

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

00377
11

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la Participación del Sistema Nervioso en el Proceso de Diferenciación Sexual Gonadal en la Tortuga Marina *Lepidochelys olivacea*.

Tesis presentada por:

M.V.Z. Francisco Javier Jiménez Trejo

Para obtener el grado de:

“Maestro en Ciencias Biológicas”

(Orientación: Biología Experimental).

293108

Director de Tesis:

Dr. Horacio Merchant Larios
Investigador Emérito

Co-director de Tesis:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Investigador Titular “A”, T.C.

México, 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

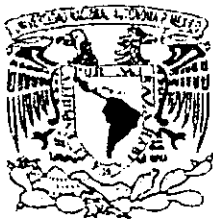


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Castañeda
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de marzo de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del alumno JIMENEZ TREJO FRANCISCO JAVIER con número de cuenta 90572395, número de expediente 3991063, con la tesis titulada: "EVALUACION DE LA PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO EN EL PROCESO DE DIFERENCIACION SEXUAL GONADAL DE LA TORTUGA MARINA *Lepidocheilys olivacea*", bajo la dirección del DR. HORACIO MERCHANT LARIOS.

Presidente:	Dr. Horacio Merchant Larios
Secretario:	Dra. Carolina Escobar Briones
Vocal:	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Suplente:	Dra. María Elena Ayaia Escobar
Suplente:	Dra. Norma Angélica Moreno Merdoza

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de abril de 2001

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios y la co-dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, parte del trabajo se realizó en el Centro de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro, con el apoyo y asesoramiento técnico del Dr. Fernando Barrios Alvarez y el M. en C. Rafael Favila Humara.

Agradecimientos

Al Dr. Horacio Merchant Larios por su asesoramiento y apoyo para la realización del presente trabajo, por permitirme ser parte de su grupo, por compartir sus conocimientos, su apoyo y confianza.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por su valioso apoyo, por tener una gran calidad humana al guiarme en cada momento de mi vida académica, por su entusiasmo y apoyo, gracias!.

Al Dr. Fernando Barrios Alvarez del CNB, por su apoyo técnico y económico, para sacar adelante este trabajo.

Al M. en C. Rafael Favila Humara, por su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

A la Dra. Norma Moreno Mendoza, por su asesoría y apoyo.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su asesoría y comentarios al presente trabajo.

Al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por su ayuda en la obtención y cuidado de los nidos de tortuga marina, así como al Sr. Jose Guadalupe Baltazar, por su asesoramiento y apoyo técnico.

A los miembros del jurado:

Dr. Horacio Merchant Larios.

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

Dra. María Elena Ayala Escobar.

Dra. Norma Moreno Mendoza.

Dra. Carolina Escobar Briones.

Por la revisión del trabajo y sus comentarios al mismo.

Dedicatorias

A mis padres: Francisco Jiménez Cárdenas (+) y Yolanda Trejo Rosas, por enseñarme el valor de la vida, de la libertad, por su apoyo y porque son y serán por siempre lo mejor de mi vida.

A mis hermanos: Isabel, José Luis, Martín, Evelia y Nancy Jiménez Trejo, por su cariño, respeto y amistad.

A mis amigos: José G. Mendoza, Mireya, Sam, Leda, Naye, Ada, Alejandro Marmolejo, Norma M., Miguel, Don Jose, Ismael, Rafael Favila., Naima, Eileen, Norma y todos los que falten, por su amistad y por brindarme su confianza.

A la Biol. Graciela Reséndiz Ocampo por su gran apoyo y confianza a pesar de la distancia.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	4
Antecedentes.....	5
Mecanismos de Diferenciación Sexual Gonadal en Vertebrados.....	6
Determinación Sexual por Temperatura.....	8
Organización Anatómica y Funcional del Sistema de Termoregulación en Vertebrados.....	12
Hipótesis.....	15
Objetivo General.....	16
Objetivos Particulares.....	17
Material y Métodos.....	18
Material Biológico.....	18
Histología de la Médula espinal.....	18
Histoquímica para la Enzima Acetilcolinesterasa.....	19
Marcaje Anterogrado de Vías Nerviosas.....	19
Inmunocitoquímica para Factor de Crecimiento Neural Y Sinaptofisina.....	20
Resultados.....	21
Ontogenia de la Médula Espinal.....	21
Desarrollo de la Inervación en la Gónada.....	25
Origen de la Inervación Gonadal.....	27
Identificación de terminales Nerviosas con Sinaptofisina.....	29
Inmunoreactividad para el Factor de Crecimiento Neural.....	31
Discusión.....	33
Conclusiones.....	40
Anexo I.....	41
Anexo II.....	42
Bibliografía.....	43

RESUMEN

En los vertebrados, existen dos mecanismos principales que conducen a la determinación y diferenciación del sexo. En el primero de ellos, el sexo se determina por factores genéticos durante la fecundación. En el segundo mecanismo son los factores ambientales los que modulan la determinación sexual. Este último, se presenta en algunas especies de reptiles, en los cuáles la temperatura de incubación es el principal factor que regula la determinación del sexo. Se han propuesto dos hipótesis para entender como la temperatura dirige la determinación y/o diferenciación sexual. La primera supone la existencia de un termosensor intrínseco en la gónada indiferenciada que promueve, a través de una cascada de señales, la determinación del sexo, que depende de la temperatura de incubación del embrión. La segunda hipótesis propone la existencia de un termosensor externo a la gónada, probablemente ubicado en el sistema nervioso, que promueve la determinación y/o diferenciación sexual a través de liberar directamente en el parénquima gonadal sustancias neuroactivas. Ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes.

En el presente trabajo iniciamos la evaluación de la posible participación del sistema nervioso en los procesos que conducen a la determinación y/o diferenciación sexual gonadal dependiente de temperatura, utilizando como modelo animal la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. Empleando técnicas de histología clásica, inmunocitoquímica, así como trazadores de vías neurales con ayuda de microscopía de luz y confocal.

Nuestros resultados muestran que la médula espinal de los embriones se encuentra estructuralmente madura para enviar o recibir señales sensoriales al término del periodo crítico en que se lleva a cabo la determinación sexual. En apoyo a esto, existen fibras nerviosas, al parecer colinérgicas, que penetran a la gónada desde el inicio del periodo de determinación sexual gonadal. Así mismo, se observaron terminales nerviosas marcadas con el anticuerpo para la proteína integral de vesículas sinápticas conocida como sinaptofisina. También se observó material inmunoreactivo para factor de crecimiento neural (NGF), en células del parénquima gonadal. Este factor es quimioatrayente y favorece la sobrevivencia de neuronas colinérgicas y adrenérgicas periféricas. Finalmente, se demostró, que los embriones, en la etapa 28 del estadio embrionario responden a estímulos de temperatura cuando se utiliza como marcador de actividad neural la expresión de C-fos.

Los resultados del presente trabajo sugieren que el sistema nervioso participa en los mecanismos que regulan la determinación y/o diferenciación sexual gonadal regulada por temperatura en reptiles como la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Introducción

La diferenciación sexual, en los vertebrados, es el evento de desarrollo a través del cual se adquieren las características anatómicas y funcionales propias de cada sexo. En términos generales, la diferenciación sexual sucede en dos etapas que comprenden, en primer término, la adquisición de los caracteres histológicos y fisiológicos de los testículos y los ovarios (diferenciación sexual gonadal), y en segundo, la adquisición de los caracteres sexuales en el resto del cuerpo (diferenciación sexual fenotípica). En este esquema, la adquisición de un fenotipo sexual adecuado depende de la diferenciación sexual gonadal, donde las hormonas producidas por las gónadas son las responsables de consolidar el sexo fenotípico (Jost, 1953; Crews, 1994).

En las últimas décadas se han dedicado grandes esfuerzos para entender los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la diferenciación histofisiológica de las gónadas. En términos generales, se sabe que en algunas especies de vertebrados, existen cascadas genéticas que transfieren información a la gónada indiferenciada para transformarse en testículo u ovario. En otras especies, sin embargo, dicha información genética parece jugar un papel menor, ya que la proclividad de los individuos para adquirir determinado sexo gonadal es aparentemente inducida por factores epigenéticos (factores ambientales), como la temperatura (Bull, 1980, Lance, 1997).

Aunque el conocimiento de las interacciones entre los factores moleculares, celulares y ambientales que conducen a la diferenciación gonadal es cada vez mayor, existe una multiplicidad de detalles sobre los mecanismos que aún se desconocen. Para el caso de aquellos organismos cuya diferenciación gonadal depende significativamente de factores ambientales, no se conoce con claridad los mecanismos a través de los cuales las gónadas en desarrollo responden a los cambios de las condiciones físicas del ambiente (Bull et al., 1988; Crews et al., 1994).

Un modelo experimental adecuado para abordar éste problema científico, lo constituye la regulación de la diferenciación sexual gonadal por temperatura (DST). Este proceso se puede observar en algunos embriones de reptil cuyas gónadas se comprometen a adquirir las características histofisiológicas gonadales específicas de cada sexo, dependiendo de la temperatura a la que los huevos son incubados. Así por ejemplo, en embriones de algunas especies de tortuga marina, temperaturas de incubación que oscilan por encima de los 30°C pueden conducir al desarrollo de ovarios, mientras que aquellas temperaturas que oscilan alrededor de los 26°C promueven la diferenciación testicular. El efecto opuesto se observa en embriones de cocodrilo, en los cuales las temperaturas altas de incubación inducen la diferenciación testicular, y las temperaturas bajas resultan en diferenciación ovárica (Merchant et al., 1989; Lance and Bogart, 1994; Pieau et al., 1994).

Hasta el momento, y en términos muy generales, la idea dominante en el área de investigación que compete al presente trabajo, es que las gónadas poseen un "termosensor" que es capaz de distinguir entre las temperaturas de incubación feminizantes o masculinizantes. Una vez hecha esta distinción, dicho termosensor propio activaría/inhibiría una cascada de mensajes intracelulares, en correspondencia con la temperatura de incubación, que culminaría con la producción local de hormonas sexuales femeninas o masculinas. Es la presencia de dichas hormonas en el parénquima comprometido de la gónada lo que consolidaría la diferenciación sexual gonadal en las especies termosensibles (Merchant-Larios et al., 1989; Spotila et al., 1994; Merchant-Larios et al., 1997; Lance, 1997).

No obstante la gran aceptación que tiene este mecanismo en el ámbito científico, la naturaleza del termosensor gonadal dista de ser clara. Se ha propuesto la existencia de genes responsivos a temperatura. Hasta el momento, sin embargo, no se ha mostrado de manera clara la existencia de un promotor genético activado/inactivado por cambios en la temperatura de incubación en el parénquima gonadal (Spotila et al., 1994; Pieau et al., 1994).

En los vertebrados la temperatura corporal y los ajustes de ella son regulados por el sistema nervioso, otra posibilidad es que la gónada posea inervación sensorial durante las etapas de indiferenciación, que le permitan monitorear los cambios de la temperatura de incubación. Dicha inervación podría ser el origen de un asa de regulación neural o neuroendocrina que condujera a los cambios hormonales requeridos para la consolidación del proceso de diferenciación gonadal en las especies cuya diferenciación sexual es sensible a la temperatura. En apoyo a esta posibilidad, existe evidencia de la presencia de fibras nerviosas en estadios tempranos de desarrollo en gónadas embrionarias de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. (Merchant-Larios et al., 1989; Merchant-Larios H. and Villalpando I., 1990; Gutierrez-Ospina et al., 1999). Además, se han documentado acciones tróficas de los nervios periféricos sobre la morfología y función ovárica y testicular (Burden et al., 1981; Burden et al., 1983; Gerendai, 1988). Finalmente, existe evidencia de que el sistema nervioso central modifica su metabolismo oxidativo y capacidad de producción esteroideogénica (testosterona y estradiol), en embriones de reptil incubados a distintas temperaturas (Crews, 1996; Coomber et al., 1997; Godwin and Crews, 1997; Salame-Méndez et al., 1998).

Justificación

Esta tesis representa el inicio de una línea de investigación que pretende establecer si el sistema nervioso central participa en la diferenciación sexual gonadal en embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. Así, en los párrafos que siguen, describimos la información general que consideramos pertinente para dar contexto al trabajo realizado.

Antecedentes

La reproducción es una de las funciones vitales de los organismos que habitan nuestro planeta. El objetivo esencial de esta función parece ser el de permitir la continuidad y permanencia física de las especies a lo largo del tiempo, mediante la transferencia de información genética necesaria para incrementar las posibilidades de variación, adaptación y supervivencia de la especie, entre generaciones de individuos (Billett et al., 1985; Hafez, 1998).

A lo largo de la historia de la vida, se desarrollaron dos principales sistemas de reproducción. El primero de ellos, conocido como asexual, requiere de la existencia de organismos auto-replicativos, que transfieren la totalidad de la información necesaria para la sobrevivencia de la especie a su progenie de manera directa. El segundo sistema conocido como sexual, requiere de la presencia de dos morfotipos sexuales diferentes de organismos de una misma especie (dimorfismo sexual). En este sistema, es necesario el intercambio de información genética entre los morfotipos para mejorar la viabilidad de la progenie. Si bien ambos sistemas de reproducción se observan en organismos simples unicelulares, los sistemas de reproducción sexual se asocian a la evolución de organismos pluricelulares complejos que están constituidos por poblaciones celulares perfectamente diferenciadas y especializadas para la realización de funciones particulares. Es interesante hacer notar que la pluricelularidad y compartimentalización o especificidad funcional parecen relacionarse, por un lado, con la imposibilidad de auto-replicarse (aunque ver partenogénesis en *Mecanismos de diferenciación sexual gonadal en los vertebrados*), y por otro, con el desarrollo exagerado de las diferencias físicas y funcionales de los morfotipos de los individuos de la especie destinados a reproducirse sexualmente. Además, la aparición de los morfotipos sexuales se acompañó del desarrollo de gametos (ovocitos y espermatozoides) y de los órganos responsables de su producción, las gónadas (ovarios y testículos) (Hafez, 1998).

De esta forma, parece que la pluricelularidad, la especialización funcional celular, la incapacidad de autoreplicación, y el desarrollo de morfotipos sexuales se asociaron, en un momento evolutivo, a la necesidad de intercambiar información, a través de los gametos en un sistema de reproducción sexual, entre los morfotipos de la especie para poder dar origen a progenie viable y mejor adaptada. Así, es en la generación de morfotipos sexuales como mecanismo adaptativo de los organismos pluricelulares a su medio, en donde los eventos celulares y moleculares que conducen a la diferenciación de las gónadas y gametos, tienen la mayor importancia. No debemos olvidar que la reproducción sexual, y el intercambio y transferencia de información asociada a ella, entre individuos de la misma especie con morfotipos sexuales distintivos, han facilitado la diversificación fenotípica a lo largo de la evolución, hecho que incrementa las posibilidades de adaptación, sobrevivencia, permanencia y continuidad de generaciones de organismos en el medio ambiente (Crews, 1996; Hafez, 1998).

Mecanismos de diferenciación sexual gonadal en los vertebrados.

Estudios realizados por distintos grupos han mostrado la diversidad de los mecanismos que conducen a la determinación y/o diferenciación sexual gonadal en los vertebrados (Bull, 1980; Bull et al., 1988; Crews, 1994; Pieau et al., 1982). En uno de estos mecanismos, los procesos celulares que conducen a la diferenciación gonadal dependen principalmente de la presencia y la expresión de factores genéticos localizados en cromosomas sexuales heteromórficos. Así, el sexo gonadal está determinado al momento de la fertilización. Por ejemplo, en mamíferos placentados, el desarrollo testicular es promovido por la acción del producto de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma Y (SRY en humanos, Sry en el ratón). En ausencia de este gen, se desarrolla una gónada con características histofisiológicas de ovario (Koopman et al., 1991). El mecanismo genético de diferenciación sexual, no es privativo de los mamíferos, también se han documentado cromosomas sexuales heteromórficos en diferentes especies como son aves, anfibios y algunos reptiles como las serpientes (Bull, 1980; Lance, 1997).

Un ejemplo que ilustra la diversidad de los mecanismos de diferenciación sexual gonadal lo constituye la llamada diferenciación sociosexual observada en el pez *Anthias squamipinnis*. Estos organismos son constitutivamente hermafroditas, es decir poseen tanto gónadas masculinas como femeninas. La decisión del cambio para hembra o macho depende de la relación poblacional de los morfotipos sexuales femenino y masculino en un momento y espacio dados. Una vez definido el sexo de un individuo, sin embargo, éste puede revertirse incluso en etapas de madurez sexual con el objetivo aparente de estabilizar la relación poblacional entre machos y hembras, en caso de que la población así lo requiriera (Fishelson, 1970). Aunque los mecanismos que subyacen a éste sistema dinámico de diferenciación sexual no se conocen con exactitud, parece que la concentración de feromonas masculinas en el agua, es un factor crítico que afecta la probabilidad de reversión sexual (Fishelson, 1970; Crews, 1994).

Por otro lado, en algunos vertebrados ovíparos como los cocodrilos, algunas tortugas y lagartijas, no existe evidencia clara sobre la existencia de factores genéticos y/o sociales asociados a la diferenciación sexual gonadal. En estas especies, la diferenciación sexual gonadal parece depender de factores epigenéticos como lo es la temperatura de incubación (Bull, 1980).

Existen algunas especies de lagartijas cuyo mecanismo de diferenciación sexual gonadal es partenogénico. En este caso, los individuos por sí solos tienen la capacidad de reproducirse sin necesidad de un complemento fenotípico, no requieren del dimorfismo gamético, aunque existen múltiples genes que parecen participar en el proceso de diferenciación sexual gonadal. El origen de las especies unisexuales, sin embargo, es un evento extremadamente raro y altamente forzado por factores filogenéticos y ambientales (Fu et al., 2000; Rand and Crews, 1994).

Determinación Sexual por Temperatura.

Como anteriormente se mencionó, existen diversas especies de reptiles ovíparos que carecen de cromosomas sexuales, y cuyo proceso de diferenciación sexual gonadal depende de la temperatura de incubación. En algunas especies de tortuga marina, se sabe que los embriones incubados a temperaturas superiores a los 30°C originan 100% de individuos hembra. Por el contrario, temperaturas de incubación por debajo de los 28°C originan 100% de individuos macho (Mrosowsky and Yntema, 1980; Merchant-Larios et al., 1989; Desvages et al., 1993; Pieau et al., 1982). Asimismo, las gónadas de embriones de algunas especies de cocodrilo incubados a temperaturas inferiores a los 30°C y superiores a los 34.5°C se diferencian como ovarios, mientras que aquellas gónadas de embriones incubados a temperaturas cercanas a los 33°C dan origen a testículos. (Lance and Bogart, 1994).

