

00343
9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2ej

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIFERENCIACION SEXUAL EN Lepidochelys olivacea:
PERIODO SENSIBLE A LA TEMPERATURA, EFECTO DE LA
TEMPERATURA Y EL ESTRADIOL EN LA GONADA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA ANIMAL)
P R E S E N T A :
SALVADOR RUIZ RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M.

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por darme la oportunidad de realizar esta tesis en el laboratorio. Por los conocimientos transmitidos, las ideas, estímulos, críticas y orientación para la elaboración de la misma.

Al los sinodales y revisores: Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Irma Villalpando Fierro, Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dr. Fausto Méndez de la Cruz, Dra. Maricela Villagrán Santacruz, Dra. María del Carmen Uribe Aranzabal y Dr. Joaquín Herrera Muñoz. Por la revisión, comentarios y críticas de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio Norma A. Moreno M., Diana M. Escalante A., Rosa María Viguera V., Denhi, Enrique Salas V., J. Alejandro Marmolejo V., José G. Baltazar G. y P. Arturo Salame M. Particularmente a Norma A. Moreno M. y P. Arturo Salame M., por la ayuda en algunas técnicas.

En el trabajo de campo a los colegas, Cuahutemoc Peñaflores S. y J. Ermelí Natarén E. y respectivas familias. A la Biól. Ana Bertha Troop, por todas facilidades para obtener los permisos de colecta en la Administración de Recursos Pesqueros de la Secretaría de Pesca.

A la Universidad de Guadalajara, al Centro de Ecología Costera; al H. Consejo de Becas. Y a la Dirección General de Intercambio Académico, U.N.A.M. Por el apoyo y la beca.

A mis padres, M^a Guadalupe Ramírez de Ruiz† y Ramón Ruiz Razo†. A mis hermanos, Alejandra, Ramón, Rosa María, M^a Guadalupe, M^a del Pilar, José y Emilia S. y mi tía Cuca, por su apoyo, interés y compartir los momentos más trascendentales en la vida.

Dedico especialmente esta tesis a Gabriela Lucano Ramírez, por todo lo compartido y lo que resta.

Las colectas del material biológico se realizaron en los términos establecidos por el permiso no. 310 03 otorgado por la Secretaría de Pesca. Parte de la tesis fué financiada por el CONACYT.

INDICE

Indice de Esquemas	3
Indice de Figuras	3
Indice de Gráficas	5
Indice de Ilustraciones	6
Indice de Tablas	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Determinación Sexual en Vertebrados	12
Determinación Sexual en Reptiles	13
Estudios en la Tortuga Marina <i>Lepidochelys olivacea</i>	22
Períodos Sensibles a la Temperatura para la Determinación Sexual en Reptiles	24
Efecto de Hormonas Esteroides en el Desarrollo de la Gónada de Reptiles	27
Hipótesis sobre la Determinación del Sexo Gonadal en Reptiles con Determinación Sexual Dependiente de la Temperatura de Incubación.....	30
Genes y Diferenciación Sexual	34
Planteamiento del Problema	35
OBJETIVOS.....	36
HIPÓTESIS.....	36
MATERIAL Y METODO	37
Período Sensible a la Temperatura de Incubación para la Determinación del Sexo de la Gónada	37
Efecto de la Temperatura de Cultivo en la Gónada Aislada	39
Efecto de la Aplicación de Estradiol en la Gónada <i>in ovo</i>	40
Efecto del Estradiol en la Gónada Aislada	42
Procesamiento de Tejidos	42
RESULTADOS.....	44
Período Sensible a la Temperatura para la Determinación del Sexo de la Gónada	44
Efecto de la Temperatura de Cultivo en la Gónada Aislada	58
Efecto del Estradiol en la Gónada <i>in ovo</i>	61
Efecto del Estradiol en la Gónada Aislada de Embriones Incubados a Temperatura Masculinizante	69
DISCUSIÓN.....	71
Período Sensible a la Temperatura para la Determinación del Sexo de la Gónada	71
Efecto de la Temperatura en la Gónada Aislada	78
Efecto del Estradiol en la Gónada	81
CONCLUSIONES.....	89
LITERATURA CITADA	90

Indice de Esquemas

Esquema 1.- Patrones de respuesta a la temperatura de incubación en la determinación del sexo en reptiles	18
Esquema 2.- Hipótesis propuestas para explicar la determinación sexual dependiente de la temperatura de incubación en tortugas	33
Esquema 3.- Experimentos de doble cambio de temperatura: de feminizante a masculinizante a feminizante	53
Esquema 4.- Experimentos de doble cambio de temperatura: de masculinizante a feminizante a masculinizante	55

Indice de Figuras

Figura 1.- Ovario de una hembra a la eclosión	48	Inverso (I)
Figura 2.- Testículo de un macho a la eclosión	48	I
Figura 3.- Gónada indeterminada: Cresta genital de un embrión de etapa 18 incubado a temperatura masculinizante	48	I
Figura 4.- Gónada predeterminada: Cresta gonadal de un embrión de etapa 23 incubado a temperatura masculinizante	48	I
Figura 5.- Gónada determinada: Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 26 incubado a temperatura masculinizante	48	I
Figura 6.- Gónada indeterminada: Cresta gonadal de un embrión de etapa 22 incubado a temperatura feminizante	48	I
Figura 7.- Gónada predeterminada: Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura feminizante	48	I
Figura 8.- Gónada determinada: Ovario de un embrión de etapa 27 incubado a temperatura feminizante	48	I
Figura 9.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante	59	I
Figura 10.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada por 15 días a temperatura masculinizante	59	I
Figura 11.- Gónada aislada de un embrión en etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada por 15 días a temperatura feminizante	59	I

- Figura 12.- Cresta gonadal de un embrión de etapa 22
incubado a temperatura feminizante59 I
- Figura 13.- Gónada aislada de un embrión de etapa 22
incubado a temperatura feminizante y cultivada por
15 días a temperatura masculinizante59 I
- Figura 14.- Gónada aislada de un embrión de etapa 22
incubado a temperatura feminizante y cultivada por
15 días a temperatura feminizante59 I
- Figura 15.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25
incubado a temperatura feminizante61 I
- Figura 16.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25
incubado a temperatura feminizante y cultivada por
15 días a temperatura masculinizante61 I
- Figura 17.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25
incubado a temperatura feminizante y cultivada por
15 días a temperatura feminizante61 I
- Figura 18.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 26
incubado a temperatura feminizante61 I
- Figura 19.- Gónada aislada de un embrión de etapa 26
incubado a temperatura feminizante y cultivada 15 días a
temperatura masculinizante61 I
- Figura 20.- Gónada aislada de un embrión de etapa 26
incubado a temperatura feminizante y cultivada 15 días a
temperatura feminizante61 I
- Figura 21.- Ovario de una hembra inducida por la aplicación
de estradiol en la etapa 18 y sacrificada a la eclosión66 I
- Figura 22.- Ovario normal de una hembra inducida por la
incubación a temperatura feminizante y sacrificada a la
eclosión66 I
- Figura 23.- Ovario de una hembra inducida por la aplicación
de estradiol en la etapa 23 y sacrificada a la eclosión66 I
- Figura 24.- Ovario de una hembra inducida por la aplicación
de estradiol en la etapa 18 y sacrificada a la eclosión66 I
- Figura 25.- Testículo de un macho tratado con estradiol en
la etapa 27 y sacrificado a la eclosión66 I
- Figura 26.- Testículo normal de un macho inducido por la
incubación a temperatura masculinizante y sacrificado a la
eclosión66 I

Figura 27.- Ovario de una hembra de nueve meses posteclosión, inducida por la aplicación de estradiol cuando embrión en la etapa 24	69 I
Figura 28.- Ovario de una hembra de ocho meses posteclosión, inducida por la incubación a temperatura feminizante	69 I
Figura 29.- Ovario de una hembra de cinco meses posteclosión, provocada por la aplicación de estradiol cuando embrión en la etapa 24	69 I
Figura 30.- Ovario de una hembra de tres meses posteclosión, inducida por la aplicación de estradiol cuando embrión en la etapa 24	69 I
Figura 31.- Ovario de una hembra de seis meses posteclosión, inducida por la incubación a temperatura feminizante	69 I
Figura 32.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante	70 I
Figura 33.- Gónada asilada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada 15 días a temperatura masculinizante en presencia de estradiol (1 µg/ml de medio)	70 I
Figura 34.- Gónada asilada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada 15 días a temperatura masculinizante en presencia del vehículo (OH) ..	70 I
Figura 35.- Diferenciación histológica del ovario. Ovario de un embrión incubado a temperatura feminizante y sacrificado a los 33 días (etapa 27)	70 I
Figura 36.- Diferenciación histológica del testículo. Testículo de un embrión incubado a temperatura masculinizante y sacrificado a los 45 días (etapa 27)	70 I

Indice de Gráficas

Gráfica 1.- Morfometría de las areas medular y cortical de ovarios.....	67
Gráfica 2.- Experimentos de un cambio de temperatura: de 32 a 27°C y de 27° a 32°C	72
Gráfica 3.- Respuesta a la temperatura de cultivo de las gónadas aisladas	80

Gráfica 4.- Experimentos de un cambio de temperatura y cultivos de gónadas	80
Gráfica 5.- Efecto del estradiol en la gónada <i>in ovo</i>	82
Gráfica 6.- Experimentos de un cambio de temperatura y aplicación de estradiol	82

Indice de Ilustraciones

Ilustración 1.- La tortuga marina <i>Lepidochelys olivacea</i>	10
Ilustración 2.- Distribución mundial de <i>Lepidochelys olivacea</i> ..11	
Ilustración 3.- Dibujo de un corte transversal de un ovario inducido por la incubación a temperatura feminizante	63
Ilustración 4.- Dibujo de un corte transversal de un ovario inducido por la aplicación de estradiol	63
Ilustración 5.- Dibujos de cortes transversales de ovarios inducidos por la temperatura de incubación feminizante	64
Ilustración 6.- Dibujos de cortes transversales de ovarios inducidos por la aplicación de estradiol en etapas embrionarias.....	65

Indice de Tablas

Tabla 1.- Las diferentes especies de tortuga marina y su distribución.....	10
Tabla 2.- Localización mundial de las principales playas de anidación de la tortuga <i>Lepidochelys olivacea</i>	12
Tabla 3.- Determinación del sexo en vertebrados	13
Tabla 4.- Primeros registros de determinación sexual por efecto de la temperatura de incubación en los principales grupos de reptiles	15
Tabla 5.- Determinación del sexo en reptiles	16
Tabla 6.- Registros de la influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en las tortugas marinas sin incluir a <i>Lepidochelys olivacea</i>	20

Tabla 7.- Registros de la influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en la tortuga marina <i>Lepidochelys olivacea</i>	23
Tabla 8.- Experimentos de un cambio de temperatura: de masculinizante a feminizante	47
Tabla 9.- Experimentos de un cambio de temperatura: de feminizante a masculinizante	47
Tabla 10.- Cultivos de gónadas aisladas de embriones incubados a temperatura masculinizante	60
Tabla 11.- Cultivos de gónadas aisladas de embriones incubados a temperatura feminizante	60
Tabla 12.- Aplicación de estradiol en la gónada <i>in ovo</i> : Análisis del efecto a la eclosión	62
Tabla 13.- Morfometría en ovarios inducidos por la aplicación de estradiol y la temperatura feminizante: Comparación de las áreas medular y cortical	67
Tabla 14.- Aplicación de estradiol en la gónada <i>in ovo</i> : Análisis del efecto entre los meses tres y nueve posteclosión ..	69
Tabla 15.- Análisis del efecto del estradiol en la gónada aislada.....	70
Tabla 16.- Correspondencia entre el día de incubación y la etapa de desarrollo alcanzada en función de la temperatura de incubación (Masculinizante o Feminizante)	72
Tabla 17.- Correspondencia entre las etapas morfológicas de Miller ('85) y las de Yntema ('68)	74
Tabla 18.- Períodos sensibles a la temperatura (PST) para la determinación del sexo en tortugas	74
Tabla 19.- Relación cronológica entre el período sensible a la temperatura (PST) y el de diferenciación morfológica de la gónada en algunos reptiles	76

RESUMEN

En muchos reptiles la temperatura de incubación en etapas embrionarias determina el sexo. En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, temperaturas mayores de 32°C producen hembras, mientras que los machos se desarrollan a temperaturas menores de 28°C. Se ha sugerido una hipótesis que propone la participación del sistema nervioso. Esta tesis planteó: a) delimitar el período sensible a la temperatura para la determinación del sexo, b) conocer el efecto de la temperatura de cultivo en la gónada aislada y c) investigar el efecto del estradiol en la gónada *in ovo* y aislada. Para conocer el período sensible a la temperatura, se realizaron experimentos de un cambio de temperatura con embriones de las etapas 17 a 27. Los cambios fueron de temperatura masculinizante a feminizante y cambios a la inversa. Además, se realizaron experimentos de doble cambio de temperatura, es decir, de temperatura masculinizante a feminizante a masculinizante y cambios a la inversa. Para evaluar el efecto de la temperatura en la gónada aislada, se realizaron cultivos de gónadas aisladas de embriones de las etapas 25 y 26, previamente incubados a temperatura masculinizante. También se realizaron, cultivos de gónadas aisladas de embriones de las etapas 22, 23, 25 y 26, provenientes de temperatura feminizante. Para conocer el efecto del estradiol en la gónada *in ovo*, la hormona se aplicó a huevos con embriones de las etapas 17 a 27 incubados a temperatura masculinizante. El efecto del estradiol en la gónada se determinó en tortugas a la eclosión y hasta de nueve meses de vida. Además, se realizaron comparaciones morfométricas de ovarios de hembras inducidas por la aplicación de estradiol respecto de ovarios de hembras inducidas por la incubación a la temperatura feminizante. Para investigar el efecto de estradiol en la gónada aislada, se realizaron cultivos de gónadas en presencia del estradiol incubados a temperatura masculinizante.

El período sensible a la temperatura de ambos sexos, en base a una escala de desarrollo morfológico se ubica entre las etapas 20 a 26. A su vez, cuando este período se determina en una escala cronológica, se ubica entre los días de incubación 12 a 30. En la gónada aislada, la temperatura masculinizante provocó que los cordones medulares se mantuvieran y la temperatura feminizante indujo que los cordones medulares se disgregaran. En la corteza de las gónadas aisladas, la temperatura de cultivo no indujo efecto consistente. Por otro lado, cuando el estradiol se aplicó a embriones de las etapas 17 a 25 provocó feminización de la gónada en todos los embriones. Cuando el estradiol se aplicó a embriones de las etapas 25-26 y 26 feminizó la gónada de algunos embriones. En la etapa 27 no logró feminizar la gónada. Comparaciones morfométricas entre ovarios inducidos por el estradiol y la temperatura feminizante, mostraron diferencias entre estos dos tipos de ovarios. La feminización inducida por el estradiol se mantiene en tortugas de nueve meses posteclosión. El estradiol no indujo clara feminización en la gónada aislada. Los resultados obtenidos parecen apoyar la hipótesis de que el sistema nervioso central puede participar en el proceso de determinación sexual de la gónada de la tortuga marina *L. olivacea*.

DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN *Lepidochelys olivacea*: PERÍODO SENSIBLE A LA TEMPERATURA, EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL ESTRADIOL EN LA GÓNADA.

INTRODUCCIÓN

Los reptiles (actualmente con más de 6,000 especies) forman una de las cinco clases de vertebrados que evolucionaron de anfibios primitivos hace más de 200 millones de años llegando a dominar prácticamente todos los ambientes de la tierra en el Mesozoico (Bellairs y Altridge, '75). Hoy en día los reptiles están representados por las tortugas (con 244 especies), cocodrilos (22 especies), serpientes (2,389 especies), lagartijas (3,751 especies), anfisbénidos (144 especies) y el tatuara de Nueva Zelanda (Bellairs y Altridge, '75; Janzen y Paukstis, '91). Las tortugas constituyen el grupo de reptiles más primitivo y desde su aparición, desarrollaron la capacidad de invadir con éxito varios ambientes, estando representadas por las tortugas terrestres, las dulceacuícolas y las marinas (Ernst y Barbour, '89).

Las tortugas marinas se clasifican en dos familias con un total de ocho especies, algunas de éstas presentan amplia distribución mundial, Tabla 1 (Márquez-Millán y col., '90; Ernst y Barbour, '89). A los mares mexicanos llegan siete de las ocho especies, Tabla 1, por lo cual, algunos especialistas han denominando a México como "El país de las tortugas" (Márquez-Millán y col., '90). El presente estudio incluye como modelo de estudio a la tortuga marina *L. olivacea* (Ilustración 1).

L. olivacea también conocida como tortuga golfina, se distribuye mundialmente en latitudes cercanas a los trópicos, habitando principalmente en el hemisferio Norte y teniendo como límite de distribución las regiones isotérmicas de los 20°C,

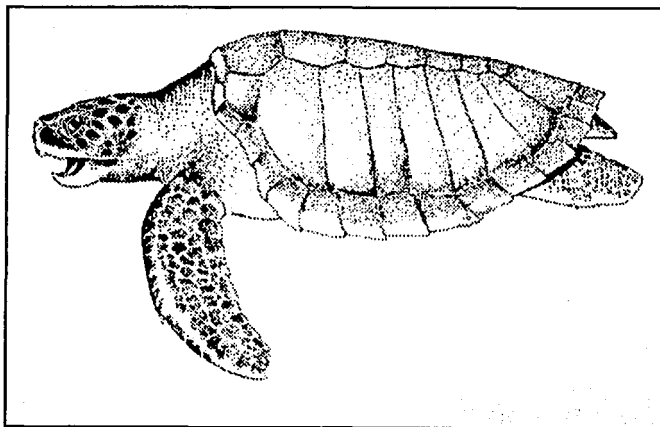
Tabla 1.- Las diferentes especies de tortuga marina y su distribución.

