 % y por debajo de este, 100% machos fenotípicos. Este modelo se describió en *Emys orbicularis*, lo presentan 7 especies de tortugas y podría ocurrir en 9 más.

MODELO 2

Característico de *Alligator mississippiensis*, la respuesta es inversa a la anterior, aquí nacen 100% de machos fenotípicos por encima del intervalo crítico de temperatura (31-33 °C) y por debajo de este 100% de hembras fenotípicas. En el intervalo crítico, comprendido entre 31-33 °C, nacen hembras y machos. Este modelo, ha sido observado en otras 3 especies de cocodrilos; *Crocodylus niloticus*, *C. siamensis* y *Caiman crocodylus* (Deeming y Ferguson, 1988) y posiblemente también ocurre en dos especies de lagartijas: *Agama agama* y *Eublepharis macularius*.

MODELO 3

Este modelo fue descrito para *Chelydra serpentina*, en donde 100% de hembras fenotípicas son obtenidas tanto a temperaturas bajas como altas y 100% de machos a temperaturas intermedias, con dos períodos críticos.

Ambos sexos se diferenciaron dentro de los intervalos 21-23 °C y 26-29 °C con un alto porcentaje de machos fenotípicos a 22 °C y 28 °C (Yntema, 1976). Datos preliminares indican que este modelo también ocurre en otras nueve especies de tortugas,

en el geco *Gekko japonicus* y en dos especies de cocodrilos (*Crocodylus porosus* y *C. palustris*).

MODELO 4

Se presenta en *Crocodylus johnstoni*, en donde hembras fenotípicas fueron obtenidas a todas las temperaturas de incubación, pero machos fenotípicos solo fueron producidos entre 31-32.5 °C, con menor porcentaje que las hembras fenotípicas. Este modelo puede derivar del modelo 3 pero con la reducción extrema del intervalo de temperatura para la diferenciación de los machos.

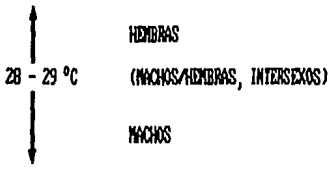
MODELO 5

La temperatura no afecta la diferenciación sexual. En *Lacerta viridis*, fueron incubados a 17 C, 19.5 °C , 22.5 ± 0.5 °C y a 35.5 ± 0.5 °C en cada una de estas temperaturas, la relación de sexos era cercana a 1:1, mostrando que la determinación del sexo genotípico es mantenida.

MODELO 1

Emys orbicularis

7 especies de tortugas



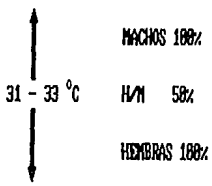
MODELO 2

Alligator mississippiensis

Crocodylus niloticus

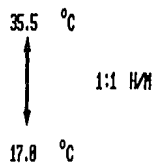
C. siamensis

Caiman crocodilus



MODELO 5

Lacerta viridis



NO AFECTA LA TEMPERATURA
(DSG)

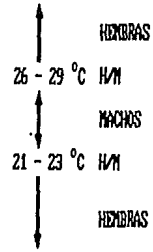
MODELO 3

Chelydra serpentina

Crocodylus porosus

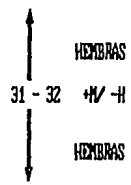
C. palustris

9 especies de tortugas



MODELO 4

Crocodylus johnstoni



Esquema. 2. MODELOS DE RESPUESTA A LA TEMPERATURA EN LA DIFERENCIACION SEXUAL DE LAS GOMADAS.
(EN DOURNOU ET AL. 1998).

DETERMINACION DEL SEXO Y DIFERENCIACION

La diferenciación sexual en los vertebrados es un proceso secuencial que se realiza en tres etapas. La primera etapa abarca la determinación del sexo genético, que se establece en el momento de la fertilización. 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 a cabo el establecimiento sexual del organismo o diferenciación fenotípica (George y Wilson, 1988).

DETERMINACION GENETICA EN REPTILES

Para ver la influencia de la determinación del sexo genético en reptiles tanto en especies con DST, como en los que presentan cromosomas sexuales, Bull et al., (1988), emplearon la sonda del gene ZFY comparando DNA genómico de reptiles con DSG y el DNA de reptiles con determinación sexual por temperatura. No observaron diferencias en los patrones de hibridación.

La hibridización de ZFY a RNA poliadenilado indica que, la versión reptiliana de este gen, es expresado en embriones de ambos sexos durante el período en donde la temperatura es importante en la determinación sexual. Infiriendo que, si las secuencias de ZFY son importantes en la determinación del sexo en reptiles, entonces la diferenciación gonadal dependiente de la temperatura y la genotípica, puede tener una base molecular similar. Posteriormente, este trabajo fué cuestionado por otros autores, ya que también se presentan secuencias del ZFY en especies con determinación del sexo genotípico, con diferentes expresiones de cariotípos XX,XY,ZZ ó ZW.

Demas et al., en 1991, secuenciaron DNA específico sexual, en reptiles con determinación del sexo por efecto de la temperatura; aislando "banded krait minor" (Bkm), que fué encontrado en altas concentraciones en el cromosoma W de la serpiente *Bungarus fasciatus*, la cual presenta cromosomas sexuales isomórficos semejante a la región determinante de machos del

cromosoma "Y", del ratón y del hombre. Demas et al., realizaron una hibridización filtrada con el Bkm 2 (8), en dos especies de tortugas marinas *Chelonia mydas* y *Lepidochelys kempii*, en las cuales el sexo es determinado por la temperatura de incubación, encontrando que el Bkm relacionado con el DNA de estas especies son cuantitativamente fragmentos específicos de machos en ambas especies.

Estos autores concluyeron que las secuencias de DNA específicas del sexo en especies con determinación del sexo por la temperatura, se explican sosteniendo el modo genético de la determinación del sexo en estos animales, o alternativamente, si la determinación del sexo es influenciada por la temperatura, existen modificaciones estructurales en el DNA adyacente o directamente relacionadas con los genes determinantes del sexo.

Estudios preliminares de DNA de 4 especies de cocodrilos revelaron nuevos fragmentos de Bkm, sugiriendo que se presentan modelos para cada especie, a diferencia de las tortugas en que la identificación para especie no fue posible, ya que se requieren más estudios de estos animales (Demas y Wachtel, 1991).

En mamíferos, la determinación del sexo es gobernada por un gene en el cromosoma Y, llamado *SRY* (región sexo determinante Y), sin embargo en reptiles, estudios de hibridización del gene *SRY* mostraron secuencias de aminoácidos del mismo, pero sin atribuirseles la misma función. Por lo tanto el *SRY* es un determinante primario del sexo en los mamíferos, pero no en otros grupos de vertebrados (Terrence, et al., 1991).

DIFERENCIACION GONADAL

La morfogénesis gonadal es un proceso de diferenciación de los órganos reproductores que involucra la interacción entre células germinales y células somáticas, las cuales tienen diferente origen: el componente germinal extragonadal y los elementos somáticos mesodérmicos (Fox, 1977). Este proceso presenta eventos morfogenéticos particulares; como la división celular, movimientos celulares, muerte celular programada, modificación de la matriz extracelular y diferenciación celular,

así como la interacción de sus elementos en tiempo y espacio (Merchant-Larios, 1984).

El desarrollo gonadal en reptiles, fue descrito por Daufaure en 1966 para *Lacerta vivipara* y en general es similar para otros reptiles. Al inicio del desarrollo gonadal existen dos estructuras llamadas crestas genitales, las cuales se forman a partir del epitelio celómico y una condensación de células mesenquimáticas, a uno y otro lado del mesenterio dorsal (op. cit.).

Las células germinales de origen extraembrionario, migran desde el saco vitelino a la gónada vía transporte pasivo, junto con los tejidos circundantes y/o a través del sistema circulatorio (Hardisty, 1977).

La formación de la cresta genital en cocodrilos es semejante a la descrita para *Lacerta vivipara* y otros reptiles (Ferguson, 1985) y se desarrolla durante las primeras 4 semanas (Joss, 1989).

Merchant et al., en 1989, describieron en *Lepidochelys olivacea* la morfogénesis gonadal a nivel ultraestructural, que es similar a otros reptiles. Las células del mesotelio de la cresta genital muestran las siguientes modificaciones: las células internas mesoteliales pierden sus conexiones intercelulares y las células exteriores que se encuentran frente a la cavidad celómica permanecen unidas con sus células vecinas. Una delgada lámina basal, descansa sobre el mesotelio, se ve interrumpida en varios sitios, principalmente donde las células mesoteliales tienen contacto directo con las células mesenquimáticas, y de esta manera ambas células parecen contribuir en la formación de cordones sexuales.

El siguiente período es el establecimiento de la gónada indiferenciada con la formación de los cordones sexuales en la región medular, que para los cocodrilos es denominada "etapa de biopotencialidad" (Ferguson, 1985; Joss, 1989). Cuando empieza la formación de los cordones medulares, se inicia la invasión de vasos sanguíneos en la cresta genital, por lo tanto se ha pensado que en el establecimiento de la gónada indiferenciada la vascularización juega un papel importante,

probablemente actuando como un soporte mecánico para la constitución de los cordones medulares (Merchant-Larios et al., 1989). El establecimiento de los cordones sexuales en la gónada, se debe a que las células mesoteliales y mesenquimáticas inician una gran actividad proliferativa al llegar las células germinales primordiales, formando un agregado compacto. Posteriormente, se inicia el depósito de una delgada lámina basal y de fibras de colágena que participan en la formación de un epitelio organizado (op. cit.). En el *Alligator mississippiensis* este período se lleva a cabo entre la 4a y 6a semana de incubación (Joss, 1989).

Diferenciación testicular.

La diferenciación del testículo, se observa por la compactación de los cordones sexuales. Joss en 1989 describió para *Alligator mississippiensis*, que como resultado de esta compactación hay una disminución de volúmen, en comparación con el del ovario.

La morfología del testículo en términos generales, es similar a la descrita para la mayoría de los vertebrados, consistiendo de cordones seminíferos, rodeados de tejido intersticial muy vascularizado, con una cápsula de tejido conjuntivo, constituida principalmente por fibras de colágena (Deemming, 1988, Austin, 1989). En mamíferos se ha descrito que el "traslado" de los cordones sexuales a la región medular de la gónada es un movimiento morfogenético que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un activo depósito de las moléculas que forman la lámina basal, con los cambios histológicos que conlleva el movimiento de las células mesenquimáticas y endoteliales (Merchant-Larios and Taketo, 1991).

Forbes observó que en algunos cocodrilos y tortugas, había persistencia de una región cortical en el testículo, aun después de la eclosión (en Merchant-Larios, 1977).

Diferenciación ovárica.

La estructura del ovario en reptiles, está determinada por la

migración de las células germinales hacia la región cortical, observándose un engrosamiento del epitelio, con células estromáticas entre las germinales (Fox, 1977; Merchant-Larios, 1977).

En la parte medular, hay una regresión de los cordones epiteliales y predomina el tejido mesenquimático. Sin embargo, su apariencia pronto cambia como resultado de una proliferación epitelial dando un arreglo compacto al tejido el cual, bajo el microscopio óptico, no muestra una estructura bien definida (Merchant-Larios, 1977).

DIFERENCIACION FENOTIPICA

Por último, el establecimiento sexual del organismo ó diferenciación sexual fenotípica, se lleva a cabo por la activación hormonal que aunque no influye directamente en el proceso fundamental de la determinación del sexo, es importante para el desarrollo de las características sexuales secundarias. Estas hormonas sexuales son elaboradas por glándulas endócrinas, sobre todo los ovarios y testículos, aunque también intervienen las adrenales y la hipófisis. Las adrenales producen esteroides químicamente relacionados con los producidos por las gónadas y probablemente también influyen en el desarrollo de las características sexuales secundarias. Los ovarios y los testículos tienen una función común: son responsables de la producción de las células sexuales primarias, es decir, los ovocitos y espermatozoides, respectivamente. Asimismo inducen la aparición de las características sexuales secundarias, a través de las hormonas sexuales (Eckert R. et al., 1989).

MECANISMOS DE DIFERENCIACION SEXUAL HIPOTESIS PROPUESTAS

Las bases moleculares y fisiológicas de la determinación del sexo dependiente de la temperatura DST son todavía desconocidas, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis.