Recientemente, Merchant et al., (1997) han sugerido la existencia de tres fases en el proceso de diferenciación sexual gonadal dependiente de la temperatura para la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. La primera de éstas fases corresponde al período de indiferenciación/indeterminación. Durante esta fase, las gónadas de los embriones de una población de huevos incubados a temperaturas feminizantes o masculinizantes “revierten” su proceso de diferenciación en un 100%, cuando son incubados a temperaturas contrarias a aquellas correspondientes a las condiciones iniciales. En otras palabras, todos los embriones que nominalmente, al principio del experimento, eran machos se transforman en hembras y viceversa, al ser incubados respectivamente a temperaturas feminizantes y masculinizantes. La segunda fase, la más importante contiene al denominado periodo sensible a la temperatura (PST). Dicho periodo corresponde al momento en el cual las gónadas de los embriones se diferencian y determinan progresivamente. Este hecho es evidenciado porque las gónadas de los embriones de una población de huevos muestran una incapacidad progresiva para revertir su sexo en respuesta a los experimentos de intercambio térmico.

Mediante el uso de experimentos de intercambio más detallados y estrictos, se ha mostrado que el PST, al menos para embriones de la tortuga marina *L. olivacea*, se extiende entre las etapas 20 a 23 del desarrollo embrionario (etapas definidas de acuerdo a Miller, 1985), para aquellos huevos incubados inicialmente a temperaturas masculinizantes (26°C), y entre las etapas 24-26 para aquellos huevos incubados a temperaturas feminizantes (33°C). Finalmente, la tercera fase o de determinación sexual, corresponde al momento en el que el 100% de las gónadas de una población de embriones dejan de responder al cambio de la temperatura de incubación. Es decir, los embriones son incapaces de revertir o modificar su sexo gonadal en respuesta al cambio de temperatura.

Hasta el momento, los procesos celulares y moleculares que participan en la diferenciación sexual gonadal dependiente de la temperatura de incubación no han sido completamente establecidos. Sin embargo, se piensa que la temperatura de incubación puede regular la capacidad en la gónada indiferenciada para producir estrógenos derivados de la aromatización de testosterona (Crews, 1994; Crews, 1996; Crews et al., 1995; Lance, 1997; Merchant-Larios et al., 1997; Pieau et al., 1982; Spotila et al., 1994; Wibbels et al., 1993; Wibbels and Crews, 1995). En este escenario, los embriones incubados a temperaturas feminizantes aumentarían la conversión local de testosterona hacia estrógenos, como resultado del aumento en la concentración y actividad de la enzima aromatasa P-450 (Desvages et al., 1993; Richard-Mercier et al., 1995; Wibbels and Crews, 1995; Lance and Bogart, 1994). Debido a que los estrógenos exógenos tienen efectos feminizantes sobre el desarrollo de embriones incubados a temperatura masculinizante (Bull et al., 1988; Dorizzi et al., 1991), los aumentos en la producción de estrógenos en la gónada pudieran ser el evento que active los programas de diferenciación ovárica (Wibbels et al., 1993). En contraste, las temperaturas masculinizantes, al inhibir la expresión del gen de aromatasa, provocarían una reducción en la concentración de estrógenos en la gónada. Bajas concentraciones de estrógenos gonadales serían incapaces de antagonizar la actividad de la enzima 5 α -reductasa de testosterona (Crews et al., 1994), responsable de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (hormona masculinizante) (Wibbels et al., 1992), conduciendo así a la diferenciación testicular.

En apoyo a este mecanismo propuesto, el bloqueo de la síntesis de estrógenos con tamoxifen o utilizando inhibidores de la enzima aromatasa p450 como Letrozol en embriones de *Emys orbicularis* incubados a temperaturas feminizantes, conducen a masculinización parcial de las gónadas (Dorizzi et al., 1991). Por otro lado, en embriones del cocodrilo americano (*Alligator mississippiensis*), los estrógenos aplicados sobre la membrana corioalantoidea inducen el desarrollo ovárico, a pesar de que los huevos se encuentren incubados a temperaturas masculinizantes (Lance and Bogart, 1994).

El esquema propuesto arriba explica algunos eventos que inducen y promueven la diferenciación sexual gonadal dependiente de la temperatura (White and Thomas, 1992; Lance and Bogart, 1994), sin embargo, poco se sabe acerca de los procesos celulares responsables de la activación de tal cascada de eventos endocrinos. Estudios recientes han sugerido, que la temperatura de incubación parece regular la expresión de genes en la gónada, tal como es el gen de la enzima aromatasa. Además, recientemente se ha visto que, al utilizar técnicas de inmunocitoquímica, cultivo organotípico de gónada o técnicas de biología molecular (RT-PCR), la expresión gonadal de la proteína SOX9, producto de un gen homónimo involucrado en la cascada de diferenciación testicular en otros vertebrados varía en gónadas indiferenciadas incubadas a temperatura masculinizante o feminizante. La expresión de Sox9 se mantiene en gónadas incubadas a temperaturas masculinizantes (up-regulation), y decrece o se apaga (down-regulation) en aquellas incubadas a temperaturas feminizantes de manera coincidente con la duración del PST (Moreno-Mendoza et al. 1999; 2001) y Torres-Maldonado et al., (2001). En conjunto estos datos parecen apoyar la existencia de un termosensor genético gonadal (Spotila et al., 1994), probablemente responsable de encender o apagar el programa de diferenciación testicular y ovárica.

Así, los datos descritos apoyan que tanto la enzima aromatasa como la proteína Sox9, además de la presencia de otros genes involucrados como la hormona antimülleriana (MIS) y recientemente el gen *Dmrt1* expresados durante el PST, pudieran participar en la cascada de diferenciación testicular, ya que su expresión parece sensible a temperatura. Desde nuestro punto de vista, sin embargo, continua abierta la pregunta de si en verdad funcionan como "termosensores" biológicos (Western et al., 1999).

Por otro lado, se conoce muy bien, que el sistema nervioso en los vertebrados coordina, regula e induce una multiplicidad de funciones fundamentales en el organismo. Una de estas funciones es la regulación de la temperatura corporal, la cual debe ser ajustada, minuto a minuto, considerando el estado metabólico general y local, así como los cambios de temperatura ambiental (Hensel, 1973; Nelson et al., 1984; Satinoff, 1978). Las respuestas reguladoras térmicas generadas por el sistema nervioso pueden ser de naturaleza general, es decir que el ajuste térmico se lleve a cabo en todo el cuerpo, o bien de naturaleza local, lo que traduce cambios en la temperatura de ciertas regiones sin inducción de modificaciones mayores de la temperatura en el resto el cuerpo. Esta última característica hace al sistema nervioso un buen candidato para evaluar su posible participación en los mecanismos de diferenciación gonadal dependiente de temperatura (Merchant et al., 1989; Gutiérrez-Ospina et al., 1999; Martín-Cora et al., 2000).

En apoyo a que el sistema nervioso pudiera participar en los procesos de diferenciación sexual gonadal en las especies termosensibles, es sorprendente observar algunos nervios formados por axones no mielinizados en la región medular en etapas tempranas de la diferenciación ovárica (etapas 24-27) en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (*L. olivacea*) (Merchant-Larios et al., 1989). Interesantemente, en otros vertebrados (mamíferos), la inervación en las gónadas se presenta poco después del nacimiento. Además, en un estudio de cultivo organotípico de la gónada indiferenciada de esta misma especie, se observó que la temperatura no influye directamente en la gónada para la diferenciación del sexo, proponiéndose que el sexo de la gónada pudo haber sido determinado por factores extragonadales antes de la explantación (Merchant-Larios and Villalpando, 1990).

También, se han documentado acciones tróficas directas de los nervios periféricos (nervio vago) sobre la morfología y función ovárica y testicular (Burden et al., 1981; Burden et al., 1983; Ojeda et al., 1983; Chavéz and Domínguez, 1994). Además, existe evidencia de que el sistema nervioso central modifica su metabolismo oxidativo y capacidad de aromatización de testosterona, es decir, regula la capacidad de producción de hormonas esteroides en cerebro (diencéfalo) de embriones de reptil incubados a distintas temperaturas (Coomber et al., 1997; Sálame-Méndez et al., 1998).

Finalmente, también se ha documentado que la temperatura de incubación tiene efectos marcados sobre la morfología neural, fisiología, crecimiento y comportamiento de lagartos adultos de un mismo sexo, incubados durante su desarrollo prenatal a distintas temperaturas (Crews et al., 1996; Coomber et al., 1997; Godwin and Crews, 1997).

Organización anatómica y funcional del sistema de termoregulación en vertebrados

En el transcurso de la evolución, los vertebrados han desarrollado sistemas sofisticados que permiten la regulación de la temperatura corporal con relación a la temperatura del medio ambiente. En reptiles (vertebrados ectotérmicos), éstos obtienen su calor corporal de acuerdo a las condiciones del medio ambiente y almacenan poca energía que es consumida bajo condiciones de baja temperatura ambiental, su regulación es principalmente por comportamiento, esto es de acuerdo a su postura, orientación corporal hacia los rayos solares y por seleccionar su microclima óptimo para llevar a cabo sus principales funciones fisiológicas. Se sabe que muchos de estos patrones que compensan las sensaciones de temperatura tienen una organización principalmente de origen espinal (médula espinal), además del núcleo pontino y el área preóptica anterior del hipotálamo, los cuales ejercen una influencia principal al modular neuronas termosensibles que juegan un papel esencial en estos procesos (zonas involucradas directamente con la información y las sensaciones de la temperatura ambiente, cuya información es utilizada para mantener una temperatura corporal estable) (Nelson et al., 1984).

En general, estos sistemas están constituidos por termorreceptores periféricos localizados en la dermis cutánea y en la submucosa de las vísceras, asociados a aferentes primarias provenientes de las neuronas ganglionares de la raíz dorsal. Estas neuronas proyectan hacia la médula espinal en donde inicia una vía poli-sináptica que alcanza estructuras del tallo cerebral, el hipotálamo y el tálamo somatosensorial. A partir de esta última región, la información asociada a los estímulos térmicos se transmite a la corteza somatosensorial primaria y secundaria, y de éstas a las cortezas de asociación. Es aquí en donde la percepción de la temperatura se integra (Nelson et al., 1984).

En los vertebrados existen al menos dos tipos de receptores sensibles a la temperatura que terminan en la piel como terminaciones nerviosas libres o no encapsuladas. Los axones (fibras C) que transmiten la información para el calor son amielínicos y de conducción lenta (0.4-1.2m/s). Los axones que conducen la información térmica referente a las bajas temperaturas ($A\delta$) también son amielínicos y conducen a una mayor velocidad que aquellos que transmiten la información de calor (12-36m/s). Los campos receptivos de los termorreceptores son pequeños (1-5 μ m), y tres o cuatro de ellos pueden ser inervados por un solo axón (Bregelmann and Brown, 1965; Ruch, 1965). Ambos tipos de receptores responden a temperaturas de entre los 30 y 35°C. A menores temperaturas, los receptores para el frío incrementan su tasa de disparo. Los efectos opuestos se observan cuando las temperaturas incrementan por encima de los 35°C. En contraste, los receptores para el calor incrementan su tasa de disparo al incrementar la temperatura sobre los 25°C, y la decrecen en respuesta al descenso de la temperatura. A temperaturas extremas, solo receptores para bajas o altas temperaturas responden (Bregelmann and Brown, 1965; Nelson et al., 1984). Estudios recientes, han identificado tres tipos de receptores que responden a estímulos térmicos de baja temperatura. Los receptores al frío de bajo umbral, los cuales exhiben una descarga tónica que incrementa conforme el estímulo disminuye, y que responden en rangos de temperatura que van desde los 20 a los 30°C. Los receptores al frío de alto umbral, que no exhiben descargas espontáneas y que responden a temperaturas menores a los 15°C. Finalmente, mecanorreceptores que exhiben una respuesta débil a cambios moderados de temperatura (alrededor de los 10°C) (Nelson et al., 1984; Bregelmann and Brown, 1965).

Las aferentes primarias de las neuronas ganglionares penetran a la médula espinal a través de las raíces dorsales. Una vez en el interior de la médula, las fibras ascienden y descienden dos niveles para hacer sinápsis con neuronas localizadas en la lámina I de la asta posterior de la médula espinal. Estas neuronas proyectan sus axones hacia la región contralateral de la médula espinal y se dirigen hacia el funículo anterior en donde se integran al sistema anterolateral por el cual ascienden. Las fibras del sistema anterolateral alcanzan al tálamo dorsal, el hipotálamo (regiones preóptica anterior) y el núcleo parabraquial pontino. Estas regiones funcionan como centros termoreguladores primarios, y sirven como puerta de entrada hacia la corteza cerebral. Esta última (corteza cerebral), termina las acciones reflejas ya integradas hacia una respuesta específica (Nelson et al., 1984; Ruch, 1965).

Hipótesis

El sistema nervioso central participa directa o indirectamente en el proceso de regulación de la cascada de genes involucrados en la diferenciación sexual gonadal en embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Objetivo General

Correlacionar algunos aspectos del desarrollo del sistema nervioso central con la determinación y diferenciación sexual por temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Objetivos Particulares

Objetivo I

Establecer el grado de maduración de la médula espinal, en los embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (*L. olivacea*), incubados a temperaturas masculinizantes y feminizantes, durante el periodo sensible a temperatura (PST), empleando técnicas de tinción con violeta de Cresilo y microscopía confocal.

Objetivo II

Evaluar la presencia, distribución y patrón de desarrollo de la innervación en las gónadas de embriones de la tortuga marina *L. olivacea*, durante el PST, empleando técnicas de histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa y microscopía de luz.

Objetivo III

Determinar el origen de la innervación en las gónadas de embriones de la tortuga marina *L. olivacea*, durante el PST, empleando técnicas de trazado anterógrado con colorante liposoluble (DiI), y microscopía confocal.

Objetivo IV

Caracterizar el patrón de expresión espacio-temporal de sinaptofisina en las gónadas de embriones de la tortuga marina *L. olivacea*, durante el PST, empleando técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Objetivo V

Caracterizar el patrón de expresión espacio-temporal del factor de crecimiento neuronal (NGF) en las gónadas de embriones de la tortuga marina *L. olivacea*, durante el PST, empleando técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Para este estudio se emplearon embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* entre las etapas de desarrollo en las que se ubica el PST (Merchant et al., 1997). Los huevos fueron colectados inmediatamente después de la oviposición en la playa "La Escobilla" en el estado de Oaxaca (96°27'16"W, 15°40'36"N), con autorización del Instituto Nacional de Ecología (SEMARNAP), permisos: 1997-1998: No.250997-312-03; 1998-1999: No.230998-213-03; 1999-2000: No.161199-213-03. Los huevos fueron transportados al laboratorio y se colocaron nidos artificiales de vermiculita húmeda, para luego ser incubados en condiciones controladas de humedad y temperatura. Los experimentos fueron realizados utilizando huevos de 6 nidos de *Lepidochelys olivacea*. Cada nido fue dividido al azar en dos grupos, uno de ellos incubado a temperatura de 26°C (temperatura masculinizante) y el otro grupo incubado a 33°C (temperatura feminizante). Los embriones se muestrearon para realizar las diferentes técnicas, se muestrearon entre las etapas 20 a 26 de acuerdo con los criterios establecidos por Miller, (1985), tomándose en cuenta el crecimiento del embrión (largo del cuerpo) y su pigmentación.

Histología para Médula Espinal

Los embriones incubados a distintas temperaturas y de las etapas de desarrollo correspondientes al PST fueron eviscerados bajo un microscopio estereoscópico, y bloques de tejido conteniendo la médula espinal tóraco-lumbar y las gónadas fueron obtenidos y fijados por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PB; 0.1M, pH 7.4), por dos horas a 4°C. Las muestras se lavaron en PB y deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol. Una vez deshidratados, las muestras se infiltraron e incluyeron en parafina a 54°C. Las muestras fueron cortadas transversalmente (10µm), montadas en portaobjetos cubiertos con gelatina, y teñidos con violeta de Cresilo. La laminillas fueron finalmente observadas en un microscopio de campo claro (Nikon III). El grado de desarrollo y maduración de la médula espinal en las distintas poblaciones de embriones de diferente edad se evaluó en base a parámetros anatómicos previamente reportados (Hergueta et al., 1993; Senn, 1979).

Histoquímica para la enzima acetil-colinesterasa

Los embriones fueron eviscerados como se describió arriba. Se obtuvieron entonces complejos urogenitales y se fijaron en paraformaldehído al 4% en buffer durante dos horas, para posteriormente ser transferidos a una solución de sacarosa al 30% en PBS durante toda la noche a 4°C. La muestra fueron incluidas en tissue-tek II, congeladas en hexano y cortadas (12µm) transversalmente en un criostato. Los cortes montados en portaobjetos cubiertos por gelatina fueron procesados por la técnica histoquímica que detecta la actividad de la enzima acetil-colinesterasa (Bulmer, 1965; Tsuji, 1974; Gautron, 1982; Gerendai, 1988).

Marcaje anterógrado de vías nerviosas

Embriones eviscerados de las edades y tratamientos requeridos fueron fijados en formalina al 10% en PB por una semana a 4°C. Transcurrido este tiempo, se aplicaron micro-inyecciones de 1,1',dioctadecyl-3,3,3'3'tetrametilindocarbocianina (DiI; Molecular Probes; Honing and Hume, 1989) con la ayuda de un estereomicroscopio y de un picopritzer en la región dorsal y lumbar de la médula espinal, así como en el pedículo gonadal. Una vez terminada la aplicación, los embriones se regresaron al fijador y se incubaron en la oscuridad a 37°C por aproximadamente 50 a 60 días (Rabin et al., 1995; DiCarlo et al., 1996; Bruce, 1997). Después de monitorear el grado de avance del trazador, los embriones fueron analizados con ayuda de microscopía confocal, con el objetivo de determinar el origen de la inervación gonadal. El microscopio utilizado fue un Nikon Optiphot equipado con un laser de argón/helio PCM 2000, y un filtro barrera 515/30. Las imágenes finales fueron obtenidas integrando el promedio de cuatro imágenes, utilizando el valor de intensidad máxima de cada pixel.

Inmunocitoquímica para el NGF y sinaptofisina

Los complejos urogentiales de embriones eviscerados de las edades y tratamientos requeridos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en buffer durante dos horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y transferidas a sacarosa como fue descrito anteriormente. Una vez incluidas en tissue-tek II, las muestras fueron cortadas (12µm) longitudinalmente en un criostato. Los cortes fueron montados en portaobjetos cubiertos de gelatina, y las laminillas colocadas en un desecador por 3 horas a 4°C. Una vez transcurrido este periodo, los cortes fueron incubados con suero de bloqueo (SB; 3% suero normal bovino, 10% albumina, en PB-0.3% tritón X-100) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de quince minutos, los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios conejo anti-NGF (DAKO) o conejo anti-sinaptofisina (DAKO) diluidos 1:100 en SB por tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se lavaron en tres ocasiones, y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo (Vector) acoplado a fluoresceína por dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron en tres ocasiones, y las laminillas fueron montadas en glicerol y observadas en el microscopio confocal. Se realizaron los controles negativo y de preadsorción para cada anticuerpo (Navone et al., 1986).