Familia	Género	Especie	Subespecie	Nombre común	Rango de distribución	Distribución en México
Cheloniidae	<i>Caretta</i>	<i>caretta</i>	<i>caretta</i>	Cahuama	Mundial	Golfo y Caribe
	<i>Caretta</i>	<i>caretta</i>	<i>gigas</i>	Perica	Mundial	Pacífico (1)
	<i>Chelonia</i>	<i>mydas</i>		Blanca	Mundial	Golfo y Caribe
	<i>Chelonia</i>	<i>agassizi</i>		Prieta	Pacífico(2)	Pacífico
	<i>Eretmochelys</i>	<i>imbricata</i>	<i>imbricata</i>	Carey	Mundial	Golfo y Caribe
	<i>Eretmochelys</i>	<i>imbricata</i>	<i>bisa</i>	Carey	Mundial	Pacífico
	<i>Lepidochelys</i>	<i>kempi</i>		Lora	Atlántico(3)	Golfo y Caribe
	<i>Lepidochelys</i>	<i>olivacea</i>		Golfina	Mundial	Pacífico
Dermochelyidae	<i>Natator</i>	<i>depressus</i>		Kikila	Australia	-
	<i>Dermochelys</i>	<i>coriacea</i>	<i>coriacea</i>	Laúd	Mundial	Golfo y Caribe
	<i>Dermochelys</i>	<i>coriacea</i>	<i>schlegelii</i>	Tinglada	Mundial	Pacífico

1:No anida, solo arriba temporalmente

2:Desde el pacifico mexicano hasta Perú.

3:Golfo de México, Mar Caribe y norte del Atlántico

Ilustración 1.- La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

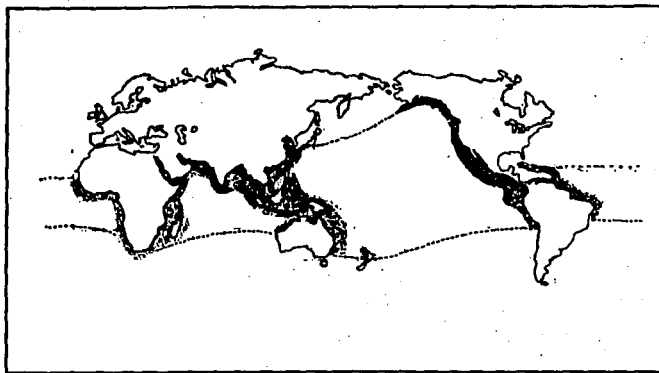


Ilustración 2.- Distribución mundial de *Lepidochelys olivacea*.

Ilustración 2 (Márquez-Millán, '90).

Las tortugas marinas *L. olivacea* y *L. kempi*, son las únicas especies que manifiestan el comportamiento reproductivo denominado arribazón, que consiste en la llegada masiva de hembras a los sitios de anidación (en cientos o miles) durante un período de tres a siete días (Márquez- Millán, '90). Las hembras depositan en promedio 100 huevos por nido, teniendo regularmente de dos a tres anidaciones por temporada reproductiva. De todas las tortugas marinas, la especie más abundante es *L. olivacea* conociendo el amplio intervalo de distribución mundial y la concentración de algunas poblaciones en determinados países, Tabla 2 (Márquez-Millán, '90). En México, *L. olivacea* anida en muchas playas distribuidas a lo largo del Pacífico, desde el estado de Sinaloa hasta Chiapas (Márquez-Millán y col., '90). Cabe resaltar, que la playa de mayor anidación para esta especie es la de La Escobilla, ubicada en Oaxaca.

Tabla 2.- Localización mundial de las principales playas de anidación de la tortuga *Lepidochelys olivacea*

País	Anidaciones por año
México	más de 200,000
Costa Rica	más de 200,000
Nicaragua	más de 20,000
Guatemala	3,000
Honduras	3,000
Surinam	más de 2,000
Guyana Francesa	más de 500
Angola, Namibia y Costa de Marfíl	500
Malasia e Isla de Adaman	menos de 1000
India	más de 300,000

También *L. olivacea*, es la especie de tortuga marina que anida en mayor número en playas mexicanas (Márquez-Millán y col., '90).

DETERMINACIÓN SEXUAL EN VERTEBRADOS

En los vertebrados la determinación sexual se establece por efecto de factores genéticos, ambientales o ambos, Tabla 3 (Deeming y Ferguson, '88; Bull, '80, '85). El tipo de Determinación Sexual Genética (DSG), lo manifiestan en su totalidad las aves y los mamíferos, así como también muchos peces, anfibios y reptiles y se distingue porque el sexo del individuo se establece al momento de la fertilización mediante el genotipo y no es modificado por el ambiente (Janzen y Paukstis, '91). Esta forma de determinación sexual incluye machos heterogaméticos ($XX\sigma:XY\sigma$, típico en mamíferos), hembras heterogaméticas ($ZW\sigma:ZZ\sigma$ común en aves) y arreglos poco comunes como cromosomas homomórficos (en algunas serpientes) (Janzen y Paukstis, '91).

Tabla 3.- Determinación del sexo en vertebrados.

Clase	Tipos de determinación sexual			
	Determinación sexual genética		Determinación sexual ambiental	
	Número relativo de especies	Tipos de cromosomas	Número relativo de especies	Factor
Peces	Muchas: XX/XX, ZW/ZZ, XX/XY		Algunas:	T, pH
Anfibios	Muchas: XX/XX, ZW/ZZ, XX/XY		Algunas:	T
Reptiles	Muchas: XX/XX, ZW/ZZ, XX/XY		Muchas:	T
Aves	Todas:	ZW/ZZ	Ninguna	-
Mamíferos	Todas:	XX/XY	Ninguna	-

XX/XX= machos y hembras sin cromosomas sexuales evidentes

ZW/ZZ= hembras heterogaméticas; XX/XY= machos heterogaméticos

T= Temperatura ambiental; pH= pH del medio acuático

En los vertebrados el tipo de Determinación Sexual Ambiental (DSA), ocurre en peces, anfibios y reptiles, siendo común en este último grupo (Bull, '80). Esta forma de determinación sexual se caracteriza por el establecimiento del sexo, después de que el embrión (o larva) en ciertos estadios del desarrollo ha estado expuesto al factor ambiental determinante (Janzen y Paukstis, '91). La DSA se conoce mediante dos factores determinantes: a) la temperatura de incubación ambiental para algunos peces, anfibios y reptiles (Conover y Kynard, '81; Dournon y col., '90; Bull, '80) y b) el pH del agua para ciertas especies de peces (Rubin, '85).

DETERMINACIÓN SEXUAL EN REPTILES

En los reptiles la forma más frecuente de DSA es la de Determinación Sexual Dependiente de la Temperatura de incubación (DSDT) (Bull '80). Esta forma consiste en que la temperatura de incubación experimentada en ciertas etapas embrionarias determina el sexo del individuo (Janzen y Paukstis, '91). Los primeros

hallazgos de **DSDT** en el grupo de los reptiles fueron reportados por Charnier ('66), Pieau ('71) y Ferguson y Joanen ('82), Tabla 4. En otro estudio, Yntema ('76), reportó la **DSDT** en la tortuga de agua dulce *Chelydra serpentina*. En esta especie la incubación de huevos a 20° y 30°C provocó la eclosión del 100% de hembras; a 24°C se desarrolló el 100% de machos; ambos sexos se diferenciaron en los intervalos 21°-23° y 26°-29°C, pero con un mayor porcentaje de machos a 22° y 28°C.

De las aproximadamente 6,551 especies de reptiles, se han realizado estudios del cariotipo en más de 1000, y de éstas, 329 presentaron cromosomas sexuales heteromórficos, 25 especies mostraron cromosomas homomórficos. Sólo 94 especies han sido estudiadas para conocer si presentan **DSDT**, de éstas, 72 especies manifestaron **DSDT** (Janzen y Paukstis, '91). Ninguna especie con cromosomas sexuales heteromórficos presenta **DSDT**. Hasta la fecha, la **DSDT** se ha encontrado en las tortugas, cocodrilos y lagartijas (Janzen y Paukstis, '91).

En los grupos de reptiles se presentan los diferentes tipos de determinación sexual, Tabla 5. En el orden Chelonia (tortugas), la **DSDT** es bastante frecuente con algunas excepciones. Algunas tortugas muestran **DSG**: se han registrado machos heterogaméticos ($XX\sigma/XY\sigma$) en *Staurotypus triporcatus*, *S. salvinii* (Bull y col., '74), *Siebenockiella crassicollis* (Carr y Bickham, '81) y *Platemys radiolata* (McBee y col., '85). Al parecer existen hembras heterogaméticas ($ZW\sigma/ZZ\sigma$) en *Kachuga smithi* (Sharma y col., '75). Mientras que, *Trionyx spiniferus* presenta **DSG** pero sin cromosomas sexuales (Vogt y Bull, '82a).

Las lagartijas como las tortugas manifiestan amplia variación en los tipos de determinación sexual, presentando: **DSDT**, machos o hembras heterogaméticas e individuos con cromosomas sexuales homomórficos (Janzen y Paukstis, '91).

Tabla 4.- Primeros registros de determinación sexual por efecto de la temperatura de incubación en los principales grupos de reptiles.

Investigadores	Grupo	Especie	T. de incubación : % de machos	
Charnier ('66)	Lagartijas	<i>Agama agama</i>	26.5°C: 2	29°C: 100
Pieau ('71)	Tortugas	<i>Emys orbicularis</i>	< 27.5°C: 100	29-30°C: 0
		<i>Testudo graeca</i>	< 30°C: 100	31-33°C: 0
Ferguson y Joanen ('82)	Cocodrilos	<i>Alligator mississippiensis</i>	< 30°C: 0	> 34°C: 100

T= Temperatura

%= porcentaje

En el grupo de las serpientes, todas las especies estudiadas presentan **DSG** mediante hembras heterogámicas o individuos con cromosomas sexuales homomórficos. En ningún miembro de este grupo se ha reportado **DSDT** (Janzen y Paukstis, '91). La tuatara y los anfisbénidos parecen mostrar **DSG** (Janzen y Paukstis, '91).

A diferencia de los otros grupos, todas las especies de cocodrilos estudiadas presentan **DSDT**. En estudios realizados investigando el cariotipo, todos los miembros de este grupo presentaron cromosomas homomórficos (Cohen y Gans, '70), condición necesaria para la **DSDT** (Bull, '80). Lo anterior puede indicar que la **DSDT** es universal para los cocodrilos a diferencia de los otros grupos de reptiles (Janzen y Paukstis, '91).

Se mencionó que la **DSDT** es la forma más frecuente de **DSA** en reptiles, pero al parecer no es la única, Gutzke y Paukstis ('83), encontraron que la variación en el contenido de humedad (potencial hídrico) del sustrato de incubación influyó en la determinación sexual de la tortuga *Chrysemys picta*. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes y aún es dudosa la influencia del factor humedad en la determinación del sexo y más que resultados similares no se han logrado repetir (Packard y col., 91).

Tabla 5.- Determinación del sexo en reptiles.

Grupo Taxonómico	Tipos de determinación sexual			
	Determinación sexual genética		Determinación sexual ambiental	
	Número relativo de especies	Tipos de cromosomas	Número relativo de especies	Factor
Tortugas	Algunas: XX/XX, ZW/ZZ, XX/XY		La mayoría:	T, H2O?
Tuatara	Todas (1)	?	Ninguna	-
Anfisbénidos	Muchas:	?	?	?
Lagartijas	Muchas: XX/XX, ZW/ZZ, XX/XY		Algunas:	T
Serpientes	Todas: XX/XX, ZW/ZZ		Ninguna	-
Cocodrilos	Ninguna	-	Todas:	T

XX/XX= machos y hembras sin cromosomas sexuales evidentes

ZW/ZZ= hembras heterogámicas; XX/XY= machos heterogámicos

T= Temperatura de incubación; H2O?= humedad, no se ha reconfirmado

?= no se conoce

Después de numerosas investigaciones se han encontrado cinco patrones de respuesta a la temperatura de incubación en la determinación sexual de los reptiles, Esquema 1 (Bull, '80; Head y col., '87; Dournon y col., '90):

Patrón 1: Tipo *E. orbicularis*, Esquema 1, Gráfica A:

Los dos sexos se obtienen con la incubación en un intervalo estrecho de temperatura. Arriba de este intervalo todos los individuos producidos son hembras fenotípicas, mientras que debajo de este mismo intervalo de temperatura se obtiene el 100% de machos fenotípicos (Pieau, '76). Este patrón lo presentan la mayoría de tortugas.

Patrón 2: Tipo *A. mississippiensis*, Esquema 1, Gráfica B:

Es opuesto al anterior patrón, produciéndose el 100% de machos fenotípicos con la incubación arriba del intervalo crítico de temperatura y el 100% de hembras fenotípicas producidas debajo del intervalo crítico (Ferguson y Joanen, '82). Este tipo de respuesta

se ha encontrado en los cocodrilos *Crocodylus niloticus*, *C. siamensis*, *Caiman crocodylus* (Deeming y Ferguson, '88), *C. moreletii* (Aguilar-Miguel, '94). También parece ocurrir en dos especies de lagartija *A. agama* (Charnier, '66) y *Eublepharis macularius* (Wagner, '80).

Patrón 3: Tipo *C. serpentina*, Esquema 1, Gráfica C:

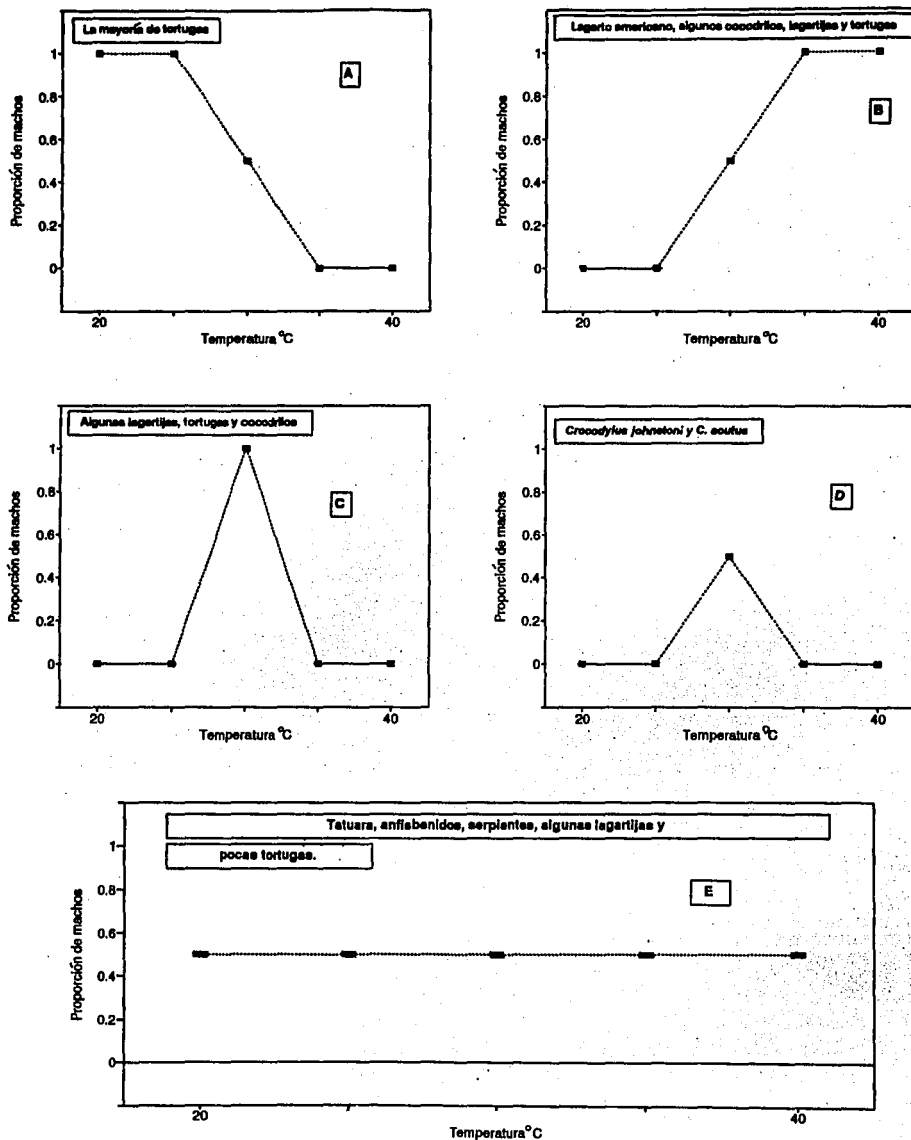
El 100% de hembras fenotípicas son producidas tanto a temperaturas frías como a temperaturas calientes y el 100% de machos fenotípicos se obtienen a temperaturas intermedias; en este patrón se presentan dos intervalos críticos de temperatura, uno a temperaturas bajas y el otro a altas (Yntema, '76). Este patrón también ocurre en la lagartija *Gekko japonicus* (Tokunaga, '85) y en dos especies de cocodrilos *C. porosus* y *C. palustris* (Deeming y Ferguson, '88). Y pudiera ocurrir en otras especies (Gutzke y Paukstis, '84).

Patrón 4: Tipo *C. johnstoni*, Esquema 1, Gráfica D:

En esta especie, hembras fenotípicas fueron obtenidas en todas las temperaturas de incubación y los machos fenotípicos sólo se produjeron entre 31° y 32.5°C, pero siempre en menor porcentaje que las hembras (Webb y Smith, '84). Este tipo de respuesta también parece ocurrir en *C. acutus*, sólo que en esta especie la incubación a 32°C produjo 50% de machos y 50% de hembras (Aguilar-Miguel, '94). Esta forma pudo derivarse del patrón 3, al reducirse el intervalo de temperatura crítico que permite la determinación de machos (Dournon y col., '90).

Patrón 5: Tipo *Lacerta viridis*, Esquema 1, Gráfica E:

En este caso, la temperatura de incubación no interfiere en la determinación del sexo. En un estudio, se incubaron huevos de



Esquema 1.- Patrones de respuesta a la temperatura de incubación en la determinación del sexo en reptiles.

L. viridis a diferentes temperaturas, desde 17.5° hasta 35°C, para cada temperatura la proporción sexual fue aproximadamente de 1 macho:1 hembra (Raynaud y Pieau, '72). Esta forma también lo presentan: la lagartija *Dipsosaurus dorsalis* (Muth y Bull, '81), la víbora *Nerodia fasciata* (Osgood, '80) y las tortugas *Chelodina longicollis* (Georges, '88), *Emydura signata*, *E. macquarii* (Thompson, '88) *Clemmys insculpta* (Bull y col., '85) y *Trionyx spiniferus* (Vogt y Bull, '82a).

La DSDT también se ha registrado en las tortugas marinas, tanto en condiciones naturales como en estudios de laboratorio, Tabla 6.