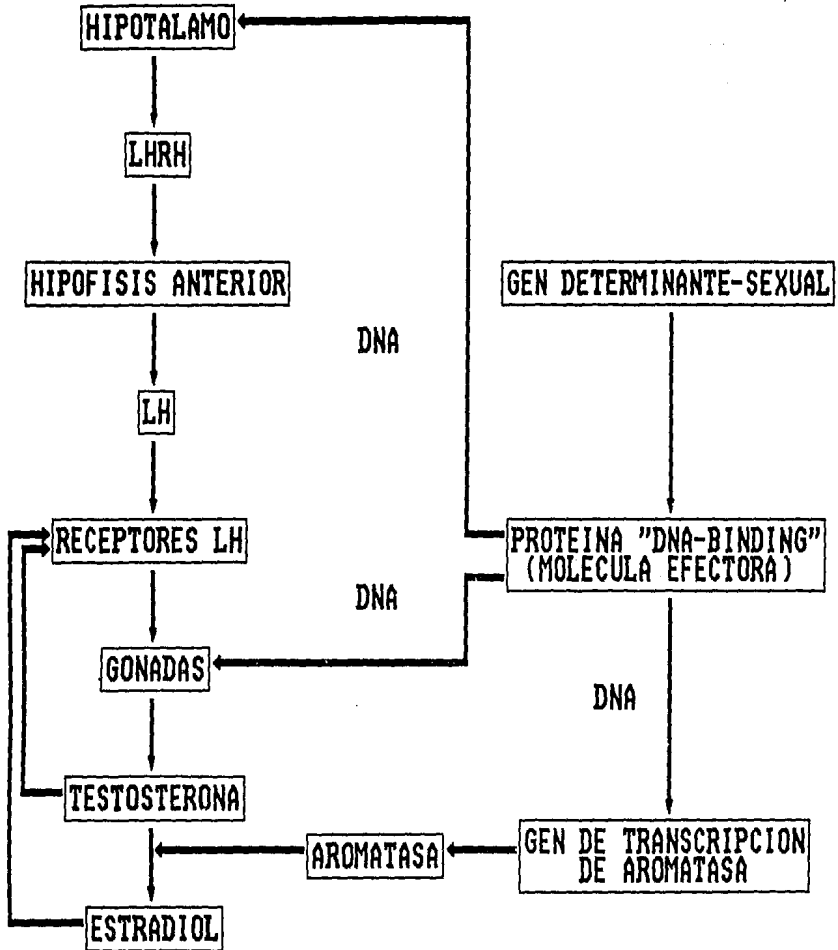
Raynaud y Pieau (1985), presentaron la primera hipótesis que implica a la temperatura de incubación como agente causal de la determinación del sexo, particularmente, de la diferenciación sexual gonadal en la tortuga *Emys orbicularis*. Basándose en las proposiciones de Engel et al., (1981) y Zaborski et al., (1979 y 1980) considerando la participación del antígeno H-Y, y de las hormonas esteroides sexuales (HES), en el proceso de la diferenciación sexual gonadal (Pieau, 1982), sugirieron que la temperatura de incubación podría modificar la biosíntesis de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis de HES, así como del antígeno H-Y. El primordio gonadal, se diferenciará en ovario, si la concentración de estrógenos es relativamente mayor durante su período termosensible, mientras que, si el primordio gonadal es H-Y, se diferenciará en testículo, cuando la concentración de estrógenos es baja o nula en el mismo período. La hipótesis de estos investigadores se fortaleció 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 comprobar esta hipótesis Raynaud y Pieau (1985) sugieren que es necesario llevar a cabo estudios de esteroidogénesis en la gónada (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 del inicio del período termosensible gonadal en embriones (DST), provenientes de huevos incubados a diferentes temperaturas.

Otra hipótesis es la propuesta por Crews et al., (1989), quienes sugieren que, en los reptiles sexo-termodependientes, la determinación del sexo se lleva a cabo por la acción de una HES, regulada 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 la gónada y/o adrenales embrionarias. Asimismo, regularía la biosíntesis de estrógenos y éstos al antagonizar la acción de la(s) hormona(s) masculinizante(s), favorecerían la diferenciación del ovario al estimular la proliferación de la región cortical de la gónada en diferenciación.

La tercera hipótesis fué propuesta por Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (1990), en la que explican el efecto de la temperatura de incubación en la determinación del sexo de una especie de tortuga DST (*Lepidochelis olivacea*). Basados en los resultados obtenidos en una serie de experimentos como fueron: cultivo in vitro de gónadas embrionarias en diferentes estadios del desarrollo, provenientes de huevos incubados bajo el efecto de la temperatura masculinizante o feminizante, así como el intercambio de la temperatura masculinizante a la feminizante y viceversa, de huevos en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Sus resultados indicaron que hay prominente inervación en la fase primaria de la diferenciación sexual gonadal. Los resultados los llevaron a proponer un efecto indirecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual de la gónada. Es decir, que el sistema nervioso central actuaría como sensor de la temperatura, la cual regularía la secreción de neurohormona(s). Dichos "factores" neurohormonales, serían las moléculas morfogenéticas responsables tanto de la determinación embriológica como del mantenimiento de la diferenciación sexual gonadal femenina. Para que se lleve a 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.

Janzen y Paukstis, en 1991, hacen una combinación de estas hipótesis, mencionan que más de un componente se encuentra actuando sobre los procesos de determinación del sexo gonadal (Esq. 3).



Esquema 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS HIPOTESIS PROPUESTAS PARA LOS MECANISMOS DE DETERMINACION SEXUAL DEPENDIENTE-TEMPERATURA (JANZEN Y PAUSTIS, 1991)

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

La temperatura de incubación no solo tiene influencia sobre la diferenciación sexual en cocodrilos, sino también en el desarrollo y crecimiento embrionario. Deeming et al., en 1990, toman varias medidas morfométricas durante el desarrollo embrionario de *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus johnstoni* y *C. porosus*, a diferentes temperaturas de incubación, obteniendo un intervalo de crecimiento embrionario más rápido a temperaturas altas, independientemente de las características genéticas de las especies.

También fue demostrada la influencia de la temperatura de incubación sobre los patrones de termoregulación, crecimiento y sobrevivencia, de las crías *C. johnstoni* y *C. porosus* (Webb et al., 1987). Las características químicas originales del huevo se modifican durante el desarrollo embrionario por influencia de la temperatura de incubación, siendo una modificación importante la pérdida de agua por vía metabólica o por evaporación. (Manolis et al., 1987).

Los patrones de erupción de dientes y su desarrollo para *C. johnstoni*, también son afectados por la temperatura de incubación. Beal y Webb en 1989, incubaron a temperaturas diferentes entre 28 y 34° C para determinar la dentición o la no dentición, obteniéndose una erupción de dientes temprana a temperaturas altas. Además de modificarse el número de dientes; a temperaturas bajas y altas el número es mayor (19-21). En cambio a temperaturas intermedias se forman menos dientes de 15-18.

Otros factores influenciados por la temperatura de incubación, son los patrones de pigmentación y termorregulación. Estos han sido evidenciados en *Alligator mississippiensis* (Lang, 1987), los cuales son controlados por el hipotálamo vía hormonas influenciadas por la temperatura.

IMPLICACIONES DE LA DETERMINACION SEXUAL TEMPERATURA-DEPENDIENTE

Es importante conocer las implicaciones ecológicas, evolutivas y adaptativas de la determinación del sexo dependiente de la temperatura (DST) y la determinación del sexo genotípico (DSG) entre reptiles. Para esto hay que ver las condiciones físicas de los nidos naturales, ya que la mayoría de los estudios para DST, han empleado temperaturas constantes en condiciones de laboratorio.

La mayoría de los estudios en ecología de nidos, han demostrado que las condiciones térmicas dentro de los nidos naturales cambian diaria y/o estacionalmente (Deeming y Ferguson, 1989; Lutz y Dunbar-Cooper, 1984; Joanen, 1987 y Thorbjarnarson, 1988).

En estudios de relaciones de sexos en nidos naturales de especies con DST (*C. johnstoni*, *C. porusus* y *C. palustris*) se ha demostrado que la localización del sitio de los nidos influye en la relación de sexos y que, en general algunos nidos producen solo machos, solo hembras, ó ambos sexos, sí se encuentran distribuidos en estratos (Webb et al., 1987; Lang et al., 1989), demostrando que la DST ocurre también bajo condiciones naturales.

Los resultados de los estudios de DST en nidos naturales de cocodrilos son similares a los de laboratorio, sugiriendo que el proceso de diferenciación sexual es el mismo. Aunque todavía no esta claro cómo distintos componentes del proceso de desarrollo (ej. variaciones térmicas naturales o períodos críticos de diferenciación sexual en nidos), puedan relacionarse con la determinación sexual en la naturaleza.

La selección de sitios de anidación por parte de las hembras, las características físicas de los nidos y otros factores, también deben de tomarse en cuenta. Para un completo entendimiento de la diferenciación sexual y las relaciones de sexos en condiciones naturales, es necesario investigar más sobre DST en nidos y sus consecuencias en poblaciones naturales.

Desde el punto de vista evolutivo, los reptiles mantienen una única e importante posición filogenética para el conocimiento de la evolución de los mecanismos de determinación del sexo. Todos los mamíferos, aves y casi todos los anfibios tienen DSG, (Bull, 1980, 1983), mientras que los reptiles muestran una variedad de mecanismos de determinación del sexo, incluyendo DST.

La presencia tanto de mecanismos ambientales como genotípicos de determinación sexual en tres de los cinco mayores taxa de reptiles, lleva a interesantes preguntas acerca de los orígenes de estos mecanismos en los reptiles. Varios tipos de determinación del sexo ambiental (DSA), aquellos influenciados por el pH, nutrición, temperatura han sido descritos para un pequeño grupo de organismos pero que sin embargo, varía de acuerdo con el grupo taxonomico estudiado como en los Equiúridos, en Nemátodos Nermítidos y Diplogastéridos, Isópodos, Amfípodos y el pez plateado del Atlántico (en Bull, 1983; Adams et al., 1987).

Se ha argumentado mucho que la DSA fue el estado ancestral de determinación sexual en todos los vertebrados, (Witschi, 1959). Ciertos autores argumentan en favor de lo anterior dada la perspectiva de que la mayoría de los invertebrados, peces, anfibios y reptiles, carecen de cromosomas sexuales y que muchos miembros de los tres primeros grupos también muestran alguna labilidad en expresiones del sexo. Sin embargo, se han reunido más evidencias desde que esta hipótesis fue propuesta. La amplia ocurrencia de DST entre varios taxa de reptiles, ha sido tomada como un indicador de que el DST fue la condición ancestral (Bull, 1980). Un análisis de la filogenia de tortugas, sugiere que es más probable asumir que DSA más que la DSG, es la condición ancestral de determinación del sexo en tortugas (Janzen and Paukstis, 1991). Para asumir esto, tendría que contemplarse un mínimo de 7 eventos evolutivos necesarios para generar la distribución conocida de los mecanismos de determinación sexual. Con DSG como estado ancestral tomaría por lo menos 13 estados evolutivos (Janzen y Paukstis, 1991).

Esto puede cambiar conforme cambie el conocimiento. Un análisis así excluye la convergencia: orígenes múltiples de un mecanismo sexual particular puede no ser claro.

La predominancia aparente entre quelonios, en conjunción con la aparición de los primeros registros fósiles de este grupo, ha originado la presuposición de que el DSA es el estado ancestral, aunque hay algunas evidencias que sugieren lo contrario. En primer lugar, la distribución común de DST entre reptiles extintos y también dentro de los quelonios, no necesariamente sugiere a un DSA ancestral. De las especies estudiadas 72 tienen DSA contra 354 que tienen DSG. Entre quelonios hay 47 especies conocidas que poseen DST y 12 con DSG. Esto hace pensar que más especies de quelonios poseen DST que DSG y que probablemente solo el 24% de especies extintas poseen otros mecanismos (de acuerdo con los resultados de la secuenciación de DNA en fósiles). En segundo lugar la DST ocurre en 9 de 13 familias de quelonios y la DSG sólo en 4. La familia (Emydidae) muestra ambos y existe una familia que no ha sido estudiada (Janzen y Paukstis, 1991).

La frecuencia de DST en quelonios no es una evidencia muy fuerte para decir que DSA es el estado ancestral, porque la DSG ocurre también en ellos y ambos mecanismos se presentan en otros vertebrados tetrápodos (op. cit.).

Por otro lado, los primeros fósiles conocidos de quelonios Cryptodirianos, son del Jurásico Superior y están representados actualmente por miembros de la Superfamilia Chelonoidea (con especies extintas) que exhiben DST y Trionychoidea (con especies extintas) que muestran DST y DSG (Carrol, 1988).

Algunos autores sugieren que el cariotipo del quelonio primitivo puede ser como el de las tortugas Quelónidas y Dermátidas ($2n=56$) pero el cariotipo primitivo como el de las tortugas Trionicoideas ($2n=69-68$) no podría ser descartado. Finalmente, las relaciones de tortugas con otros grupos de reptiles está también en duda. Estos factores hacen difícil determinar cual carácter (DSA ó DSG) es ancestral. La distribución mencionada puede indicar que DSA ha evolucionado independientemente muchas veces y puede sugerir múltiples orígenes independientes de DSA dentro de reptilia y aún dentro de Chelonia (Webb y Cooper-Preston, 1989).

El significado adaptativo de DSA en reptiles se ha discutido, proponiéndose que la DSA será favorecida sobre DSG en situaciones

donde una ventaja del "fitness" (contribución proporcional de individuos a generaciones futuras, con el mayor número de descendientes que deja un individuo en relación al menor número que deja el otro) aumentaría el número de individuos de un sexo particular en un ambiente dado (Charnov y Bull, 1977). Se ha considerado que el crecimiento posteclosión es afectado por las temperaturas de incubación, así, las crías producidas a bajas temperaturas durante la incubación aumentan su crecimiento, en comparación a las producidas a altas temperaturas. Si esto es así, los efectos del crecimiento posteclosión sobre el "fitness" son específicos del sexo. Por ejemplo los machos pueden beneficiarse más que las hembras, creciendo más rápido después de la eclosión. Consecuentemente de acuerdo con el modelo Charnov-Bull, habrá la selección de un mecanismo determinante del sexo que permita la producción de machos a temperaturas bajas de incubación y producción de hembras a temperaturas altas.

Los dos únicos intentos por investigar el significado adaptativo del DST en reptiles han empleado esta clase de propuestas, pero con éxito limitado. En el primero, se observó el crecimiento de *Alligator mississippienses* en huevos incubados a 4 diferentes temperaturas y hasta 18 meses después de la eclosión. Los machos incubados a 34.7° C, eran grandes y fuertes, lo contrario sucedió para las hembras (Janzen y Paukstis, 1991).

En el segundo estudio (Gutzke y Crews, 1988), se encontró que hembras de *Eublepharis macularius* producidas a temperaturas altas de incubación no fueron receptivas sexualmente, mientras que hembras producidas a bajas temperaturas exhibieron receptividad sexual cuando las cortejaban los machos. El comportamiento sexual de machos producidos a diferentes temperaturas no fue significativo. Así que parece haber una selección sexual negativa contra la producción de hembras a altas temperaturas (Joanen et al., 1987). También se ha sugerido que el significado adaptativo de DST puede ser manifestado en el patrón de dimorfismo sexual expresado entre taxa con DST y DSG, o entre taxa con varios tipos de DST.