Resultados

Ontogenia de la Médula Espinal

En vertebrados, la inervación gonadal nace de los segmentos torácicos bajos y lumbares altos de la médula espinal. Por esta razón, se describen únicamente las características histológicas de la médula espinal de los segmentos torácicos y lumbares. Por otro lado, debido a que el aspecto histológico de la médula espinal no difiere significativamente entre estadios embrionarios consecutivos, la descripción anatómica se realizó de manera alternada. Finalmente, debido a que tanto embriones incubados a temperatura feminizante como masculinizante, se compararon por etapas de desarrollo, y no por edad cronológica, la descripción histológica de la médula espinal en ambos sexos es similar. Cabe mencionar, sin embargo, que en los embriones nominalmente hembra el desarrollo corporal, más no el gonadal, está acelerado. Así pues, la descripción por etapas que se presenta es la misma para hembras y machos.

Etapas 20 (Figuras 1^a, 1b)

En la figura 1^a se muestra el inicio del periodo sensible a temperatura (PST), para embriones incubados a temperatura feminizante, en donde la médula espinal muestra dos regiones. La más interna se conoce con el nombre de estrato matriz, y es en donde la neurogénesis se está llevando a cabo. La región externa corresponde al estrato zonal. Esta última región está dividida en dos capas conocidas como la capa del manto o interna que dará origen a la sustancia gris, y la capa marginal externa que originará la sustancia blanca. El grosor relativo de ambas capas es equivalente en la mitad anterior de la médula espinal. Esto no sucede así en la mitad posterior en donde el estrato zonal está poco desarrollado. No obstante la poca diferenciación de la médula espinal en esta etapa, las raíces ventral y dorsal se observan bien desarrolladas, y las últimas de hecho ya han alcanzado a la médula espinal. El funículo anterior, especialmente la región que contiene a las fibras del sistema ventrolateral, está bien representado a esta edad. Algunas neuronas de los ganglios de la raíz dorsal muestran reacción positiva para la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Fig. 1b).

Etapa 22 (Figuras 1c, 1d)

Para esta etapa el estrato de la matriz ha disminuido de grosor. Las figuras mitóticas son menos numerosas con relación a las etapas anteriores. En contraste, el estrato zonal ha incrementado su grosor a expensas del crecimiento de la capa del manto. El número de neuroblastos migratorios y neuronas depuestas aumenta, y no se observan cambios obvios en el grosor de la capa marginal externa. Estos cambios son más evidentes en la mitad anterior de la médula espinal, siendo la región anterolateral de sustancia blanca la que se observa más desarrollada. El número de aferentes sensoriales y eferentes motoras incrementa con relación a las etapas previas. En esta etapa, las astas anterior y posterior empiezan a ser claramente visibles en la capa del manto (Fig. 1c). La intensidad para AchE incrementa en el sitio de entrada de las aferentes sensoriales y en el asta anterior de la médula espinal (Fig. 1d).

Etapa 24 (Figuras 1e, 1f)

Hacia la etapa 24, el estrato de la matriz se ha adelgazado, y las figuras mitóticas han decrecido en número significativamente. El estrato zonal incrementa su grosor como reflejo del crecimiento de las capas del manto y marginal. El número de neuroblastos migratorios disminuye, y al mismo tiempo, el número de neuronas depuestas aumentan y muestran signos claros de diferenciación. Los funículos anterior, lateral y posterior se distinguen fácilmente, si bien la mitad anterior de la médula muestra un grado mayor de diferenciación, la región anterolateral de la sustancia blanca se mantiene como la más desarrollada de la médula espinal (Fig. 1e). Las astas anterior y posterior de la médula son claramente visibles, y la sustancia gris que la constituye muestra una tinción homogénea para AchE. Las neuronas ganglionares están intensamente teñidas para esta enzima (Fig. 1f).

Etapa 26 (Figuras 1g, 1h)

La etapa 26 se caracteriza por la casi desaparición del estrato de la matriz y de las figuras mitóticas. Algunas de estas solo se observan en la región dorsal del estrato de la matriz. De hecho en distintos segmentos, el epitelio endimario semeja el observado en la médula espinal madura. El estrato zonal se ha expandido y diferenciado. La capa del manto muestra una citoarquitectura madura con las astas anterior y posterior claramente distinguibles y los tipos neuronales que las constituyen altamente diferenciadas. La sustancia blanca parece estar completamente organizada, y los funículos anterior, lateral, y posterior se observan bien desarrollados (Fig. 1g). La reacción para AchE es intensa y heterogénea a lo largo de la sustancia gris. En contraste, las neuronas ganglionares muestran una tinción homogénea e intensa para esta enzima (Fig. 1h).

Nota: la secuencia de desarrollo descrita es similar en embriones nominalmente hembra y macho al ser comparados en etapas equivalentes. Así, el grado de diferenciación de la médula espinal es más avanzada en hembras que en machos al inicio de PST.

Ontogenia de la médula espinal de *Lepidochelys olivacea*

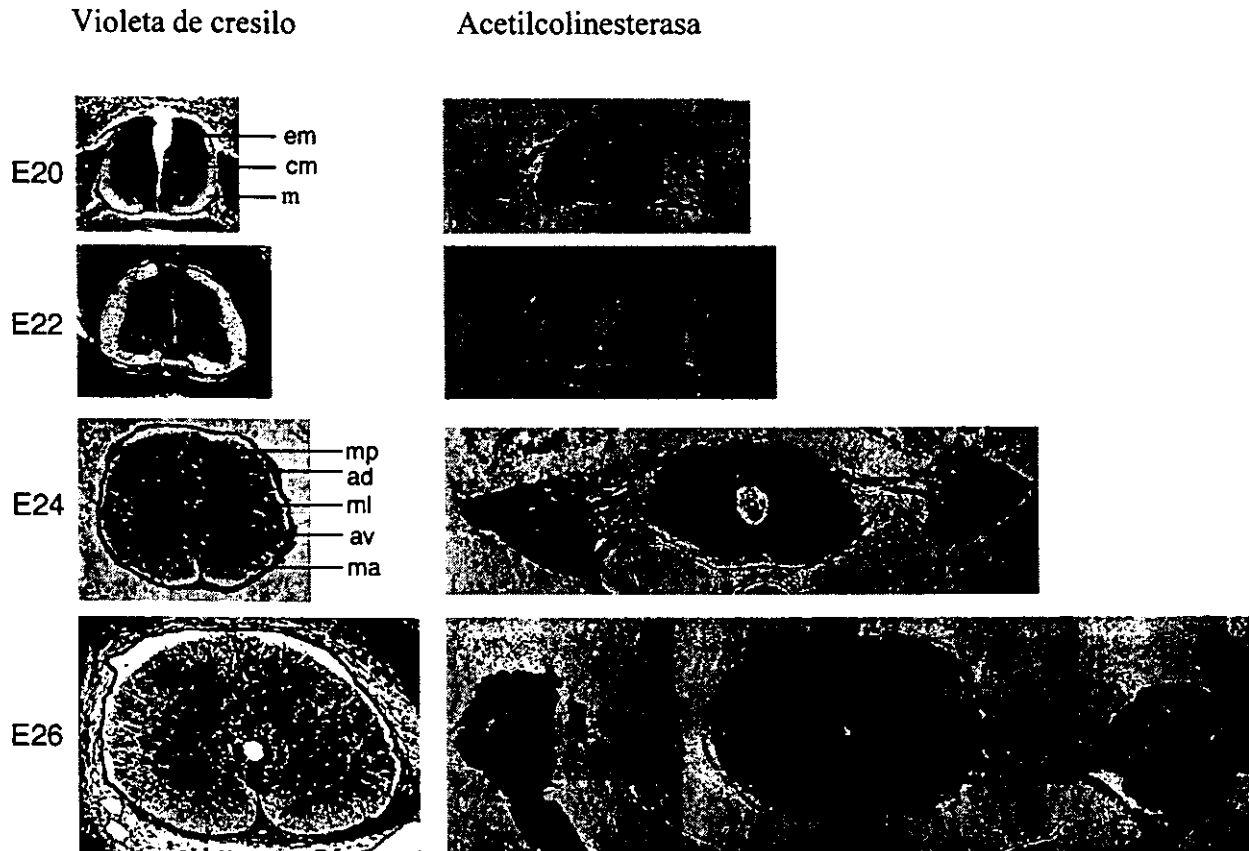


Figura 1. Fotomicrografías que ilustran el patrón de desarrollo de la médula espinal. En embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a temperatura feminizante. Los cortes transversales se tiñeron con violeta de cresilo y con histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Ambas series de micrografías muestran el desarrollo progresivo de la citoarquitectura de la médula espinal, desde la etapa 20 a la 26. Un alto grado de diferenciación de la médula se observa a partir de la etapa 24 en adelante. Estos mismos patrones de maduración corresponde a las mismas etapas de embriones incubados a temperatura masculinizante. em: estrato de la matriz, cm: capa del manto, m: capa marginal externa, mp: médula posterior, ml: médula lateral, ad: asta dorsal, av: asta ventral, ma: médula anterior. Escala de barra 500 μ m

Desarrollo de la inervación en la gónada.

La AChE es la enzima encargada de degradar a la acetilcolina una vez que esta es liberada a la hendidura sináptica. Por otro lado, la acetilcolina y la adrenalina son los neurotransmisores liberados por los nervios parasimpáticos y simpáticos, respectivamente, en sus órganos blanco. Debido a que durante el desarrollo temprano los nervios periféricos muestran los fenotipos colinérgico y adrenérgico transitoriamente, la AChE puede utilizarse como marcador de ambos tipos de fibras nerviosas. Tractos y fibras nerviosas fueron identificadas en embriones de ambos sexos a partir de la etapa 24 de desarrollo (Figura 2a, 2b). Las fibras aparecen en la región subcortical de la gónada y penetran su parénquima desde la región localizada entre la gónada y el mesonefros. Estas fibras corren transversalmente a lo largo de la región subcortical gonadal. Existen otras aferentes que inervan la médula gonadal. Estas nacen en el hilio, y penetran el parénquima gonadal siguiendo un patrón radial con dirección hacia la corteza (Fig. 2c). El arreglo descrito de las fibras nerviosas no se repite en secciones consecutivas, por lo que la distribución de las fibras nerviosas parece ser segmental (Fig.2d).

Histoquímica para la enzima Acetilcolinesterasa en la gónada de *Lepidochelys olivacea*

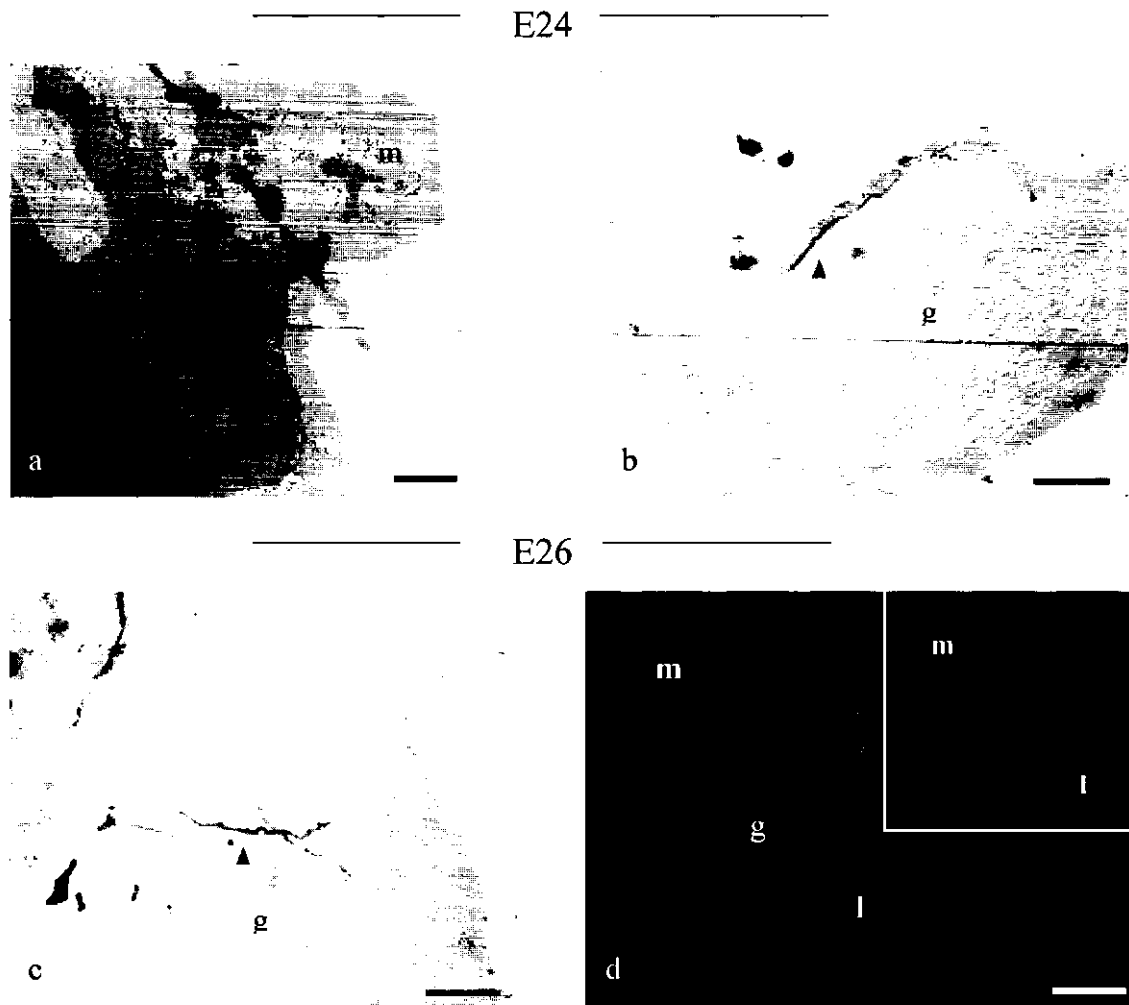


Figura 2. Fotomicrografías que muestran cortes transversales de la gónada indiferenciada con tinción de histoquímica para AchE. **a, b.** Las fibras positivas se observan a partir de la etapa 24 tanto en la corteza como en la médula. Las muestras fueron obtenidas de embriones incubados a temperatura feminizante. **c.** La cabeza de flecha indica las fibras nerviosas que penetran de la región del hilio hacia la médula. **d.** reconstrucción tridimensional parcial de la gónada (3D), que muestra la distribución de las fibras nerviosas positivas a AchE (E26). Los tractos de fibras que se localizan en la región medial de la gónada son de color azul. Las fibras marcadas de color rojo viajan lateralmente por la gónada. Las fibras de color amarillo se localizan superficialmente sobre ésta. g: gónada, l: lateral, m: medial, mf: mesonefros. Escala de barra en a: 500 μ m; en b,c,d: 100 μ m.

Origen de la innervación gonadal

Los colorantes lipofílicos de la familia de las carbocianinas, a la cual pertenece el DiI, tienen la propiedad de intercalarse y difundir a lo largo de las membranas de las aferentes nerviosas. Esta propiedad ha sido ampliamente utilizada para el trazado de vías nerviosas en preparaciones fijadas de embriones y fetos.

Con el objeto de establecer el posible origen y función de las fibras nerviosas que inervan a la gónada indiferenciada, se realizaron microinyecciones múltiples de DiI tanto en la región dorsal de la médula espinal en los niveles torácicos y lumbares, como en el hilio y en el parénquima gonadal. Aunque estudios previos han mostrado la existencia de neuronas intrínsecas en el parénquima del ovario en los mamíferos, nuestros resultados sugieren que la innervación observada en las gónadas embrionarias durante el PST se relaciona con las astas dorsales de la médula espinal (Figura 3), y por tanto, podrían originarse en las neuronas de la cadena ganglionar dorsal. Las inyecciones realizadas en el hilio y directamente en el parénquima confirman la presencia de nervios en la gónada indiferenciada a partir de la etapa 24 (Figura 3e). Inyecciones realizadas antes de esta etapa, no revelan la presencia de innervación gonadal.

Microinyecciones con DiI en médula espinal y gónada de *L. olivacea*.

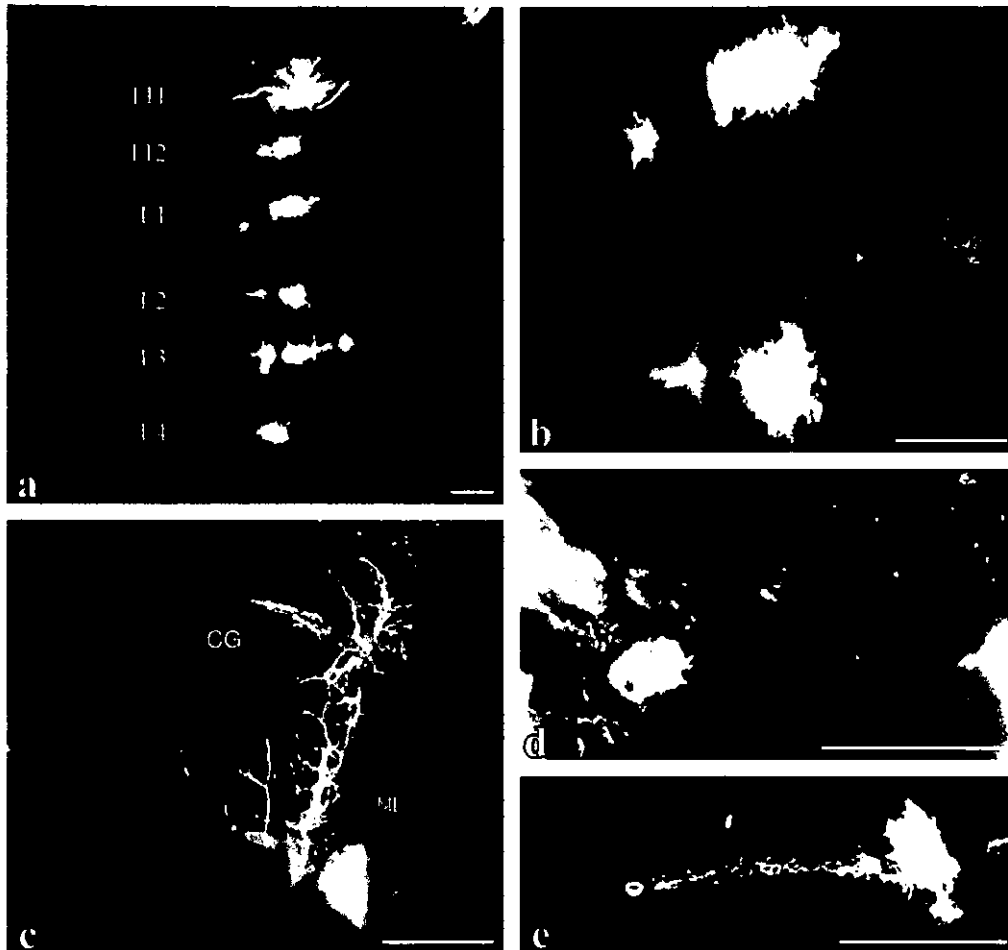


Figura 3.- Fotomicrografías que ilustran la distribución y origen de las fibras nerviosas presentes en el complejo urogenital marcadas con DiI. En a y b, las microinyecciones de DiI en la etapa 20 revelan la penetración de muy pocas fibras aferentes (flechas), aparentemente de tipo sensorial (ver texto). En c y d, durante la etapa 24 del desarrollo embrionario el patrón de inervación está bastante avanzado. Las ramas de los nervios se extienden sobre la cavidad abdominal hacia la cresta urogenital. En esta etapa sólo unas pocas fibras (flecha) han penetrado en la gónada. Fig. e, pequeñas microinyecciones directamente en el parénquima gonadal muestran la presencia de fibras nerviosas que corren a través de éste. T: torácico; L: lumbar; CG: cresta urogenital; ME: médula espinal. Escala de Barra en a,b,c=100 μ m; d y e 50. μ m.