Las investigaciones sobre la DSDT han puesto en evidencia la necesidad de definir términos propios de este fenómeno, tales como el de temperatura crítica (Pieau, '76), temperatura pivote (Mrosovsky e Yntema, '80), temperatura umbral (Bull, '80) y período sensible a la temperatura (Yntema, '79; Pieau y Dorizzi, '81; Bull y Vogt, '81; Bull, 87;). La temperatura crítica, Pieau ('76), la define como la temperatura de incubación en la cual, los individuos que nacen expresan el sexo fenotípico de acuerdo al sexo genético, en tanto a temperaturas de incubación por debajo o arriba de la temperatura crítica, una parte de los organismos adquieren un fenotipo sexual diferente a su sexo genético. Bull ('80), definió la temperatura umbral, como la temperatura en donde la proporción de sexos producida es de 1 macho:1 hembra, temperaturas por encima o por debajo de esta temperatura umbral, inducen el predominio de un sexo. Mrosovsky e Yntema ('80), definieron la temperatura pivote, como la temperatura en donde la proporción es 1 macho: 1 hembra. Si bien, los tres términos describen lo mismo desde un punto de vista práctico, se da preferencia al de temperatura pivote, porque ha sido muy utilizado, además el término umbral es aplicado ampliamente en otros contextos. En tanto, el término de temperatura crítica, puede provocar confusión porque crítico

Tabla 6.- Registros de la influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en las tortugas marinas sin incluir a *Le pidochelys olivacea*.

Especie	Porcentaje de machos producidos a diferentes temperaturas de incubación (°C)							Investigadores			
	25	26	27	28	29	30	31		32	33	34
<i>C. caretta</i>		100		100		56		0		0	Yntema y Mrosovsky, '79
<i>C. caretta</i>	100	100	*80		50	*0		0			Limpus y col., '83
<i>C. mydas</i>		85			10					14	Miller y Limpus, '81
<i>C. mydas</i>	Nidos en campo: la incubación a temperatura fría produjo más machos y nidos incubados a temperatura caliente desarrollo más hembras									Morreale y col., '82	
<i>C. agassizi</i>	Nidos en playa									Díaz y Alvarado, '88	
<i>D. coriacea</i>	Nidos en campo: el sexo de la gónada es influido por la temperatura de incubación y esta depende de la ubicación del nido y fecha de oviposición									Benabib-Nisenbaum, '84	
<i>D. coriacea</i>			*100	*100							Dutton y col., '85
<i>D. coriacea</i>			100	100	100		0				Lescure y col., '85
<i>D. coriacea</i>			100	100	100*	*0		0			Rimblot y col., '85
<i>L. kempí</i>	Nidos en campo: < 28.6°C 100 %; > 31.2°C 0 %									Aguilar-Reyes, '87	
<i>L. kempí</i>	Nidos en campo en Isla Padre, Texas: temperaturas de incubación bajas produjeron machos y temperaturas de incubación alta produjeron hembras									Shaver y col., '88	
<i>E. imbricata</i>	Reporte de un nido en campo: temperaturas de incubación bajas solo produjeron machos									Dalrymple, '85	

*X= la temperatura se ajustó 0.5°C hacia abajo.

X*= la temperatura se ajustó 0.5°C hacia arriba.

algunas veces se refiere al período o intervalo del desarrollo durante el cual, la temperatura influye en la determinación sexual (Mrosovsky y Pieau, '91).

La DSDT en reptiles se ha encontrado en estudios de campo y se ha confirmado en investigaciones de laboratorio (Paukstis y Janzen, '90; Janzen y Paukstis, '91). La sobrevivencia de los embriones hasta la eclosión ha sido lo suficientemente elevada como para descartar la hipótesis de que los resultados obtenidos se deban a la mortalidad diferencial de los sexos por efecto de la temperatura (Vogt y Flores-Villela, '86).

Investigaciones de campo demostraron que la ubicación del nido influye en la proporción sexual y en general, determinados nidos solo producen hembras, otros únicamente machos y algunos producen los dos sexos (Janzen y Paukstis, '91). Vogt y Bull ('82b), estudiando a la tortuga *Graptemys* spp., encontraron que los nidos que produjeron hembras estuvieron localizados en playas abiertas (a distancia de la vegetación y por tanto con exposición directa a los rayos del sol), mientras que los nidos que produjeron machos estuvieron asociados con manchones de vegetación densa.

Bull, ('80) señala que la DSG y la DSA, son tipos alternativos que no ocurren simultáneamente en una misma especie. Sin embargo, menciona que no hay una separación absoluta entre DSG y DSA, ya que las especies que viven en un ambiente heterogéneo pueden presentar DSG que opera en determinadas condiciones y al modificarse estas condiciones pudiera presentarse la DSA que operaría en condiciones diferentes a la DSG para una misma especie. Otro estudio ha demostrado que en la DSA ocurre un efecto genético moderado en la determinación del sexo, cuando los huevos son incubados a temperaturas cercanas a la temperatura pivote (Vogt y Bull, '82b). Sin embargo, Dournon y col., ('90) y Zaborski y col., ('88), argumentan que ambos tipos de determinación pueden coexistir y manifestarse. Se ha demostrado en salamandras y en la tortuga *E. orbicularis* que el sexo genético es superado o enmascarado por las temperaturas de incubación altas o bajas, éstas producen sólo un sexo fenotípico y paralelamente se expresan los dos sexos genéticos.

Los tipos de determinación sexual que presentan los reptiles hasta hace poco tiempo eran desconocidos. En las últimas décadas han sido el centro de muchas investigaciones, sobre todo en cocodrilianos y tortugas, tal vez porque en estas últimas los huevos son fáciles de obtener y el número por nido es relativamente grande (Bull, '80; Janzen y Paukstis, '91). La diversidad en los tipos de determinación sexual es muy marcada en los principales

grupos de los reptiles. Ambos tipos de determinación, genética o ambiental pueden presentarse en una misma subfamilia o género. Estos hechos sugieren que los dos tipos de determinación sexual, pudieron evolucionar independientemente en varias ocasiones. Además, categóricamente hablando, dos tipos de determinación sexual parecidos no necesariamente son homólogos. Por ejemplo, en las serpientes ocurren diferentes subtipos de hembras heterogaméticas entre diferentes familias y dentro de una misma familia. Estas formas pudieron tener orígenes independientes (Janzen y Paukstis, '91). Conforme más información se obtiene sobre la DSDT, se observa claramente que este fenómeno es muy variable y complejo. Por ejemplo, en las diferentes especies de tortuga, la temperatura pivote para cada especie no es la misma, observándose diferencias tanto entre especies, como entre poblaciones de una misma especie de tortuga (Bull y col., '82a; Bull y col., '82b; Limpus y col., '85). Además, la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares que controlan la DSDT, se complica por la influencia potencial de factores distintos a la temperatura, como son el fondo genético y la amplia variación en las metodologías experimentales utilizadas por los investigadores (Janzen y Pukstis, '91).

ESTUDIOS EN LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea*

Los primeros registros de DSDT en tortuga marina *L. olivacea* se presentan en la Tabla 7. Observaciones de campo sugirieron que la temperatura de incubación determina el sexo en los embriones de la tortuga golfina *L. olivacea* (Morreale y col., '82). La temperatura pivote para esta especie parece ubicarse en o cerca de los 30°C (McCoy y col., '83; Silva-Bátiz y col., '86), aunque otro estudio no apoya este valor (Dimond y Mohanty-Hejmadi, '83). Para esta misma especie, se realizó un estudio del cariotipo en machos, observándose que el número diploide de cromosomas es de 56, presentando 24 macrocromosomas y 32 microcromosomas (Bhunya y

Tabla 7.- Registros de la influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en la tortuga marina *Le pidochelys olivacea*.

% de machos producidos a las temperaturas de incubación (°C).										Investigadores
25	26	27	28	29	30	31	32	33		
Datos de campo: nidos en zona abierta 0 %; nidos en la sombra 75 %; incubación en caja: 99.5 %										Ruiz y col., '81
100			88		60			0		McCoy y col., '83
		100*			0*			0*		Dimond y Mohanty-II., '83
		100*	100	*40		0	0	0*		Mohanty-H. y col., '85
98*	*98									Standora y Spotila, '85
		100*			dos sexos*			0*		Mohanty-H. y Dimond, '86
		100/			50/			0/		Silva-Bátiz y col., '86

X* = la temperatura se ajustó 0.5°C hacia arriba.

*X = la temperatura se ajustó 0.5°C hacia abajo.

% = porcentaje

/ = promedio de temperaturas.

Mohanty-Hejmadi, '85).

Se ha demostrado en *L. olivacea*, que la incubación de huevos (transplantados de nidos naturales o extraídos del oviducto) en cajas de unicel provocó el 100% de masculinización en los neonatos eclosionados, esto debido a las bajas temperaturas de incubación (26°-28°C) (Millán-Gómez, '88).

Salame-Méndez ('92), realizó un estudio en *L. olivacea*, encontrando que las gónadas embrionarias de ambos sexos tienen la capacidad de aromatizar la testosterona a estradiol. La concentración sérica de estas hormonas, fue mayor en los machos que en las hembras. También, se detectó la presencia del receptor a estradiol en el complejo gónada-mesonefros de embriones incubados a temperaturas masculinizante y feminizante. Sin embargo, estos estudios se realizaron en embriones de etapas relativamente avanzadas.

Merchant-Larios y col. ('89), describieron el desarrollo morfológico de la gónada de *L. olivacea* a nivel de ultraestructura. Observaron que las gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante se diferencian primero (a los 31-32 días) que las gónadas incubadas a temperatura masculinizante (45 días). Así también, en la gónada indiferenciada incubada a temperatura feminizante se detectaron terminaciones nerviosas. Además, tanto el ovario como el testículo no presentan actividad esteroidogénica, sólo la glándula interrenal en la etapa de eclosión. Por las observaciones realizadas, los autores indican que la diferenciación sexual gonadal es morfológicamente incipiente para los dos sexos.

Merchant-Larios y Villalpando ('90), utilizando a *L. olivacea* como modelo, estudiaron el efecto directo de la temperatura en la diferenciación de la gónada aislada de embriones de diferentes etapas de desarrollo. Encontraron, que la temperatura de cultivo (masculinizante o feminizante), no influyó en la diferenciación sexual de la gónada en cultivo.

PERÍODOS SENSIBLES A LA TEMPERATURA PARA LA DETERMINACIÓN SEXUAL EN REPTILES

Los estudios que se han realizado investigando la **DSDT** en condiciones de laboratorio pueden ser divididos en tres tipos: a) la incubación a temperaturas constantes, b) la incubación a temperaturas fluctuantes y c) experimentos de cambio de temperatura (Janzen y Paukstis, '91). Estos tipos de incubación han sido utilizados para conocer la presencia o ausencia de **DSDT** en reptiles, para determinar el período sensible a la temperatura en especies con **DSDT** y para investigar los posibles mecanismos que controlan los procesos de determinación y diferenciación sexual para estas especies (Bull, '80; Janzen y Paukstis, '91).

Algunos estudios han encontrado que el sexo de la gónada de un reptil con DSDT, comienza a determinarse por efecto de la temperatura a partir del segundo tercio del desarrollo, de tal forma que no es necesaria su permanencia durante todo el desarrollo embrionario (Yntema, '79; Bull y Vogt, '81; Pieau y Dorizzi, '81). A este intervalo del desarrollo se le denomina Período Sensible a la Temperatura (PST) (Yntema, '79; Bull y Vogt, '81; Pieau y Dorizzi, '81). Para delimitar el PST, se han utilizado estrategias de cambios de temperatura. Estos experimentos incluyen la incubación inicial de huevos a temperaturas que producen machos o hembras y después de un tiempo se cambian a la temperatura que produce el sexo opuesto. El cambio a la otra temperatura puede ser permanente hasta la eclosión (experimentos de un cambio) o por un tiempo específico antes de que se cambien a la temperatura de incubación inicial (experimentos de doble cambio) (Yntema, '79; Bull y Vogt, '81; Pieau y Dorizzi, '81; Wibbels y col., '91a; Janzen y Paukstis, '91).

Es importante conocer el PST en reptiles con DSDT, sobre todo para aquellas especies que requieran de la conservación y el manejo al estar en peligro o amenazadas de extinción, ya que la proporción sexual puede ser manipulada al controlar la temperatura de incubación (Mrosovsky e Yntema, '80; Mrosovsky y Pieau, '91). Además, la ubicación del PST, permite realizar investigaciones moleculares y fisiológicas del fenómeno en dicho intervalo del desarrollo embrionario (Pieau y col., '82; Gutzke y Bull, '86; Bull, y col., '88).

En la tortuga semiacuática *C. serpentina*, el PST para la determinación sexual de la gónada para ambos sexos abarca las etapas 14 a 19 (Yntema, '79).

En la tortuga europea *E. orbicularis*, el PST para la determinación sexual gonadal abarca las etapas 16 a 22. Para inducir el desarrollo de machos se necesita un menor intervalo

entre etapas (etapas 16 a 21) que para inducir el 100% de hembras (16 a 22) (Pieau y Dorizzi, '81). Sin embargo, el tiempo de exposición para ambos sexos se extiende de 11 a 12 días.

En la tortuga *Trachemys scripta*, el PST inicia en la etapa 16 y continua hasta la etapa 19 o 20, dependiendo del régimen específico de incubación (Wibbels y col., '91a).

Bull y Vogt ('81), investigando en las tortugas *Graptemys ouachitensis* y *Chrysemys picta*, encontraron que la temperatura determina el sexo gonadal entre las etapas 16 a 22. A este intervalo del desarrollo le denominaron período sensible primario de determinación sexual, el cual abarca todas las etapas del desarrollo en donde el sexo gonadal puede quedar determinado de manera irreversible. Cronológicamente, este período ocupa el segundo tercio del desarrollo embrionario.

En una especie de tortuga marina se conoce el PST. En la caguama *C. caretta*, el PST para la determinación sexual de la gónada ocurre entre las etapas 15 y 22, la temperatura feminizante parece influir más en la determinación sexual que la temperatura masculinizante (Yntema y Mrosovsky, '82).

En el gecko *E. macularius*, el PST se ubica entre las etapas 32 a 37, este período abarca gran parte de la primera mitad del desarrollo embrionario. De acuerdo a una escala cronológica, el PST se presenta comparativamente un poco antes en el gecko y el lagarto americano, *A. mississippiensis* (en la primera mitad) que en las tortugas (segundo tercio), debido a que los primeros grupos presentan un desarrollo embrionario más avanzado al momento de la oviposición (Bull, '87).

Algunos estudios al correlacionar el PST con el desarrollo de la gónada, sugieren que la temperatura de incubación empezaría a actuar en una etapa en donde la gónada se encuentra

morfológicamente indiferenciada (Pieau y Dorzzi, '81; Bull, '87; Wibbels y col., '91a).

Los reptiles que presentan DSDT, conjuntamente han mostrado que el PST para la determinación sexual inicia desde el segundo tercio o en la primera mitad del desarrollo embrionario (Wibbels y col., '91a).

EFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL DESARROLLO DE LA GÓNADA DE REPTILES

Los primeros estudios fisiológicos sobre la determinación sexual en los vertebrados, sugirieron la posible participación de las hormonas esteroides en la morfogénesis gonadal, esto en base a estudios en los que se administraron estrógenos a embriones y larvas de algunas especies (Gutzke y Chymiy, '88). Si bien, en peces y anfibios, la diferenciación de la gónada puede estar principalmente bajo control genético, se ha demostrado en algunas especies de peces y anfibios, que la influencia hormonal temprana puede ocasionar reversión sexual en la diferenciación de la gónada sin modificar la información genética del sexo (Takahashi, '75; Döhler, '86). Específicamente, cuando a larvas genéticas femeninas del pez *Oryzias latipes* se les trata con andrógenos, éstas se desarrollan como machos fenotípicos fisiológicamente reproductivos, los cuales al cruzarse con hembras genotípicas, sólo tuvieron descendencia femenina; a su vez, la administración de estrógenos a larvas genéticas masculinas, provocó el desarrollo de hembras fértiles (Döhler, '86). En otro estudio, la aplicación de estradiol en las etapas de desarrollo 44-50 de machos genéticos de *Xenopus laevis*, provocó reversión sexual gonadal (Villalpando y Merchant-Larios, '90).

En tortugas, Pieau ('70), inyectó estradiol (70-180 μg) a huevos de *T. graeca* incubados a temperaturas masculinizantes. Al aplicar el esteroide en etapas previas a la diferenciación sexual de la gónada, la hormona inhibió el desarrollo de los tubos seminíferos conservando el epitelio germinal de la gónada, pero sin parecerse a una corteza típica de ovario. Cuando el estradiol se agregó en etapas posteriores a la diferenciación gonadal, el esteroide afectó parcialmente el desarrollo de los cordones y tubulos seminíferos engrosando ligeramente el epitelio germinal.

En otro estudio, Pieau ('74) suministró estradiol a huevos de *E. orbicularis* incubados a temperaturas masculinizantes. La hormona se administró al inicio del período de diferenciación sexual de la gónada. Las dosis mayores (80 a 120 μg) provocaron que se mantuviera el epitelio germinal e indujera regresión de los tubulos seminíferos. Las dosis menores (50 a 80 y 5 a 10 μg) causaron el desarrollo de ovarios típicos y gónadas bisexuales (ovotestis).

Gutzke y Bull ('86), administraron hormonas esteroides a huevos de las tortugas *Chrysemys picta* y *Chelydra serpentina*. Las hormonas se inyectaron en etapas tardías del PST. La testosterona y el estradiol indujeron feminización en embriones incubados a temperaturas masculinizantes. El efecto feminizante fue más claro cuando se aplicó el estradiol que con la testosterona, este último feminizó aproximadamente el 50% de los embriones tratados.

Bull y col. ('88), inyectaron estradiol (10, 15 y 20 μg) a huevos de *A. mississippiensis*, *E. macularius* y *T. spiniferus*, incubados a temperaturas masculinizantes. La hormona indujo la eclosión de hembras en las tres especies. Sin embargo, enontraron que el esteroide provocó mortalidad en los embriones (entre el 6 y 60 %).

Gutzke y Chymiy ('88), aplicaron estradiol a huevos de la tortuga *C. serpentina* en diferentes etapas del desarrollo (antes de

la etapa 10 y hasta la 22). Cuando el esteroide se adicionó entre las etapas 10 a 19, éste feminizó gran parte de los individuos (90%). Y cuando el esteroide se agregó antes de la etapa 10 y después de la 22, no feminizó la gónada. Con lo anterior, proponen que hay un período de sensibilidad a la hormona para inducir feminización, el cual parece coincidir con el PST.