Por otra parte, investigar los aspectos de determinación del sexo, como de temperatura de incubación, períodos críticos y otros mecanismos, son de suma importancia para la conservación y manejo de reptiles amenazados ó en peligro de extinción que tengan DST. La proporción de sexos podría ser manipulada por un control de la temperatura de incubación en aquellas especies con DST.

ESPECIES ESTUDIADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

Crocodylus acutus (Cuvier, 1807)

Status: En peligro de extinción (CITES, IUCN)

Distribución: Es el cocodrilo con más amplia distribución de América. En la vertiente del Atlántico, desde Florida en los Estados Unidos y Campeche en México hasta el Noreste de Venezuela. Por la vertiente del Pacífico desde Sinaloa en México, hasta el Norte del Perú, también presente en Cuba, Martinica, Trinidad, Jamaica, Haití y la República Dominicana (Thorbjarnarson, 1989).

Hábitat: Esta especie prefiere habitats costeros, manglar, pantanos, esteros, además de ocupar grandes ríos y lagos. Se sabe que se adaptan a varios tipos de aguas como las dulces, salobres e hipersalinas (Thorbjarnarson, 1989).

Dieta: Principalmente peces y otros organismos acuáticos.

Anidación: El ciclo reproductor es anual, la puesta de huevos, es en los meses de marzo-abril (Alvarez del Toro, 1974) y el nido es un hoyo cavado por la hembra utilizado dos tipos de sustrato para cubrirlo, arena y limo; la temperatura de incubación natural está comprendida en un intervalo de 30 °C a 34 °C (Lutz y Dunbar-Cooper, 1984).

Crocodylus moreletii (Bibron & Dumeril, 1851)

Status: En peligro de extinción. CITES, IUCN.

Distribución: Localizado en la vertiente del Atlántico, en las zonas costeras desde el sur de Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche y Yucatán, en México y hasta el Sur de Belice y la región del Peten en Guatemala (Smith y Smith, 1977).

Hábitat: Palustre, charcos, lagos y ríos, y recientemente se les ha registrado en habitats costeros.

Dieta: Se alimenta de pequeños invertebrados acuáticos, cangrejos, peces, aves, reptiles, pequeños mamíferos e incluso animales domésticos como perros y cabras.

Anidación: Ciclo reproductor anual, la temporada de anidación comprendida entre fines de abril y mediados de julio. Los nidos son montículos contruidos por la hembra, de diferentes proporciones de material vegetal, suelo y arena. El tamaño de la nidada varía entre 11 y 51 huevos con un promedio de 30 (Casas-Andreu, 1986). La temperatura de incubación en nidos naturales es entre los 28° C y 34° C (Ferguson, 1985).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre los cocodrilos, la ausencia universal de cromosomas sexuales heteromórficos, implicaría que todos los cocodrilos vivientes exhibieran DST. Sin embargo, los patrones de DST en los pocos representantes estudiados difieren sustancialmente y esta diversidad proporciona argumentos para estudiar a otras especies. No se cuenta con esta información en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*, y menos aún sobre los mecanismos que actúan en la determinación sexual en especies termodependientes, que permitan comprender este fenómeno en el grupo.

En lo que se refiere a la situación actual de *C. acutus* y *C. moreletii*, sus poblaciones han disminuido considerablemente, tanto por la destrucción del hábitat como la explotación de este recurso. Actualmente están en las listas internacionales de especies en peligro de extinción (CITES, IUCN), por lo que es necesario establecer programas de conservación, en los cuales el conocimiento de DST es muy importante, ya que al parecer, los patrones de temperatura podrían ser característicos para cada especie de cocodrilo.

OBJETIVOS

- * Establecer si la temperatura de incubación determina el sexo en *C. acutus* y *C. moreletii*.
- * Determinar el tiempo de formación y establecimiento de la diferenciación gonadal, durante el desarrollo embrionario en *C. acutus*.
- * Establecer si las hormonas esteroides sexuales, constituyen un factor determinante del sexo en cocodrilos.

MÉTODOS

RECOLECTA DE HUEVOS FERTILES

Para llevar a cabo la presente investigación, se recolectaron 3 nidos de *Crocodylus acutus*, con 46 huevos fértiles en la desembocadura del Río Cuitzmala en Jalisco, México, durante la época de anidación en los meses de abril- mayo en 1991 y 1992. Para *Crocodylus moreletii* se obtuvo un nido con 30 huevos fértiles en la granja de cocodrilos en Buena Vista, Tabasco, México, en los meses de mayo- junio de 1992.

SOBREVIVENCIA DEL EMBRION

Los huevos utilizados se encontraban en las primeras etapas de desarrollo reconocidas, de acuerdo con las claves de Ferguson (1985), incubándose posteriormente a 30° C, 32° C y 34° C, en incubadoras con sensibilidad de $\pm 0.5^\circ$ C, con una humedad relativa del 95 % y utilizando vermiculita como sustrato (Grigg, 1987).

HISTOLOGIA

Con el fin de conocer la morfogénesis gonadal se utilizaron los embriones de *C. acutus* incubados a 32 ° C , sacrificándose a los 14, 50, 55, 60, 70, 75 y 81 días de incubación, verificando el estadio de desarrollo embrionario en que se encontraban mediante la clave de Ferguson (1985). Se extrajo de éstos la región urogenital, procesándose los tejidos con la técnica de microscopía electrónica mediante una fijación en Karnovsky, postfijándose después en Tetraóxido de Osmio al 1% y se incluyeron en Epon 812. Se realizaron cortes semifinos de esos tejidos de 1.0 a 1.5 μ m, tiñéndolos con azul de toluidina para microscopía óptica de alta resolución. Se obtuvieron cortes finos de 60 a 90 nm, los que se contrastaron con acetato de uranilo-citrato de plomo para microscopía electrónica.

DETERMINACION DEL SEXO

Para determinar el sexo en *C. acutus* se utilizaron 13, 10 y 12 embriones incubados a 30° C, 32° C y 34° C respectivamente.

Para *C. moreletii*, se incubaron a 30° C, 32° C y 34° C, 10 embriones para cada temperatura. Siete días después de la eclosión, se sacrificaron por decapitación. Se disecaron las gónadas, la derecha fué empleada para histoquímica y la izquierda se procesó para microscopía electrónica de alta resolución de acuerdo con la técnica descrita anteriormente, determinándose el sexo en relación con las características que presentara la gónada a nivel histológico. Para determinar si es un testículo, la gónada debe presentar apariencia compacta, con cordones seminíferos en su interior, rodeados de tejido intersticial. El ovario debe presentar dos regiones, la corteza y la médula; la corteza está constituida de un epitelio engrosado con numerosas células germinales.

HISTOQUIMICA E INMUNOHISTOQUIMICA

La actividad esteroideogénica se registró en 24 ovarios y 10 testículos de los embriones incubados a las temperaturas ya mencionadas, en ambas especies. Se extrajo la gónada derecha a la cual se le realizó la técnica histoquímica para la detección de la actividad de Δ 5-3 B hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 BHSB). Congelando la gónada a -70° C en hexano, se realizaron cortes por congelación a 8 μ m. El medio de incubación se preparó con 20 mg de Nitro Blue Tetrazolium, (NBT, grado III de Sigma), en 20 ml de amortiguador Tris HCl 0.2 M, pH 7.6. Por separado se disolvieron 40 mg de NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleótido) también en 20 ml del amortiguador Tris HCl. Se mezclaron ambas soluciones y se separaron 20 ml para utilizarlos como control. El medio experimental se preparó agregando a los 20 ml restantes de la mezcla arriba descrita, 2 mg de la hormona esteroide (dehidroepiandrosterona), previamente disuelta en 0.5 ml de dimetilamina. Se incubaron a 37° C por una hora, lavándose y fijándose en formalina neutra al 10%, a temperatura ambiente; para definir mejor con esta reacción la estructura de la gónada, se utilizó además, la técnica inmunohistoquímica para la detección de laminina; los cortes anteriores se lavaron, realizándose dos bloqueos de la peroxidasa endógena, el primero con metanol y agua oxigenada y el segundo con albúmina

disuelta en PBS. Después se incubaron con el anticuerpo primario (laminina) por dos horas, nuevamente se lavaron incubándose después con el anticuerpo secundario IgG biotinilado, en albúmina, por una hora; se lavó y se incubó nuevamente con el anticuerpo conjugado AB en albúmina, se revelaron con diaminobenzidina, lavándose y montándose finalmente en glicerol.

RADIOINMUNOANALISIS

Para cuantificar las hormonas esteroides en el suero sanguíneo, se obtuvo la sangre 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 xg/10 min. El volumen de suero en *C. acutus* fué de 1.2-1.3 ml y en *C. moreletii* de 0.5-1.0 ml, se guardó a -4° C, hasta el momento de la medición de las hormonas.

En este trabajo se cuantificaron nueve hormonas esteroideogénicas, por el método de radioinmunoanálisis en una misma muestra biológica. En tubos cónicos de 50 ml con tapón esmerilado, se agregaron aproximadamente 1000 cpm de cada uno de los esteroides por cuantificar; al mismo tiempo se colocaron alícuotas iguales en viales de conteo. Estos esteroides radiactivos sirveron como referencia para cuantificar las pérdidas durante todo el proceso. Posteriormente se añadieron las alícuotas del suero de los cocodrilos. Se realizó el proceso de extracción, adicionando 10 ml de tolueno y se agitron en un mezclador de vibración; se congelo la fase acuosa en un baño de hielo seco-acetona y la fase orgánica, que contenía a los esteroides "libres", fué separada y evaporada a sequedad. A la fase acuosa se le agregó 20% de NaCl, se ajustó a pH 1 con ácido clorhídrico y se realizó una segunda extracción con 10 ml de acetato de etilo. La segunda fase acuosa se desechó y la fase orgánica se incubó a 37 °C durante 12 hrs, al término de las cuales se evaporó a sequedad. En la purificación, los residuos se transfirieron a cromatoplacas de sílica-gel previamente desarrolladas en solución metanólica de EDTA 3mM y en éter etílico 100%. En zonas paralelas se aplicó un microgramo (*mg*) de cada uno de los esteroides por determinar, que sirvieron como punto de referencia. Las cromatoplacas se desarrollaron inicialmente en benceno 100%; una

vez secas, se pasaron a un sistema de benceno: acetato de etilo 1/8:2; finalmente y como en los casos anteriores, el frente del solvente se llevó hasta el borde superior de la cromatoplaça en el sistema saturado de benceno:metanol 1/95:5.

Posteriormente, los esteroides de referencia se revelaron con reactivos de Oërtel (ácido sulfúrico:etanol 1/2:1). Se marcaron las zonas correspondientes a cada uno de los esteroides: 1.3 cm hacia arriba y hacia abajo de su referencia. De cada una de estas áreas se desprendio la sílica-gel y se colectó en pipetas Pasteur empacadas con fibra de vidrio. Los esteroides se eluyeron con una solución de éter etílico: metanol 1/9:5. Después de la elusión se tomaron alícuotas para el análisis y la recuperación.

Para el análisis se construyó la curva tipo de cada esteroide, que se prepara agregando por duplicado alícuotas de una solución de concentración conocida con 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 y 250 nanogramos (ng), además de cuatro tubos de 0.0 ng. Tanto las alícuotas de las curvas tipo como las correspondientes a la muestra se evaporaron a sequedad en un horno a 40 °C y al vacío. Se preparan soluciones de anticuerpo en concentración de 1:1000 en una solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M a pH 7.0, conteniendo azida de sodio y gelatina, ambas al 1%; a estas soluciones se les agregó el esteroide radiactivo correspondiente, en cantidad suficiente para tener 5000 cpm en cada 500 ml de la solución.

A cada uno de los tubos de las curvas tipo y de la muestra se les agregaron 500 ml de la solución de anticuerpo y radiactividad respectiva; posteriormente los tubos se agitaron e incubaron a 4°C durante 36 hrs, al término de las cuales se agregaron 200 ml de una suspensión de carbón activado-dextran (0.25%-0.25% en la misma solución amortiguadora) agitandolas y posteriormente se centrifugaron a 1,500 g durante 15 minutos y a 4° C. El sobrenadante se decantó a viales de conteo, los que fueron adicionados con solución de centelleo (10 ml) y agitados, determinándose la cantidad de radiactividad presente en ellos. Se procedió en forma similar con las alícuotas de recuperación, a las cuales, previa evaporación del solvente, se les agregaron 5 ml de la solución de centelleo.

Después de calcular los porcentajes de unión de los puntos de las curvas tipo, se expresaron gráficamente en logaritmos, teniendo en las ordenadas dichos porcentajes y en las abscisas la dosis; se interpolaron los porcentajes obtenidos para las muestras y posteriormente se corrigieron con la recuperación de cada una de ellas, conociéndose así la masa total inicial.

Después de realizar el análisis, se determinó que los parámetros del control de calidad fueron aceptables, ya que con los sistemas de cromatografía empleados se obtuvo una elevada especificidad; la sensibilidad, considerada como dosis mínima detectable fué de 5 pg/ml; los blancos fueron de 0.0 ng; en cuanto a precisión, en las diferentes dosis de la curva tipo se obtuvieron coeficientes de variación menores de 5%. La exactitud al tomarse como la recuperación de una cantidad conocida de masa fue superior al 70%.

ANALISIS ESTADISTICOS

Para el análisis de los resultados obtenidos en la cuantificación de hormonas esteroides en sueros por RIA, se realizó la prueba de "t" de student, que permitió la comparación de productos finales (testosterona y estradiol), en relación a la temperatura de incubación, al sexo, en las especies estudiadas y un análisis de varianza (ANAVAS) para el grupo con tres temperaturas.

RESULTADOS

SOBREVIVENCIA DEL EMBRION

En *C. acutus* a 30° C (n=12), a 32° C (n=10) y a 34° C (n=13) y para *C. moreletii* a 30° C (n=10), a 32° C (n=10) y a 34° C (n=10), se obtuvo un 96.22 % de sobrevivencia en promedio. Se intentó la incubación a 27-28° C (n=12) pero el desarrollo fue muy lento y no se obtuvo eclosión.