Identificación de terminales nerviosas con sinaptofisina

La sinaptofisina es una glicoproteína integral en la membrana de las vesículas sinápticas y de los gránulos secretorios, localizados en las terminales nerviosas. Esta proteína participa en la formación del poro de fusión a través del cual se liberan las sustancias neuroactivas y algunas hormonas. Estudios previos han mostrado que, en el sistema nervioso, el material inmunoreactivo a sinaptofisina se acumula en las terminales, por lo que se considera que esta proteína es un buen marcador para monitorear el proceso de sinaptogénesis.

Material inmunoreactivo para sinaptofisina marcado con fluorescencia, fue observado a partir de la etapa 24 de desarrollo en embriones de ambos sexos (Figura 4a). Dicho material presentó una apariencia de puntos que es característica de las terminales nerviosas. Las terminales marcadas se observaron distribuidas sobre la superficie de algunas células epiteliales localizadas predominantemente en la corteza gonadal (Figura 4b). El número de terminales inmunoreactivas a sinaptofisina incrementó notoriamente con la edad, siendo muy escasas durante la etapa 24 pero abundantes hacia la etapa 26 (Figuras 4c, 4d). Esto sugiere que el proceso de sinaptogénesis es progresivo durante el PST.

Inmunocitoquímica para sinaptofisina en la gónada de *Lepidochelys olivacea*

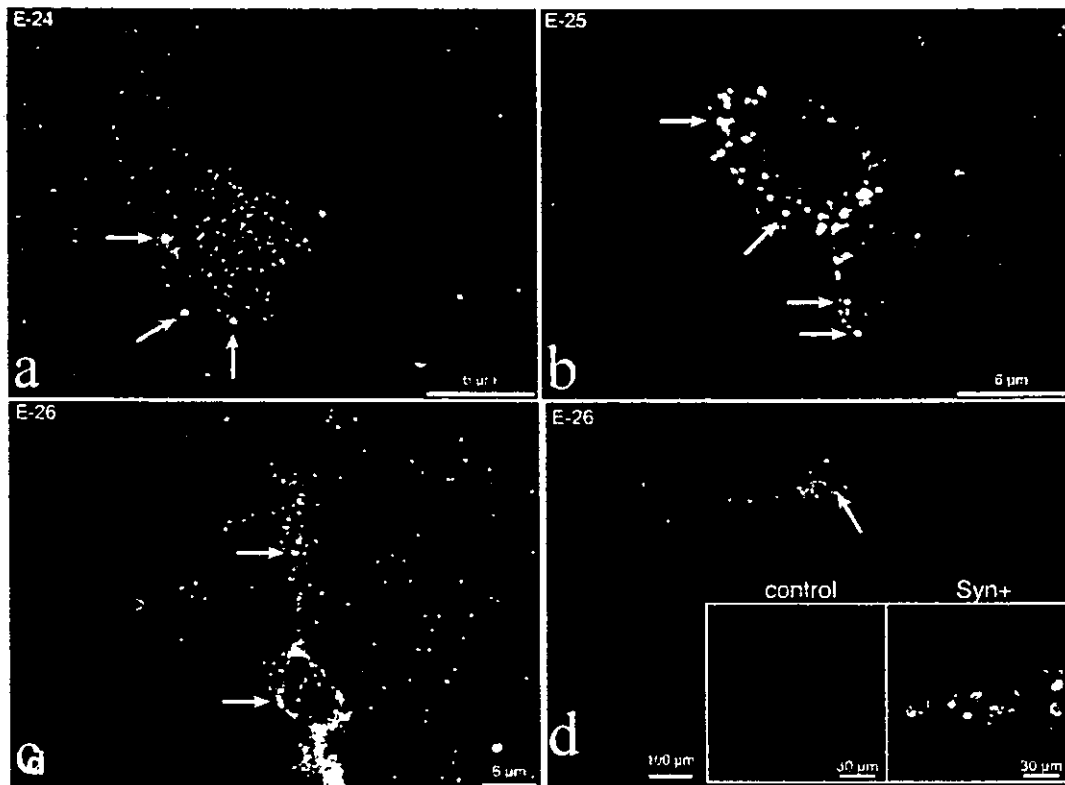


Figura 4.- Fotomicrografías que muestran la inmunocitoquímica para el anticuerpo contra la proteína sinaptofisina. a: se observan las vesículas sinápticas distribuidas sobre la superficie de una célula epitelial en la etapa 24, en donde la expresión de sinaptofisina es escasa. b: la presencia de terminales nerviosas sobre dos células epiteliales es notoria. En esta etapa (25), el número de terminales aumenta con respecto a la etapa 24. En c: la presencia de terminales en el parenquima gonadal aumenta en la etapa 26 con respecto a las etapas anteriores. d: vista panorámica de la parte anterior de la gónada, notrese la presencia de grupos de células “marcadas” en la región subcortical de la gónada, en el recuadro de la derecha se observa un acercamiento de la zona, el de la izquierda es control. Escala de barra en a,b,c=6μm; d 100μm; recuadros; 30μm.

Inmunoreactividad para el factor de crecimiento neuronal (NGF)

El NGF es una proteína con acciones neuroquimiotácticas y neurotróficas para los nervios periféricos. Este factor es producido abundantemente durante el tiempo en el que las fibras nerviosas “buscan” a sus órganos blanco. Una vez alcanzados los blanco, el NGF permite la consolidación sináptica y la supervivencia de poblaciones neuronales ubicadas en los ganglios nerviosos periféricos. De esta manera, si la gónada indiferenciada presenta inervación periférica, deberían existir células en su parénquima capaces de producir NGF. Así, para evaluar esta posibilidad, realizamos estudios de inmunofluorescencia para detectar la presencia de NGF. Nuestros resultados muestran la existencia de células epiteliales con inmunoreactividad para NGF en la corteza de gónadas desde la etapa 24 del desarrollo embrionario (Fig.5^a). Las células positivas se observaron distribuidas predominantemente en la corteza gonadal (Fig. 5b, 5c).

Inmunocitoquímica para el factor de crecimiento neural (NGF) en *Lepidochelys olivacea*

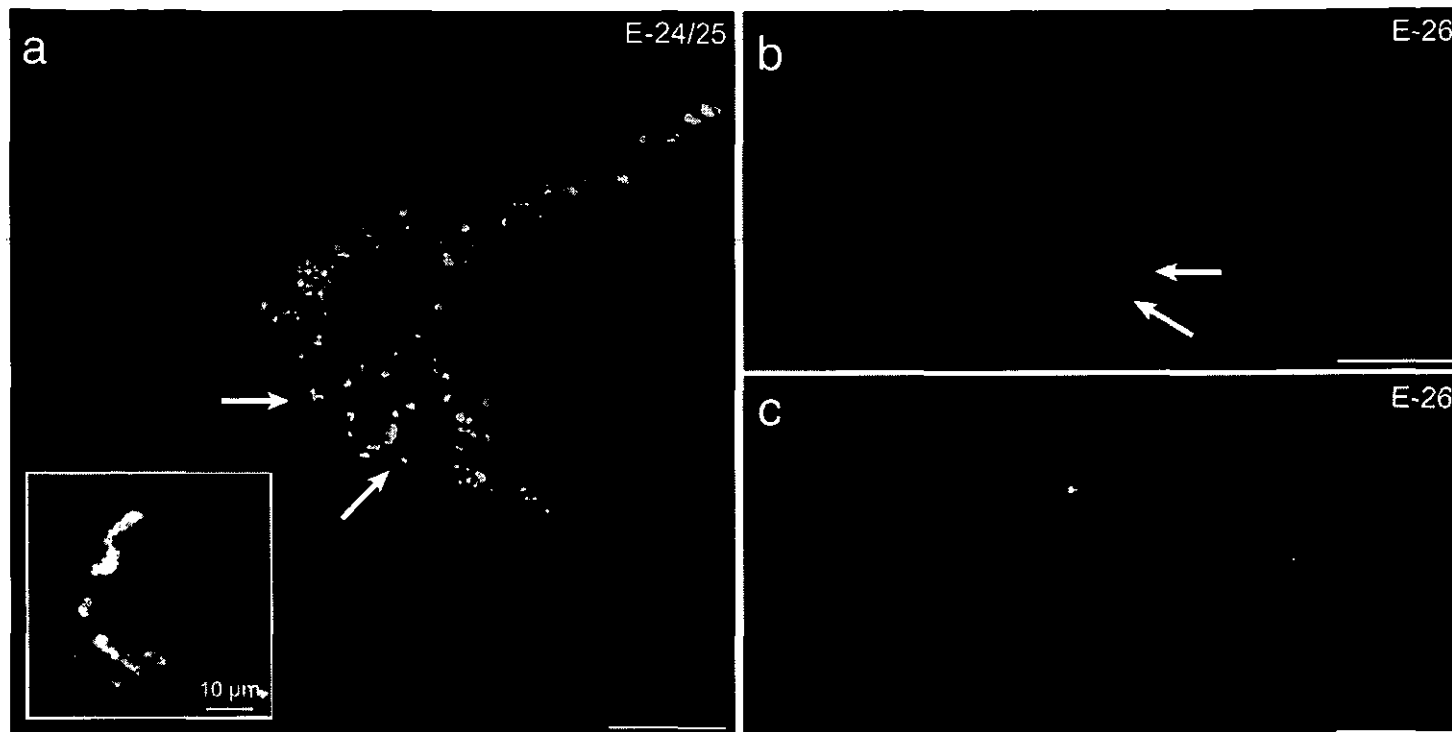


Figura 5.- Fotomicrografías que muestran células positivas al factor de crecimiento neural (NGF) en la corteza gonadal entre las etapas 24 y 26 del desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea*. Las flechas indican grupos de células inmunopositivas para el anticuerpo contra la proteína NGF. Escala de barra: a, b=100µm; en c=25µm.

Discusión

En distintas especies de reptiles ovíparos, el proceso de diferenciación sexual gonadal es modulada por la interacción de factores genéticos, hormonales y ambientales. En el caso de las especies con determinación sexual por temperatura (DST), los mensajeros endocrinos y factores genéticos parecen jugar un papel muy importante en mediar estas interacciones, aunque se sabe poco sobre los mecanismos que activan este proceso de determinación, se ha sugerido que la temperatura modula directamente la expresión de genes candidato que activarían el proceso de diferenciación sexual. Si bien, evidencia reciente ha mostrado que tanto la expresión del gen de aromatasa como el de la proteína Sox-9 varía dependiendo de la temperatura de incubación, por ejemplo, mientras que en los embriones incubados a temperatura masculinizante se mantiene todo el tiempo la expresión de este gen, para embriones incubados a temperatura feminizante, aunque al inicio del PST se observa, posteriormente se presenta una regulación negativa (downregulation) disminuyendo e incluso desapareciendo la expresión de Sox-9 durante el periodo sensible a temperatura (etapa 25 y 26) (Spotila, 1994; Spotila et al., 1998; Moreno-Mendoza et al., 1999, 2001; Torres-Maldonado et al., 2001), sin embargo, queda aún por demostrar que los promotores de estos genes tengan secuencias amplificadoras o reguladoras sensibles a temperatura, y que estos genes ocupen posiciones iniciales en la cascada de diferenciación, como es el caso de genes que codifican para proteínas de choque térmico (genes que responden de manera programada a través de una secuencia de eventos dentro de las células que les permiten amortiguar y promover las adaptaciones para los efectos al estrés térmico) (Morimoto et al., 1994; Parsell and Lindquist, 1994). Esta condición es indispensable para asegurar que el termosensor gonadal es en verdad puramente genético.

Los estudios sobre la diferenciación sexual en reptiles han conducido a explorar los mecanismos de dimorfismo sexual no sólo en las gónadas, sino también en otros órganos tales como el cerebro. Las contribuciones actuales han dado también la pauta para comprender como es que la temperatura puede actuar independientemente del sexo gonadal en regular y organizar los diferentes centros del comportamiento en el cerebro de algunos reptiles. En la lagartija *Cnemidophorus inornatus* y en el gecko leopardo (*Eublepharis macularis*) existe un marcado dimorfismo en cuanto al volumen, actividad y funcionalidad metabólica de dos principales núcleos hipotalámicos. En machos de estas especies, el área preóptica anterior del hipotálamo (POAH) es la zona más importante que regula el comportamiento típico de estos a lo largo de su vida (agresividad, cortejo, apareamiento). Por otro lado, en hembras el hipotálamo ventromedial (VMH), es el principal núcleo organizado que regula los mecanismos del comportamiento típico de hembras (sumisión, receptividad y monta) (Crews et al., 1996; Godwin and Crews, 1997; Coomber et al., 1998).

En los vertebrados, existen centros nerviosos a lo largo del neuroeje capaces de integrar información térmica y generar una respuesta efectora en segmentos específicos y/o en todo el cuerpo (Satinoff, 1978), una alternativa es que el sistema nervioso, después de sensar e integrar la información térmica del embrión y su entorno, liberaría una o varias señales que conducirían a la activación de una cascada de eventos moleculares que llevarían a la diferenciación gonadal en especies termosensibles.

En este escenario, el sistema nervioso podría actuar sobre los procesos de diferenciación gonadal a distancia, a través de liberar de manera dependiente de temperatura, hormonas derivadas del sistema nervioso central (White and Thomas, 1992). Por otro lado, el sistema nervioso podría actuar directamente sensando la temperatura de incubación y liberando mensajeros locales cerca o dentro del parénquima gonadal afectando así a los programas de diferenciación gonadal. Esto no sería sorprendente, pues se conoce que las fibras nerviosas y sus neurotransmisores modulan la progresión de los programas de desarrollo de sus órganos blanco periféricos (hígado, riñón, bazo, etc) (Purves and Litchman, 1987).

También, los nervios ejercen acciones tróficas sobre el tejido gonadal (Gerendai, 1988). Por estas razones, en este trabajo decidimos evaluar la posible participación del sistema nervioso en el proceso de diferenciación gonadal dependiente de temperatura en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Nuestros resultados muestran la presencia de fibras nerviosas positivas a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el parénquima gonadal durante el periodo sensible a temperatura (PST). Estas fibras se identificaron claramente a partir de las etapas 23-24 del desarrollo embrionario, al inicio del PST en embriones incubados a temperaturas feminizantes, y posteriormente al periodo de determinación sexual de embriones incubados a temperaturas masculinizantes. Es importante destacar que los axones en crecimiento tienen la capacidad y la maquinaria básica para liberar espontáneamente cantidades pequeñas de sustancias neuroactivas incluso antes de hacer contacto con sus células blanco y en ausencia de sinapsis maduras (Barrios et al., 1999; Hydon and Zoran, 1993; Hydon and Drapeau, 1995; Fletcher et al., 1991).

La posibilidad de que las fibras nerviosas gonadales pudieran tener la capacidad de liberar sustancias neuroactivas, es apoyada por la observación de terminales inmunoreactivas a sinaptofisina. Estos datos también sugieren que durante el PST se lleva a cabo un proceso progresivo de formación de terminales nerviosas. Así, la existencia de fibras nerviosas y de terminales inmunoreactivas para sinaptofisina en el parénquima gonadal durante el PST sugiere que éstas pudieran participar en la diferenciación gonadal dependiente de temperatura. Debido a que los tractos y fibras nerviosas, así como las terminales inmunopositivas para sinaptofisina, se pueden identificar consistentemente a partir de la etapa 24 de desarrollo, nuestras observaciones sugieren que dicha inervación puede ser más importante para el proceso de diferenciación gonadal en embriones incubados a temperaturas feminizantes; la determinación del testículo en embriones de *L. olivacea* ocurre más temprano (etapas 20 a 23) que la determinación ovárica (etapas 24 a 26) (Merchant-Larios et al., 1997). Estos hallazgos fortalecen la idea de que los machos son el estado pasivo en especies de reptiles con determinación sexual por temperatura (DST) (Dorizzi et al., 1996; Lance, 1997).

En refuerzo a la conclusión de que la inervación temprana pudiera participar en la DST en hembras, está el hecho de que las fibras nerviosas se observan 1 ½ etapa antes (etapa 23/24) de que se presente la disminución de la expresión de Sox-9 (etapa 25 y 26). Sin embargo, la relación causal de ambos parámetros debe aún ser establecida.

Por otro lado, nuestras observaciones muestran que la secuencia ontogénica de la maduración en la médula espinal es similar en embriones incubados a temperatura feminizante y masculinizante, al comparar etapas equivalentes de desarrollo. Al comienzo del PST, la citoarquitectura de los niveles torácico y lumbar de la médula espinal rudimentaria con la sustancia gris y blanca pobremente diferenciadas. La médula anterior y lateral, aunque presente, está poco desarrollada, mientras que la médula posterior no está presente. Aunque las astas anterior y posterior no están claramente desarrolladas en la etapa 20, las raíces dorsales y ventrales ya muestran actividad de AchE. Nuestras observaciones con Dil muestran que en esta etapa los nervios sensoriales han hecho contacto con la sustancia gris de la médula espinal. Por su parte, las raíces ventrales ya formadas envían ramificaciones hacia la cavidad abdominal. Conforme procede el PST, la organización medular avanza de manera tal que entre las etapas 24 y 27, las características citoarquitectónicas de la médula espinal madura se distinguen claramente.

Así, el alto grado de maduración de la anatomía medular sugiere que esta es perfectamente capaz de integrar respuestas segmento-específicas de termoregulación durante el periodo en el que el fenotipo de hembra ha comenzado a ser diferenciado. Una observación importante es que la región anterolateral de la médula espinal está, relativamente hablando, mejor desarrollada que el resto de la sustancia blanca, en cualquiera de las etapas de desarrollo analizadas. Se sabe que en muchos vertebrados las vías neurales responsables de la transmisión de la información térmica entre la médula espinal y el cerebro corren a lo largo del sistema ventrolateral (Barr and Kierman, 1986). Así, nuestras observaciones hacen posible pensar que la información térmica puede enviarse desde los niveles bajos de la médula espinal hasta los centros de regulación térmica en el cerebro desde etapas tempranas del desarrollo.

Es importante enfatizar que la participación del cerebro, y en especial del hipotálamo, no es necesaria para elaborar respuestas termoreguladoras primarias que se sabe están bajo control de los centros espinales. En otras palabras, la médula espinal es capaz por sí misma de integrar una respuesta específica a un determinado estímulo térmico (Nelson et al., 1984; Jessen, 1990; Simon, 1974; Satinoff, 1978).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el sistema nervioso podría participar en los procesos de diferenciación sexual por temperatura en las gónadas de embriones de *L. olivacea*. Estos datos también apoyan que la información térmica y las respuestas efectoras podrían ser enviadas de ida y vuelta al menos entre la médula espinal y las gónadas desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, y durante el periodo sensible a temperatura (PST).