La administración de estradiol o de un agonista de estrógenos (R2858) a huevos de *C. serpentina*, provocó que los embriones incubados a temperaturas masculinizantes se desarrollaran como hembras. A su vez, la inyección de suero antiestradiol a embriones ocasionó que algunos individuos eclosionaran con gónadas ambiguas o indiferenciadas. Los resultados del tratamiento con antisueros, sugieren que las hormonas esteroides endógenas pudieran tener un papel natural en la diferenciación sexual de reptiles que presentan DSDT (Crews y col., '89).

Wibbels y col. ('91b), trabajando con *T. scripta*, encontraron que mediante la combinación de la aplicación de estradiol más la incubación a temperatura pivote (de 28.2°C), provocó la eclosión de un mayor porcentaje de hembras que las esperadas cuando se aplica cada factor de forma independiente (sólo estradiol o sólo la incubación a 28.2°C). Los autores sugieren que hay un efecto de sinergismo entre la temperatura de incubación y el estradiol para inducir feminización gonadal. Y proponen que la temperatura y el estradiol pudieran actuar al feminizar la gónada en una vía común en los reptiles con DSDT.

Wibbels y Crews ('92), administraron estradiol y un agonista de estrógenos (dietilestilbestrol) a huevos de *T. scripta* incubados a temperaturas masculinizantes. Los anteriores agentes provocaron feminización gonadal. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la diferenciación sexual femenina inducida por esteroides esta mediada por receptores específicos a estrógenos.

En *T. scripta*, la aplicación de estrógenos (benzoato de estradiol o 17 β -estradiol) a embriones incubados a temperaturas masculinizantes, provocó feminización gonadal de manera dependiente a la dosis administrada: mayor porcentaje de feminización se obtuvo con las dosis más altas de estradiol (Crews y col., '91). En el geco *E. macularius*, también se ha reportado un efecto feminizante del estradiol que es dependiente de la dosis aplicada (Tousignant y Crews, '94).

Gahr y col., ('92), investigaron en embriones de la tortuga *T. scripta*, las regiones de incorporación de estradiol radioactivo durante el período sensible a la temperatura. Encontraron que gran número de células del mesonefros y de la glándula interrenal incorporaron el estradiol, mientras que prácticamente ninguna célula de la gónada incorporó esta hormona. Con lo anterior, los autores sugieren que en la determinación sexual la acción del estradiol sobre la gónada puede ser indirecta.

HIPÓTESIS SOBRE LA DETERMINACIÓN DEL SEXO GONADAL EN REPTILES CON DETERMINACIÓN SEXUAL DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.

Hasta la fecha, se desconocen los eventos moleculares y fisiológicos básicos que expliquen la DSDT. Para tratar de explicar como la temperatura de incubación determina el sexo gonadal en reptiles con DSDT, se han propuesto tres hipótesis, Esquema 2:

A) Raynaud y Pieau ('85), proponen la primera hipótesis para la tortuga *E. orbicularis* (Esquema 2, Figura A). Sugieren que la temperatura de incubación afectaría la biosíntesis de enzimas involucradas en la esteroidogénesis (aromatasa), las cuales, a su vez modificarían la síntesis de hormonas esteroides sexuales (estrógenos) y del antígeno H-Y. El primordio gonadal H-Y⁺ se desarrollaría como ovario si la concentración de estrógenos fuera relativamente mayor durante el PST; en cambio, en el testículo

(siendo H-Y) la concentración de estrógenos sería baja o nula durante este período. Otras propuestas, apoyan esta hipótesis. Bogart ('87), propone que la proporción relativa de hormonas esteroides (masculinas o femeninas provocada por las aromatasas) promueve la diferenciación ovárica. Se ha encontrado que durante el PST, la actividad de las aromatasas gonadales se incrementa en los ovarios en desarrollo en tanto que en los testículos permanece baja. Lo anterior se reporta para las tortugas *E. orbicularis* y *D. coriacea* (Desvages y Pieau, '92a y b; Desvages y col., '93). Para estas mismas especies, se encontró mayor concentración de estrógenos en ovarios que en testículos (Dorizzi y col., '91; Desvages y col., '93). A diferencia, en la tortuga *T. scripta*, no se encontraron claras diferencias en la concentración de esteroides en el suero de ambos sexos y solo en los machos de la etapa 19, la concentración de estradiol en suero es mayor que en las hembras (White y Thomas, '92c). Además, para esta misma especie, encontraron que juntos el riñón y la adrenal pueden secretar activamente esteroides, mientras que las gónadas por sí solas no son capaces de hacerlo (White y Thomas, 92a).

B) Crews y col. ('89), desarrollaron esta hipótesis para la tortuga *C. serpentina* (Esquema 2, Figura B). Es muy similar a la anterior hipótesis y plantea que la determinación del sexo gonadal ocurre mediante la participación de hormonas esteroides sexuales. La temperatura de incubación (feminizante) activaría diferencialmente enzimas termolábiles, las cuales actuarían sobre precursores de las hormonas esteroides (del vitelo, y/o de la gónada y/o interrenal) y con ello se incrementaría la biosíntesis de estrógenos, que en el primordio gonadal, por un lado antagonizarían la acción de las hormonas masculinizantes y por el otro estimularían la diferenciación y proliferación de la región cortical de la gónada provocando la diferenciación ulterior del ovario.

c) Merchant-Larios y Villalpando ('89 y '90) plantean la tercera hipótesis, específicamente para la tortuga marina *L. olivacea* (Esquema 2, Figura C). A partir de los hallazgos encontrados en sus estudios resumen lo siguiente:

a) En la gónada *in ovo*, el cambio de temperatura realizado en etapas tempranas del desarrollo influye en la determinación sexual gonadal, produciendo una tortuga con el sexo acorde a la segunda temperatura de incubación. Mientras que, cuando el cambio de temperatura masculinizante a feminizante ó viceversa se realiza en etapas avanzadas del desarrollo, dicho cambio de temperatura no modificó el sexo gonadal que, por tanto, ya estaba determinado.

b) En la gónada aislada, en condiciones de cultivo, el cambio de temperatura no influyó en la diferenciación sexual de la misma, aún si el cambio de temperatura se realiza en etapas tempranas.

c) En la etapa de gónada indiferenciada a nivel de microscopía electrónica se observaron terminaciones nerviosas en la gónada de embriones incubados a temperatura feminizante.

Con lo anterior, los autores proponen que la determinación sexual de la gónada por efecto de la temperatura, puede tener origen extragonadal. Es decir, la temperatura de incubación feminizante induciría la biosíntesis-liberación de una(s) neurohormona(s), la(s) cual(es) sería(n) inhibida(s) por la temperatura masculinizante. Merchant-Larios y Villalpando ('89), sugieren que las neurohormonas actuarían sobre el primordio gonadal femenino y provocarían la biosíntesis de hormonas esteroides (¿estrógenos?), los cuales inducirían la diferenciación sexual del ovario.

Un hallazgo reciente parece apoyar esta última hipótesis. White y Thomas ('92b), observaron en la tortuga *T. scripta* que algunas gonadotropinas estimularon la síntesis *in vitro* de

A
 Raynaud y Pleau (1985)
Emys orbicularis
 Temperatura Feminizante

33

Activación de Enzimas		
antígeno HY+	Período Termosensible	antígeno HY-
Activación	Aromatasas	Inhibición
Biosíntesis	Estrógenos	No biosíntesis
	Provocarían Diferenciación	
Ovario		Testículo

B
 Crews y col. (1989)

Cheyltra serpentina

Temperatura Feminizante

Activación Diferencial
 De Enzimas Termolábiles

Actuarían Sobre Precusores
 Hormonas Esteroides Sexuales
 Vitelo/Gónada/Interrenal

Provocarían la
 Biosíntesis de Estrógenos
 Gónada

Estimularían la Corteza		Antagonizarían el Efecto de Hormonas Masculinas
	Diferenciación del Ovario	

C

Merchant-Larios y
 Villalpando (1989, 1990)

Lepidochelys olivacea

Temperatura Feminizante

Induciría en el SNC

Liberación de
 Neurohormona(s)

Primordio Gonadal
 Induciría la Biosíntesis
 de Hormonas Esteroides
 Sexuales (Estrógenos?)

Provocarían la
 Diferenciación del Ovario

Esquema 2.- Hipótesis propuestas para explicar la determinación sexual dependiente de la temperatura de incubación en tortugas. SNC= Sistema Nervioso Central.

esteroides por parte del mesonefros y las adrenales, mientras que las gónadas solas no respondieron al estímulo de gonadotropinas.

GENES Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Se han realizado pocas investigaciones a nivel del ADN. En un estudio (para *L. kempfi* y *C. mydas*), se encontraron bandas de ADN Bkm (Bandas de fractura menor) específicas en machos (de 16.6 Kb) (Demas, y col., '90). Estos autores proponen que las bandas de ADN (Bkm) son excindidas mediante la temperatura feminizante modificando secuencias cercanas que provocarían la diferenciación del ovario.

En el humano (como en el ratón), la determinación del sexo del macho es dirigida por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma Y. A este gen se le conoce genéricamente como TDF (Factor Determinante del Testículo) o específicamente como SRY (Región determinante del Sexo en el cromosoma Y) (Koopman y col., '90). Este gen promueve, en la gónada embrionaria la diferenciación testicular, que posteriormente inducirá la diferenciación sexual masculina. En ausencia de este gen (SRY) la gónada se diferencia como ovario (Tiersch y col., '91). En un estudio Tiersch y col. ('91), mediante "Southern" investigaron la presencia de genes homólogos al SRY en diferentes especies de la escala animal, incluidos reptiles con DSDT. Se identificaron genes homólogos al SRY en los dos sexos de peces, reptiles (*C. mydas*, *A. mississippiensis* y *E. macularius*, especies con DSDT) y aves. Como habría de esperarse en los mamíferos se detectaron bandas homólogas al SRY únicamente en los machos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La información obtenida hasta el momento sobre la determinación sexual en reptiles es abundante. Sin embargo, son pocos los estudios que pretenden conocer las bases fisiológicas del período sensible a la temperatura para la determinación del sexo. Este conocimiento es fundamental para realizar investigaciones fisiológicas y/o moleculares sobre la diferenciación sexual en especies con determinación sexual dependiente de la temperatura de incubación. Además, esta información es esencial para aplicarse en estudios ecológicos, de conservación y manejo de reptiles amenazados o en peligro de extinción. Por lo anterior, se considera importante delimitar el período sensible a la temperatura para la determinación del sexo en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

OBJETIVOS

1. Delimitar el período sensible a la temperatura para inducir la determinación del sexo en embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.
2. Determinar el efecto de la temperatura de cultivo en la gónada aislada de embriones incubados previamente a temperaturas masculinizante y feminizante.
3. Conocer el efecto de la aplicación de estradiol en la gónada *in ovo* en embriones de diferentes etapas del desarrollo incubados a temperatura masculinizante.
4. Investigar el efecto que provoca el estradiol en la gónada aislada en cultivo de órganos de embriones incubados a temperatura masculinizante.

HIPÓTESIS

La temperatura de incubación induce la producción y liberación de algún factor extragonadal que promueve la determinación del sexo de la gónada en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron huevos de la tortuga marina *L. olivacea* de nidos de reciente oviposición, colectados en la playa de la Escobilla (96°27'16" L.O., 15°40'36" L.N.), en la costa central del estado de Oaxaca, México. Las colectas se realizaron en diferentes meses de tres años consecutivos (1991-1993). Los huevos colectados se colocaron en cajas de unicel con vermiculita húmeda estéril. Se trasladaron a la ciudad de México por vía terrestre. En el laboratorio los huevos se ubicaron en cajas de plástico y fueron cubiertos con vermiculita estéril húmeda. Las cajas con huevos se introdujeron en incubadores de temperaturas controladas de $27 \pm 0.5^{\circ}$ (masculinizante) y $32 \pm 0.5^{\circ}$ (feminizante). Diariamente se registró la temperatura mediante termómetros colocados en el interior de los incubadores. Las temperaturas de incubación se seleccionaron con base en resultados de McCoy y col. ('83) y Silva-Bátiz y col. ('86).

Para estandarizar el grado de desarrollo de los embriones se siguieron las claves descritas por Miller ('85) de tortugas marinas.

PERÍODO SENSIBLE A LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LA GÓNADA

Se realizaron dos tipos de experimentos:

A) Experimentos de un cambio de temperatura.

En esta serie de experimentos los huevos se incubaron inicialmente a una temperatura (masculinizante o feminizante) y cuando los embriones alcanzaron diferentes etapas de desarrollo (17

a 27) se cambiaron a la temperatura opuesta permaneciendo en esta última temperatura hasta la eclosión. Estos experimentos de cambio de temperatura fueron:

- 1) Masculinizante → feminizante
- 2) Feminizante → masculinizante

B) Experimentos de doble cambio de temperatura.

Para esta serie de experimentos, los huevos se incubaron inicialmente a una temperatura (masculinizante o feminizante) y después de algunos días se cambiaron a la temperatura opuesta permaneciendo en ésta diferentes días (una o más etapas de desarrollo) y finalmente se regresaron a la temperatura de incubación inicial. Estos experimentos fueron:

- 1) Feminizante → masculinizante → feminizante
- 2) Masculinizante → feminizante → masculinizante

Concretamente en los ensayos del inciso 1, los embriones iniciaron el desarrollo a temperatura feminizante y posteriormente se trasladaron a la temperatura masculinizante permaneciendo en esta por algunos días (o etapas) y finalmente se regresaron a la temperatura feminizante quedándose en esta última hasta la eclosión. Es decir, a estos embriones se les otorgó un pulso de temperatura masculinizante entre pulsos de temperatura feminizante al inicio y final del desarrollo embrionario. En los ensayos de inciso 2, los embriones recibieron un tratamiento de temperatura de manera inversa al inciso 1.

En cada experimento de cambio se tomaron uno o dos embriones para determinar la etapa de desarrollo morfológico y conocer el

grado de desarrollo de la gónada de estos embriones al momento de cada experimento. Las tortugas se sacrificaron después de la eclosión. Las gónadas se fijaron y procesaron (ver más adelante). Se obtuvieron cortes semifinos y se observaron al microscopio óptico. Para determinar el sexo de las tortugas, se siguieron los criterios morfológicos de la gónada descritos por Merchant-Larios y Villalpando ('89).

EFEECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO EN LA GÓNADA AISLADA

En este grupo de experimentos se utilizaron: a) embriones incubados a temperatura masculinizante de las etapas 25 y 26, y b) embriones incubados a temperatura feminizante de las etapas 22, 23, 25 y 26. Estas etapas fueron seleccionaron con base a las observaciones realizadas por Merchant-Larios y Villalpando ('90).

PROCEDIMIENTO.

De cada embrión se aislaron el par de gónadas. Las condiciones de cultivo se siguieron con base en Merchant-Larios y Villalpando ('90). Cada gónada se colocó sobre un filtro (Nucleopore de 1 μm de diámetro de poro; Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA) flotando en 2 ml de medio de cultivo L-15 (Difco USA) sin suero y suplementado con NaCl 0.06 M (Wolf. '79) más antibióticos (penicilina/estreptomycin). Las gónadas sobre los filtros suspendidos en el medio de cultivo se colocaron en cajas de Petri en condiciones de ambiente húmedo dentro de microcámaras de cultivo. De cada embrión, una gónada se cultivó a temperatura masculinizante y la otra a feminizante. El medio de cultivo se cambió por nuevo a los cinco y diez días de cultivo. A los 15 días las gónadas se fijaron en una solución de Karnovsky ('65) sin calcio. Los tejidos se procesaron siguiendo la técnica para microscopía electrónica. Se realizaron cortes semifinos de las gónadas.

Al inicio de cada cultivo se tomaron uno o dos embriones para determinar la etapa de desarrollo morfológico y el estado de diferenciación de la gónada de los embriones al inicio del experimento.

Para determinar el efecto de la temperatura en la gónada se tomaron los criterios morfológicos descritos por Merchant-Larios y Villalpando ('90).

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ESTRADIOL EN LA GÓNADA *in ovo*.

En esta serie de experimentos se utilizaron huevos con embriones de las etapas 17 a 27 (excepto de la etapa 19) incubados a temperatura masculinizante. En el cascarón de cada huevo se señaló una zona vascularizada, en ésta, se colocó un "anillo" (cápsula Been recortada) adherido con cera de abeja. Se consideraron dos lotes experimentales:

- 1) Lote control: a) Se aplicó 6.25 μ l del vehículo (aceite de sésamo) por huevo.
- 2) Lote tratados: b) Se aplicó 6.25 μ l de la solución de estradiol (12.5 μ g de benzoato de estradiol) por huevo.

La hormona y el vehículo se aplicaron tópicamente sobre el cascarón. Después de administrar estos agentes, los embriones continuaron la incubación a temperatura masculinizante.

Evaluación del efecto del estradiol en la gónada

El efecto del estradiol en la gónada se analizó en dos tiempos diferentes: A) A la eclosión y B) Entre los tres a nueve meses posteclosión:

A) En tortugas de reciente eclosión: en donde el estradiol se administró previamente a embriones de las etapas 17 a 27.

B) En tortugas de entre tres y nueve meses posteclosión: para este estudio primeramente se tomó un grupo de huevos ($n=13$) con embriones de la etapa 24 a los cuales se les aplicó estradiol. Estos huevos tratados se dejaron eclosionar y las crías se mantuvieron en cautiverio hasta por un período máximo de nueve meses de vida posteclosión. Las tortugas en cautiverio se confinaron en acuarios y se les proporcionó como alimento trozos de filete de pescado.

Para conocer el efecto que provocó el estradiol en la gónada de las tortugas tratadas se realizaron comparaciones morfológicas con las gónadas de tortugas del lote control y de hembras producidas por la temperatura feminizante.

Comparación morfométrica entre ovarios inducidos por la incubación a temperatura feminizante y la aplicación de estradiol.

Después de que se observaron diferencias histológicas entre ovarios de hembras producidas por la temperatura y ovarios inducidos por la aplicación de estradiol, se realizó una comparación morfométrica entre estos dos tipos de ovarios. Los ovarios se procesaron y se obtuvieron cortes transversales semifinos ($1-2 \mu\text{m}$). Con una cámara lúcida (Nikon, 1.25X) acoplada a un microscopio (Nikon), se realizaron dibujos de las áreas medular y cortical de los dos tipos de ovario. Mediante un planímetro polar se obtuvieron mediciones de las áreas de 26 ovarios inducidos por los dos factores. Se obtuvieron las áreas medular y cortical (en μm^2). Se calcularon la media y desviación estándar para las áreas cortical y medular de los dos tipos de ovarios. Se realizaron comparaciones de medias con la prueba t de student, utilizando un $\alpha < 0.05$.