DURACION DEL DESARROLLO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

El período de incubación del embrión es dependiente de la temperatura. El efecto de la temperatura durante el desarrollo está indicado al comparar el total de días de incubación, a las diferentes temperaturas, la relación entre el tiempo total de incubación y la temperatura (cuadros 1 y 2).

En *C. acutus* el desarrollo embrionario es más rápido, si la temperatura aumenta, a 30° C fué de 84 días, a 32° C de 81 días y a 34° C de 76 días. Para *C. moreletii* se observa el mismo efecto de la temperatura en el desarrollo, a 30° C fué de 94 días, a 32° C de 86 días y a 34° C de 80, días siendo un poco más largo que para *C. acutus*; a la eclosión se obtuvo que el vitelo se absorbe mejor a la temperatura de 34° C, observándose una completa invaginación de la vesícula vitelina y la cicatrización de la abertura abdominal, para las dos especies.

Estos resultados nos muestran que a temperaturas de incubación elevadas el desarrollo se acelera y el tiempo de incubación disminuye.

TEMPERATURA	N	PERIODO DE INCUBACION
-------------	---	-----------------------

34 °C	14	76
32 °C	10	81
30 °C	14	84

CUADRO 1. PERIODOS DE INCUBACION EN *Crocodylus acutus*.

TEMPERATURA	N	PERIODO DE INCUBACION
-------------	---	-----------------------

34 °C	9	80
32 °C	10	86
30 °C	10	94

CUADRO 2. PERIODOS DE INCUBACION EN *Crocodylus moreletii*.

HISTOLOGIA

La morfogenesis gonadal de *Crocodylus acutus*, muestra en embriones de 14 días de incubación correspondiente al estadio 4 de desarrollo, presentan los primeros eventos de la morfogénesis de la gónada, la formación de las crestas genitales, localizadas paralelas al mesenterio intestinal en relación con el mesonefros y los primordios de la glándula adrenal (fig. 1).

Histológicamente las crestas genitales (a), presentan la evaginación del epitelio celómico en proliferación y un acúmulo de células mesenquimatosas, por debajo de éste, a nivel ultraestructural se observa el grado de compactación de este mesénquima (b), así como una similitud entre estas células.

En embriones del estadio 23 y 24, con 50 y 55 días de incubación, se observa la estructura de una gónada indiferenciada (fig.2), en donde el epitelio celómico sigue siendo proliferativo, presentando células germinales e interrupciones en la lámina basal del epitelio, indicando la migración de estas células. En el mesénquima, se observan células germinales y la presencia de vasos sanguíneos (a). La interrelación entre células geminales y estromáticas, se muestra en esta etapa, con la formación de los cordones medulares. En esta etapa se evidencia una diferenciación de las células del estroma, en relación a su afinidad tintórea (b), comienzan a relacionarse con las germinales constituyendo los cordones medulares; en el establecimiento de éstos participa el depósito de lámina basal, fibras colágenas y mecanismos de unión puntiforme entre las células epiteliales que están formando los cordones (c). Además se encontró, la participación del sistema nervioso, con la presencia de cordones nerviosos en la gónada indiferenciada (fig. 3).

En la etapa 26, 27 y 28, con 70, 76 y 81 días de incubación respectivamente, se presentó la diferenciación sexual de la gónada, mostrando la estructura histológica de ovario o testículo.

En la diferenciación sexual del testículo (fig. 4), se observa una tendencia a la compactación y un incremento en la vascularización rodeado por una cápsula de tejido conjuntivo (a). En la región medular, las células germinales y las estromáticas se asocian formando los cordones seminíferos (b), reconociéndose a

nivel ultraestructural las presertoli y las germinales en los cordones, delimitados por una lámina basal, y la presencia de células intersticiales entre los cordones (c). El epitelio cortical se reduce a una capa delgada de fibras de colágena y fibroblastos constituyendo la cápsula, presentando algunas células germinales aisladas en su interior (b).

Cuando el ovario se diferencia sexualmente, presenta un mayor volumen con respecto al testículo (fig. 5). Se reconocen claramente dos regiones: la cortical y la medular, separadas por una lámina basal (a). Las células germinales migran hasta la región cortical constituyendo un epitelio de varios estratos, con abundantes células germinales, rodeadas por las células prefoliculares (b). La región medular, muestra vasos sanguíneos, algunas células germinales aisladas y grandes espacios "regiones lagunares", rodeadas por un epitelio cúbico, que va cambiando a epitelio plano simple conforme la región lagunar es de mayor volumen, en los cuales se pueden observar en su interior "productos celulares" (c).



Fig. 1. Cresta genital (Etapa 4, 14 días de incubación, 32°C).
a. epitelio celómico (ec) y condensación del mesénquima (m) X 60. b. Ultraestructura celular, mostrando la compactación de las células mesenquimatosas (cm) X 1950.

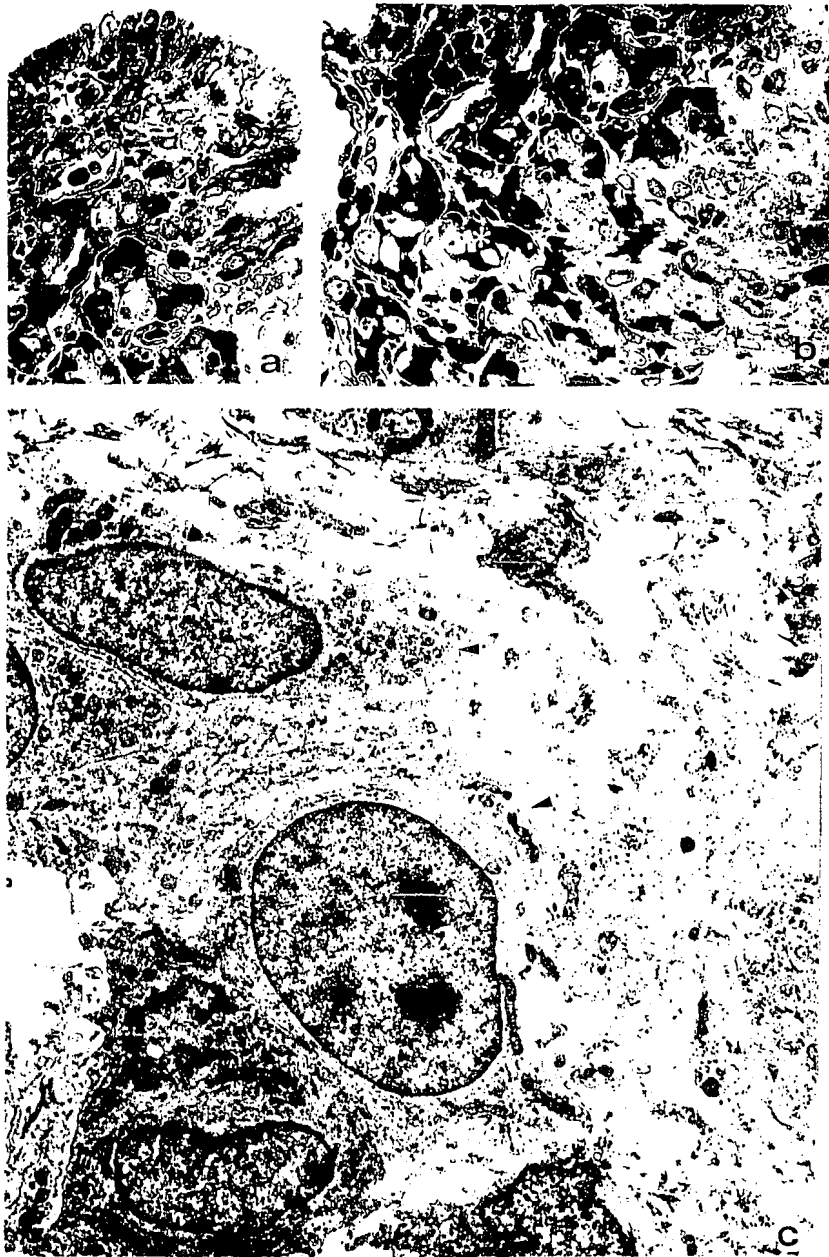


Fig. 2. Gónada indiferenciada (Etapa 23 y 25, 50 y 55 días de incubación, 32°C). a. epitelio celómico (ec) y mesénquima (m) X 60. b. mesénquima y células germinales formando cordones (*) X60. c. presencia de lámina basal (◄) rodeando los cordones medulares. X 1950.

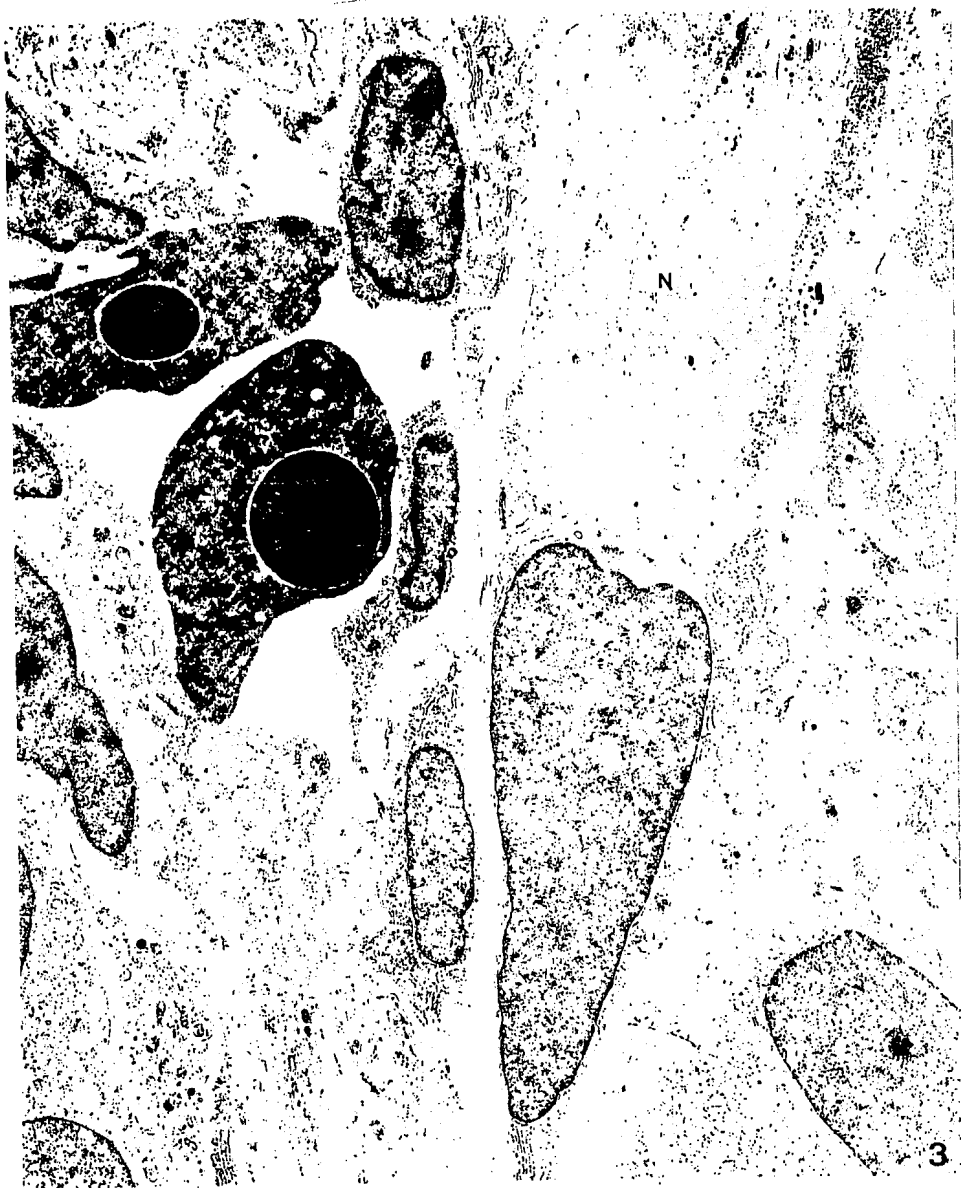


Fig. 3. Cordón nervioso en el interior de la gónada indiferenciada (N) de embrión de 55 días de incubación.
X 1950.