La demostración de la existencia de termorreceptores centrales o periféricos, de la activación de neuronas en respuesta a los cambios de la temperatura de incubación, de la naturaleza de las señales neurales, y de los efectos de la denervación sobre la diferenciación gonadal, son algunos de los aspectos que tendrán que explorarse para evaluar adecuadamente los méritos de nuestra propuesta.

En este momento, estudios preliminares realizados en el laboratorio (Jiménez-Trejo, Gutiérrez-Ospina, Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, datos no publicados) han mostrado actividad neural en embriones de *L. olivacea* expuestos a estímulos de temperatura al mostrar inmunoreacción positiva para la proteína c-fos (Figuras 6 y 7). Aunque estos experimentos fueron realizados con embriones de la etapa 28 y animales recién nacidos, los resultados sugieren que el sistema nervioso está lo suficientemente maduro para transmitir y posiblemente integrar información térmica en etapas muy tempranas del desarrollo. Estos resultados pues, apoyan la posible participación del sistema nervioso central en el proceso de diferenciación gonadal.

Se conoce que la inervación modula el desarrollo de los órganos blanco periféricos (Purves and Lichtman, 1987), y que los mensajeros químicos tales como la acetilcolina, las aminos biogénicas y varios péptidos liberados desde terminales nerviosas maduras e inmaduras funcionan como señales tróficas capaces de modular los programas de diferenciación de linajes celulares no neurales (Lauder, 1993). Al respecto, la presencia de AChE en las fibras nerviosas gonadales apunta a que la acetilcolina pudiera ser un candidato para evaluar su papel en el proceso de diferenciación sexual gonadal dependiente de temperatura.

En apoyo a esta posibilidad se ha demostrado en otras especies de vertebrados, que la inervación colinérgica sensorial parasimpática juega un papel central en el mantenimiento de la estructura y función ováricas. Por otro lado, debido que las fibras catecolaminérgicas también muestran AChE en estadios tempranos del desarrollo, nuestros resultados sugieren que también las catecolaminas podrían participar en el proceso de diferenciación gonadal dependiente de la temperatura. En apoyo a esta posibilidad, Merchant-Larios y colaboradores han mostrado la presencia de fibras nerviosas positivas a neurotensina en gónadas de embriones de *L. olivacea* durante el PST (etapa 25) (resultados no publicados); es conocido que la neurotensina co-localiza con las catecolaminas en los nervios periféricos. La probable naturaleza colinérgica y/o adrenérgica de las fibras nerviosas gonadales es aún mas apoyada por la presencia de células inmunoreactivas al factor de crecimiento neural (NGF) (etapa 24 en adelante), en el parénquima gonadal. El NGF funge como factor quimiotáctico y trófico para las neuronas colinérgicas y adrenérgicas que dan origen a los nervios periféricos en los ovarios de vertebrados (Lara et al., 1990). Además de las implicaciones que nuestras observaciones tienen para entender la diferenciación sexual dependiente de temperatura, los resultados aquí descritos también se apartan de las posturas convencionales sobre los mecanismos de diferenciación sexual corporal en los vertebrados.

Diversos órganos muestran características estructurales, metabólicas y fisiológicas con dimorfismo sexual. Tales diferencias parecen emerger durante el desarrollo del organismo como resultado de las interacciones de las hormonas sexuales con los diferentes tipos celulares que constituyen cada órgano. Un ejemplo dramático de este fenómeno se observa en el cerebro cuya diferenciación sexual depende de las concentraciones locales de estrógenos.

En otras palabras, se asume que la diferenciación sexual gonadal antecede a la corporal. Nuestras observaciones parecen estar en conflicto con esta posición. En embriones de *Lepidochelys olivacea*, la maduración estructural y funcional de la médula espinal parece alcanzarse antes de la diferenciación gonadal. De igual manera cuando las tasas absolutas de desarrollo son consideradas, el tamaño y maduración corporal en los embriones incubados a temperaturas feminizantes son mayores que en aquellos incubados a temperaturas masculinizantes, a cualquier edad embrionaria. Así, el desarrollo y tamaño del cerebro y del cuerpo son dimórficos mucho antes de que la gónada muestre signo alguno de diferenciación. Estas observaciones, junto con la presencia de inervación gonadal y la demostración de que varias estructuras en el sistema nervioso central responden a la temperatura de incubación de manera independiente de los niveles circulantes de hormonas sexuales, apoyan la hipótesis de que la temperatura induce la diferenciación sexual del sistema nervioso antes que aquella de las gónadas, a través de regular diferencialmente los tiempos de desarrollo.

Estas observaciones son datos novedosos, no convencionales que muestran que en algunas especies de vertebrados, diversas características dimórficas sexuales del cerebro están determinadas por interacciones entre genes y factores diferentes de las hormonas sexuales, antes de que inicie la función gonadal.

CONCLUSIONES

1. Existen fibras nerviosas en el parénquima gonadal durante el PST.
2. Dichas fibras parecen ser de naturaleza colinérgica debido a que presentan reacción positiva para la enzima AchE.
3. La entrada de las fibras a la gónada ocurre en las etapas 23/24 en adelante por lo que los efectos asociados a ellas, cualesquiera que estos sean, deben tener algún efecto sobre el fenotipo sexual.
4. La inervación observada parece hacer contactos funcionales con células al parecer de tipo epitelial en el parénquima gonadal, debido a que las terminales muestran inmunoreactividad positiva para la sinaptofisina.
5. El parénquima gonadal muestra células inmunoreactivas al factor de crecimiento neural que, en otros órganos en desarrollo, funge como quimioatrayente de fibras colinérgicas y adrenérgicas, así como factor de supervivencia para las mismas poblaciones neuronales.

Anexo I

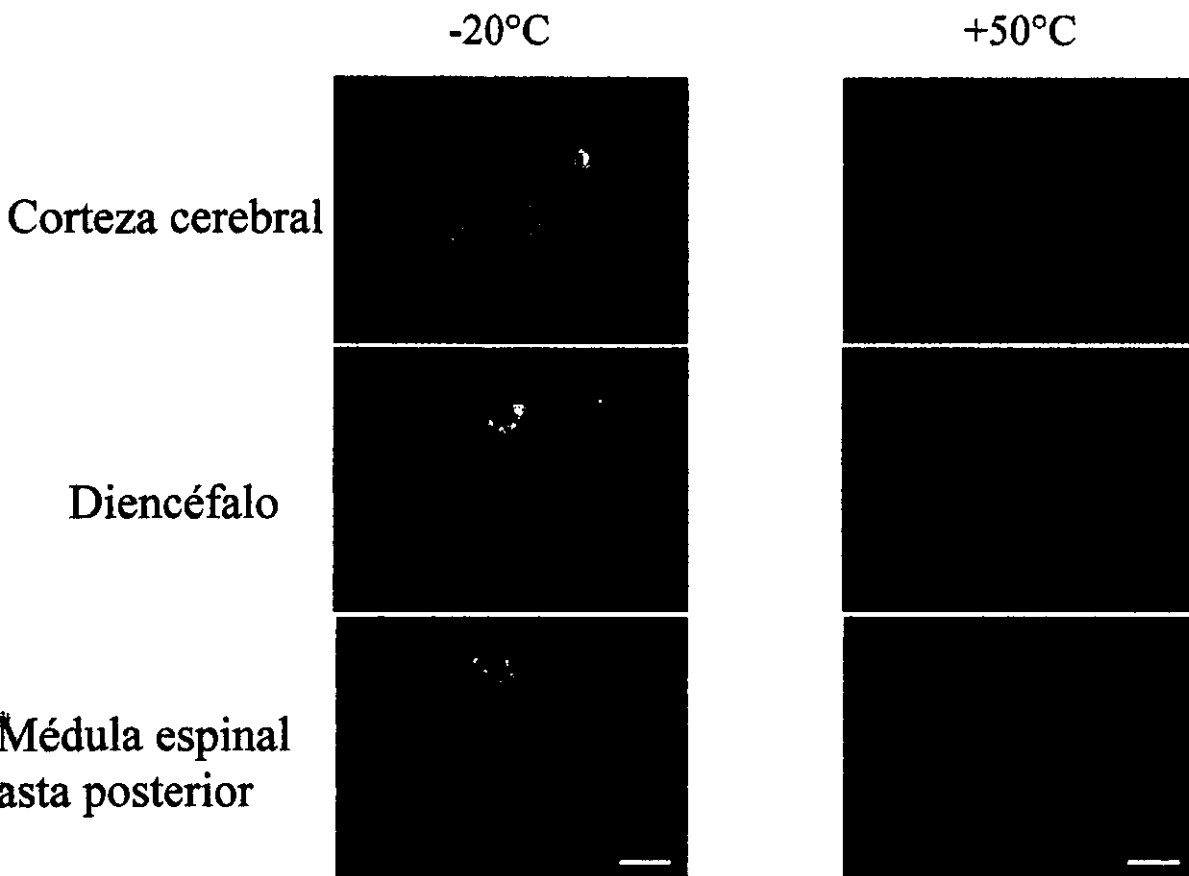
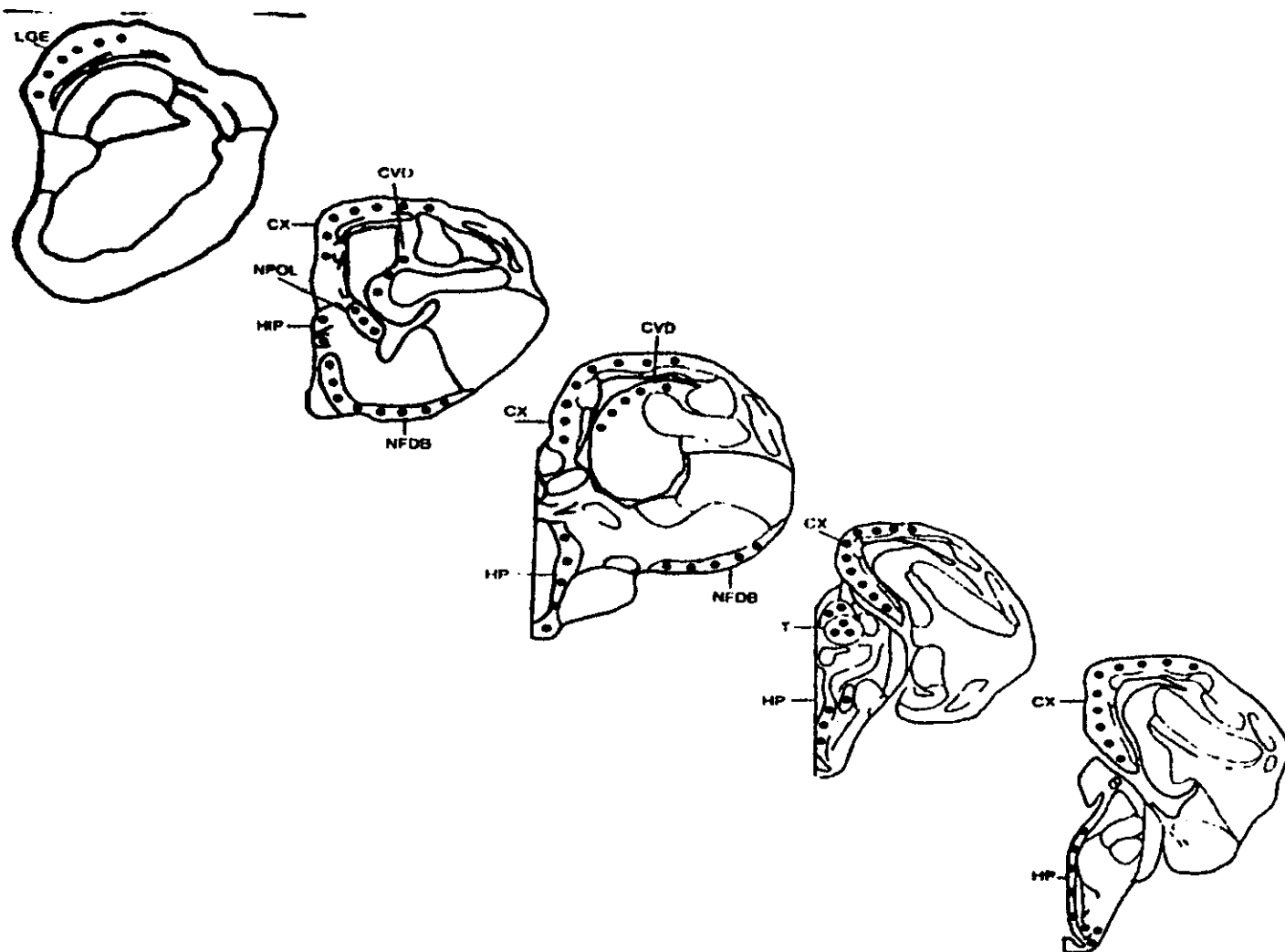
Inmunocitoquímica para c-fos en cerebro y médula espinal de *Lepidochelys olivacea*

Figura 6.- Fotomicrografías que muestran las dos principales zonas del sistema nervioso central de *Lepidochelys olivacea* en cerebro (corteza cerebral y diencéfalo), así como médula espinal (lámina I, asta posterior). La expresión de c-fos con dos diferentes tipos de estímulos de temperatura, se hicieron evidentes en la etapa 28 y en animales recién eclosionados. Escala de barra $12\mu\text{m}$;

Anexo II



Esquemas que muestran las principales zonas inmunoreactivas para la expresión de C-fos en el cerebro de *Lepidochelys olivacea* (etapa 28), para los dos diferentes tipos de estímulos de temperatura utilizados (-20°C y $+50^{\circ}\text{C}$). CX: corteza cerebral; HP: hipotálamo; T: tálamo; CVD: corteza ventricular dorsal; NFDB: núcleo del fascículo de la broca; HIF: hipocampo; NPOL: núcleo paraolfatorio lateral; LGE: lámina granular externa.

Bibliografía

- Barr M. L., Kierman J. A. (1986). *The Human Nervous System: An Anatomical viewpoint*. New York: Harper and Row Publishers, Inc.
- Barrios F. A., Favila R., Jiménez-Trejo F., Gutiérrez-Ospina G. Díaz-Cintra S., Merchant-Larios H. (1998). Acetylcholinesterase (AChE) Positive Fibers in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* Embryonic Gonads: Anatomical Survey by 3D Visualization. *Soc Neurosci*. 2:160.
- Billet F., Gans C., Maderson P. F. A. (1985). Practical Considerations in Biology of the Reptilia. *Biology of the Reptiles*. En Gans C., Billet F., Maderson P. F. A. Vol. 14 pp.7-14.
- Bull J. J. (1980). Sex Determination in Reptiles. *Q. Rev. Biol.* 55:3-21.
- Bull J. J. Gutzke W. H. Crews D. (1988). Sex Reversal by Estradiol in three Reptilian Orders. *Gen Com. Endocrinol.* 76:425-28.
- Bulmer D. (1966). A Histochemical Study of Ovarian Cholinesterases. *Acta Anat.* 62:254-265.
- Bruce L., Christensen M. A., Fritsch B. (1997). Electron Microscopic Differentiation of Directly and Transneuronally Transported DiI and Applications for Studies of Synaptogenesis. *J. Neuroscience Meth.* 73:107-112.
- Bregelmann G., Brown A. C. (1965). Temperature Regulation. En *Physiology and Biophysics*. (Ruch T. C. Patton H.). Nineteenth Edition pp. 1050-1068.
- Bruce L., Christensen M. A., Fritsch B. (1997). Electron Microscopic Differentiation of Directly and Transneuronally Transported DiI and Applications for Studies of Synaptogenesis. *J. Neuroscience Meth.* 73:107-112.
- Burden H. W., Lawrence I. E., Louis T. M., Hodson C. (1981). Effects of Abdominal Vagotomy on the Estrous Cycle of the Rat and the Induction of Pseudopregnancy. *Neuroendocrinology*. 33:218-222.
- Burden H. W., Lawrence I. E., Louis T., Hodson C. (1983). Abdominal Vagotomy Does not Activate the Corpus Luteum in Rats. *Neuroendocrinology*. 37:288-290.
- Chavez R., Dominguez R. (1994). Participation of the Superior Ovarian Nerve in the Regulation of Compensatory Ovarian Hypertrophy: the Effects of its Section Performed on each Day of the Oestrous Cycle. *J. Endocrinology*. 140:197-201.

-Coomber P., Crews D., Gonzalez-Lima F. (1997). Independent Effects of Incubation Temperature and Gonadal Sex on the Volume and Metabolic Capacity of the Brain Nuclei in the Leopard gecko (*Eublepharis macularius*) a Lizard with Temperature-Dependent sex Determination. *J. Comp. Neurol.* 380:409-421.

-Crews D. (1994). Animal Sexuality. *Scient. Amer. Science.* Jan 108-114.

-Crews D., Bergeron J. M., Bull J. J., Flores D., Tousignant A., Skipper J. Wibbels T. (1994). Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles: Proximate Mechanisms, Ultimate outcomes, and Practical Applications. *Dev. Gen.* 15:297-312.

-Crews D., Cantú A. R., Bergeron J. M., Rhen T. (1995). The relative Effectiveness of Androstenedione, Testosterone, and Estrone, Precursor to Estradiol, in sex Reversal in the Red-Eared Slider (*Trachemys scripta*), a Turtle with Temperature-Dependent Sex Determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100:119-127.

-Crews D. (1996). Temperature Dependent sex Determination: the Interplay of Steroid Hormones and Temperature. *Zool. Sci.* 13:1-13.

-Crews D., Coomber P., Baldwin R., Azad N., Gonzalez-Lima F. (1996). Brain Organization in a Reptile Lacking Sex Chromosomes: Effects of Gonadectomy and Exogenous Testosterone. *Hormones and Behavior* 30:474-486.

-Desvages G., Girondon M., Pieau C. (1993). Sensitive Stages for the Effects of Temperature on Gonadal Aromatase Activity in Embryos of the Marine Turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92:54-61.

-Di Carlo J. J., Lane J. W., Hsiao S., Johnson K. (1996). Marking Microelectrode Penetrations with Fluorescent Dyes. *J. Neuroscience Met.* 64:75-81.

-Dorizzi M., Mignot F. M., Guichard A., Desvages G., Pieau C. (1991). Involvement of Oestrogens in Sexual Differentiation of Gonads as a Function of Temperature in Turtles. *Differentiation* 47:9-17.

-Dorizzi M., Richard-Mercier N., Pieau C. (1996). The Ovary Retains Male Potential after the Thermosensitive Period for Sex Determination in the Turtle *Emys orbicularis*. *Differentiation* 60:193-201.

-Ewert M., Jackson D. R., Nelson C. E. (1994). Patterns of Temperature Dependent Sex Determination in Turtles. *J. Exp. Zool.* 270:3-15.