EFFECTO DEL ESTRADIOL EN LA GÓNADA AISLADA

Estos experimentos se realizaron con embriones de las etapas 25, 25-26 y 26 previamente incubados a temperatura masculinizante. Las anteriores etapas fueron seleccionadas con base en lo encontrado por Merchant-Larios y Villalpando ('90).

Para estos cultivos se procedió básicamente de igual forma que en los anteriores de cultivo de gónadas. De cada embrión se aisló el par de gónadas, una se cultivó en presencia de estradiol (1 $\mu\text{g/ml}$ de medio; lote tratado). Como vehículo se utilizó etanol absoluto. La otra gónada se cultivó en presencia del vehículo (lote control). Las gónadas en cultivo se mantuvieron a temperatura masculinizante. Se realizaron cambios de medio a los cinco y diez días de cultivo, al día 15 las gónadas se fijaron en una solución de Karnovsky. Los tejidos se procesaron siguiendo la técnica para microscopía electrónica y se obtuvieron cortes semifinos.

Al inicio de cada cultivo se tomaron uno o dos embriones para determinar la etapa de desarrollo morfológico y el grado de diferenciación de la gónada.

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Los embriones y las crías se decapitaron. Rápidamente se aislaron y fijaron las gónadas en una solución de Karnovsky ('65) sin calcio, durante una hora. Posteriormente se dejaron una hora en una solución de cacodilato de sodio. Se postfijaron en tetraóxido de ósmio durante una hora (Zetterqvist, '56). El tejido se deshidrató en etanol (en concentraciones crecientes de 70% a 100%, durante 15 minutos cada vez). Se dejaron en óxido de propileno (dos cambios de 20 minutos cada uno), se preincluyeron en una mezcla de óxido de propileno y epon 812 en proporción 1:1 (una hora), después

en una mezcla igual pero en proporción 1:2, respectivamente (una hora). Se dejaron en una mezcla de epon a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se incluyeron en epon por 24 horas. Se obtuvieron cortes semifinos (1-2 μm) con un ultramicrotomo (LKB, Bromma, Nova, Suecia). Para la tinción se utilizó azul de toluidina (al 0.5 %). Los cortes se observaron con un microscópio óptico (Zeiss, Alemania).

RESULTADOS

PERÍODO SENSIBLE A LA TEMPERATURA PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LA GÓNADA.

A.- Experimentos de un solo cambio de temperatura:

Se realizaron diferentes experimentos de cambio de temperatura con huevos de la tortuga marina *L. olivacea*. Considerando en primer lugar los experimentos de cambio de temperatura masculinizante a feminizante, los resultados se muestran en la Tabla 8. Cuando el cambio de temperatura se realizó con embriones de etapas tempranas (17, 18 y 19), únicamente eclosionaron hembras (Figura 1). A su vez, cuando el cambio de temperatura se efectuó con embriones de las etapas 20 a 23, se desarrollaron machos y hembras, resultando mayor número de machos en el cambio de la etapa más avanzada (23). En el cambio de temperatura realizado con embriones de las etapas 24 a 27 únicamente eclosionaron machos (Figura 2).

En los anteriores experimentos se puede anotar lo siguiente. En los embriones de las etapas 17 a 19 la temperatura masculinizante (la primera temperatura de incubación) no influyó en la determinación del sexo gonadal, ya que todos los embriones que eclosionaron fueron hembras. Lo anterior indica que la temperatura feminizante (la temperatura de cambio) si influyó al 100% en la determinación del sexo de los embriones de etapas tempranas (17 a 19), es decir todos los embriones fueron sensibles a la temperatura feminizante ya que todos fueron hembras. A este intervalo del desarrollo embrionario le denominamos período de indeterminación o de no determinación sexual gonadal, el cual incluye a los embriones de etapas anteriores a la 20 (Figura 3). Los embriones de estas etapas no determinaron el sexo con la primera temperatura, fue la temperatura de cambio la que determinó el sexo.

La temperatura masculinizante comienza a influir en la determinación sexual en los embriones de las etapas 20 y subsiguientes, esto se concluye, ya que de todos los embriones que se cambiaron a la temperatura feminizante algunas tortugas se desarrollaron como machos, es decir no respondieron al cambio de temperatura feminizante por que antes del cambio estaban determinados como machos. Entre más tiempo permanecieron en la temperatura masculinizante (antes del cambio de temperatura) mayor fue el número de embriones que se determinaron como machos. A este intervalo del desarrollo embrionario le denominamos período de **predeterminación** o de **determinación parcial** sexual e incluye a embriones de las etapas 20 a 23 (Figura 4). Este período se caracteriza porque sólo algunos o muchos (y no el 100%) de los embriones quedaron determinados como machos antes del cambio a la temperatura feminizante. A su vez, cuando los embriones permanecieron en la temperatura masculinizante al menos hasta la etapa 24 o hasta la 27, la temperatura determinó el sexo en todos los embriones provocando la eclosión de machos únicamente. Es decir, los embriones pasaron el tiempo suficiente en la temperatura masculinizante para que todos se determinaran como machos. A este intervalo del desarrollo embrionario le denominamos período de **determinación** sexual de la gónada e incluye a embriones de las etapas 24 y subsiguientes (Figura 5). Esto es, la incubación continua a temperatura masculinizante hasta la etapa 24 o posteriores asegura el 100% de machos. Conjuntamente estos resultados indican que el período sensible a la temperatura para que ocurra la determinación testicular abarca las etapas de desarrollo 20 a 23, como ya se mencionó a este mismo intervalo se le puede denominar período de **predeterminación** sexual.

Continuando con los cambios de temperatura feminizante a masculinizante, los resultados se muestran en la Tabla 9. Cuando el cambio de temperatura se realizó con embriones de las etapas 17 a 23, únicamente se desarrollaron machos. En los cambios de temperatura efectuados con embriones de las etapas 24 a 26, se

obtuvieron machos y hembras. Si bien, en el cambio de la etapa 26 eclosionaron ambos sexos, principalmente se desarrollaron hembras. En el cambio de temperatura con embriones de la etapa 27 sólo eclosionaron hembras.

En estos experimentos de cambio de temperatura feminizante a masculinizante con embriones de las etapas 17 a 23, se observa que la temperatura feminizante (la primera temperatura de incubación) no influyó en la determinación del sexo, ya que en estos experimentos todos los embriones se desarrollaron como machos, lo que indica que la temperatura masculinizante influyó al 100% en la determinación del sexo. Este intervalo del desarrollo embrionario corresponde al período de **indeterminación** del sexo de la gónada e incluye a los embriones de las etapas anteriores a la 24 (Figura 6). Posteriormente, la temperatura feminizante comenzó a influir en la determinación sexual de la gónada en los embriones de las etapas 24 y subsiguientes, esto se deduce porque de todos los embriones que se cambiaron a la temperatura masculinizante algunos eclosionaron como hembras, indicando que no respondieron el cambio a la temperatura masculinizante, mientras que otros embriones si fueron sensibles a este cambio de temperatura (los que eclosionaron como machos). Entre más tiempo permanezcan en la temperatura feminizante (antes del cambio de temperatura) mayor será el número de embriones que se determinen como hembras. Estamos entonces en lo que denominamos período de **predeterminación** sexual de la gónada e incluye a embriones de las etapas 24 a 26 (Figura 7), en donde la incubación a temperatura feminizante hasta estas etapas determina el sexo de algunos embriones (no de todos). A su vez, cuando los embriones permanecieron en la temperatura feminizante hasta la etapa 27, la temperatura determinó el sexo en todos los embriones provocando la eclosión de únicamente hembras. Es decir los embriones pasaron el tiempo suficiente en la temperatura feminizante para que todos se determinaran como hembras de manera irreversible. Correspondiendo entonces al período de **determinación** sexual e incluye a embriones de la etapa 27 (Figura 8) y

Tabla 8.- Experimentos de un cambio de temperatura: de masculinizante a feminizante.

Los embriones se incubaron inicialmente en la temperatura masculinizante y después de alcanzar diferentes etapas de desarrollo (17 a 27) se cambiaron a la temperatura feminizante permaneciendo hasta la eclosión.

Etapas de Cambio	Número de Tortugas	Sexo		Periodo
		Macho	Hembra	
17	11	0	11	Indeterminación
18	17	0	17	Indeterminación
19	11	0	11	Indeterminación
20	19	5	14	Predeterminación
21	33	14	19	Predeterminación
22	76	40	36	Predeterminación
23	97	90	7	Predeterminación
24	34	34	0	Determinación
25	8	8	0	Determinación
26	17	17	0	Determinación
27	9	9	0	Determinación

Tabla 9.- Experimentos de un cambio de temperatura: de feminizante a masculinizante.

Los embriones se incubaron inicialmente a temperatura feminizante y después de alcanzar diferentes etapas de desarrollo (17 a 27) se cambiaron a la temperatura masculinizante permaneciendo hasta la eclosión.

Etapas de Cambio	Número de Tortugas	Sexo		Periodo
		Macho	Hembra	
17	19	19	0	Indeterminación
18	11	11	0	Indeterminación
19	11	11	0	Indeterminación
20	18	18	0	Indeterminación
21	9	9	0	Indeterminación
22	18	18	0	Indeterminación
23	18	18	0	Indeterminación
24	74	70	4	Predeterminación
25	85	53	32	Predeterminación
26	32	1	31	Predeterminación
27	22	0	22	Determinación

subsiguientes. Esto es, la incubación continua a temperatura feminizante hasta la etapa 27 o posteriores asegura el 100% de hembras. Conjuntamente, estos resultados indican que el período sensible a la temperatura para que ocurra la determinación del ovario abarca a embriones de las etapas de desarrollo 24 a 26, a estas mismas etapas se le puede denominar período de **predeterminación sexual**.

Los resultados de los experimentos de un cambio de temperatura, de masculinizante a feminizante y viceversa, muestran de manera general tres tipos de respuesta de los embriones a la temperatura de incubación en la determinación sexual de la gónada. En la primera, la temperatura de incubación inicial no influye en la determinación del sexo de los embriones, de tal forma que todos éstos adquieren el sexo según la temperatura de cambio. Este período de **indeterminación sexual** de la gónada, incluye a embriones de etapas tempranas del desarrollo. Este período puede explicarse porque: a) el embrión y la gónada presentan poco desarrollado para que se desencadenen los mecanismos de determinación sexual, b) los eventos de determinación sexual, se pudieron haber disparado en las etapas iniciales pero fueron revertidos por el cambio de temperatura, c) los embriones y la gónada no han acumulado el tiempo suficiente en la temperatura de incubación para que se activen los procesos de determinación sexual. La segunda respuesta se observa cuando se obtienen crías de los dos sexos por el cambio de temperatura. Algunos embriones adquirieron el sexo de la primera temperatura de incubación (antes del cambio de temperatura los embriones ya habían determinado el sexo), mientras que otros embriones desarrollaron el sexo acorde a la segunda temperatura de incubación (estos embriones fueron sensibles al cambio de temperatura). Este período de **predeterminación sexual** de la gónada, incluye a embriones de etapas desarrollo intermedias. Se le denomina período de **determinación parcial sexual**, porque solo una parte de los embriones establece el sexo de la primera temperatura de incubación. Este período es equivalente a lo que muchos

LAMINA I

Figura 1.- Ovario de una hembra a la eclosión. El ovario presenta la corteza (C) engrosada con algunas células germinales (G), mientras que en la médula se observan restos de lo que fueron cordones medulares (R). 200X.

Figura 2.- Testículo de un macho a la eclosión. El testículo presenta epitelio plano simple (E) y en la médula se distinguen claros cordones medulares (M). 200X.

Figura 3.- Gónada Indeterminada: Cresta genital de un embrión de etapa 18 incubado a temperatura masculinizante. Se observa el epitelio celómico ligeramente engrosado (E). 200X.

Figura 4.- Gónada Predeterminada: Cresta gonadal de un embrión de etapa 23 incubado a temperatura masculinizante. Se observa una célula germinal (G) en el epitelio celómico. 200X.

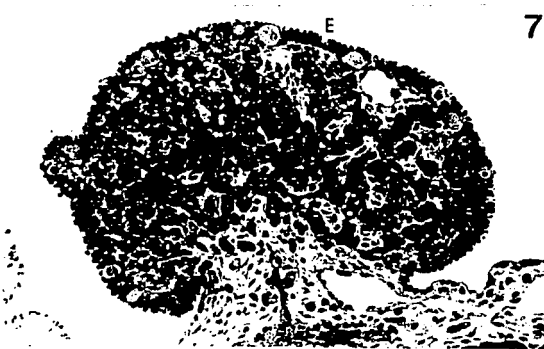
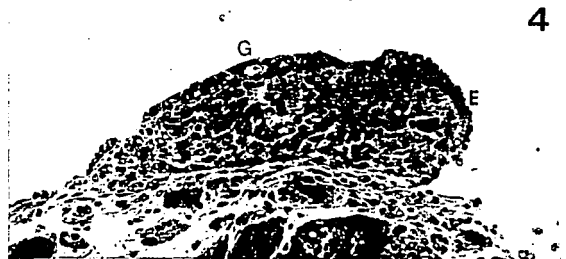
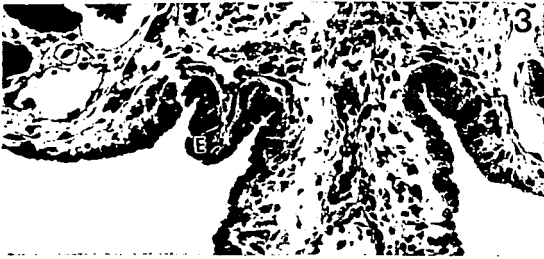
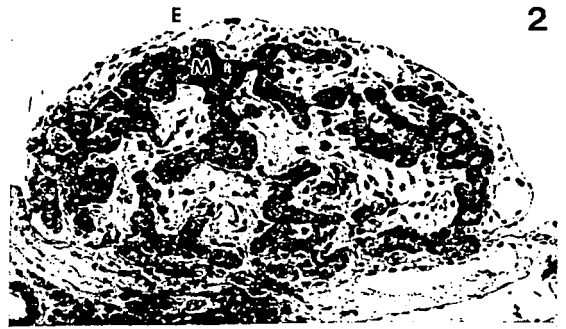
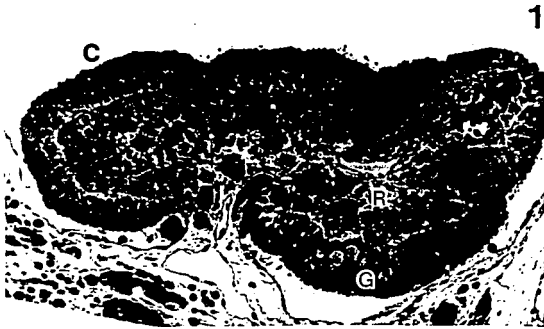
Figura 5.- Gónada Determinada: Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 26 incubado a temperatura masculinizante. Se observa una célula germinal (G) en el epitelio celómico. 200X.

Figura 6.- Gónada Indeterminada: Cresta gonadal de un embrión de etapa 22 incubado a temperatura feminizante. El epitelio celómico esta ligeramente engrosado. 200X.

Figura 7.- Gónada Predeterminada: Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura feminizante. Se observan algunas células germinales en el epitelio cortical (E). 200X.

Figura 8.- Gónada Determinada: Ovario de un embrión de etapa 27 incubado a temperatura feminizante. Se distingue la corteza (C) y la médula (M). 200X.

LAMINA I



investigadores denominan período sensible a la temperatura para la determinación del sexo. Este período puede explicarse porque: a) los embriones que desarrollaron el sexo acorde a la primera temperatura de incubación, estuvieron el tiempo suficiente en la primera temperatura para activar los procesos de determinación sexual b) los embriones que presentaron el sexo acorde a la segunda temperatura, puede suponerse que no se activaron los procesos de determinación sexual porque no estuvieron el tiempo suficiente en la primera temperatura, o tal vez si se activaron inicialmente, pero los procesos fueron revertidos por la segunda temperatura. La tercera respuesta se caracteriza porque todos los embriones de un lote adquieren el sexo acorde a la primera temperatura de incubación, de tal forma que ningún embrión es sensible a la temperatura de cambio. Este período de **determinación total**, incluye a embriones de etapas intermedias y avanzadas. Este período puede explicarse porque todos los embriones estuvieron el tiempo suficiente en la primera temperatura de incubación para determinar el sexo de la gónada.

B.- Experimentos de doble cambio de temperatura:

En los experimentos de doble cambio de temperatura, de feminizante a masculinizante a feminizante (de 32° a 27° a 32°C), en los cuales se proporcionó un pulso intermedio de temperatura masculinizante entre pulsos de temperatura feminizante al inicio y al final del desarrollo embrionario. Se realizaron 18 experimentos (series), los cuales difieren en la etapa en que inició el pulso (etapas 12 a 24) y en la duración del mismo pulso (de tres a 17 días), ver en el Esquema 3. En las series 1 y 2 el pulso de temperatura masculinizante se inició después de cuatro días de incubación (d.i.) a temperatura feminizante: un pulso masculinizante con duración de ocho días no provocó la eclosión de machos (serie 1), en cambio un pulso masculinizante de 11 días indujo el desarrollo de un macho y cuatro hembras (serie 2). En las series 3 a 9 el pulso de temperatura masculinizante inició en la

etapa 20 (después de 12 d.i. a temperatura feminizante): pulsos masculinizantes con duración de cuatro, nueve y 17 días provocaron la eclosión del 100% de machos (series 3, 6 y 9, respectivamente); a su vez, pulsos masculinizantes de cinco, 11 y 14 días, indujeron principalmente la eclosión de machos (series 4, 7 y 8, respectivamente); en cambio un pulso masculinizante de siete días indujo el desarrollo de dos machos y nueve hembras (serie 5). En las series 10 a 14 el pulso de temperatura masculinizante inició en la etapa 23 (después de 18 d.i. a temperatura feminizante): un pulso masculinizante de 3 días indujo la eclosión de cuatro machos y una hembra (serie 10); en tanto, pulsos masculinizantes de seis, diez, 11 y 15 días provocaron el desarrollo del 100% de machos (series 11 a 14). En las series 15 a 17 el pulso masculinizante de temperatura comenzó en la etapa 24 (después de 21 d.i. a temperatura feminizante): pulsos masculinizantes de tres, siete y 12 días indujeron la eclosión del 100% de machos (series 15 a 17). En la serie 18 el pulso masculinizante inició en la etapa 24 avanzada (después de 25 d.i. a temperatura feminizante), mismo que provocó la eclosión del 100% de machos. En los anteriores experimentos se puede observar que el pulso de temperatura masculinizante influyó en la determinación sexual de los embriones al provocar la eclosión de cuando menos un macho, sólo en la serie 1 dicho pulso no provocó la eclosión de machos.