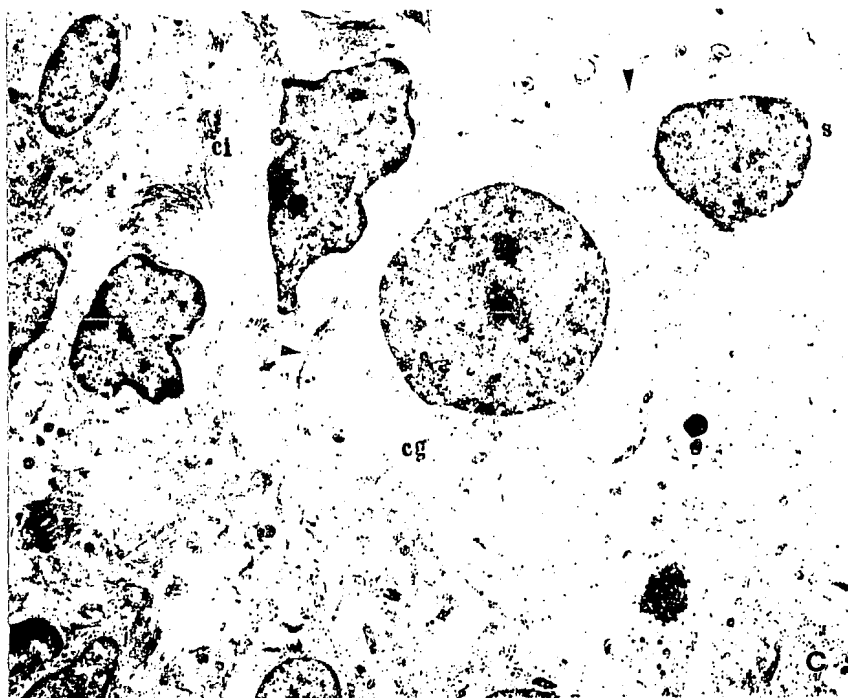
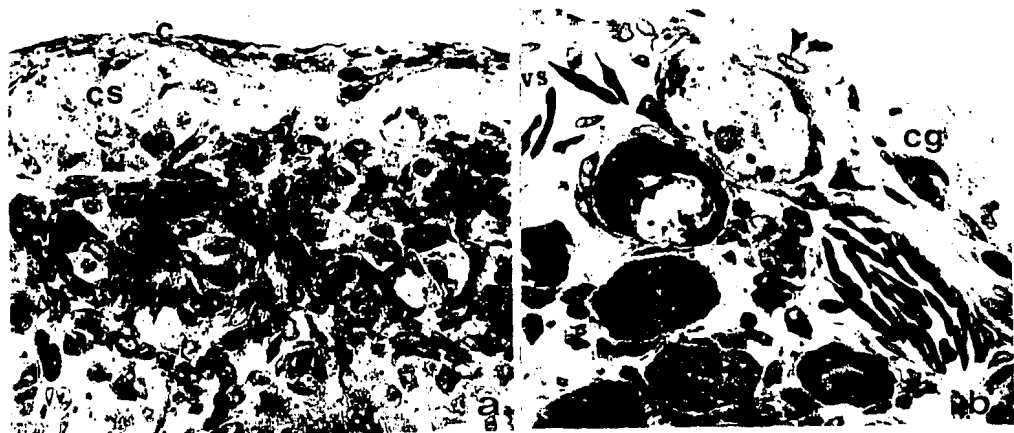


Fig. 4. Testículo (Etapa 27 y 28, 76 y 81 días de incubación, 32°C).
 a. cordones seminíferos (cs), cápsula (c) X 60.
 b. células germinales (cg) en la cápsula y vasos sanguíneos (vs) X 100. c. Ultraestructura de los cordones seminíferos lámina basal (▲), células germinales (cg) y células precursoras de sertoli (s) y células precursoras de intersticiales (ci) X 1950.

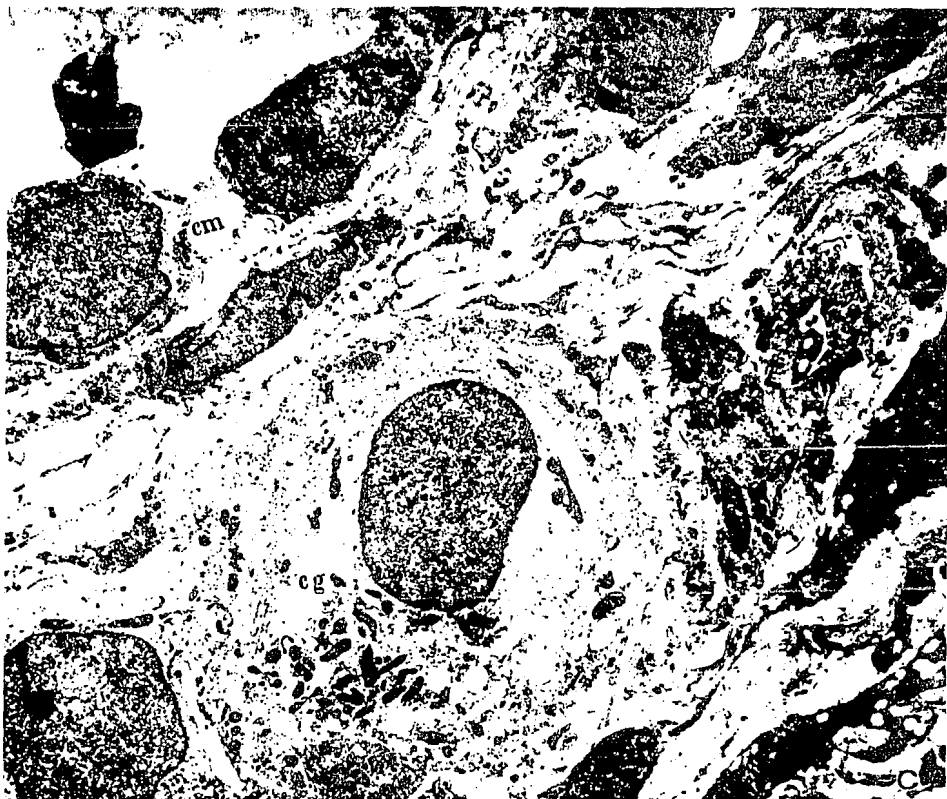
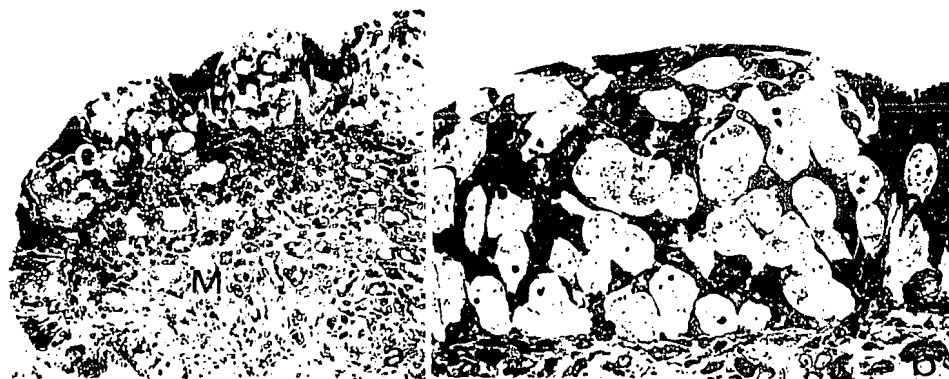


Fig. 5. Ovario (Etapa 27 y 28, 76 y 81 días de incubación, 32°C).
a. Regiones del ovario: corteza (Cz) y médula (M) X 20.
b. Corteza conteniendo células germinales X 60.
c. Ultraestructura de la región medular, con células germinales (cg) y cordones medulares (cm). X 1950.

DETERMINACION DEL SEXO

La relación entre el sexo y la temperatura de incubación bajo condiciones constantes se representa en la cuadros 3 y 4.

Para *C. acutus* a 34° C se obtienen, 100 % hembras, a 32° C machos y hembras en una relación de 50 % para cada sexo y a 30° C, 100% hembras. Así, la producción de machos fue restringida en un rango limitado de temperatura de $> 34^{\circ} \text{C}$ y $\leq 32^{\circ} \text{C}$. En contraste, las hembras se desarrollaron en las tres temperaturas estudiadas.

TEMPERATURA	N	SEXO	%
34 °C	14	♀	100
32 °C	10	♀ ♂	50/50
30 °C	14	♀	100

CUADRO 3. PROPORCION DE SEXOS EN *Crocodylus acutus* POR TEMPERATURA DE INCUBACION.

En *C. moreletii* se obtuvieron a 34° C, 100 % machos, a 32° C, 100 % hembras y a 30° C 100 % hembras. La producción de machos fué restringida a la de temperatura de 34° C y para las hembras en un rango más amplio de 30 a 32° C.

La información obtenida indica que la influencia de la temperatura sobre la determinación del sexo es diferente en las dos especies estudiadas.

TEMPERATURA	N	SEXO	%
34 °C	9	♂	100
32 °C	10	♀	100
30 °C	10	♀	100

CUADRO 4. PROPORCION DE SEXOS EN *Crocodylus moreletii* POR TEMPERATURA DE INCUBACION.

HISTOQUIMICA E IMMUNOHISTOQUIMICA.

La actividad enzimática de la Δ 5-3 B hidroxisteroide deshidrogenasa fué determinada por un precipitado denso, que es el diformazán.

En la región urogenital de organismos posteclosionados, esta actividad se observó unicamente en la glándula adrenal (fig. 6).

Con el empleo de la técnica inmunohistoquímica para laminina, se pudo observar mejor la estructura del testículo (a), en donde se evidencia la laminina, delimitando los cordones seminíferos. La actividad positiva de la enzima Δ 3B HSD, en los 10 complejos urogenitales de machos examinados, fué en la glándula adrenal.

Las hembras producidas a diferentes temperaturas, no presentaron variación en cuanto a la actividad de la Δ 3 B HSD, siendo sólo positiva para la glándula adrenal, observandose la presencia de la laminina delimitando la zona cortical de la medular y rodeando las regiones medulares (b).

En el presente trabajo, no se encontraron diferencias cualitativas significativas de la actividad de la enzima Δ 3B HSD, tanto en testículos, como en ovarios.

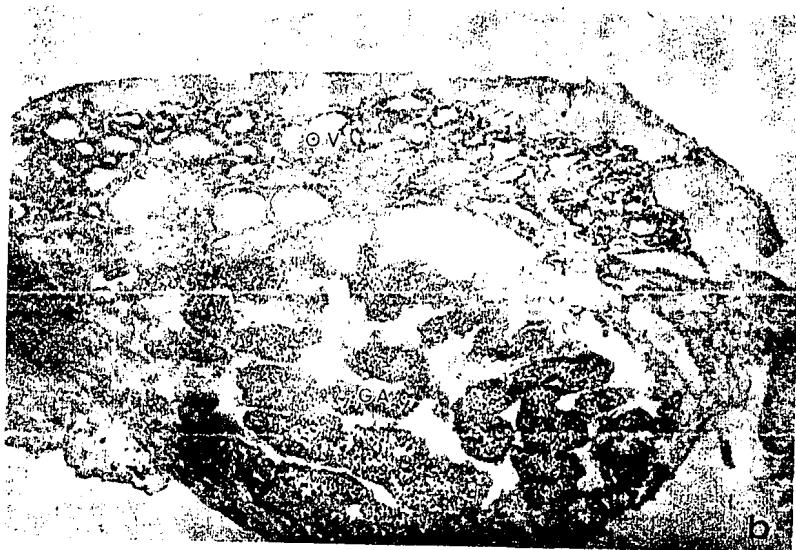
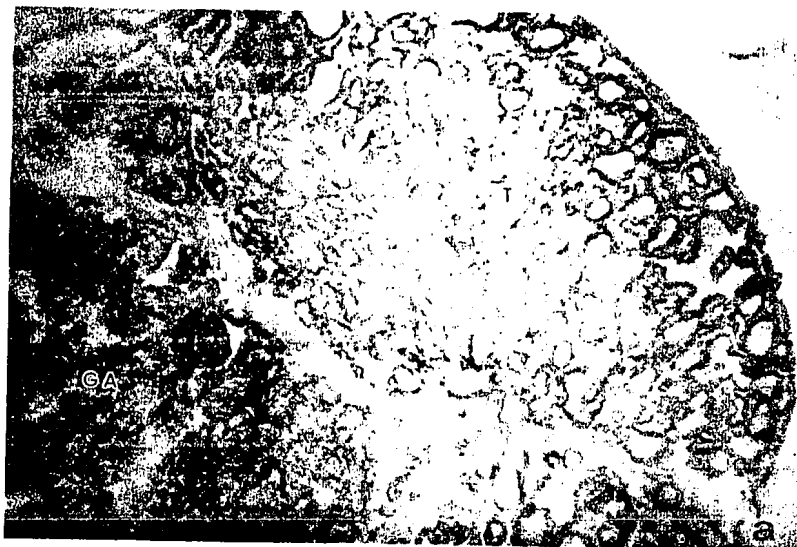


Fig. 6. Micrografía de luz, en la que se observa la reacción a 3 B hidroxisteroide deshidrogenasa (3B HSD) en complejos urogenitales. a. En machos, con reacción positiva en la glándula adrenal (GA), el testículo (T) sin reacción X 20. b. En hembras, reacción positiva en la glándula adrenal (GA) y sin reacción en el ovario (OV). X 16.

RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

La cuantificación sérica de hormonas esteroides sexuales (HES), en organismos posteclosionados de las dos especies estudiadas, se determinaron por medio de RIA y presentándose como concentraciones en pg/ml; los resultados se muestran en el anexo 1 y 2 y los análisis estadísticos en el anexo 3.

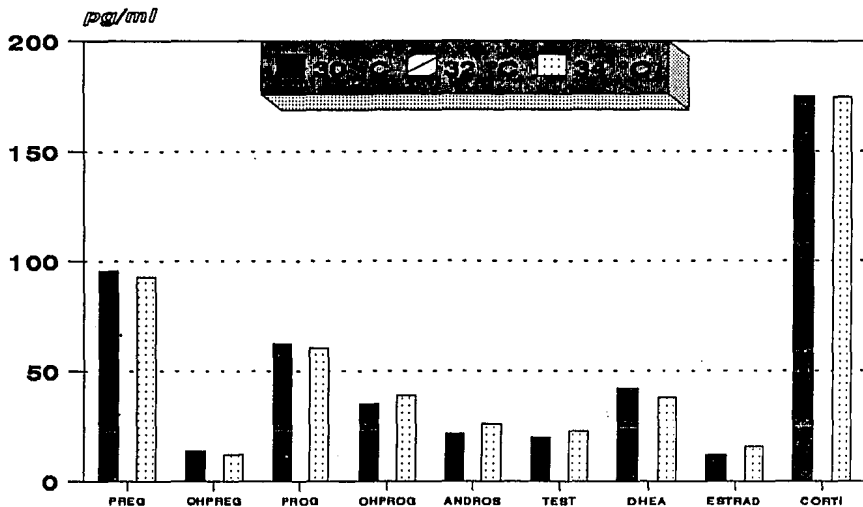
En *C. acutus*, las concentraciones séricas de HES se muestran en la gráfica 1, encontrándose diferencias significativas, entre los incubados a las temperaturas de 30 y 34° C, para androsterona ($t= 5.08$, gl 22, $p < 0.05$), testosterona ($t= 2.43$, gl 22, $p < 0.05$) y estradiol ($t= 2.36$, gl 22, $p < 0.05$), observándose un incremento a la temperatura más alta (34° C).