-Fishelson L. (1970). Protogynous Sex Reversal in the Fish *Anthias squamipinnis* (Teleostei, Anthiidae) Regulated by the Presence or absence of a male Fish. *Nature.* 227:90-91.

-Fletcher T. L., Cameron P., De Camilli P., Banker G. (1991). The Distribution of Synapsin I and Synaptophysin in Hippocampal Neurons Developing in Culture. *J. Neurosci.* 11:1617-1626.

-Fu J., MacCulloch R. D., Murphy R. W., Darevsky I. S., Tuniyev B. S. (2000). Allozyme Variation Patterns and Multiple Hybridization Origins: Clonal Variation among Four Sibling Parthenogenetic Caucasian Rock Lizards. *Genetica*. 108(2):107-112.

-Gautron J. (1982). Ultrastructural Localization of Acetylcholinesterase. A Direct Method for Light and Electron Microscopy. *Histochemistry*. 76(4):469-78.

-Gerendai I. (1988). Innervation of the Ovary and its Functional Significance in the Brain and Female. En *Reproduction Function*. Ed A. R. Genazzani., U. Mortegnon., C. Nappi., F. Petraglia. The Parthenon Publishing Group USA. Pp.191-195.

-Godwin J., Crews D. (1997). Sex Differences in the Nervous System of Reptiles. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Vol:17. 6:649-669.

-Gordon C. J. (1993). *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*. Cambridge University Press. Pp.19-37.

-Gutiérrez-Ospina G., Jiménez-Trejo F., Favila-Humara R., Moreno-Mendoza N., Granados-Rojas L., Barrios F., Díaz-Cintra S., Merchant-Larios H. (1999??). Acetylcholinesterase-positive Innervation is Present at Undifferentiated Stages of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* Embryo Gonads: Implications for Temperature Dependent Sex Determination. *Journal Comp. Neurol.* 410:90-98.

-Hafez (1998). *Reproduction in Farm Animals*. Ed. Interamericana. pp.81-123.

-Hensel H. (1973). Neural Processes in Thermoregulation. *Physiol. Rev.* 53:948-1017.

-Hergueta S., Lemiere M., Pieau C., Ward R., Reperant J. (1993). The Embryological Development of primary Visual Centres in Sea Turtle *Emys orbicularis*. *J. Anat.* 183:367-404.

-Honig M. G., Hume R. I. (1989). DiI and DiO: Versatile Fluorescent Dyes for neuronal Labelling and Pathway Tracing. *TINS* 12(9):333-341.

-Hydon P. G., Zoran M. J. (1993). Retrograde Regulation of Presynaptic Development during Synaptogenesis. *J. Neurobiol.* 25:694-706.

-Hydon P.G., Drapeau P. (1995). From Contact to Connection: Early Events during Synaptogenesis. *J. Neurobiol.* *TINS* 18:196.

-Jessen C., Mayer E. T. (1971). Spinal Cord and Hypothalamus as core Sensors of Temperature in the Conscious dog Equivalence of Responses. *Plügers Arch.* 324:189-209.

-Jessen C., Mclean J. A., Calvert D. T., Findlay J. D. (1972). Balanced and Unbalanced Temperature Signals Generated in Spinal Cord of the Ox. *Am. J. Physiol.* 222:1343-1347.

-Jessen C. (1990). The Control of Body Temperature in Thermoregulation Physiology and Biochemistry (Schonbaun E. and Lomax P.) Ed. Board pp. 163-183.

-Jost A. (1953). Problems of fetal Endocrinology: The Gonadal and Hypophyseal Hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 8:379-418.

-Koopman P. J., Gubbay., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1991). Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for SRY. *Nature* 351:117-121

-Lance V. A., Bogart M.H. (1991). Tamoxifen "Sex Reverses" Alligator Embryos at Male Producing Temperature, but is an Antiestrogen in Female Hatchling. *Experientia* 47:263-266.

-Lance V. A., Bogart M. H. (1994). Studies on Sex Determination in the American alligator. *J. Exp. Zool.* 270:79-85.

-Lance V. A. (1997). Sex Determination in Reptiles: an Update. *Amer. Zool.* 37:504-513.

-Lara H. E., McDopnald J. K., Ahmed C. E., Ojeda S. R. (1990). Guanethidine-Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats. *Endocrinology.* Nov;127(5):2199-209.

-Lauder J. M. (1993). Neurotransmitters as Growth Regulatory signals: Role of Receptors and Second Messengers. *TINS* 16:223-240.

-Levi-Montalcini R., Angeletti P. U. (1966). Immunosympathectomy. *Pharmacol. Rev.* 18(1):619-628.

-Martin-Cora F. J., Fornal C. A., Metzler C., Jacobs B. L. (2000). Single-Unit Responses of Serotonergic Medullary and Pontine Raphe Neurons to Environmental Cooling in Freely moving Cats. *J. Endocrinology.* 140:197-201.

-Merchant-Larios H. Villalpando I., Centeno-Urruiza B. (1989). Gonadal Morphogenesis under Controlled temperature in Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpet. Monog.* 3:43-61.

-Merchant-Larios H. Villalpando I. (1990). Effect of temperature on Gonadal Sex Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*: an Organ Culture Study. *J. Exp. Zool.* 254:327-31.

-Merchant-Larios H. Ruiz-Rámirez S., Moreno-Mendoza N., Marmolejo-Valencia A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. Gen. Comp. Endocrinol. 107:373-85.

-Miller J. D. (1985). Embryology of Marine Turtles. In "Biology of Reptilia" (C. Gans, F. Billet, and P.F.A. Maderson, Eds.), Vol.14, pp:270-328. Wiley, New York.

-Moreno-Mendoza N., Harley V., Merchant-Larios H. (1999). Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* at Male- or Female- Promoting Temperatures. J. Exp. Zool. 284:705-710.

-Moreno-Mendoza N. Harley V., Merchant-Larios H. (2001). Temperature Regulates SOX9 Expression in Cultured Gonads of *Lepidochelys olivacea*, a Species with Temperature Sex Determination. Developmental. Biology 229:319-326.

-Morimoto R., Fissieres A., Georgopoulos C. (1994). The biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp.1-29.

-Mrosovsky N., Yntema C. L. (1980). Temperature Dependence of Sexual Differentiation in Sea Turtles: Implications for Conservation Practices. Biological Conservation. 18:271-280.

-Navone F., Jahn R., DiGioia G., Stukenbrok H., Greengard P., DeCamilli P. (1986). Protein p38: An Integral Membrane Protein Specific for Small Vesicles of Neurons and Neuroendocrine Cells. J. Cell. Biol. 103(6):2511-2527.

-Nelson D. O., Heath J. E., Prosser C. (1984). Evolution of Temperature Regulatory Mechanisms. Amer. Zool. 24:791-807.

-Ojeda S. R., Smith-White S., Aguado L., Advis J., Andersen J. M. (1983). Abdominal Vagotomy Delays the Onset of Puberty and Inhibits Ovarian Function in the Female Rat. Neuroendocrinology. 36:261-267.

-Parsell D., Lindquist S. (1994). Heat Shock Proteins and Stress Tolerance in The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (Morimoto R., Fissieres A., Georgopoulos C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press pp.457-494.

-Pieau C., Mignot T.M., Dorizzi M., Guichard A. (1982). Gonadal Steroid Levels in the Turtle *Emys orbicularis* L: A Preliminary Study in Embryos, Hatchings, and Young as a Function of the Incubation Temperature of Eggs. Gen Comp. Endocrinol. 47: 392-98.

-Pieau C., Girondont M., Desvages G., Dorizzi M., Richard-Mercier N., Zaborski P. (1994). Environmental Control of Gonadal Differentiation. In: The Differences between the Sexes, pp433-448, Short R., Balaban E. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge

-Purves D., Lichtman J. (1987). Principles of Neural Development. Cambridge, M.A.: Sinauer Associates, Inc.

-Rand M. S., Crews D. (1994). The Bisexual Brain: Sex Differences and Sex Behaviour Differences in Sexual and Parthenogenetic Lizards. *Brain Res.* 665:163-167.

-Rabin B. S., Pezzonne M. A., Kusnecov A., Hoffman G. E. (1995). Identification of Stressor-Activated Areas in the Central Nervous System. *En Neuroimmunology (Methods in Neuroscience)* M. Ian Phillips and E. Dwight. Academic Press Vol. 24 pp. 185-193.

-Richard-Mercier N., Dorizzi M., Desvages G., Girondont M., Pieau C. (1995). Endocrine Sex Reversal of Gonads by the Aromatase Inhibitor Letrozole (CGS 20267) in *Emys orbicularis*, a Turtle with Temperature-Dependent Sex Determination. *Gen Comp. Endocrinol.* 100:314-326.

-Ruch T. C. (1965). Neural Basis of Somatic Sensation. *En Physiology and Piophysics (Ruch T., Patton H. D.). Nineteenth Edition* pp.318-336.

-Salame-Méndez A., Herrera J., Moreno-Mendoza N., Merchant-Larios H. (1998). Response of Diencephalon but not the Gonad to Female-Promoting Temperature with Elevated Estradiol Levels in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Exp. Zool.* 280:304-313.

-Satinoff E. (1978). Neural Organization and Evolution of Thermal Regulation in Mammals. *Science.* 201:16-22.

-Senn D. G. (1979). Embryonic Development of the Central Nervous System. *En Biology of the Reptilia (Gans C., Northcutt R., Ulinsky P)* Academic Press, London and New York. Vol. 19 pp. 173-244.

Simon E. (1974). Temperature Regulation: the Spinal Cord as a site of Extrahypotalamic Thermoregulatory Functions. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 71:1-76.

-Spotila J. R., Spotila L. D., Kaufner N. F. (1994). Molecular Mechanisms of TSD in Reptiles: A Research for the Magic Bullet. *J. Exp. Zool.* 270:117-127.

-Spotila L. D., Spotila J. R., Hall S. E. (1998). Sequence and Expression Analysis of WT1 and Sox9 in the Red-eared slider Turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* 281:417-427.

-Torres-Maldonado L., Moreno-Mendoza N., Landa A., Merchant-Larios H. (2001). Timing of Sox9 Downregulation and Female Sex Determination in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *In press.*

-Tsuji S. (1974). On the Chemical Basis of Thiocoline Methods for demonstration of Acetylcholinesterase Activities. *Histochemistry*. 42:99-110.

-Western P., Harry J., Marshall J. A., Sinclair A. (1999). Temperature-Dependent Sex Determination in the American Alligator: AMH Precedes SOX9 Expression. *Developmental Dynamics* 216:411-419.

-White R. B. Thomas P. (1992). Stimulation of *In vitro* Steroidogenesis by Pituitary Hormones in a Turtle (*Trachemys scripta*) within the Temperature-Sensitive Period for Sex Determination. *Biol. Reprod.* 47:952-959.

-Wibbels T., Bull J. J., Crews D. (1992). Steroid Hormone-Induced Male Sex Determination in an Amniotic Vertebrate. *J. Exp. Zool.* 262:454-57.

-Wibbels T., Gideon P., Bull J. J. Crews D. (1993). Estrogen and Temperature-Induced Medullary Cord Regression During Gonadal Differentiation in a Turtle. *Differentiation*. 53:149-54.

-Wibbels T., Bull J. J., Crews D. (1994). Temperature-Dependent Sex Determination: a Mechanisms Approach. *J. Exp. Zool.* 270:71-78.

-Wibbels T., Crews D. (1995). Steroid-Induced Sex Determination at Incubation Temperatures Mixed Sex Ratios in a Turtle with TSD. *Gen Comp. Endocrinol.* 100:53-60.

-Williams S., Evan G. I., Hunt S. P. (1990). Changing Patterns of C-fos Induction in Spinal Neurons Following Thermal Cutaneous Stimulation in the Rat. *Neuroscience*. Vol. 36 (1):73-81.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Acetylcholinesterase-Positive Innervation Is Present at Undifferentiated Stages of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* Embryo Gonads: Implications for Temperature-Dependent Sex Determination

GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA,¹ FRANCISCO J. JIMÉNEZ-TREJO,²
RAFAEL FAVILA,¹ NORMA A. MORENO-MENDOZA,² LETICIA GRANADOS ROJAS,¹
FERNANDO A. BARRIOS,¹ SOFÍA DÍAZ-CINTRA,¹
AND HORACIO MERCHANT-LARIOS^{2*}

¹Department of Developmental Neurobiology, Center of Neurobiology, National University of México, Campus UNAM-UAQ-Juriquilla, Querétaro, México 76001

²Department of Cell Biology, Biomedical Research Institute, National University of México, Ciudad Universitaria, México 04510

ABSTRACT

In embryos of different reptile species, incubation temperature triggers a cascade of endocrine events that lead to gonad sex differentiation. The cellular and molecular mechanisms by which temperature sets in motion this process are still controversial. Here, we begin evaluating the possible participation of the nervous system in temperature-dependent sex determination by showing the existence and origin of acetylcholinesterase (AChE)-positive nerve fibers in undifferentiated gonads of the *Lepidochelys olivacea* (*L. olivacea*) sea turtle putative male and female embryos, along the thermosensitive period for sex determination (TPSD; stages 20–27). AChE-positive nerve bundles and fibers were readily visualized until developmental stage 24 and thereafter. DiI injections and confocal imaging showed that some of these gonadal nerves arise from the lower thoracic and upper lumbar spinal cord levels, and might thus be sensory in nature. Because the vertebrate spinal cord is capable of integrating by itself thermoregulatory responses with no intervention of uppermost levels of the central nervous system, we also evaluated spinal cord maturation during the TPSD. The maturation of the spinal cord was more advanced in putative female than in male embryos, when sex determination is taking place for each sex; this process starts and ends earlier in male than in female embryos. Together these observations open the possibility that the spinal cord and the innervation derived from it could play a direct role in driving or modulating the process of temperature-dependent gonad sex determination and/or differentiation, particularly in female *L. olivacea* embryos. *J. Comp. Neurol.* 410:90–98, 1999. © 1999 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: vertebrate; sexual differentiation; heterochrony; brain; reptiles

In the course of vertebrate evolution, two major developmental strategies have emerged to achieve gonad sex differentiation (Crews, 1994). In one of them, the cellular processes underlying the undifferentiated gonad phenotypic fate primarily depend on the presence and expression of genetic determinants at the time of fertilization. In the second one, the acquisition of the gonad-specific phenotype

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 26697N; Grant number: 26293M; Grant sponsor: DGAPA; Grant number: PAPIIT IN209694; Grant number: IN209195; Grant number: IN206796.

*Correspondence to: Horacio Merchant-Larios, Department of Cell Biology, Biomedical Research Institute, National University of Mexico, Mexico D.F., C.P. 04510. E-mail: merchant@servidor.unam.mx

Received 22 July 1998; Revised 18 December 1998; Accepted 11 February 1999

depends upon dynamic interactions between environmental factors and the embryonic genome along prenatal development.

In several oviparous reptile species, sexual differentiation of the gonads is greatly sensitive to changes in incubation temperature. For instance, while incubating sea turtle *Lepidochelis olivacea* (*L. olivacea*) embryos at 32°C yields female individuals, lower incubation temperatures (27°C) give rise to male individuals (Merchant-Larios et al., 1989). Sex reversal may occur if embryos initially incubated at female-biased incubation temperatures (FbT) are switched over male-biased incubation temperatures (MbT), or vice versa, before and during a critical developmental time known as the thermosensitive period for sex determination (TPSD): a period during which the gonad phenotype is progressively determined in a given population of embryos (Gutzke and Chymiy, 1988).

Cellular processes underlying temperature-dependent gonad sex differentiation are not completely understood. It has been hypothesized, nonetheless, that incubation temperature may regulate the capacity of undifferentiated gonads to aromatized C-19 steroid derivatives (i.e., testosterone) to estrogens (Crews, 1996; Crews et al., 1994, 1995; Lance, 1997; Merchant-Larios et al., 1997; Pieau et al., 1982; Spotila et al., 1994; Rhen and Lang, 1994; Wibbels et al., 1994; Wibbels and Crews, 1995). In this scenario, FbT would increase testosterone local conversion to estrogens by augmenting p450 aromatase gonads concentration and thus its activity (Desvages et al., 1993; Dorizzi et al., 1994; Richard-Mercier et al., 1995; Wibbels and Crews, 1994; Lance and Bogart, 1991). Since estrogens have feminizing effects on developing embryos (Bull et al., 1988; Dorizzi et al., 1991), increments in gonadal estrogen production would trigger the ovarian differentiation program (Wibbels et al., 1993). In contrast, MbT would inhibit aromatase gene expression, leading to reduced gonadal estrogen concentrations. Low gonadal estrogen concentration would in turn be incapable of overriding the activity of the constitutively expressed enzyme testosterone reductase (Crews et al., 1994), an enzyme responsible for converting testosterone to dihydrotestosterone (i.e., the masculinizing hormone) (Wibbels et al., 1992). In the mechanism described above, temperature and local estrogen concentrations exert synergistic effects in determining the gonad phenotype (Crews, 1996; Wibbels et al., 1991). Indeed, while incubation temperature commits the gonads toward a particular phenotype, the presence or absence of estrogens consolidates such a commitment, making it progressively deterministic. In addition, the hypothesized constitutive expression of testosterone reductase sets the male phenotype as a default state (see also Dorizzi et al., 1996; Lance, 1997).

While the mechanism outlined above frames a likely explanation as to how temperature-dependent sex differentiation proceeds (although see White and Thomas, 1992; Lance and Bogart, 1991; Salame-Méndez et al., 1998), little is known about the actual cellular processes responsible for activating such a cascade of events. Recent *in vivo* studies have led to the proposal that incubation temperature might directly regulate the expression of gonadal candidate genes (Spotila et al., 1994)—e.g., aromatase gene—suggesting the existence of intrinsic gonadal thermosensors. *In vitro* experiments using organotypic cultures showed, however, the inability of isolated undifferentiated

gonads to directly respond to incubation temperature changes (Merchant-Larios and Villalpando, 1990). In this regard, it is worth recalling that vertebrate evolution has created sophisticated neural systems to monitor environmental temperature through changes in body surface temperature (Hensel, 1973; Nelson et al., 1984; Satinoff, 1978). In a broad sense, these systems convey heat/cold information from thermosensors laid down on the body surface to central structures of the nervous system. After receiving and integrating thermal information at spinal, brain stem, and diencephalic levels, the nervous system sets on a series of level-specific effector responses whose final goal is to regulate segment or whole body temperature (Hensel, 1973; Jessen and Mayer, 1971; Jessen et al., 1972; Mercer and Simon, 1984; Nelson et al., 1984; Riedel et al., 1973; Satinoff, 1978; Simon, 1974). It is then possible that structures of the nervous system could sense incubation temperature, transduce it, and trigger or modulate sex differentiation in reptile species.