En cuanto a los experimentos de doble cambio de temperatura de masculinizante a feminizante a masculinizante (de 27° a 32° a 27°C), en donde se otorgó un pulso intermedio de temperatura feminizante entre pulsos de temperatura masculinizante al inicio y final del desarrollo. Se realizaron 18 experimentos (series), los cuales difieren en la etapa en que se inició el pulso (etapas 12 a 24) y en la duración del mismo pulso (de tres a 17 días), los resultados se muestran en el Esquema 4. En las series 1 y 2 el pulso de temperatura feminizante comenzó en la etapa 12 (después de 6 d.i. a temperatura masculinizante): pulsos feminizantes con duración de

cinco y 11 días no indujeron la eclosión de hembras. En las series 3 y 4, el pulso de temperatura feminizante inició en la etapa 13 (después de 7 d.i. a temperatura masculinizante): pulsos feminizantes con duración de cuatro y ocho días no provocaron la eclosión de hembras. En la serie 5, un pulso feminizante de 16 días que comenzó en la etapa 14 no provocó el desarrollo de hembras. En las series 6 a 10 el pulso feminizante se inició en la etapa 17 (después de 12 d.i. a temperatura masculinizante): pulsos de temperatura feminizante con duración de cuatro, siete, 11 y 14 días, no provocaron la eclosión de hembras (series 6 a 9), en cambio un pulso de 17 días indujo la eclosión de seis hembras y ocho machos (serie 10). En la serie 11 se aplicó un pulso feminizante de 12 d.i. y se provocó la eclosión de ocho machos y dos hembras. En las series 12 a 14 el pulso feminizante se inició en la etapa 20 (después de 18 d.i. a temperatura masculinizante): pulsos feminizantes de seis y diez días no provocaron el desarrollo de hembras (series 12 y 13), en cambio un pulso de 15 días indujo la eclosión del 100% de hembras (serie 14). En las series 15 a 17 el pulso feminizante de temperatura comenzó en la etapa 21 (después de 21 d.i. a temperatura masculinizante): los pulsos feminizantes fueron de tres, siete y 12 días, indujeron la eclosión de machos y hembras. Cabe señalar que todos los embriones de estas series (15 a 17) murieron por exceso de humedad en el sustrato de incubación. En la serie 18, el pulso feminizante que se inició en la etapa 24 (después de 31 d.i. a temperatura masculinizante) con duración de tres días no provocó la eclosión de hembras. La determinación sexual del ovario ocurre cuando el pulso de temperatura feminizante (series 10, 11 y 14) es prolongado o si tal pulso se aplica después del día 20 de incubación (series 15 a 17).

Los resultados de los cambios de temperatura de masculinizante a feminizante, mostraron que el período sensible a la temperatura para la determinación sexual de los machos abarca a embriones de las etapas de desarrollo 20 a 23. Este período queda confirmado con resultados de experimentos de doble cambio de temperatura: ya que

pulsos de temperatura masculinizante que se iniciaron en la etapa 20 provocaron la eclosión machos (Esquema 3, series 3 a 9). A su vez, resultados de los cambios de temperatura feminizante a masculinizante, sugieren que el período sensible a la temperatura para la determinación sexual de las hembras incluye a embriones de las etapas 24 a 26. Dos experimentos de pulso de temperatura feminizante (Esquema 4, series 10 y 14), apoyan que el período sensible se ubica en las etapas 24 a 26. Sin embargo, otros experimentos del mismo tipo sugieren que el período sensible puede iniciar en la etapa 21 (Esquema 4, series 15 a 17). Esta aparente contradicción ocurre cuando el período sensible se mide con base en una escala de desarrollo morfológica. Si analizamos los pulsos de temperatura feminizante (Esquema 4, especialmente las series 15 a 17) con base al tiempo (escala cronológica de desarrollo), el período sensible a la temperatura inicia aproximadamente en el día 20. Entonces, el período sensible a la temperatura para la determinación de las hembras (con base en una escala cronológica) se ubica entre los días de incubación 20 a 28. Este período es congruente para los resultados de experimentos de un cambio y doble cambio. Al parecer la determinación sexual de las hembras esta más en función del tiempo (días de incubación) que de la etapa de desarrollo del embrión. Contrariamente, la determinación sexual del macho parece depender más de la etapa de desarrollo.

La influencia que tenga un pulso de temperatura (masculinizante o feminizante) en la determinación sexual va a depender de: la duración del pulso de temperatura, el día en que inicia (día de incubación) y la etapa de desarrollo de los embriones cuando se aplica el pulso de temperatura. Cuando un pulso de temperatura se aplica a embriones de etapas (o edades) tempranas de desarrollo, estos pulsos no influyen en la determinación sexual, porque los mismos se aplicaron en etapas tempranas del desarrollo para poder producir algún efecto en la determinación sexual: como se observa en el Esquema 3, serie 1 y en el Esquema 4, series 1 a 9.

ESQUEMA 3
EXPERIMENTOS DE DOBLE CAMBIO DE TEMPERATURA
CAMBIOS DE TEMPERATURA FEMINIZANTE A MASCULINIZANTE A FEMINIZANTE

Serie	T °C	Etapas de Desarrollo										Eclosión			Sexo					
		12	14	16	18	20	22	24	26	28	31	N	M	H						
1	32	4d		8d		12d														
	27	?					17													
2	32	4d		11d		15d														
	27	?					18													
3a	32	12d				4d		16d												
	27					20			22											
4	32	12d				5d		17d												
	27					20			22											
5b	32	12d				7d		19d												
	27					20			22+											
6	32	12d				9d		21d												
	27					20			23											
7c	32	12d				11d		23d												
	27					20			23											
8d	32	12d				14d		26d												
	27					20			23+											
9e	32	12d				17d		29d												
	27					20			24											
10	32	18d				3d		21d												
	27							23			24									

Continúa

EXPERIMENTOS DE DOBLE CAMBIO DE TEMPERATURA
CAMBIOS DE TEMPERATURA FEMINIZANTE A MASCULINIZANTE A FEMINIZANTE

Serie	T °C	Etapas de Desarrollo						Eclosión			Sexo				
		12	14	16	18	20	22	24	26	28	31	N	M	H	
11f	32	18d						6d	24d				10	10	0
	27							23	25						
12g	32	18d						10d	28d				13	13	0
	27							23	25+						
13	32	18d						11d	29d				5	5	0
	27							23	26						
14h	32	18d						15d	33d				10	10	0
	27							23	26						
15i	32	21d						3d	24d				5	5	0
	27							24	25						
16j	32	21d						7d	28d				8	8	0
	27							24	26						
17k	32	21d						12d	33d				11	11	0
	27							24	26+						
18	32	25d						6d	31d				9	9	0
	27							24+	27						

Esquema 3.- Experimentos de doble cambio de temperatura: de feminizante a masculinizante a feminizante. Los embriones inicialmente se incubaron a temperatura feminizante (línea gruesa) después de algunos días se cambiaron a la temperatura masculinizante (línea delgada) permaneciendo por diferentes días (o etapas) y finalmente se regresaron a la temperatura feminizante quedándose hasta la eclosión. T= temperatura de incubación; N= número de tortugas; M= macho; H= hembra; d= días de incubación; += etapa de desarrollo avanzada; ?= no se registró la etapa; las series con letras son ensayos paralelos respecto a otros señalados en el Esquema 4.

ESQUEMA 4
EXPERIMENTOS DE DOBLE CAMBIO DE TEMPERATURA
CAMBIOS DE TEMPERATURA MASCULINIZANTE A FEMINIZANTE A MASCULINIZANTE

Serie	T °C	Etapas de Desarrollo							Eclósión			Sexo		
		12	14	16	18	20	22	24	26	28	31	N	M	H
1	32 27	12 6d		5d	17 11d							10	10	0
2	32 27	12 6d		11d			21+ 17d					10	10	0
3	32 27	13 7d		4d	16+ 11d							3	3	0
4	32 27	13 7d		8d	18 15d							4	4	0
5	32 27		14 8d		16d		25 24d					11	11	0
6a	32 27			17 12d		4d	21 16d					13	13	0
7b	32 27			17 12d		7d	22+ 19d					10	10	0
8c	32 27			17 12d		11d	24 23d					12	12	0
9d	32 27			17 12d		14d	24+ 26d					15	15	0
10e	32 27			17 12d		17d	26 29d					14	8	6

Continúa

EXPERIMENTOS DE DOBLE CAMBIO DE TEMPERATURA
CAMBIOS DE TEMPERATURA MASCULINIZANTE A FEMINIZANTE A MASCULINIZANTE

Serie	T °C	Etapas de Desarrollo						Eclósión			Sexo			
		12	14	16	18	20	22	24	26	28	31	N	M	H
11	32					18+								
	27		14d				12d		26d			10	8	2
12f	32					20				24				
	27		18d				6d		24d			12	12	0
13g	32					20				25				
	27		18d				10d		28d			7	7	0
14h	32					20				26+				
	27		18d				15d		33d			9	0	9
*15i	32					21+		23						
	27				21d		3d	24d				10	?	2
*16j	32					21+				24+				
	27				21d		7d		28d			11	9	2
*17k	32					21+				25+				
	27				21d		12d		33d			12	5	7
18	32						24			25				
	27				31d		3d		34d			4	4	0

Esquema 4.- Experimentos de doble cambio de temperatura: de masculinizante a feminizante a masculinizante. Inicialmente los huevos se incubaron a temperatura masculinizante (línea delgada) después de algunos días se cambiaron a la temperatura feminizante (línea gruesa) permaneciendo por algunos días (o etapas) y finalmente se regresaron a la temperatura masculinizante quedándose hasta la eclósión. T= temperatura de incubación; M= macho; H= hembra; ?= dos tortugas con ovotestis; d= días de incubación; += etapa de desarrollo avanzada; *= mortalidad en las tortugas por exceso de humedad; las series con letras son ensayos paralelos respecto a otros señalados en el Esquema 3.

Al comparar entre sí los resultados de los experimentos de doble cambio (de $32^{\circ}\text{C} \rightarrow 27^{\circ}\text{C} \rightarrow 32^{\circ}\text{C}$ y de $27^{\circ}\text{C} \rightarrow 32^{\circ}\text{C} \rightarrow 27^{\circ}\text{C}$), observamos que en varios experimentos de pulso de temperatura feminizante no se provocó el desarrollo de hembras (Esquema 4, series 1 a 9, 12, 13 y 18), mientras que en los experimentos de pulso de temperatura masculinizante sólo en un ensayo no se indujo el desarrollo de machos (Esquema 3, serie 1). En contra parte, el 100% de feminización se obtuvo en un solo ensayo (Esquema 4, serie 14), mientras que el 100% de masculinización se obtuvo en varios ensayos (Esquema 3, series 3, 6, 9, 11 a 18). Además, al comparar resultados de experimentos paralelos (series en donde el pulso de temperatura feminizante y masculinizante se aplicó a embriones de la misma edad y con igual duración) en los Esquemas 3 y 4: los pulsos masculinizantes influyeron en mayor medida en la determinación de machos que los pulsos feminizantes para la inducir la determinación de hembras. En el Esquema 3 las series 3a, 5b, 7c, 8d, 9e, 11f, 12g, 14h, 15i, 16j y 17k, son ensayos paralelos respectivamente de las series 6a, 7b, 8c, 9d, 10e, 12f, 13g, 14h, 15i, 16j y 17k del Esquema 4. Podemos observar en los Esquemas 3 y 4 que al comparar los ensayos paralelos a, b, c, d, f y g, sólo los pulsos masculinizantes produjeron algunos machos mientras que ningún pulso feminizante provocó el desarrollo de alguna hembra. Estas diferencias tan notables en donde el pulso masculinizante si influye en la determinación sexual mientras que el pulso feminizante no influye en la determinación sexual, puede explicarse porque en estos ensayos los pulsos de temperatura se aplican a embriones con diferente grado de desarrollo. En estos ensayos paralelos, los embriones sometidos a un pulso masculinizante siempre estuvieron en etapas de desarrollo más avanzadas (al proceder de una temperatura de incubación alta) respecto de los embriones a los cuales se les aplica el pulso feminizante (estos embriones presentan menor grado de desarrollo ya que previamente estuvieron a temperaturas de incubación baja). En cambio, un pulso de temperatura feminizante aplicado en etapas de desarrollo mas

avanzadas sí influye en la determinación sexual de algunos embriones (Esquema 4, series 15i, 16j y 17k).

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO EN LA GONADA AISLADA.

A) CULTIVO DE GÓNADAS AISLADAS DE EMBRIONES INCUBADOS A TEMPERATURA MASCULINIZANTE.

Estos experimentos se realizaron con embriones provenientes de temperaturas masculinizantes de dos etapas de desarrollo (25 y 26); de cada embrión se aisló el par de gónadas, una se cultivó a temperatura masculinizante y la otra (su par) se cultivó a temperatura feminizante. En la Tabla 10 se presentan los resultados de estos cultivos. En la serie 1 se tomaron embriones de la etapa 25, a los cuales se les aisló las gónadas (al iniciar el cultivo las gónadas presentaron morfología de gónada indiferenciada, Figura 9). Después de los 15 días en cultivo, las gónadas que estuvieron a temperatura masculinizante presentaron en la médula agrupaciones celulares semejantes a cordones medulares (Figura 10), mientras que en la médula de las gónadas cultivadas a temperatura feminizante no se observaron cordones medulares, desarrollando en su lugar tejido conectivo de apariencia laxa (Figura 11). En estos mismos cultivos las gónadas mantenidas en ambas temperaturas desarrollaron indistintamente epitelio cortical plano simple (típico del testículo) y pseudoestratificado cúbico (típico del ovario).

En la serie 2 se tomaron embriones de la etapa 26, a los cuales se les aisló las gónadas (al iniciar el cultivo las gónadas mostraron la morfología de gónada indiferenciada). Después de los 15 días en cultivo, las gónadas respondieron a la temperatura de cultivo de igual forma que en la serie 1. Es decir, las gónadas que se cultivaron a temperatura masculinizante presentaron en la médula agrupaciones celulares de tipo epitelial, a su vez, las gónadas cultivadas a temperatura feminizante, mostraron en la médula tejido

laxo. Así también, a nivel de la corteza, las gónadas cultivadas a ambas temperaturas desarrollaron un epitelio plano simple y cúbico pseudoestratificado.

b) CULTIVO DE GÓNADAS AISLADAS DE EMBRIONES INCUBADOS A TEMPERATURA FEMINIZANTE.

Para estos experimentos se tomaron embriones de las etapas 22, 23, 25 y 26 incubados a temperaturas feminizantes. De cada embrión se aisló el par de gónadas, una se cultivó a temperatura masculinizante y la otra gónada se cultivó a temperatura feminizante. Los resultados de estos cultivos se presentan en la Tabla 11. En la serie 1 se tomaron embriones de la etapa 22, a los cuales se les aisló las gónadas (al iniciar el cultivo las gónadas presentaron la morfología de cresta gonadal, Figura 12). Después de los 15 días de cultivo, las gónadas cultivadas a temperatura masculinizante (Figura 13) y feminizante (Figura 14) presentaron arreglos de gónada indiferenciada: gónadas compactas y de tamaño pequeño. En la serie 2 se utilizaron embriones de la etapa 23, a los cuales se les aisló las gónadas (al iniciar el cultivo presentaron morfología de gónada indiferenciada). Después de 15 días de cultivo, las gónadas que se cultivaron a temperatura masculinizante presentaron restos de cordones medulares comparativamente con las gónadas cultivadas a temperatura feminizante, estas últimas mostraron una tendencia de disgregar los cordones medulares. Para estos mismos cultivos, las gónadas mantenidas en ambas temperaturas presentaron indistintamente epitelio cortical plano y cúbico. En la serie 3 se tomaron embriones de la etapa 25, se aislaron las gónadas que al iniciar el cultivo presentaron la morfología de gónada indiferenciada (Figura 15). Después de 15 días de cultivo, las gónadas que se cultivaron a temperatura masculinizante presentaron una tendencia a mantener los cordones medulares (Figura 16) comparativamente con las gónadas cultivadas a temperatura feminizante (Figura 17), estas últimas

LAMINA II

Figura 9.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante. Gónada control al inicio del cultivo en esta misma etapa. Control de inicio del cultivo de la gónadas que se muestran en las dos figuras siguientes. 200X.

Figura 10.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada por 15 días a temperatura masculinizante. La médula esta ocupada por muchas células de tipo epitelial (flechas) representando restos de cordones medulares. Contrastar con la figura siguiente. 200X.

Figura 11.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada por 15 días a temperatura feminizante. La médula esta ocupada principalmente por tejido estromático (*) dando el aspecto de un tejido laxo. Comparar con la figura anterior. 200X.

Figura 12.- Cresta gonadal de un embrión de etapa 22 incubado a temperatura feminizante. Control al inicio del cultivo en esta misma etapa. Control de inicio del cultivo de la gónadas que se muestran en las dos figuras siguientes. 200X.

Figura 13.- Gónada aislada de un embrión de etapa 22 incubado a temperatura feminizante y cultivada por 15 días a temperatura masculinizante. Se observan características de estadio indiferenciado por lo pequeño y compacto del tejido. Se observan algunas células germinales (G) en la corteza. El arreglo histológico de esta gónada es muy similar al de la figura siguiente. 200X.

Figura 14.- Gónada aislada de un embrión de etapa 22 incubado a temperatura feminizante y cultivada por 15 días a temperatura feminizante. Se observan características de estadio indiferenciado por lo pequeño y compacto del tejido. Se distinguen algunas células germinales (G) en la corteza. El arreglo histológico de esta gónada es muy similar al de la figura anterior. 200X.