Para *C. moreletii*, los niveles de HES, presentados en la gráfica 2, muestran diferencias significativas, a las tres temperaturas 30, 32 y 34° C, para pregnenolona [$F(2,25)=315.95$, $p < 0.05$], androsterona [$F(2,25)=7.41$, $p < 0.05$], testosterona [$F(2,25)=136.84$, $p < 0.05$] y estradiol [$F(2,25)=468.80$, $p < 0.05$], existiendo un incremento a mayor temperatura en la mayoría de las hormonas.

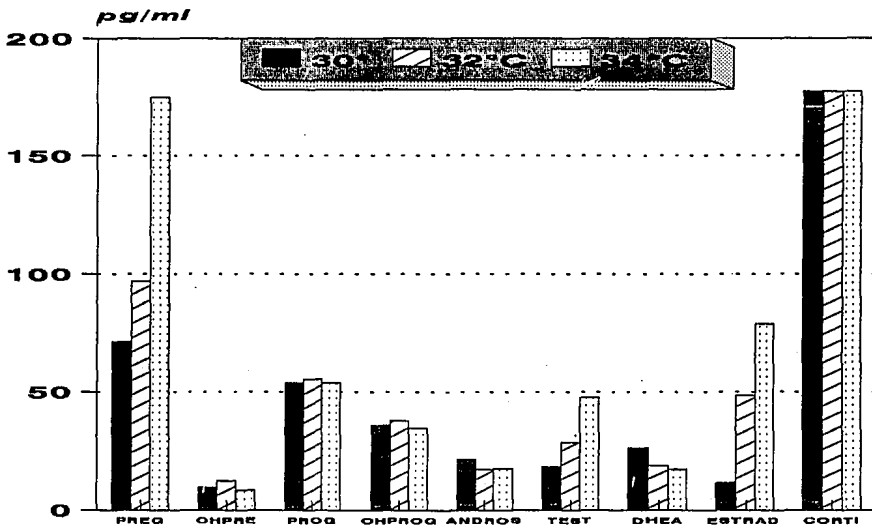
Se observaron diferencias entre las especies, en los niveles de pregnenolona, androsterona, testosterona, dehidroepiandrosterona y estradiol.

En *C. moreletii*, a 30, 32 y 34° C, se puede ver el efecto de la temperatura de incubación, para estradiol y testosterona, en la gráfica 3.

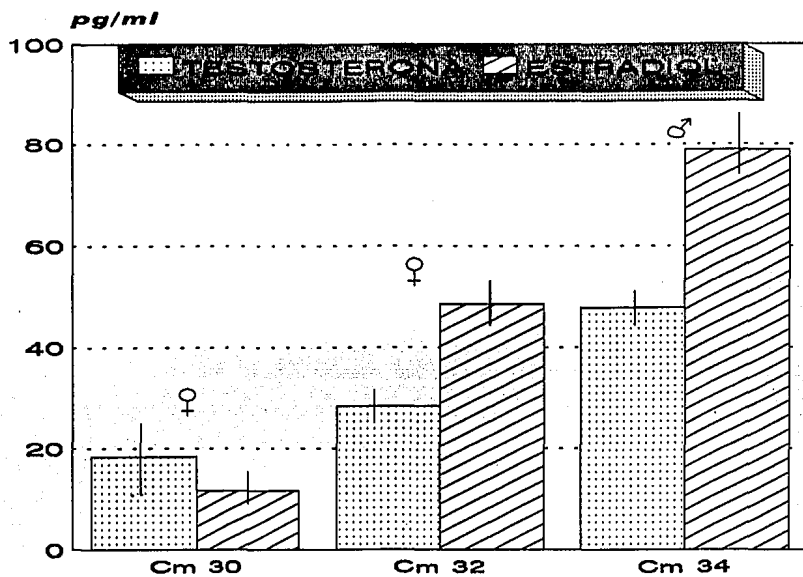
Comparando los productos finales estradiol y testosterona, en ambas especies, a diferentes temperaturas, tenemos que, existen diferencias cuantitativas entre hembras y machos, para el estradiol [$F(4,48)=555.18$, $p < 0.05$] y testosterona [$F(4,48)=115.26$, $p < 0.05$], como se muestra en la gráfica 4, encontrándose los niveles mas altos para los machos.



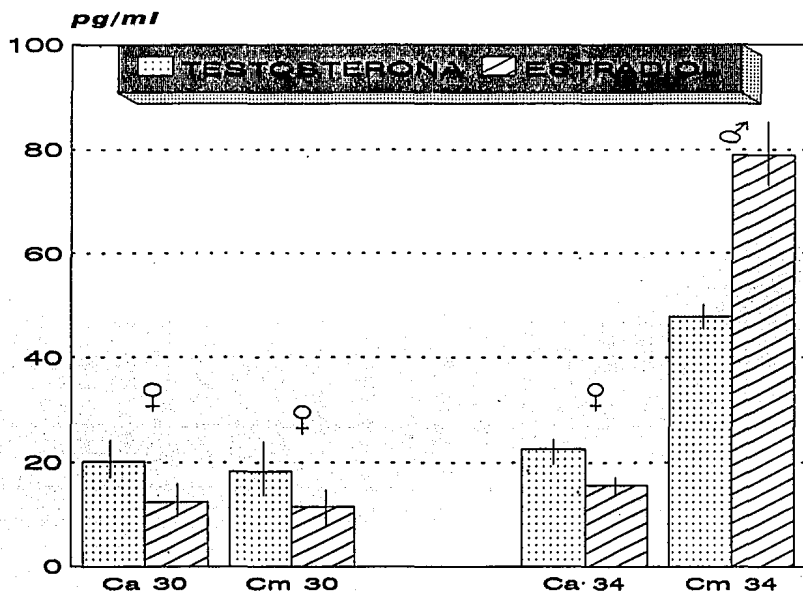
Gráfica 1: RIA (CONCENTRACION DE HES EN SUERO) EN *Crocodylus acutus*.



Gráfica 2: RIA (CONCENTRACION DE HES EN SUERO) EN *Crocodylus moreletii*.



Gráfica 3: RIA (CONCENTRACION DE HES EN SUERO) EN *Crocodylus moreletii*.



Gráfica 4: RIA (CONCENTRACION DE HES EN SUERO).
Ca = *Crocodylus acutus*, Cm = *Crocodylus moreletii*.

DISCUSION

El presente estudio demuestra que la temperatura de incubación afecta tanto la sobrevivencia del embrión, como la duración del desarrollo in ovo de *C. acutus* y *C. moreletii*. Así, sólo se completó el desarrollo de los embriones a temperaturas constantes de 30, 32 y 34° C.

Este rango de temperatura coincide con las registradas para otras especies, en las que también se encontró una alta sobrevivencia de embriones, como en *Alligator mississippiensis* entre 28 y 34° C (Ferguson and Joanen, 1983; Demming y Ferguson, 1989); en *Caiman crocodilus*, entre 28 y 33° C, en *Crocodylus palustris* (Lang, J. W., 1989) y *Crocodylus johnstoni*, entre 29 y 33° C (Webb et al., 1983; Webb y Smith, 1984; Webb et al., 1987) en *Crocodylus niloticus*, entre 28 y 34 °C (Hutton, 1987); para *Crocodylus porosus*, entre 29 y 33 °C (Webb et al., 1987; Webb, 1989), y para *Crocodylus siamensis*, entre 28 y 33° C (Lang, 1987).

El desarrollo del embrión de *C. acutus* y *C. moreletii*, como en otras especies estudiadas, se acelera cuando la temperatura de incubación se aumenta dentro de un intervalo viable. En general, la temperatura de incubación afecta el intervalo de diferenciación y crecimiento del emnbrion en estas especies de cocodrilos, de manera similar a los efectos de temperatura observados para *C. johnstoni*, *C. porosus*, (Webb et al., 1987) y *C. palustris* (Lang, 1989). En desarrollo embrionario en *Crocodylus acutus*, fué de 84 días a 30° C, 81 días a 32° C y 76 días a 34° C y en *C. moreletii*, de 94 días a 30° C, 86 días a 32° C y de 80 días a 34° C, siendo más largo en *C. moreletii*. Por lo tanto, la temperatura de incubación es uno de los determinantes el principales del tiempo de desarrollo del embrión en las especies aquí estudiadas.

En el presente trabajo se encontró que la morfogénesis gonadal de *Crocodylus acutus* concuerda en general con la descripción Ferguson (1985) de la gonadogénesis en *Alligator mississippiensis*.

Durante la morfogénesis gonadal de *Crocodylus acutus*, en la etapa de cresta genital y gónada indiferenciada, se observó el mismo patrón general descrito para otros reptiles, tanto a nivel histológico (Ferguson, 1985; Demming, 1988; Joss, 1989), como a nivel ultraestructural (Merchant-Larios, 1989).

La diferenciación sexual gonadal en testículo, mostro que es igual a la estructura descrita para otros reptiles, y la compactación de los cordones sexuales, exhibió una disminución de tamaño como lo observa Joss (1989). De manera que el tamaño del testículo es considerablemente menor que el del ovario. Además se pudieron identificar, claramente en el testículo, los tipos celulares que lo constituyen: en los cordones medulares las células germinales y las células precursoras de Sertoli; en el tejido intersticial, fibroblastos y precursoras de Leydig y numerosos vasos sanguíneos. Asimismo, el testículo mostró una cápsula de tejido conjuntivo, con predominancia de fibras colágenas y algunas células germinales aisladas.

La estructura del ovario presenta diferencias respecto a lo registrado en otras especies. Particularmente para la región de la médula, la cual se ha descrito como una estructura compacta (Ferguson, 1985; Demming y Ferguson, 1988; Joss, 1989), e inclusive se ha descrito que posee características de una gónada indiferenciada. En nuestro estudio encontramos que, presenta una estructura de ovario bien definida, diferenciándose dos regiones, la cortical, con un incremento en células germinales en íntima asociación con las precursoras de las células foliculares y en la región medular con "regiones lagunares" constituidas por espacios que van aumentando de tamaño y modificando su epitelio de cúbico a plano simple conforme se desarrolla la gónada.

En las especies de cocodrilos estudiados hasta la fecha, la temperatura de incubación tiene un efecto directo sobre la determinación del sexo, pero la respuesta a la temperatura es diferente (Dovrnnon, 1990).

En el presente estudio se encontró que el sexo en *C. acutus*, se determina por la temperatura de incubación. En el laboratorio, fueron incubados huevos fértiles en las primeras etapas de desarrollo a temperaturas constantes de 30, 32 y 34° C,

obteniéndose 100 % hembras a 30 y 32° C y una proporción de 50 a 50 % tanto de machos como hembras a 32 ° C.

En relación a la proporción de sexos obtenidos en *C. acutus*, podemos decir que la respuesta a la temperatura de incubación se asemeja a la descrita para *C. johstoni* (Webb y Smith, 1984) en donde las hembras se obtuvieron a todas las temperaturas de incubación y el rango para producir machos fué reducido, ya que a 32° C se obtuvieron solamente el 50%. Sin embargo, queda por hacer otra incubación a una temperatura intermedia, para comprobar si hay mayor proporción de machos a esta temperatura intermedia ó si es más restringido este intervalo.

En esta investigación se encontró que para *C. moreletii* el sexo se determina también por la temperatura de incubación. Se incubaron huevos fértiles, recién puestos, a temperaturas constantes de 30, 32 y 34° C y la proporción de sexos obtenida fué de, 100% machos a 34° C y de 100 % hembras a 30 y 32° C. De manera que en esta especie, existe una notable semejanza con el mecanismo de respuesta a la temperatura de incubación, descrita por Ferguson y Joanen (1982), para *A. mississippiensis* en donde el 100% son machos a 34° C y por debajo de esta temperatura se producen hembras en distintas proporciones. Cabe mencionar que una respuesta similar en estas temperaturas se ha descrito en *C. niloticus*, *C. siamensis*, *Caiman crocodylus* (Deeming and Ferguson, 1988) y *C. palustris* (Lang, 1989).

Las diferencias en la respuesta a las temperaturas de incubación, pueden estar correlacionadas con los hábitos de anidación. En *C. acutus* el tipo de nido que construye es un hoyo ó montículo de suelo (Thorbjarnarson, 1989) y para *C. moreletii* el tipo de nido es en montículo de vegetación (Casas-Andreu, 1986). Lang (1989) hizo una comparación entre patrones de anidación en *C. palustris*, y *C. niloticus*, mencionando que puede haber alguna correlación entre los patrones de anidación y la respuesta de determinación del sexo en estas especies, pero que para asegurarlo, habría que realizar trabajos de ecología de nidos.

Desafortunadamente no hay datos relacionados con la proporción sexual en nidos naturales de *C. acutus* y *C. moreletii*, por lo que no es posible establecer si la estrategia de respuesta a la

temperatura de incubación, tendría implicaciones ecológicas generadas por la misma especie. Sin embargo, se ha citado que en *C. palustris* (Lang, 1989) hay mayor proporción de hembras en condiciones naturales. En otras especies se encontró que hay una proporción de sexos balanceada (aproximadamente 50% de cada sexo) en poblaciones de *A. mississippiensis* (Ferguson y Joanen, 1983), de *C. johnstoni* (Webb y Smith, 1984) y *C. niloticus* (Hutton, 1987).