That the developing reptilian brain might be capable of responding to changes in incubation temperature has recently been shown by Coomber et al. (1997) and Salame-Méndez et al. (1998). These two groups showed, respectively, that distinct regions of the lizard and sea turtle hypothalamus adjust their oxidative metabolism and capacity to aromatize testosterone to incubation temperature, in a way independent from sex hormones circulating levels. Furthermore, Merchant-Larios et al. (1989) showed the presence of nerve tracts running through the gonadal parenchyma soon after the TPSD had ended (Merchant-Larios et al., 1989). Finally, the existence of sensory and visceral cholinergic parasympathetic (Bulmer, 1965; Burden and Lawrence Jr, 1978; Burden et al., 1983), as well as aminergic sympathetic nerves (Ben-Jonathan et al., 1984; Stefenson et al., 1981) having regulatory and trophic functions in adult mammalian gonads (Burden and Lawrence Jr, 1977; Gerendai, 1988), has been documented. With all these data in mind, the present study evaluated the possible presence, origin, and phenotype of gonadal nerve fibers in the sea turtle *L. olivacea* embryo gonads, along the TPSD. Since the spinal cord itself is capable of integrating thermal information and elaborating basic effector responses with no intervention of other, uppermost central nervous system thermosensitive structures (Jessen and Mayer, 1971; Jessen et al., 1972; Riedel et al., 1973; Simon, 1974), we also analyzed the degree of the spinal cord maturation as the TPSD proceeded.

MATERIALS AND METHODS

In oviparous reptilian species whose pre-hatching development is sensitive to incubation temperature, higher incubation temperatures accelerate the rate at which embryonic development and growth proceed. This results in dramatic differences in body size and maturation among embryos developing at higher and lower incubation temperatures, when they are compared using an absolute developmental timetable. To equate the development of embryos incubated at different temperatures, a stage-based developmental scheme which considers the external embryonic anatomical features has been proposed. Such a scheme allows comparisons among similar-staged embryos incubated at different temperatures based upon the relative, as opposed to the absolute, embryonic developmen-



Fig. 1. Photomicrographs showing transverse sections histochemically stained for acetylcholinesterase (AChE) at developmental stages 24 (a) and 26 (b). The existence of cortical (a) and medullar (b) AChE-positive nerve fibers (arrow heads) was consistently documented between these two stages. Although these sections were taken from embryos incubated at feminizing temperatures, the same developmental pattern was observed in embryos incubated at masculinizing

temperatures when compared at similar developmental stages. c: Partial, computer-generated, color-coded 3D-reconstruction depicting the overall distribution of medullar and cortical nerve tracts in the middle third of a 26-staged, nominally female gonad. Medial (m) tracts are color-coded in blue, and lateral (l) tracts in red. The inset shows an upper view of the model. The gonad's surface is shown in yellow (Scales bars = 100 μ m).

tal time. This relative scale was the one used in the present study to carry out comparisons of embryos incubated at different temperatures.

The thermosensitive period for sex determination in which the gonad phenotype is determined in *L. olivacea* embryos spans between developmental stages 20 and 27 (Merchant-Larios et al., 1997). For embryos incubated at MbT (27°C), this period occurs between stages 20 and 24; whereas in those incubated at FbT (32°C), it takes place later—between stages 24 and 27 (Merchant-Larios et al., 1997). This is true despite the accelerated developmental rate showed by the latter group of embryos. Therefore, our studies were restricted to nominally male and female embryos between those developmental stages corresponding to the *L. olivacea* TPSD.

Sample collection and tissue processing

Lepidochelis olivacea eggs were collected from three nests immediately after oviposition on La Escobilla beach (96°27'16" W, 15°40'36" N), Oaxaca, México. The eggs were transferred to the laboratory in vermiculite-made humid simulated nests. For each nest, half of the eggs were randomly incubated at FbT and the other half at MbT. A series of eggs (four to six individuals/age/technique) were removed from both temperature stocks throughout developmental stages 20 to 27. Embryos were carefully eviscerated under a dissecting microscope and fixed in either 4% buffered paraformaldehyde, pH 7.4, for 1.3 hours or in 10% buffered formalin, pH 7.4 (see below). After overnight cryoprotection in 20% buffered sucrose, pH 7.4, paraformaldehyde-fixed embryos were embedded in Tissue-tek II and sectioned transversally (20 μ m) in a cryostat. Sections were then processed for acetylcholinesterase (AChE) histochemistry following the protocol described by Bulmer (1965). Ethopropazine hydrochloride was used as inhibitor for nonspecific cholinesterases. Since one main goal of the present study was to provide anatomical evidence on the potential ability of the nervous system to transmit thermal information, our decision to use AChE histochemistry was based on previous reports showing sensory cholinergic parasympathetic innervation in mammalian gonads (Bur-

den et al., 1983; Gerendai, 1988). Serial sections of AChE stained tissue were digitized and segmented each to isolate the gonad borders and its intrinsic innervation as described by Barrios et al. (1998). This allowed the creation of a partial 3D-reconstruction that greatly facilitated the visualization of spatial distribution of AChE nerve tracts within the gonads' parenchyma. In addition, because previous studies showed that gonadal parasympathetic sensory innervation reaches the spinal cord at its lower thoracic (T10–T12) and upper lumbar (L1–L2) levels (Burden et al., 1983), we made small multiple-pressure DiI injections at those spinal cord segments in formalin-fixed (von Bartheld et al., 1990), 20- and 24-staged female embryos (Fig. 2a). After keeping the DiI-injected embryos in 10% formalin at 37°C for over a month, whole-mounts were imaged using an Argon laser PCM 2000 confocal microscope (Nikon) equipped with a 515/30 barrier filter. Four images were captured and averaged for each optical slice. The final reconstruction for each image was obtained, projecting the maximum value for every pixel throughout slices. An additional set of formalin-fixed embryos was used to evaluate the degree of the spinal cord maturation in cresyl violet-stained paraffin transverse sections (8 μ m). All bright field photomicrographs (Figs. 1 and 3) were elaborated, with no manipulation, by using microscope images directly obtained from histological samples and digitized with the aid of a computer imaging analysis system. Photomontages (Fig. 3) were created by manually aligning corresponding, individual images using IPLab 3.1 software (Scanalytics, Inc.). All protocols described above were approved by local animal rights committees at the National University of México and SEMARNAP.

RESULTS

Gonadal cholinergic innervation during TPSD

Nerve tracts and fibers were undoubtedly identified from developmental stage 24 and afterwards (Fig. 1). They appear first at the subcortical region entering the gonad's

parenchyma from the gonad-mesonephric boundary. Subcortical fibers then run bordering the free surface of the gonad. Afferents innervating the medulla, on the other hand, arise from the gonad hillium and grow radially towards the cortical region. This arrangement, however, is not present in every section, suggesting that gonads' innervation is segmental.

The developmental pattern and spatial arrangement of AChE-positive innervation described above was analogous in similar-staged embryos incubated at FbT and MbT temperatures. Innervation is, therefore, relatively well-developed in female embryos at the onset of the sex differentiation period (stages 24 to 27). In contrast, males have no AChE-positive innervation while their sex differentiation period (stages 20 to 24) is taking place.

Origin of gonadal innervation

Previous studies have documented the existence of intrinsic neurons in the mammalian ovary (D'Albora and Barcia, 1996). We thus evaluated whether gonadal nerve fibers had a central nervous system origin, despite the fact that intrinsic gonadal neurons have not been described in reptiles yet. DiI multiple injections at dorsal regions of the spinal cord thoracic and lumbar segments demonstrated that nerve fibers in undifferentiated gonads are indeed anatomically associated to sensory regions of the spinal cord (Fig. 2). In addition, confocal microscopy imaging shows that nerves enter the undifferentiated gonads at different segments along their longitudinal axis (Fig. 2c). Finally, small DiI injections directly applied into the hillium (Fig. 2d) and parenchyma (Fig. 2e) confirm the presence of innervation in embryonic gonads at stage 24.

Spinal cord maturation pattern during TPSD

Since gonad innervation seemed to arise from lower thoracic and upper lumbar segments, we described anatomical data obtained only from these spinal cord levels during TPSD. In addition, because no major differences in the spinal cord anatomy were observed among embryos in ongoing consecutive developmental stages, the anatomical description will be presented on an "every-other-stage" basis.

Stage 20 (Fig. 3a,b). At the onset of the TPSD, the developing *L. olivacea* spinal cord shows two cytoarchitectonic regions. The innermost *stratum matrixis* (i.e., ependimal layer) where neurogenesis is actively taking place, and the outermost *stratum zonale* itself, subdivided in two distinct layers: the internal mantle layer that will develop into gray matter, and the external marginal layer that will form the white matter. The relative thickness of both strata is roughly equivalent. Within the *stratum zonale*, the marginal layer is clearly thicker than the mantle layer. Both observations are true only for the ventral-half portion of the spinal cord, since the dorsal-half is clearly underdeveloped. Our data then support a gradient where ventral spinal cord regions develop prior to those dorsally located: a developmental pattern previously demonstrated for many other vertebrate species. Two interesting observations are that the anterolateral region of the lateral cord is relatively thicker than the rest of the ventrolateral white matter, and that sensory afferents have already reached the dorsal region of the spinal cord in spite of the poor differentiation of the posterior cords and dorsal horns. Similarly, ventral spinal roots were relatively well differentiated albeit ventral horns were clearly underdeveloped.

Finally, a light AchE-positive staining concentrates at the sensory afferents entry point into the spinal cord, and at the presumptive ventral horn region in the gray matter. A few neurons and fibers in the dorsal root ganglion display positive AchE reaction product.

Stage 22 (Fig. 3c,d). At developmental stage 22, *stratum matrixis* has decreased its absolute thickness. The mitotic figures, while still numerous, are clearly diminished relative to the two previous developmental stages. In contrast, the *stratum zonale* thickness increases in comparison to that observed in preceding stages. The expansion of the *stratum zonale* is associated mainly with the growth of the mantle layer. The number of migrating and differentiating neurons increases, and no obvious changes in the marginal layer dimensions are seen in respect to previous stages. Once again, these changes are more obvious at the ventral-half than at the dorsal-half portion of the spinal cord. The anterolateral region of the lateral cord is still the most developed part of the white matter. An increased number of both sensory afferents reaching, and motor fibers leaving the spinal cord are seen when this developmental period is compared to stages 20 and 21. At stage 22, ventral horns and posterior cord rudiments become readily observable. The intensity of AchE staining increases at both the sensory afferents spinal entry site and ventral horns. A light AchE staining is now evident throughout the rest of the spinal cord gray matter. Increased number of dorsal root ganglion neurons and fibers show AchE-positive reaction. Ventral spinal roots are well developed and positive to AchE.

Stage 24 (Fig. 3e,f). At developmental stage 24, *stratum matrixis* has decreased significantly its thickness. The mitotic figures decrease further relative to previous developmental stages. The *stratum zonale* thickness greatly increases since both the mantle and marginal layers augment their width. Relatively speaking, the number of migrating neurons become reduced, while neurons showing a more differentiated phenotype increase in number. As for previous stages, the spinal cord features described above are more evident in its ventral-half portion. Spinal cord ventral, lateral, and posterior cords are well developed, although the lateral cord's anterolateral region remains the thickest part of the white matter. At this stage, ventral and posterior horns are readily seen, and the spinal gray matter shows an homogeneous AchE staining pattern. Both ventral and dorsal spinal roots are well developed and reactive to AchE. Dorsal root ganglion neurons are also highly reactive to AchE.

Stage 26 (Fig. 3g,h). At developmental stage 26, *stratum matrixis* is decreased at its maximum. In fact, in some segments, the ependimal layer morphology resembles that of the mature spinal cord. Only a few mitotic figures are seen and largely circumscribed to the dorsal region of the *stratum matrixis*. In contrast, the *stratum zonale* has greatly expanded and differentiated. The mantle layer gray matter displays a seemingly mature geometry; ventral and dorsal horns are well developed and neuronal phenotypes characteristic of different spinal cord laminae become clearly recognizable. Also, the white matter seems fully organized with the anterior, lateral, and posterior cords well developed. AchE activity is intense, albeit heterogeneous, throughout the spinal gray matter, dorsal and ventral roots, and dorsal root ganglion neuronal population.

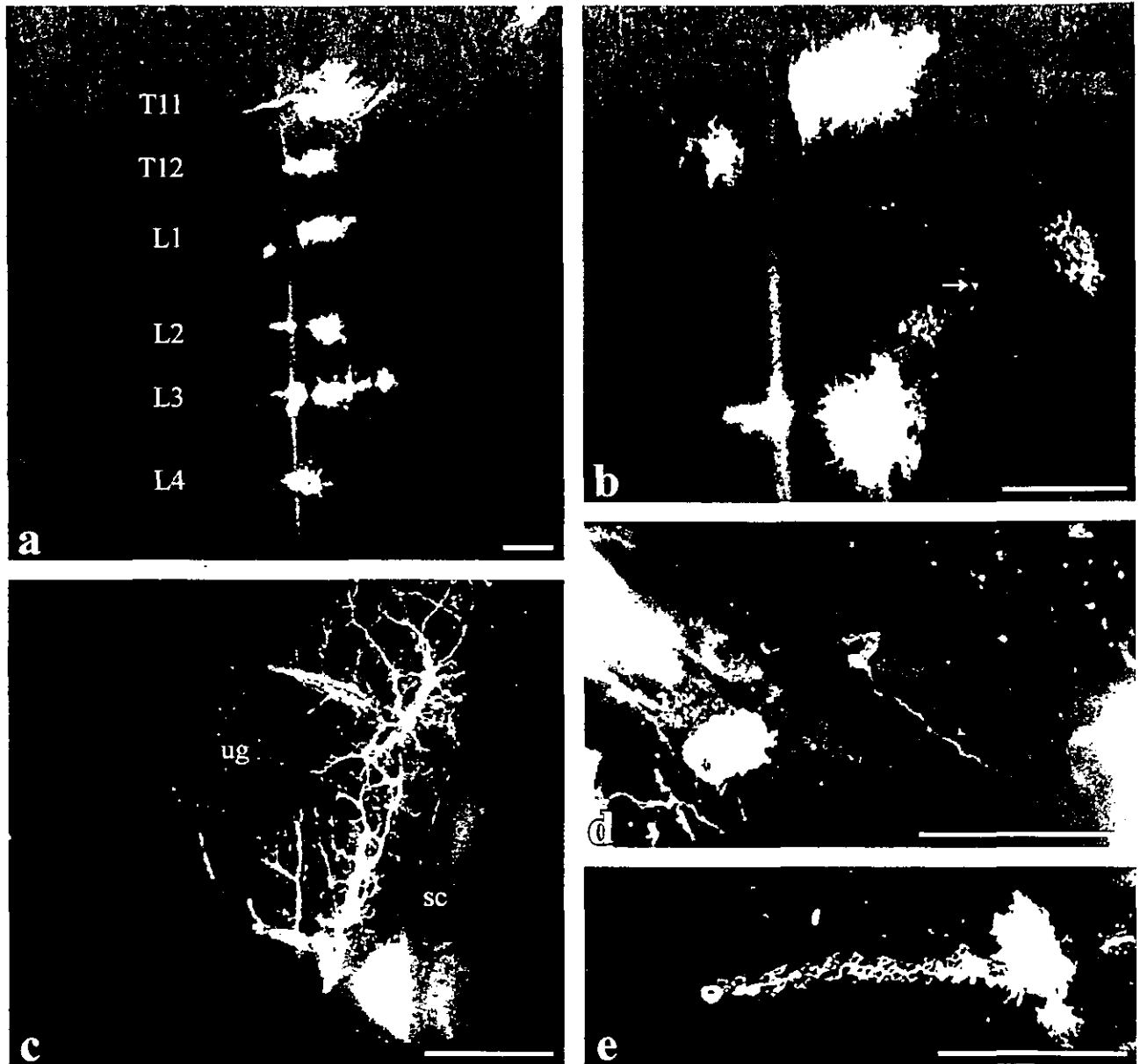


Fig. 2. Fluorescent confocal images illustrating the development and pattern of urogenital crest innervation in whole-mount female embryo preparations following Dil injections in the dorsal spinal cord, at developmental stages 20 (a,b) and 24 (c,d,e). At stage 20, Dil injections into thoracic and lumbar dorsal spinal cord segments revealed the penetration of very few afferents (arrow head), presumably sensory (see text), into the developing spinal cord. At developmen-

tal stage 24, the patterning of innervation is quite advanced. Nerves branch extensively over the abdominal cavity and urogenital crest. At this stage, only a few fibers (arrow) have entered the gonads. Finally, injections directly placed into the gonads parenchyma demonstrate the existence of nerve fibers (arrow) running through it. T, thoracic; L, lumbar; ug, urogenital crest; sc, spinal cord. Scale bars = 100 μ m in a-c; 50 μ m in d, e.

The developmental sequence of the spinal cord described above is again equivalent in similar-staged embryos incubated at FbT and MbT. Thus, the degree of spinal cord maturation and organization is more advanced in female than male embryos at the onset of the sex determination period.