LAMINA II

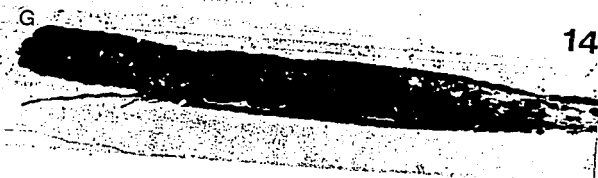
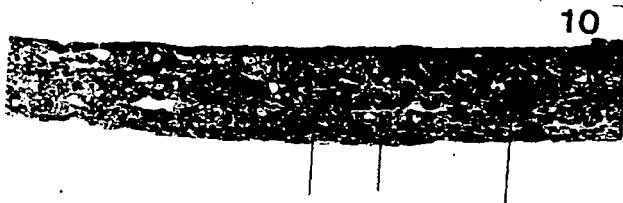


Tabla 10.- Cultivos de gónadas aisladas de embriones incubados a temperatura masculinizante.

Serie	Etapa del Explante	Temperatura de Cultivo	
		Masculinizante	Feminizante
		Efecto en Región Medular	Efecto en Región Medular
1	25	Tendencia de mantener los cordones	Tendencia de disociar los cordones
2	26	Tendencia de mantener los cordones	Tendencia de disociar los cordones

Nota: No se observó efecto consistente en la corteza de las gónadas cultivadas en las dos temperaturas.

Tabla 11.- Cultivos de gónadas aisladas de embriones incubados a temperatura feminizante.

Serie	Etapa del Explante	Temperatura de Cultivo	
		Masculinizante	Feminizante
		Efecto en Región Medular	Efecto en Región Medular
1	22	Se mantiene indiferenciada	Se mantiene indiferenciada
2	23	Tendencia de mantener los cordones	Tendencia de disociar los cordones
3	25	Tendencia de mantener los cordones	Tendencia de disociar los cordones
4	26	Disociación de cordones Diferenciación ovarica	Disociación de cordones Diferenciación ovarica

Nota: No se observó efecto consistente en la corteza de las gónadas cultivadas en las dos temperaturas.

mostraron tendencia a disgregar los cordones medulares. Las gónadas cultivadas a temperatura masculinizante y feminizante desarrollaron indistintamente epitelio cortical y plano. En la serie 4 se tomaron embriones de la etapa 26, se aislaron las gónadas que al iniciar el cultivo presentaron características de gónada indiferenciada (Figura 18). Después de 15 días de cultivo, las gónadas cultivadas a temperatura masculinizante (Figura 19) y feminizante (Figura 20)

presentaron la médula sin cordones (típico del ovario), es decir con tejido conectivo de tipo laxo.

En resumen, la temperatura de cultivo parece provocar en la gónada aislada un efecto parcial, donde, la temperatura masculinizante induce que los cordones en la médula se mantengan. A su vez, la temperatura feminizante, induce en la gónada aislada que los cordones en la médula se disgreguen, desarrollando en su lugar tejido conectivo laxo. A nivel del epitelio cortical de la gónada la temperatura de cultivo no provocó efecto evidente.

EFECTO DEL ESTRADIOL EN LA GÓNADA *in ovo*.

El efecto se determinó a la eclosión y entre los tres a nueve meses posteclosión:

A) EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRADIOL A LA ECLOSIÓN.

Los resultados del efecto de la aplicación de estradiol se presentan en la Tabla 12. Cuando el estradiol se aplicó a embriones de las etapas 17 y 18, 20 a 25, la hormona feminizó la gónada de todos los embriones, es decir, el estradiol superó el efecto masculinizante de la temperatura de incubación. En la Figura 21 se muestra un ovario inducido por la aplicación de estradiol. Cuando el estradiol se aplicó a embriones de las etapas 25-26 y 26, la hormona feminizó algunas tortugas (ocho y nueve, respectivamente), en tanto que otras tortugas eclosionaron como machos (cuatro y 14, respectivamente), esto indica que el estradiol no alteró el efecto masculinizante inducido por la temperatura de incubación. Por otra parte, cuando el estradiol se aplicó a embriones de la etapa 27, el esteroide no fué capaz de feminizar la gónada de los embriones tratados y por tanto todas las tortugas desarrollaron testículos.

LAMINA III

Figura 15.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura feminizante. Control al inicio del cultivo en esta misma etapa. Control de inicio del cultivo de las gónadas que se muestran en las dos figuras siguientes. Se observan algunas células germinales (G) en el epitelio cortical. 200X.

Figura 16.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura feminizante y cultivada por 15 días a temperatura masculinizante. La médula esta ocupada por muchas células epiteliales representando restos de cordones medulares (flechas). Se distinguen células germinales (G) en la corteza. Contrastar con la figura siguiente. 200X.

Figura 17.- Gónada aislada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura feminizante y cultivada por 15 días a temperatura feminizante. La médula esta ocupada principalmente por tejido estromático (*) que da la apariencia de un tejido laxo. Se aprecian algunas células germinales (G). Comparar con la figura anterior. 200X.

Figura 18.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 26 incubado a temperatura feminizante. Control al inicio del cultivo en esta misma etapa. Control de inicio del cultivo de las gónadas que se muestran en las dos figuras siguientes. 200X.

Figura 19.- Gónada aislada de un embrión de etapa 26 incubado a temperatura feminizante y cultivada 15 días a temperatura masculinizante. La médula esta ocupada completamente por tejido estromático (*; no se distingue algún cordón medular). El epitelio esta ligeramente engrosado (E). En el epitelio cortical (E) se distinguen algunas células germinales (G). La gónada presenta la morfología de diferenciación del ovario. Este arreglo histológico es muy similar al de la figura siguiente. 200X.

Figura 20.- Gónada aislada de un embrión de etapa 26 incubado a temperatura feminizante y cultivada 15 días a temperatura feminizante. La médula esta ocupada completamente por tejido estromático (*; no se distingue algún cordón medular). El epitelio esta ligeramente engrosado (E). Se observa una célula germinal (G). La gónada presenta la morfología de diferenciación del ovario. Este aspecto morfológico es muy parecido al de la figura anterior. 200X.

LAMINA III

15



16



17



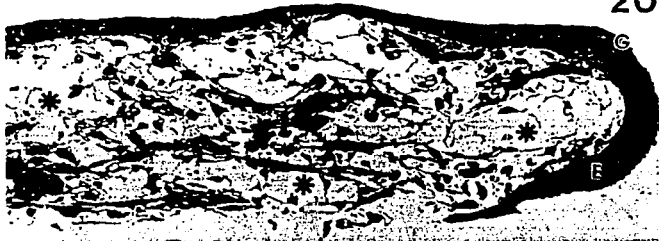
18



19



20



**Tabla 12.- Aplicación de estradiol en la gónada in ovo:
Análisis del efecto a la eclosión. La hormona se aplicó a embriones de diferentes etapas incubados a temperatura masculinizante.**

Etapa de Aplicación	Número de Tortugas	Sexo de la Gónada	
		Testículo	Ovario
17	11	0	11
18	7	0	7
20	17	0	17
21	10	0	10
22	16	0	16
23	17	0	17
23-24	9	0	9
24	22	0	22
25	9	0	9
25-26	12	4	8
26	23	14	9
27	11	11	0

Se mencionó que el estradiol feminizó la gónada cuando se aplicó a embriones de las etapas 17 a 26, sin embargo, el arreglo histológico inducido por la hormona no es el mismo que presenta un ovario normal, es decir, uno provocado por la temperatura de incubación feminizante (Figura 22). Específicamente, el estradiol indujo que la mayoría de tortugas desarrollaran ovarios de tamaño reducido (hipoovarios) en lugar de provocar el desarrollo de ovarios de tamaño normal. En estos hipoovarios, la corteza está relativamente engrosada y la médula es muy reducida (Figura 23).

Algunos hipoovarios presentaron la médula muy inhibida, esto se observó principalmente cuando el estradiol se aplicó a embriones de etapas tempranas (Figura 24). La forma de las regiones medular y cortical de los ovarios normales (Ilustración 3) son diferentes a las presentadas por los hipoovarios (Ilustración 4). En las Ilustraciones 5 y 6, se muestran ovarios inducidos por la temperatura feminizante y la aplicación de estradiol,

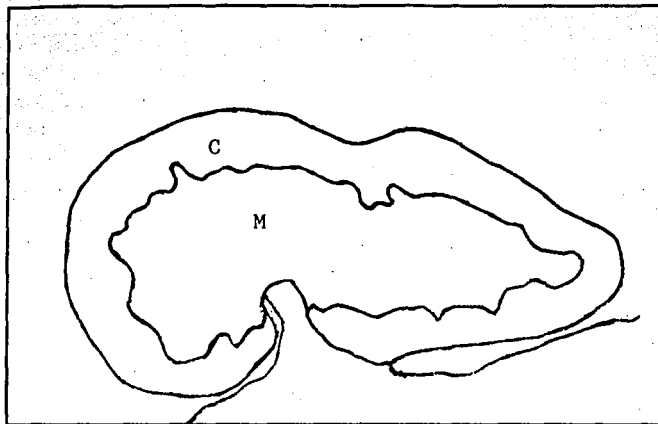


Ilustración 3.- Dibujo de un corte transversal de un ovario inducido por la incubación a temperatura feminizante. C= Corteza; M= Médula. 240X.

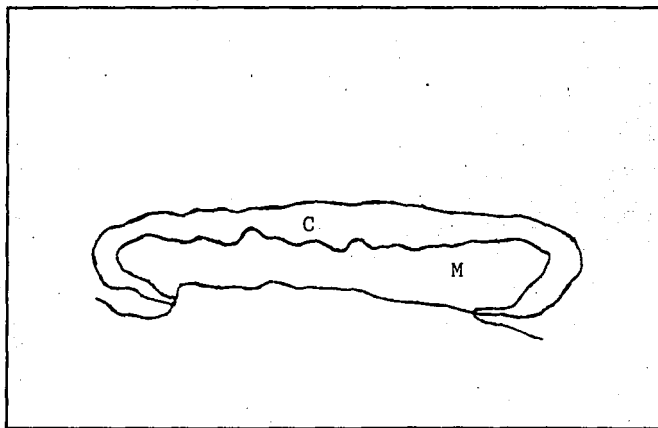


Ilustración 3.- Dibujo de un corte transversal de un ovario inducido por la aplicación de estradiol. C= Corteza; M= Médula. 240X.

Ilustración 5.- Dibujos de cortes transversales de ovarios inducidos por la temperatura de incubación feminizante. Los trazos se realizaron con una cámara lúcida y se capturan con un scanner. Los dibujos se ajustaron a la medida de los marcos.

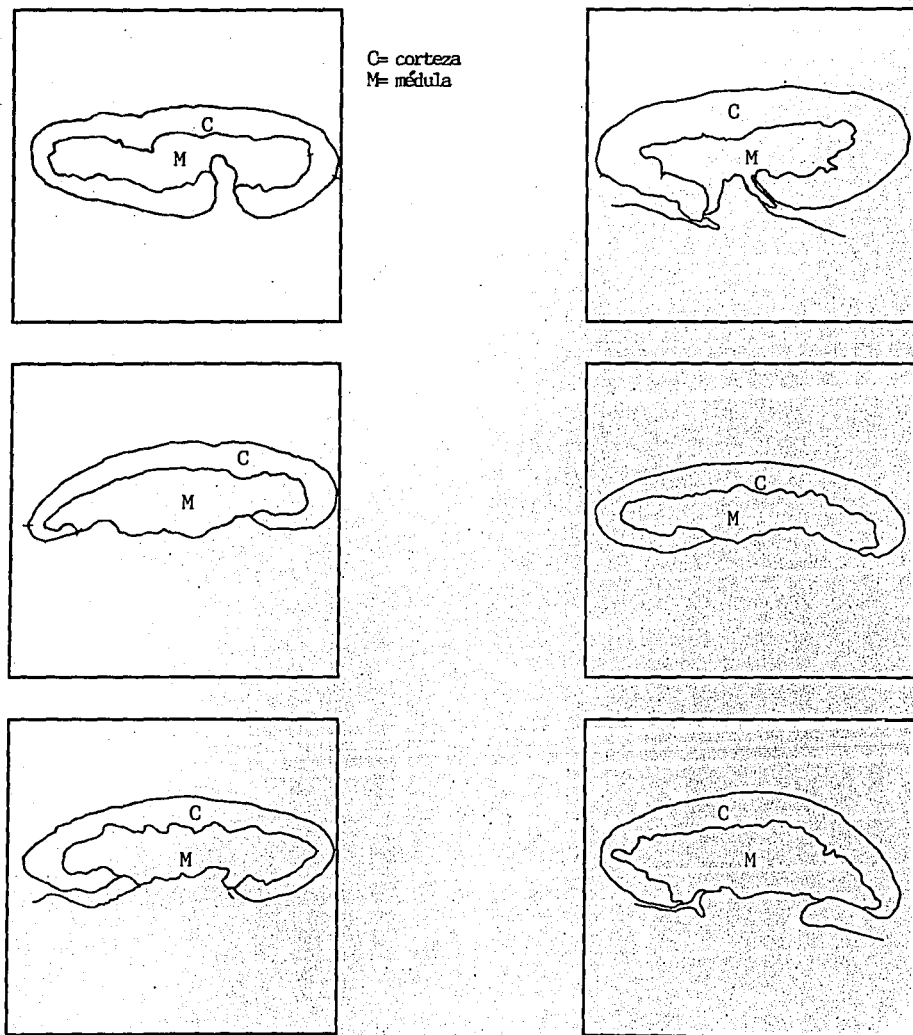
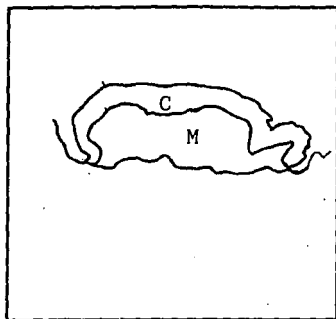
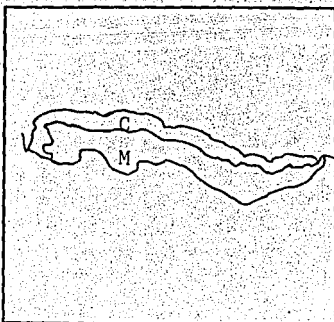
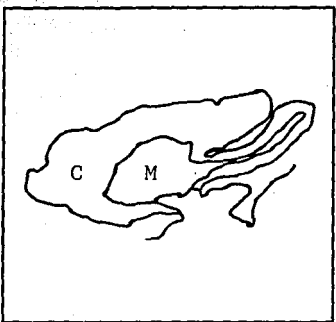
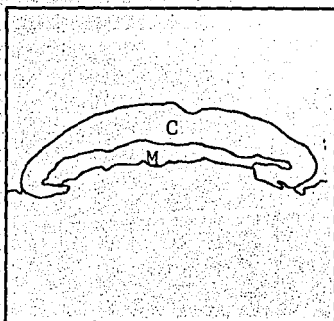
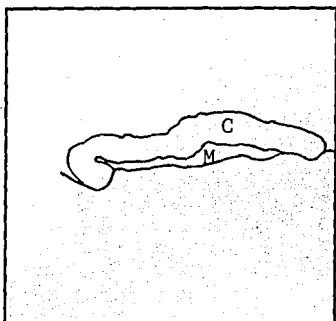
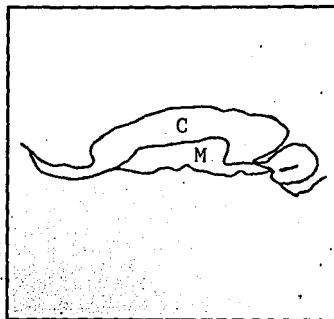


Ilustración 6.- Dibujos de cortes transversales de ovarios inducidos por la aplicación de estradiol en etapas embrionarias. Los trazos se realizaron con una cámara lúcida y se capturaron con un escanner. Los dibujos se ajustaron a la medida de los marcos.



C= corteza
M= médula



respectivamente. En estas Ilustraciones, las diferencias entre ambos tipos de ovarios son muy evidentes. Una observación interesante es que muy pocas tortugas tratadas con estradiol desarrollaron un ovario morfológicamente similar al inducido por la temperatura feminizante.

Ya se mencionó que cuando el estradiol se aplicó a embriones de la etapas 25-26, 26 y 27, la hormona no fue capaz de feminizar la gónada de algunas tortugas. Si bien, el esteroide no modificó el sexo de la gónada adquirido por la temperatura masculinizante, si alteró la estructura morfológica del testículo. Estas alteraciones incluyen: a) disminución en el número y el área ocupada por los cordones medulares, b) formación de zonas de cavitación en algunos cordones medulares y c) en algunos casos, reducción de la cantidad del tejido estromático. Estas alteraciones se observan en la Figura 25 al compararse con un testículo normal de un macho control en la Figura 26.

Los anteriores resultados indican que el estradiol puede feminizar la gónada, si ésta se aplica a embriones (incubados a temperatura masculinizante) de las etapas 17 a 25. La acción feminizante del estradiol parece disminuir, si éste se aplica a embriones de la etapas 25 avanzada y 26. Cuando el esteroide se aplicó a embriones de la etapa 27, el estradiol no logró feminizar la gónada. Lo anterior indica que el efecto feminizante del estradiol depende del grado de desarrollo de los embriones.

Comparación morfométrica entre ovarios inducidos por la incubación a temperatura feminizante y por la aplicación de estradiol.

Se mencionó anteriormente que los ovarios inducidos por la incubación a temperatura feminizante y la aplicación de estradiol parecen presentar diferente tamaño. Entonces, para investigar la observación anterior, se realizó un estudio morfométrico de las

LAMINA IV

Figura 21.- Ovario de una hembra inducida por la aplicación de estradiol en la etapa 18 y sacrificada a la eclosión. Se observan numerosas células germinales (G) en la corteza (C). La corteza esta ligeramente engrosada y la médula es reducida (M). 200X.

Figura 22.- Ovario normal de una hembra inducida por la incubación a temperatura feminizante y sacrificada a la eclosión. La corteza (C) esta muy engrosada y presenta algunas células germinales (G). La médula (M) es muy amplia. Comparar con la figura siguiente. 200X.

Figura 23.- Ovario de una hembra inducida por la aplicación de estradiol en la etapa 23 y sacrificada a la eclosión. La corteza (C) esta relativamente engrosada presentando numerosas células germinales (G). La médula es muy reducida (M). Este ovario es comparativamente menor respecto de un ovario normal, ver figura anterior. 200X.