Es importante poder conocer la actividad esteroidogénica de las gónadas, en relación con una de las hipótesis sobre los mecanismos de DST, que establece cuales son los efectos de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal (Gutzke, 1987; Crews and Bull, 1987; Crews et al., 1988). En experimentos de cambio de una temperatura a otra, en anfibios y reptiles, se sugiere un efecto-dosis de la temperatura, con la producción de una sustancia (ó sustancias) ya sea feminizantes o masculinizantes por arriba, o por abajo, de cierto umbral, en el que las hormonas esteroides podrían ser esas sustancias. De manera que el sexo gonadal podría determinarse por los niveles de andrógenos o estrógenos en la gónada (Bogart, 1987). Estos niveles, a su vez, estarían regulados por el complejo enzimático que convierte la testosterona en estrógenos. Existen además otros estudios que proveen datos para apoyar esta hipótesis, como la aplicación de estrógenos exógenos (y en algunos casos andrógenos), causando una feminización parcial o completa en muchas especies con DST, cuando son administrados en el período sensible de la diferenciación gonadal (Gutzke and Bull, 1986; Bull, Gutzke and Crews, 1988; Crews and Bull, 1987; Crews et al., 1989; Pieau et al., 1989).

Para evidenciar la capacidad de las gónadas y órganos adyacentes (mesonefros y adrenales) para biosintetizar hormonas esteroides sexuales (HES), después de su diferenciación, en forma indirecta se han utilizado las técnicas histoquímicas.

Una de las enzimas que más se han estudiado es la Δ^3 B hidroxiesteroide deshidrogenasa (Δ^3 B HSD). La actividad de ésta enzima se determina através de un proceso de oxido-reducción, el cual es dependiente del Nicotinamide Adenine Dinucleótido (NAD) en su forma oxidada. El resultado de esta reacción es un

precipitado morado insoluble llamado "formazán", cuyo depósito nos permite localizar el tejido esteroideogénico. Esta técnica proporciona información de tipo cualitativo, de tal manera que, la reacción enzimática puede ser clasificada como positiva si hay detección del precipitado y permite identificar in situ el tejido que lo presente.

En el caso particular de reptiles con determinación del sexo dependiente de la temperatura, la actividad enzimática de la Δ^3 B HSD, ha sido determinada en embriones de *Emys orbicularis*, en los que muchos andrógenos se encontraron a más altas concentraciones en testículo, que en ovario y con intensa actividad de la Δ^3 B HSD (Pieau, et al., 1982). Joss (1989), hizo una observación similar para *A. mississippiensis*; en este estudio los resultados no denotan actividad esteroideogénica en la gónada, en contraste con lo registrado por Joss, sin embargo, esta actividad es muy positiva en la glándula adrenal, de igual forma a lo citado por Merchant-Larios et al., (1989), para *Lepidochelys olivacea*. Las evidencias mencionadas sugieren que: la diferenciación sexual gonadal se da, al regularse el metabolismo de andrógenos y/o estrógenos en *E. orbicularis* y en el caso del *A. mississippiensis*, aunque se señala la reacción positiva de la Δ^3 B HSD en gónada, no se presenta evidencia morfológica de la reacción; para *C. acutus* y *C. moreletii*, aquí estudiadas, así como para *L. olivacea*, la regulación metabólica de HES, parece darse mediante la glándula adrenal.

En relación con la cuantificación de los niveles de hormonas esteroideas sexuales en suero de los cocodrilos, resulta difícil hacer una comparación, ya que no existen trabajos hasta ahora en otras especies de cocodrilos. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Pieau y col. (1982) en *Emys orbicularis*: las concentraciones de testosterona en machos son más altas, con respecto a las hembras. Sin embargo, para *L. olivacea*, en el momento de la eclosión, no hay diferencias en relación a los niveles de estrógenos y andrógenos en suero (Salame, 1992), por lo tanto los resultados aquí presentados coinciden con lo planteado por Bogart (1987), quien registró bajos niveles de estrógenos

endógenos en hembras y altos niveles en machos.

En *L. olivacea* la diferenciación del ovario ocurre antes que la del testículo, (Merchant-Larios y col., 1989), pero en estos organismos la diferenciación de hembras es a temperaturas altas, lo que sugiere que el metabolismo de HES se incrementa en función de la temperatura y no en relación con la diferenciación del sexo. En *C. moreletii* la diferenciación de machos (que es donde se obtuvieron los niveles más altos de estradiol y testosterona) se encontró que a temperaturas altas (34° C), por lo que las diferencias en los niveles de HES, podrían ser interpretadas en términos de un metabolismo diferencial de HES, en función del sexo y la temperatura de incubación.

Desde un punto de vista filogenético al comparar *C. acutus* y *C. moreletii*, existe cierto conflicto en cuanto a criterios taxonómicos tradicionales y técnicas actuales, como los estudios de citogenética realizados por Cohen, (1970), que establece la similitud entre estas especies, por presentar el mismo número cromosómico $2N= 32$ y la distribución de cromosomas metacéntricos iguales, existiendo solo diferencias en cuanto al número submetacéntrico y telocéntrico. Desde el punto de vista molecular Desmore (1989), analizó la divergencia de proteínas y endonucleasas de restricción en DNA mitocondrial y ribosomal señalando que *C. acutus* y *C. moreletii*, provienen de una misma línea y que posiblemente se presentó la separación de estas especies en épocas relativamente recientes.

Algunos autores consideran, que los criterios ontogenéticos también son importantes para ver semejanzas o diferencias entre especies. Por lo tanto, en este trabajo al hacer una comparación, de manera indirecta, entre *C. acutus* y *C. moreletii* con relación al período embrionario, la respuesta de determinación del sexo por efecto de la temperatura de incubación y el comportamiento de los niveles de hormonas esteroides sexuales, bajo las mismas condiciones, se encontró que también existen diferencias entre las dos especies, lo que daría apoyo a los resultados de Desmore (1989).

VI. CONCLUSIONES

I. En *C. acutus* y *C. moreletii* la determinación del sexo es por efecto de la temperatura de incubación.

II. La respuesta a la diferenciación sexual gonadal por efecto de la temperatura de incubación varía en las dos especies estudiadas: en *C. acutus* se producen hembras a todas las temperaturas de incubación, presentando una reducción extrema del intervalo de temperatura para la diferenciación de machos. Para *C. moreletii*, a temperaturas altas (34° C), se producen 100 % machos, a 32 y 30° C, se producen hembras, habiendo un rango de temperatura mayor para producir machos, que en *C. acutus*.

III. En *Crocodylus acutus* durante la morfogénesis gonadal la diferenciación de ovario ó testículo es tardía a partir del estadio 27 (clave de Ferguson, 1985) y la estructura histológica del ovario presenta diferencias con respecto a lo descrito por otros autores, esto es, una corteza constituida de un epitelio engrosado en donde hay predominancia de células germinales, rodeadas por algunas células precursoras de foliculares, y en la región de la médula presenta grandes "regiones lagunares" recubiertas de epitelio simple cúbico y plano simple en los espacios mayores.

IV. Los niveles séricos de las hormonas esteroides sexuales (HES), mostraron diferencias cualitativas, entre hembras y machos. Sin embargo, la temperatura regula los niveles de androsterona, testosterona y estradiol. Asimismo, existen diferencias en los niveles de algunas HES, entre *C. acutus* y *C. moreletii*.

V. La actividad esteroidogénica del complejo urogenital, fué detectado solamente en la glándula adrenal, por lo que parecería que la gónada no está interviniendo directamente en el metabolismo de hormonas esteroides sexuales. Sin embargo, no hay que excluir la posibilidad de que la gónada posea aromatasas, para la transformación de andrógenos en estrógenos.

VI. Además la presencia de nervios en la gónada indiferenciada, sugiere la participación del sistema nervioso sobre la diferenciación gonadal.

LITERATURA CITADA

- Adams, J., P. Greenwood, and C. Naylum. 1987. Evolutionary aspects of environmental sex determination. *Int. J. Invertebr. Reprod. Develop.*, 11: 123-136.
- Alvarez del Toro, M. 1974. *Los Crocodilia de México*. Inst. Méx. Rec. Natur. Renov. México. D.F. 70 p.
- Austin, H. B. 1989. Mullerian-Duct Regression in the American Alligator (*Alligator mississippiensis*): Its Morphology and Testicular enduction. *Jour. Exp. Zool.* 251: 329-338.
- Beal, A. M.. and G. J. W. Webb. 1989. Effect of incubation temperature on tooth eruption in embryos of *Crocodylus johstoni*. *Copeia* (2): 225-331.
- Bogart, M. H. 1987. Sex determination: A Hypothesis based on steroid ratios. *J. Theor. Biol.*, 128: 349-357.
- Bull, J. J. 1980. Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.* 55: 3-21
- Bull, J. L. 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin/Cummings, Menlo Park.
- Bull, J. J., D, M. Hillis, and S. O. Steen. 1988. Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardles of sex-determining mechanism. *Science*, 242: 567-569.
- Bull, J.J. and Vogt, R. C. 1979. Temperature-Dependet sex determination in turtles. *Science* 206: 1186-1188.
- Bull, J.J., R. C. Vogt, and M. G. Bulner. 1982. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution* 36: 333-341.
- Caroll, R. L. 1988. *Vertebrate paleontology and evolution*. W. H. Freeman. New York.
- Casas-Andreu, G. 1986. Observaciones sobre los nidos y las nidadas de *Crocodylus moreletii* en México. *An. Inst. Cienc. Mar. Limnol. Univ. Nat. Autón. México.* 13 (1): 223-330.
- Charnier, M. 1966. Action de la temperature sur le sex ratio chez l'embryon d' *Agama agama* (Agamidae, Lacertillen). *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 160: 620-622.
- Charnov, E. L., and J. Bull. 1977. When is sex environmentally determined. *Nature*, 266: 828-830.

- Cohen, M. M. and C. Gans. 1970. The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetic* 9: 81-105.
- Crews, D., and J.J. Bull. 1987. Evolutionary insights from reptilian sexual differentiation. In F. P. Haseltine, M.F. Mc Clure, and E. H. Goldberg (eds.), *Genetic Markers of Sex Differentiation*. Pp. 11-26. Plenum, New York.
- Crews, D., J.J. Bull, and A. J. Billy. 1988. Sex determination and sexual differentiation in reptiles. In J. M. D. Sitsen (ed.), *Handbook of Sexology Vol. 6: The Pharmacology and endocrinology of Sexual Function*. Pp. 98-121. Elsevier Science Publ., New. York.
- Crews, D. T. Wibbles, and W. H. N. Gutzke. 1989. Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen Comp. Endocrinol.*, 76: 159-166.
- Deeming, D.C. and M. W. J. Ferguson. 1988. Environmental regulation of sex determination in reptiles. *Phil. Trans. R. Soc. London. B.*, 322: 19-39.
- Deeming, D. C. and M.W.J. Ferguson. 1989. Effects of incubation temperature on growth and development of embryos of *Alligator mississippiensis*. *J. Comp. Physiol.* 159 (2): 183-194.
- Deeming, D.C. and M. W. J. Ferguson. 1989. The mechanism of temperature dependent sex. Determination in Crocodylians. A Hypothesis. *Amer. Zool.* 29: 973-985.
- Deeming, D.C. and M. W. J. Ferguson. 1990. Morphometric analysis of embryonic development in *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus johstoni* and *Crocodylus porosus*. *J. Zool. Lond.* 22(3):419-439.
- Demas, S., M. Duronslet, S. Wachtel, C. Caillovet; and D. Nakamura. 1991. Sex Specific DNA in reptiles with temperature sex determination. *J. Exp. Zool.* 253: 319-324.
- Demas, S. and S. Wachtel. 1991. DNA fingerprinting in reptiles: Bkm hybridization patterns in Crocodylia and Chelonia. *Genome* 34: 472-476.

- Densmore, L. D. 1983. Biological and immunological systematics of the order Crocodylia. In M. K. Hecht, B. Wallace and G. H. Prance (eds). **Evolutionary Biology 16**. Plenum Press, New York.: Pp. 397-465.
- Densmore, L. D. and R. Owen. 1989. Molecular systematics of the order Crocodylia. **Amer. Zool. 29**: 831-841.
- Dournov, C., C. Houillon and C. Pieau. 1990. Temperature sex-reversal in Amphibians and Reptiles. **J. Dev. Biol. 34**
- Eckert, R., D. Randall y G. Augustine. 1989. **Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones**. Interamericana- Mc Graw Hill. 683 p.
- Engel, W., B. Klemme, and M. Schmid. 1981. H-Y antigen and sex determination in turtles. **Differentiation, 20**: 152-156.
- Ferguson, M. W. J. and T. Joanen. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. **Nature (London)**., **296**: 850-853.
- Ferguson, M. W. J. and T. Joanen 1983. Temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. **J. Zool.**, **200**: 143-177.
- Ferguson, M. W. J. 1985. The reproductive biology and embryology of crocodylians. In C. Gans F.S. Biller and P.F. A. Merderson (eds). **Biology of the Reptilia vol 14**. Wiley and Sons. New York. 329-491.
- Ferguson, M. W. J. 1987. Post-laying stages of embryonic development for crocodylians. In G. J. W. Webb, S. C. Manolis and P. J. Whitehead (eds.). **Wildlife Management: Crocodiles and Alligators**. pp. 427-444. Surrey Beatty and Sons, Sydney.
- Fox, H. 1977. The Urinogenital System of Reptiles. In C. Gans and T. Parsons. **Biology of the Reptilia. Vol. 6**. Academic Press. New York: Pp. 48-56.
- George, F. W. and J. D. Wilson. 1988. Sex determination and differentiation. In E. Knobil and J. Neill. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, Ltd, New York: Pp. 3-26.