DISCUSSION

In several reptile species, gonad sex differentiation depends upon dynamic interactions between environmen-

tal, hormonal, and genetic factors (for a recent review, see Lance, 1997). Although endocrine messengers may play a rather significant role in mediating such interactions, little is known about the mechanisms by which temperature triggers the endocrine milieu modifications needed for the gonadal sex differentiation process to be turned on. It has been previously implied that temperature might directly modulate the expression of candidate genes, possibly through activating thermosensitive promoters (see, for instance, Spotila et al., 1994). Experimental evidence supporting this contention, however, is as yet fragmented

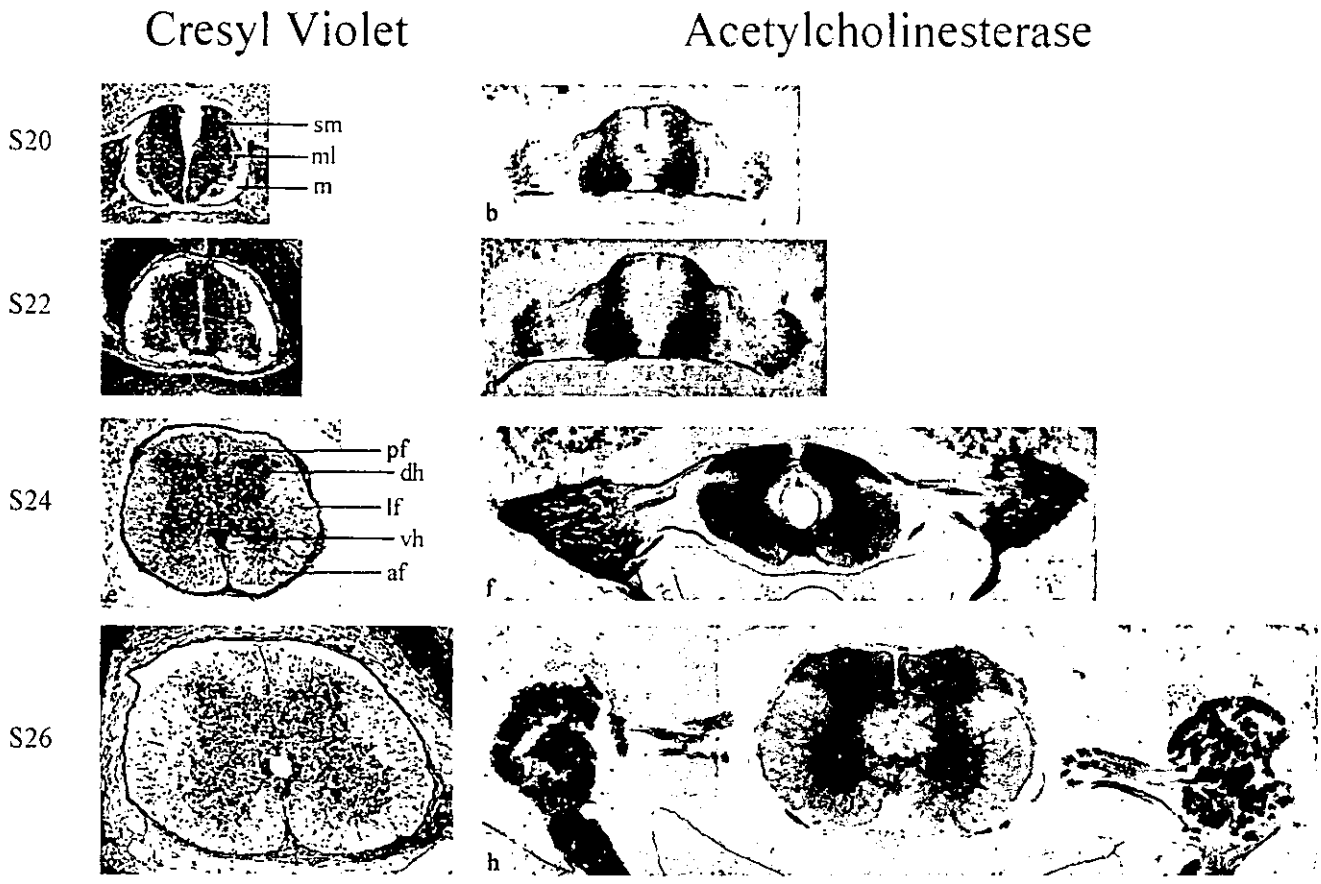


Fig. 3. Photomicrographs and montages of female spinal cord transverse sections stained with cresyl violet and acetylcholinesterase histochemistry. Both series of photomicrographs clearly show the progressive emergence of spinal cord cytoarchitecture between developmental stages 20 and 26. Notice the high degree of spinal cord

differentiation reached by stages 24 and 26. This pattern of maturation is the same in embryos incubated at female- and male-biased incubation temperatures, sm, stratum matrix; ml, mantle layer; m, marginal layer; pf, posterior cord; dh, dorsal horn; lf, lateral cord; vh, ventral horn; af, anterior cord. Scale bar = 500 μ m.

and rather indirect to rise any solid conclusion on this direction (Lance and Bogart, 1991; Merchant-Larios and Villalpando, 1990; Salame-Méndez et al., 1998; White and Thomas, 1992).

Since nerve centers at different levels of the neuraxis are capable of integrating thermal information and generating segment-specific effector responses (Satinoff, 1978), an interesting alternative is that the central nervous system could provide a temperature-dependent signal for the undifferentiated gonad to turn on/off the testis or ovary developmental programs. In this scenario, the central nervous system might act on the gonads differentiation process at distance through a temperature-dependent release of hypothalamic-pituitary gonadotrophic hormones (e.g., White and Thomas, 1992). Also, the central nervous system could act more directly by sensing incubation temperature and releasing local messengers from nerve terminals located close or within the gonadal parenchyma, thereby affecting the gonad differentiation programs. This would not be entirely surprising since it is known that developing nerves modulate the progression of peripheral targets' developmental programs (Purves and Lichtman, 1987). Thus, in the present work, we begin evaluating the possible participation of the spinal cord and the innervation derived from it on temperature-dependent sex determination in sea turtle *L. olivacea* embryos.

Integration of present results

Our results demonstrate the presence of AChE-positive nerve fibers in the gonads parenchyma during the TPSD. These fibers were clearly identified between developmental stages 24 and 27, but not before this time. Although we recognize that the presence of nerves alone is not enough to confirm their participation in temperature-dependent sex determination, it is important to recall that still-growing axons have the ability and the basic machinery to spontaneously release minute, but physiologically significant, amounts of neurotransmitters before contacting their final targets, even in the absence of anatomically mature synaptic contacts (e.g., Hydón and Zoran, 1993; Hydón and Drapeau, 1995; Fletcher et al., 1991). Thus, the existence of nerve fibers during the TPSD suggest the participation of the nervous system in the *L. olivacea* gonad determination and/or differentiation process.

Since fully developed nerve tracts were readily seen only between stages 24 and 27, our observations suggest that such an innervation may be more important for the process of determination of female rather than male phenotypes. Indeed, determination of testes in *L. olivacea* embryo occur earlier (stages 20–23) than in ovaries (stages 24–27) (Merchant-Larios et al., 1997). This conclusion also strengthens the notion that males are a default state in

some reptile species (see also Dorizzi et al., 1996; Lance, 1997).

Our observations showed that the developmental sequence of spinal cord maturation is alike in similarly staged male and female embryos. At the beginning of the TPSD (stage 20), the thoracic and lumbar levels of the spinal cord have a rather rudimentary structure with both the white and gray matter poorly differentiated. The anterior and lateral cords were already present albeit underdeveloped, whereas the posterior cord was essentially absent. Although the anterior and dorsal horns were not clearly identified by developmental stage 20, AChE-positive ventral and dorsal nerve roots were already formed. At stage 20, ventral nerve roots have left the spinal cord and started to branch over the abdominal cavity, while their dorsal counterpart reached the dorsal spinal cord entry point. As the TPSD proceeded, the mature-like pattern of spinal cord organization progressively emerged so that, between stages 24 and 27, all major features of the mature spinal cord cytoarchitecture and of its afferent/efferent fiber system are clearly recognizable. Thus, the higher degree of spinal cord anatomical maturation between stages 24 and 27 suggests that it might be perfectly capable of integrating level-specific thermoregulatory reflex responses, at the time when female phenotype is being determined.

An important observation is that the anterolateral region of the lateral cord is, relatively speaking, better developed than the rest of the white matter at any given developmental stage analyzed. This is of interest since, in most vertebrates, neural pathways responsible for transmitting thermal information between the spinal cord and the brain run through this area (Barr and Kierman, 1986). Our observation, then, makes feasible that thermal information could be sent to upper levels of the nervous system at very early developmental stages. Regarding this point, ongoing anatomical studies in the laboratory have shown that hypothalamic maturation parallels, to some extent, that seen in the spinal cord of putative male and female embryos (Gutiérrez-Ospina and Merchant-Larios, unpublished observations). It is important to emphasize, however, that brain stem and hypothalamic participation is not required to have primary thermoregulatory responses that are known to be under control of the spinal cord reflex function (Simon, 1974; Satinoff, 1978).

Implications for temperature-dependent sex determination

In short, our results support the hypothesis that the central nervous system participates in the process of sex determination and/or differentiation of the *L. olivacea* embryonic gonads. Our findings also suggest that thermal information and effector responses could be sent back and forth at least between spinal cord and gonadal targets even at very early developmental stages along the TPSD. It is thus likely that the nervous system could provide a chemical messenger to trigger and/or modulate gonadal differentiation after receiving temperature information from the environment. Experiments aimed at demonstrating the existence of temperature-sensitive peripheral or central receptors, the activation of central neurons to incubation temperature changes, the biochemical nature, temperature dependency, localization, and physiological role of the neural signal(s) and its (their) receptor(s), and the effects of peripheral denervation on the gonads pheno-

type in animals incubated at different temperatures are among several issues that need to be addressed to fully evaluate the merits of our proposal.

In spite of these issues, it has been known for a long time that peripheral innervation modulates the development of peripheral targets (Purves and Lichtman, 1987), and that chemical messengers such as acetylcholine, biogenic amines, and various peptides released by fully mature and immature, still-growing peripheral nerves function as trophic signals capable of modulating the differentiation program of several non-neural cell lineages (Lauder, 1993). In this regard, the presence of AChE activity in gonadal nerve fibers pin points the acetylcholine as a candidate messenger to evaluate its role on the *L. olivacea* temperature-dependent gonadal sex determination and/or differentiation. The sensory, cholinergic nature of embryonic gonadal innervation is further supported by the labeling of gonadal nerves after injecting DiI into dorsal, lower thoracic, and upper lumbar spinal cord levels. It has been documented in other vertebrate species that gonadal sensory cholinergic parasympathetic innervation arises from these spinal cord levels (Burden et al., 1983; Gerendai, 1988). A note of caution must be made since developing and mature aminergic fibers might also show AChE activity (Burden and Lawrence, Jr, 1978). In fact, Merchant-Larios and coworkers have recently demonstrated the presence of neurotensin-like immunoreactivity in gonads' nerve fibers during the TPSD (unpublished results). Because neurotensin co-localizes with catecholamines (Hokfelt, 1991; Black, 1994), these observations indirectly support the existence of catecholaminergic fibers in undifferentiated gonads. These uncertainties, by no means, hamper the significance of the results and novelty of the views proposed here.

Far-reaching conclusions

Besides potential implications of these observations for our understanding on temperature-dependent sex differentiation, the present results also present a departure from conventional views on mechanisms of vertebrate body sex differentiation. Diverse organs display sexually dimorphic metabolic and functional features. Such differences seem to arise during development as the result of interactions among sex hormones and distinct cells types within each organ. A dramatic example of this phenomenon is observed in the mammalian brain whose structural, metabolic, and behavioral sex differentiation is thought to depend on local concentrations of estrogens (Gorski, 1984; although, see Arnold, 1996). It is then generally assumed that gonad sex differentiation and the onset of their endocrine function precede sex differentiation of other body organs (Arnold, 1996). Our observations together with previous results are at odds with this view. In *L. olivacea* embryos, maturation of the spinal cord, and likely of other central nervous system regions (see above), is attained in both sexes before gonadal differentiation—at least from a structural point of view. Also, when absolute rates of development, as opposed to relative developmental rates as considered in this paper, are taken into account, female body size and maturation is more advanced than in their male counterparts at any given chronological age (Merchant-Larios et al., 1997). Brain and body size and development are therefore sexually dimorphic long before the gonad parenchyma displays any structural indication of sexual differentiation. These observations together with the presence of well-developed innervation in nominally female gonads, and the demon-

stration that central nervous system structures respond to incubation temperature in a way independent from sex hormones circulating levels (Coomber et al., 1997), support the hypothesis that temperature might first prime sex differentiation in the central nervous system (and probably in the whole body) before acting on the gonads, through differentially regulating their developmental timetable (i.e., developmental heterochrony). Our conclusion agrees with novel, nonconventional data showing that in some vertebrate species, several dimorphic features of the brain are likely determined by complex interactions between genes and factors other than sex hormones, before the onset of gonadal function (Arnold, 1996).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Elizabeth Hernández Echeagaray for valuable criticisms on earlier versions of the manuscript; Dr. Rogelio Arellano, Alejandro Marmolejo, José Baltazar, Tonantzin Pineda, Ismael Ramirez, Albin Fernández, and Leopoldo González Santos for valuable technical assistance in various aspects of this work; SEMARNAP for providing permission for the specimens collection; and Nikon Inc. for a kind donation of computational equipment that allowed the confocal imaging analysis. NAM, LGR, and RFI are CONACyT and DGPE fellows.

LITERATURE CITED

- Arnold AP. 1996. Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. *Hormon Behav* 30:495-505.
- Barr ML, Kierman JA. 1986. The human nervous system: An anatomical viewpoint. New York: Harper and Row Publishers, Inc.
- Barrios, FA, Favila R, Jirónnez-Trejo F, Gutiérrez-Ospina, Díaz-Cintra S, Merchang-Larios H. 1998. Acetylcholinesterase (AChE) positive fibers in the sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryonic gonads: Anatomical survey by 3D visualization. *Soc Neurosci* 2:160.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Rhoades TA, Bahr JM. 1984. Norepinephrine in the rat ovary: ontogeny and de novo synthesis. *Endocrinology* 115:1426-1431.
- Black IB. 1994. Information in the brain: a molecular perspective. Cambridge: MIT Press.
- Bull JJ, Gutzke WHN, Crews D. 1998. Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *Gen Comp Endocrinol* 70:425-428.
- Bulmer D. 1965. A histochemical study of ovarian cholinesterases. *Acta Anat* 62:254-265.
- Burden HW, and Lawrence IE. Jr. 1977. The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology* 23:368-378.
- Burden, HW, Lawrence IE Jr. 1978. Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *Anat Rec* 190:233-242.
- Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence IE, Jr. 1983. The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec* 207:623-627.
- Coomber P, Crews D, Gonzalez-Lima F. 1997. Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of the brain nuclei in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *J Comp Neurol* 380:409-421.
- Crews D. 1994. Animal sexuality. *Sci Am* 270 108-114
- Crews D. 1996. Temperature dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zool Sci* 13:1-13.
- Crews D, Bergeron JM, Bull JJ, Flores D, Tausignant A, Skipper JK, Wibbels T. 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev Gen* 15:297-312.
- Crews D, Cantú AR, Bergeron JM, Rhen T. 1995. The relative effectiveness of androstenedione, testosterone, and estrone precursors to estradiol, in sex reversal in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Com Endocrinol* 100: 119-127.
- D'Albora H, Barcia JJ. 1996. Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett* 205:65-67.
- Desvages G, Girondot M, Pieau C. 1993. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen Comp Endocrinol* 92:54-61.
- Dorizzi M, Mignot T-M, Guichard A, Desvages G, Pieau C. 1991. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation* 47:9-17.
- Dorizzi M, Richard-Mercier N, Desvages G, Girondot M, Pieau C. 1994. Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation* 58:1-8.
- Dorizzi M, Richard-Mercier N, Pieau C. 1996. The ovary retains male potential after the thermosensitive period for sex determination in the turtle *Emys orbicularis*. *Differentiation* 60:193-201.
- Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. 1991. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci* 11:1617-1626.
- Gerendia I. 1988. Innervation of the ovary and its functional significance. In: Genazzani AR, Montemagno U, Nappi C, Petaglia F, editors. The brain and female reproduction function. New York: Parthenon Publishing Group. p 191-195.
- Gorski RA. 1984. Sexual differentiation of the brain: Possible mechanisms and implications. *Can J Physiol Pharmacol* 63:577-594.
- Gutzke WHN, Chymiy DB. 1988. Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtles. *Gen Com Endocrinol* 71:265-267.
- Hensel H. 1973. Neural processes in thermoregulation. *Physiol Rev* 53:948-1017.
- Hokfelt T. 1991. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* 7:867-879.
- Hydon PG, Drapeau P. 1995. From contact to connection: Early events during synaptogenesis. *TINS* 18:196
- Hydon PG, Zoran MJ. 1993. Retrograde regulation of presynaptic development during synaptogenesis. *J Neurobiol* 25:694-706.
- Jessen C, Mayer ET. 1971. Spinal cord and hypothalamus as core sensors of temperature in the conscious dog: equivalence of responses. *Plügers Arch* 324:189-209.
- Jessen C, Mclean JA, Calvert DT, Findlay JD. 1972. Balanced and unbalanced temperature signals generated in spinal cord of the ox. *Am J Physiol* 222:1343-1347.
- Lance VA. 1997. Sex determination in reptiles: an update. *Am Zool* 37:504-513.
- Lance VA, Bogart MH. 1991. Tamoxifen "sex reverses" alligator embryos at male producing temperature, but is an antiestrogen in female hatchlings. *Experientia* 47:263-266.
- Lauder JM. 1993. Neurotransmitters as growth regulatory signals: Role of receptors and second messengers. *TINS* 16:223-240.
- Mercer JB, Simon E. 1984. A comparison between total body thermosensitivity and local thermosensitivity in mammals and birds. *Pflügers Arch* 400:228-234.
- Merchant-Larios H, Villalpando I. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: an organ culture study. *J Exp Zool* 254:327-331.
- Merchant-Larios H, Villalpando-Fierro I, Centeno-Urruiza B. 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetol monographs* 3:43-61.
- Merchant-Larios H, Ruiz-Ramirez S, Moreno-Mendoza N, Marmolejo-Valencia A. 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Comp Endocrinol* 107:373-385.
- Nelson DO, Heath JE, Prasser CL. 1964. Evolution of temperature regulatory mechanisms. *Am Zool* 24:791-807.
- Pieau C, Mignot T-M, Dorizzi M, Guichard A. 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.
- Purves D, Lichtman J. 1997. Principles of neural development. Cambridge, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Rhen TR, Lang JW. 1994. Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: manipulation of the embryonic sex steroid environment. *Gen Com Endocrinol* 96:243-254.

- Richard-Mercier N, Dorizzi M, Desvages G, Girondot M, Pieau C. 1995. Endocrine sex reversal of gonads by the aromatase inhibitor letrozole (CGS 20267) in *Emys orbicularis*, a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 100:314-326.
- Riedel W, Siaplauras G, Simon E. 1973. Intra-abdominal thermosensitivity in the rabbit as compared with spinal thermosensitivity. *Plügers Arch* 340:59-70.
- Salame-Mendez A, Herrera-Muñoz, Moreno-Mendoza N, Merchant-Larios H. 1998. Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J Exp Zool* 280:304-313.
- Satinoff E. 1978. Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science* 201:16-22.
- Simon E. 1974. Temperature regulation: the spinal cord as a site of extrahypothalamic thermoregulatory functions. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 71:1-76.
- Spotila JR, Spotila LD, Kaufer NF. 1994. Molecular mechanisms of TSD in reptiles: A search for the magic bullet. *J Exp Zool* 270:117-127.
- Stefenson A, Owman Ch, Sjöberg N-O, Spörng B, Wallis B. 1981. Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary, with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Res* 215:47-62.
- von Bartheld CS, Cunningham DE, Rube! EW. 1990. Neuronal tracing with DiI: Decalcification, cryosectioning, and photococonversion for light and electron microscopic analysis. *J Histochem Cytochem* 38:725-733.
- White RB, Thomas P. 1992. Stimulation of in vitro steroidogenesis by pituitary hormones in a turtle (*Trachemys scripta*) within the temperature-sensitive period for sex determination. *Biol Reprod* 47:952-959.
- Wibbels T, Crews D. 1994. Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. *J Endocrinol* 141:295-299.
- Wibbels T, Crews D. 1995. Steroid-induced sex determination at incubation temperatures mixed sex ratios in a turtle with TSD. *Gen Comp Endocrinol* 100:53-60.
- Wibbels T, Bull JJ, Crews D. 1991. Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination? *J Exp Zool* 260:130-134.
- Wibbels T, Bull JJ, Crews D. 1992. Steroid-induced male sex determination in an amniotic vertebrate. *J Exp Zool* 262:454-457.
- Wibbels T, Gideon P, Bull JJ, Crews D. 1993. Estrogen- and temperature-induced medullary cord regression during gonadal differentiation in a turtle. *Differentiation* 53:149-153.
- Wibbels T, Bull JJ, Crews D. 1994. Temperature-dependent sex determination: A mechanistic approach. *J Exp Zool* 270:71-75.