- Grigg G. C.. 1987. Water relations of Crocodylian eggs: Management Considerations. In G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P. J. Whitemend (eds.), **Wildlife Management: Crocodiles and Alligators**. Surrey Beattty and Sons, Sydney: Pp. 499-502.
- Gutzke, W. H. N. 1987. Sex determination and sexual differentiation in reptiles. *J. Herpetol.*, 1: 122-125.
- Gutzke, W. H. N. and D. Crews. 1988. Embryonic temperature determines adult sexuality in a Reptile. *Nature*, 332: 832-83.
- Hardisty, N. W. 1977. Primordial germ cells and the vertebrate germ line. In *The Vertebrate Ovary*. Jones R. E. (ed). Plenum Press: Pp 1-46.
- Hutton, J. M. 1987. Incubation temperatures, sex ratios and sex determination in a population of Nile Crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *J. Zool. (London)*. 211: 143-155.
- Janzen, J. F. and G. L. Paukstis. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology* 2: 149-179.
- Joanen, T. L., L. McNease, and M. W. J. Ferguson. 1987. The effects of egg incubation temperature on post-hatching growth of American Alligators. In G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P. J. Whitehead (eds.). **Wildlife Management: Crocodiles and Alligators**. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton: Pp. 533-537.
- Joanen, T., and L. L. Mc. Nease. 1989. Ecology and physiology of nesting and early development of the American Alligator. *Am. Zool.*, 29: 987-998.
- Joss, J. M. P. 1989. Gonadal development and differentiation in *Alligator mississippiensis* at male and female producing incubation temperatures. *J. Zool. Lond.*, 218: 679-687.
- Joss, J. M. P., and Cuff. 1987. Steroidogenesis during gonadal differentiation in the salt water crocodile, *Crocodylus porosus*. *Am. Zool.*, 27: 66A.

- Lang, J. W. 1987. Crocodylian thermal selection. In G.J.W. Webb, S.C. Manolis and P. J. Whitehead (eds.), **Wildlife Management: Crocodiles and Alligators**. Surrey Beatty and Sons, Sydney: Pp. 301-317.
- Lang, J. W. 1989. Sex determination and sex ratios in *Crocodylus palustris*. **Amer. Zool.** 29: 935-952.
- Lutz, P. L. and A. Dunbar-Cooper. 1984. The nest environment of the American Crocodile *Crocodylus acutus*. **Copeia** (1): 153-161.
- Manolis, S.C., G. J. W. Webb and K. E. Depsex. 1987. Crocodile egg chemistry. In G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P. J. Whitehead (eds.). **Wildlife Management: Crocodiles and Alligators**. Surrey Beatty and Sons, Sydney: Pp. 445-472.
- Merchant-Larios, H. 1977. Ovarian Differentiation. In **The Vertebrate Ovary**. Jones R. E. (ed). Plenum Press: Pp. 47-81.
- Merchat-Larios, H. 1984. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In **Ultrastructure of Reproduction**. J. Van. Blerkom and P. M. Motta, Eds. Martinus Nijhoff. Publ. Netherland: Pp.19-30.
- Merchant-Larios, H., I. Villalpando Fierro and B. Centeno Urriza. 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **Herpetological Monographs.**, 3: 43-61.
- Merchant-Larios, H., and I. Villalpando. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. **J. Exp. Zool.**, 254: 327-331.
- Merchant-Larios, H. and T. Taketo. 1991. Testicular differentiation in Mammals under normal and experimental conditions. **J. Electron Microscopy Technique** 19: 158-171.
- Paukstis, G. L., and F. J. Janzen. 1990. Sex determination in reptiles: Summary of effects of constant temperatures of incubation on sex ratios of offspring. **Smithson. Herpetol. Info. Serv.**, 83: 1-28.

- Pieau, C. 1971. Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux Chéloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'œufs incubés artificiellement. *C. R. Acad. Sci. Paris (Ser. D)*. **272**: 3071-3074.
- Pieau, C. 1972. Effects de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. *C. R. Acad. Sci. Paris (Ser. D)*. **274**: 719-722.
- Pieau, C., T. Mignot, M. Dorizzi, and A. Guichard. 1982. Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L.: A preliminary study in embryos, hatchlings, and young as a function of the incubation temperature of eggs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **47**: 392-398.
- Pieau, C., M. Dorizzi, and G. Desvages. 1989. Mechanisms involved in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in amphibians and reptiles. In T. Halliday, K. Baker, and L. Hosie (eds), First World Congress of Herpetology, 11-19. September 1989 (abstr). University of Kent, Caterbury.
- Salame-Méndez, P. A. 1992. La Temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroides sexuales y su relación en el establecimiento gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1929). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias U.N.A.M.
- Smith, H. M. and R. B. Smith. 1977. Synopsis of the herpetofauna of México. Vol. V. John Johnson 5. North Bennigton V.T. Pp 49-101.
- Terrence, R. T., M. Mitchell and S. Wachtel. 1991. Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Human Genetics*. **87**: 571-573.
- Thorbjarnarson, J. B. 1988. The status and ecology of the American Crocodile in Haiti. *Bull. Florida State Museum*. Vol. **33**. 1:1-86.

Thorbjarnarson, J. B. 1989. Ecology of the American Crocodile, *Crocodylus acutus*. In *Crocodyles their Ecology Management and Conservation. I.U.C.N. Publ. (N.S.):* 228-259.

Vogt, R. C. and Bull, J. J. 1982. Genetic sex determination in the spiny softshell *Trionyx spiniferus* (Testudines: Trionychidae). *Copeia*. 1982: 699-700.

Webb, G. J. W., R. Buckworth, and S. C. Manolis. 1983. *Crocodylus johnstoni*, in the Mc Kinlay River area, N. T. VI. Nesting biology. *Aust. Wildl. Res.* 10: 607-637.

Webb, G. J. W., S. C. Manolis and G. C. Sack. 1984. Cloacal sexing of hatchling crocodiles. *Aust Wildl. Res.* 11: 201-202.

Webb, G. J. W., and A. M. D. Smith. 1984. Sex ratio and survivorship in the Australian freshwater crocodile *Crocodylus johnstoni*. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 52: 319-355.

Webb, G. J. W., A. M. Beal, S. C. Manolis, and K. E. Dempsey. 1987. The effects of incubation temperature on sex determination and embryonic development rate of *Crocodylus johnstoni* and *C. porosus*. In G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P. J. Whitehead (eds.), *In Wildlife Management: Crocodiles and Alligators*, Surrey Beatty and Sons, Sydney: Pp. 507-531.

Webb, G. J. W. and H. Cooper-Preston. 1989. Effects of incubation temperature on crocodiles and the evolution of reptilian oviparity. *Amer. Zool.* 29: 953-971.

Witschi, E. 1959. Age of sex - Determining mechanisms in vertebrates. *Science*, 130: 372- 375.

Yntema, C. L. 1976. Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.*, 150: 453-462.

Yntema, C. L. 1979. Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.* 159: 17-28.

Yntema, C. L. and N. Mrosovsky. 1980. Sexual differentiation in hatching loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica.* 36: 33-36.

Zaborski, P., M. Dorizzi, and C. Pieau. 1979. Sur l' utilisation desérum anti-H-Y de souris pour la détermination du sexe génétique chez *Emys orbicularis* L. (Testudines Emydidae). C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris (Ser. D), 288: 351-354.

RIA en *Crocodylus acutus*

TEM C	PROG	OHPRG	PROG	OHPRG	ANDROS	TESTOS	DHEA	ESTRAD	CORTICOS
30	93.58	18	58.38	37.3	19.35	18.41	38	11.39	171.8
30	94.18	13	80.84	38.54	20.4	17.8	48	9.54	170.8
30	91.51	15	81.39	38.4	23.12	19.54	41	10.37	177.5
30	93.15	28	59.47	31.54	22.4	20.3	37	12.45	170.8
30	92.45	10	57.8	30.84	27.31	28.4	31	17.39	178.4
30	94.51	12	58.48	38.13	19.39	18.7	43	10.2	181.8
30	97.39	11	80.84	34.54	20.83	19.54	42	17.7	172.8
30	98.58	10	80.31	38.84	22.3	20.13	51	9.58	178.1
30	96.31	13	81.74	35.73	24.8	17.2	45	12.02	172
30	95.81	15	57.39	34.8	18.7	23.12	48	10.7	171.8
30	94.4	16	59.8	38.31	19.3	17.88	37	18.54	174.8
30	98.58	15	58.48	38.8	25.15	19.3	54	18.03	182.5
30	99.3	17	58.13	35.8	21.03	28.7	39	11.3	174.3
30	98.82	13	112.39	33.17	19.15	20.41	44	11.21	178.5
X	95.43	14.07	82.02	35.28	21.5	20.17	42	12.4	175.18
S	2.44	4.48	14.29	2.18	2.82	3.01	6	3.18	3.98
34	98.18	12	83.18	41.39	27.12	24.31	32	18.7	173.8
34	91.31	17	58.15	38.47	25.38	25.54	45	15.8	180.2
34	93.88	15	80.84	39.54	28.51	22.3	30	14.54	170.7
34	97.18	8	59.7	40.15	25.38	23.31	29	15.4	173.8
34	90.58	11	80.13	37.8	28.4	21.4	35	17.31	179.1
34	92.14	10	59.43	38.54	29.54	21.4	39	14.58	171.1
34	91.54	11	80.21	40.11	25.13	22.58	42	18.39	177.4
34	90.31	12	82.73	38.41	28.18	24.81	48	17.41	178.8
34	91.58	14	59.18	38.8	23.48	20.31	45	15.5	172.4
34	90.31	13	80.38	37.81	25.39	23.8	39	14.31	175.4
34	93.4	18	57.31	39.39	28.8	21.4	41	18.4	173.1
X	92.53	12.3	80.08	38.89	28.22	22.7	37	15.79	174.82
S	2.33	2.8	1.73	1.58	1.88	1.8	6	1	3.17

Anexo 1. Concentración de HES (pg/ml) en suero de *Crocodylus acutus*.

RIA en *Crocodylus moreletii*

TEM C	PREG	OHPREG	PROG	OHPROG	ANDROS	TESTOS	DHEA	ESTRAD	CORTICOS
30	89.54	12	53.21	31.63	18.73	15.58	24	12.51	181.38
30	77.71	10	58.63	38.12	19.2	27.31	28	10.38	175.15
30	70.12	16	54.28	46.67	21.56	20.08	31	11.51	180.7
30	82.95	8	49.78	32.62	19.31	17.31	29	9.31	177.2
30	58.31	9	51.15	35.18	23.15	13.51	27	12.3	173.8
30	73.8	10	57.6	30.28	20.58	18.12	25	11.51	182.1
30	89.16	7	58.7	37.54	31.17	14.31	29	13	180.4
30	81.73	9	55.61	38.15	19.81	25.6	22	12.3	177.2
30	90.18	10	55.61	37.19	20.5	25.81	21	12.45	177.3
30	88.41	7	47.8	40.8	24.8	13.51	29	11.3	170.9
X	71.4	9.5	53.92	38.12	21.8	18.25	28.3	11.8	177.5
S	9.53	2.8	3.52	4.7	3.75	5.42	3.34	1.12	3.63
32	98.88	12.5	51.84	37.54	17.31	28.84	22.2	43.58	178.1
32	90.15	15.2	54.38	38.08	18.88	28.58	18	42.48	181.4
32	98.54	10.4	49.54	31.5	14.8	29.8	20.3	43.7	174.1
32	98.45	8.8	58.7	30.88	16.71	25.58	22.2	55.81	177.8
32	108.19	18.1	58.48	41.54	15.88	28.54	20.3	49.58	184.5
32	105.32	13.3	60.31	43.8	18.54	27.38	19.8	50.31	186.4
32	98.14	14.2	50.98	39.88	18.8	30.84	17.5	47.8	179.4
32	90.38	9.5	52.14	40.38	15.34	27.51	18	48.5	173.4
32	89.7	7.8	68.94	38.54	17.48	28.13	20.3	57.31	170.8
32	98.58	13.3	55.28	40.68	20.18	28.13	15.8	48.4	175.3
32	99.37	16.8	53.8	38.81	19.8	30.31	18	49.51	178.2
X	97.08	12.1	55.4	37.9	17.13	28.28	18.98	48.59	177.7
S	5.91	3	5	4	1.87	1.55	2.25	3.89	4.77
34	181.38	7.3	58.11	31.71	20.31	45.12	21.3	70.54	173.7
34	175.15	5.5	53.24	35.54	19.15	47.58	18.1	92.8	181.2
34	191.18	12	50.15	40.13	22.14	51.73	15.8	77.89	170.8
34	185.12	8.8	58.71	37.78	17.73	48.42	12.5	75.18	183.2
34	180.15	9.7	61.12	34.42	18.19	49.31	22.2	78.71	180.7
34	180.23	11.1	48.15	30.54	15.51	47.22	18	81.15	177.2
34	173.7	8.2	51.12	35.67	13.2	45.73	18	80.8	175.8
X	175	8.34	53.9	34.97	17.81	47.82	17.38	78.98	177.4
S	10.39	2.39	4.74	3.31	2.97	2.23	3.38	6.89	4.49

Anexo 2: Concentración de HES (pg/ml), en suero de *Crocodylus moreletii*.

ANEXO 3
RESULTADOS DE ANALISIS ESADISTICO

PRUEBA DE "t" STUDENT DE RIA DE *C. acutus* a 30° C y 34° C.

gl 22 p < 0.05

ANDOSTERONA	t= 5.08926
TESTOSTERONA	t= 2.43787
ESTRADIOL	t= 2.36035

PRUEBA DE ANALISIS DE VARIANZA (ANAVA)	RANGOS (TUKEY)
gl (2,25) p < 0.05	30° C = 1, 32° C =2
	32° C = 3.
EN <i>Crocodylus moreletii</i> a 30° , 32° y 34° C.	

PREGNENOLONA	F= 315.95	1 = 2 = 3
ANDOSTERONA	F= 7.415	1 = 3 1 = 2 = 3
TESTOSTERONA	F= 136.84	1 = 2 = 3
ESTRADIOL	F= 468.80	1 = 2 = 3

PRUEBA DE ANALISIS DE VARIANZA (ANAVA), RIA EN PRODUCTOS FINALES.
gl (4,48) p < 0.0001

ESTRADIOL	F= 555.18	1,2 = 3 = 4 = 5
TESTOSTERONA	F= 115.26	1,2 = 3 = 4 = 5