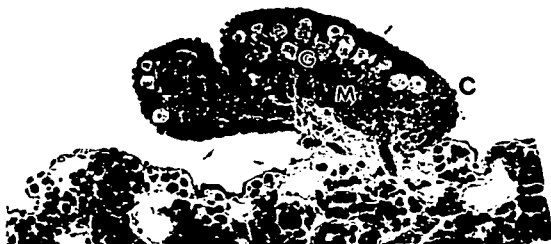
Figura 24.- Ovario de una hembra inducida por la aplicación de estradiol en la etapa 18 y sacrificada a la eclosión. La médula (M) presenta evidente atrofia con restos de algunos cordones (R). La corteza esta poco engrosada. La corteza (C) no es muy gruesa. 200X.

Figura 25.- Testículo de un macho tratado con estradiol en la etapa 27 y sacrificado a la eclosión. El área ocupada por los cordones medulares (M) es pequeña y de igual forma el número de cordones. Además, en algunos cordones se observan zonas de cavitación (flechas). Comparar con la figura siguiente. 200X.

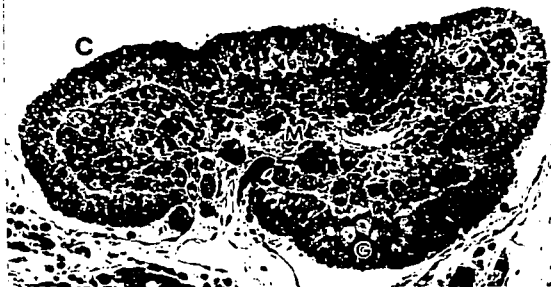
Figura 26.- Testículo normal de un macho inducido por la incubación a temperatura masculinizante y sacrificado a la eclosión. El área ocupada por los cordones medulares (M) es relativamente amplia y gran número de los cordones se encuentran conectados (continuos). Comparar con la figura anterior. 200X.

LAMINA IV

21



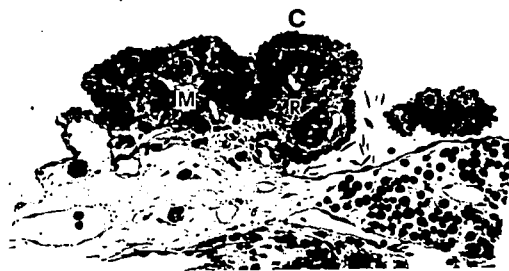
22



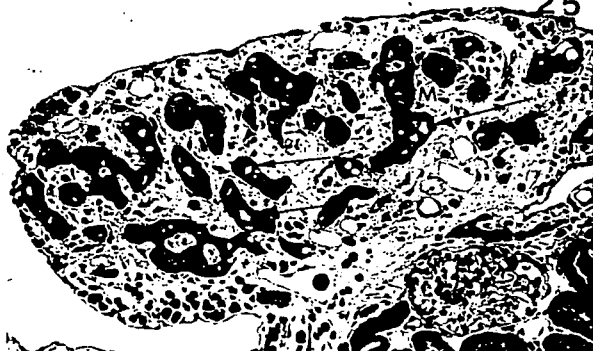
23



24

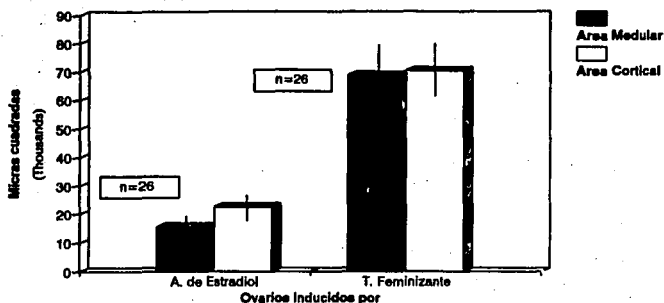


25



26





Grafica 1.- Morfometría de las áreas medular y cortical de ovarios.
 A= aplicación; T= temperatura. Se muestra la media y la desviación estándar.

Tabla 13.- Morfometría en ovarios inducidos por la aplicación de estradiol y la temperatura feminizante:
 Comparación de las áreas medular y cortical.

	Ovarios Inducidos por			
	La Aplicación de Estradiol		La Temperatura Feminizante	
	Area Medular	Area Cortical	Area Medular	Area Cortical
Media	1) 15,554	2) 22,451	3) 68,633	4) 70,223
d.s.	10,391	9,927	24,710	18,962
Comparación de Medias Mediante la Prueba t de student.				
Comparación	t tabular	t calculada	Conclusión	P
1 vs 3	2.032	10.096	d. e.	P<0.0005
2 vs 4	2.024	11.38	d. e.	P<0.0005
3 vs 4	2.012	0.26	no d. e.	P>0.5
1 vs 2	2.009	2.446	d. e.	P<0.02

d.s.= desviación estándar; los datos representan micras cuadradas < 0.05; el tamaño en la muestra para cada tipo de ovario es de 26.
 d.e.= diferencia estadística P= probabilidad del evento

regiones medular y cortical de cada tipo de ovario. En la Gráfica 1 se presentan los resultados de las mediciones (la media y desviación estándar) de las áreas medular y cortical para ambos tipos de ovarios. En esta gráfica, se observa claramente que las áreas medular y cortical son más grandes en los ovarios inducidos por la temperatura que las áreas respectivas de los ovarios inducidos por el estradiol. La Tabla 13 muestra que las áreas medular y cortical de ovarios inducidos por la temperatura son estadísticamente más grandes que las áreas respectivas de los ovarios inducidos por la aplicación de estradiol. Además, en la Gráfica 1 y Tabla 13, se observa que los dos tipos de ovarios son diferentes al analizar que tanto contribuye cada área en la formación del ovario: en los ovarios inducidos por la temperatura las regiones medular y cortical son estadísticamente del mismo tamaño, mientras que en los ovarios inducidos por la aplicación de estradiol, las regiones medular y cortical son estadísticamente diferentes (Tabla 13), en promedio la región medular es más pequeña que la región cortical.

B) EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRADIOL ENTRE LOS TRES A NUEVE MESES POSTECLOSIÓN.

Las tortugas que eclosionaron de este experimento se mantuvieron en cautiverio y a diferentes tiempos se sacrificaron para analizar cual fue el efecto del estradiol en la gónada. Los resultados se presentan en la Tabla 14. Todas las tortugas sacrificadas presentaron ovarios, lo que parece indicar que la feminización inducida por el estradiol permanece por al menos un período de nueve meses posteclosión. Si bien, todas las tortugas presentaron ovarios, estos mismos difieren con respecto a ovarios de hembras (de edades parecidas) inducidas por la temperatura feminizante. Estas diferencias incluyen el tamaño y arreglo histológico, Tabla 14. De todas las hembras inducidas por la aplicación de estradiol, algunas presentaron ovarios de tamaño

Tabla 14.- Aplicación de estradiol en la gónada *in ovo*: Análisis del efecto entre los meses tres y nueve posteclosión. La hormona se aplicó a embriones de la etapa 24. Las tortugas tratadas se dejaron eclosionar y se mantuvieron en cautiverio. El efecto del estradiol en la gónada se compara con ovarios inducidos por la temperatura feminizante. La comparación se hace entre hembras de edades parecidas.

Tiempo Posteclosión (meses)	Número de Tortugas	Sexo Gonadal	Comparación Entre		
			Punto a Comparar	Ovario Inducido por la Temperatura	Ovario Inducido por el Estradiol
3	2	Ovario	Tamaño	Mayor	Menor
3.5	4	Ovario	Forma	Regular	Irregular
4	3	Ovario	Médula (Tamaño)	Amplia	Reducida
5.5	2	Ovario	Médula (Aspecto)	Laxa	Compacta
9	1	Ovario	Corteza (Grosor)	Homogéneo	Variable

reducido con la médula también reducida (Figura 27), comparar estas características con un ovario normal de una hembra de edad parecida (Figura 28). También presentaron: la corteza anormalmente engrosada (Figura 29), restos de cordones de relativamente gran tamaño (Figura 30), la corteza proximal (la corteza del ovario más cercana al mesonefros) presentó epitelio plano y no de tipo cúbico (Figuras 29 y 30). Se pueden comparar las tres últimas características con un ovario de una hembra normal (Figura 31). A pesar de todas las diferencias, en algunos ovarios inducidos por estradiol, se observó que éstos forman ovocitos aparentemente normales.

EFFECTO DEL ESTRADIOL EN LA GÓNADA AISLADA DE EMBRIONES INCUNADOS A TEMPERATURA MASCULINIZANTE.

Los cultivos de gónadas se realizaron con embriones de las etapas 25, 25-26 y 26 previamente incubados a temperatura masculinizante. De cada embrión se aisló el par de gónadas una se cultivó en presencia de estradiol y la otra con el vehículo. Los resultados se presentan en la Tabla 15. En la serie 1, el cultivo se realizó con gónadas aisladas de embriones de la etapa 25, al iniciar el cultivo las gónadas estaban morfológicamente indiferenciadas (Figura 32). Después de 15 días en cultivo, las

LAMINA V

Figura 27.- Ovario de una hembra de nueve meses posteclosión, inducida por la aplicación de estradiol cuando embrión en la etapa 24. Se observan abundantes células germinales (G). La corteza (C) es clara aunque reducida. La médula (M) también es muy reducida. El ovario tiene una forma poco común. Además, el tamaño es muy reducido. Comparar con la figura siguiente. 200X.

Figura 28.- Ovario de una hembra de ocho meses posteclosión, inducida por la incubación a temperatura feminizante. Se distinguen algunas células germinales (G) en la corteza (C). Este ovario presenta la morfología típica: una corteza bien desarrollada y de un grosor homogéneo y la médula es muy amplia y sin cordones. Comparar con la figura anterior. 200X.

Figura 29.- Ovario de una hembra de cinco meses posteclosión, provocada por la aplicación de estradiol cuando embrión en la etapa 24. La corteza presenta muchas células germinales (G), pero esta misma muestra un engrosamiento poco común (*). Comparar con la Figura 31. 200X.

Figura 30.- Ovario de una hembra de tres meses posteclosión, inducida por la aplicación de estradiol cuando embrión en la etapa 24. Este ovario presenta dos rasgos histológicos que no son comunes en ovarios "normales": a) resto de gran tamaño de un cordón medular (*) y b) el epitelio cortical más proximal al mesonefros es de tipo plano simple (flechas). Comparar con la figura siguiente. 200X.

Figura 31.- Ovario de una hembra de seis meses posteclosión, inducida por la incubación a temperatura feminizante. La corteza (C) esta claramente engrosada y presenta un grosor homogéneo y la médula (M) es muy amplia. Comparar con las dos figuras anteriores. 200X.

LAMINA V

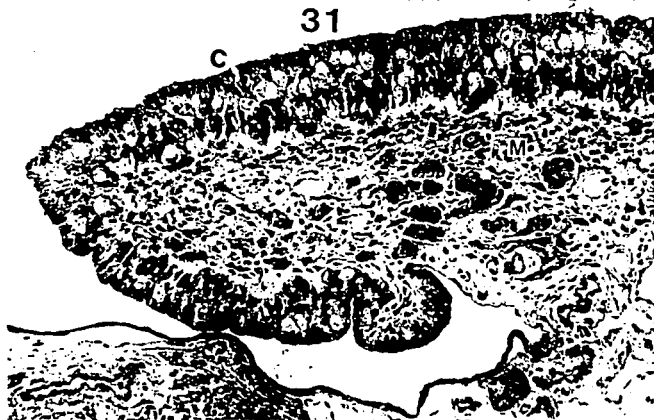
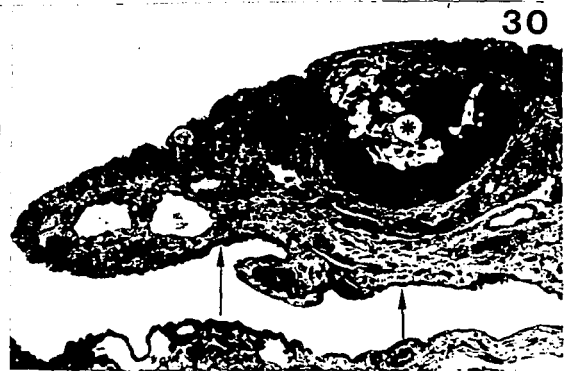
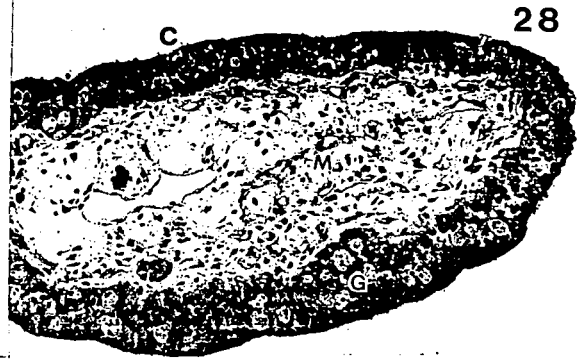


Tabla 15.- Análisis del efecto del estradiol en la gónada aislada.

Los cultivos se realizaron con gónadas aisladas de embriones incubados a temperatura masculinizante. La temperatura de cultivo fué masculinizante.

Serie	Etapa del Explante	Análisis en +Región y *Efecto	Gónadas Control: Cultivadas con el Vehículo	Gónadas Tratadas: Cultivadas con Estradiol (1 g/ml)
1	25	+Cordones Medulares *Cavitación	Se mantienen Ausente	Ligera disociación Presente
2	25-26	+Cordones Medulares *Cavitación	Se mantienen Ausente	Ligera disociación Presente
3	26	+Cordones Medulares *Cavitación	Se mantienen Ausente	Ligera disociación Presente

Nota: Las gónadas de ambos tratamientos presentaron epitello cortical simple.

gónadas que se cultivaron con estradiol presentaron cordones medulares ligeramente desorganizados, además, en estos mismos desarrollaron zonas de cavitación (Figura 33). A su vez, las gónadas cultivadas con el vehículo, presentaron cordones medulares mas o menos compactos y sin zonas de cavitación (Figura 34). En las series 2 y 3, las gónadas iniciaron el cultivo en etapa morfológicamente indiferenciada. En estas series, las gónadas cultivadas con estradiol respondieron de igual manera que en la serie 1, es decir, presentaron cordones medulares con ligera desorganización y también mostraron zonas de cavitación en los cordones. En tanto, para las mismas series, las gónadas cultivadas con el vehículo, presentaron cordones medulares más o menos compactos. En las tres series, las gónadas cultivadas con estradiol desarrollaron en la corteza epitello plano simple, es decir, la hormona no provocó evidente engrosamiento de la corteza.

LAMINA VI

Figura 32.- Gónada indiferenciada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante. Control al inicio del cultivo en esta misma etapa. 200X.

Figura 33.- Gónada asilada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada 15 días a temperatura masculinizante en presencia de estradiol (1 $\mu\text{g/ml}$ de medio). En la médula no se observan cordones medulares evidentes y en cambio, se presentan zonas de cavitación en los cordones (flechas). Comparar con la figura siguiente. 200X.

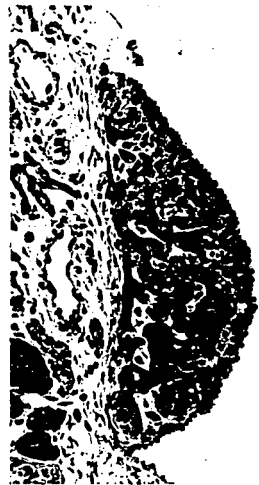
Figura 34.- Gónada asilada de un embrión de etapa 25 incubado a temperatura masculinizante y cultivada 15 días a temperatura masculinizante en presencia del vehículo (OH). En la médula se observan restos de cordones medulares (M). Comparar con la figura anterior. 200X.

Figura 35.- Diferenciación histológica del ovario. Ovario de un embrión incubado a temperatura feminizante y sacrificado a los 33 días (etapa 27). El inicio de la diferenciación del ovario se manifiesta con el engrosamiento de la corteza (C) y la regresión de los cordones medulares (M). 200X.

Figura 36.- Diferenciación histológica del testículo. Testículo de un embrión incubado a temperatura masculinizante y sacrificado a los 45 días (etapa 27). La diferenciación del testículo es evidente porque en la médula se observan cordones medulares (M) bien definidos y la corteza presenta un epitelio (E) delgado. 200X.

LAMINA VI

32



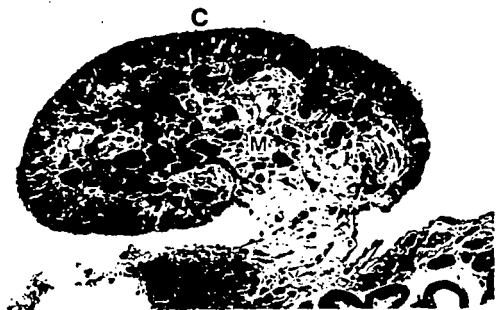
33



34



35



36



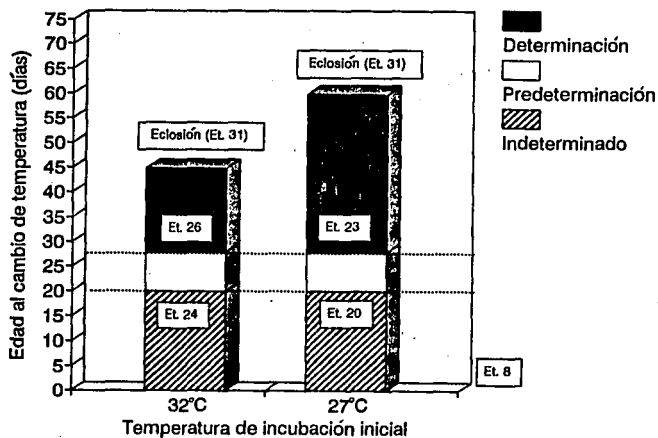
DISCUSIÓN

PERÍODO SENSIBLE A LA TEMPERATURA PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LA GÓNADA.

Cualquier período sensible a la temperatura puede ser medido con base en una escala de desarrollo morfológico (etapas de desarrollo morfológico) o a través de una escala cronológica (tiempo de incubación) (Bull y Vogt, '81). En este estudio, se encontró con base en una escala de desarrollo morfológica, que el período sensible a la temperatura para la determinación sexual de machos ocurre entre las etapas 20 a 23, mientras que el período sensible para la determinación de las hembras abarca las etapas 24 a 26. Al comparar los dos períodos sensibles (con base en una escala morfológica), parece claro que la determinación sexual de los machos (etapas 20 a 23) ocurre antes que la determinación de las hembras (etapas 24 a 26). Pero, si al comparar estos períodos, se hace una correspondencia entre las etapas de desarrollo (escala morfológica de desarrollo) con el tiempo o edad (escala cronológica de desarrollo) resulta la Tabla 16 y Gráfica 2. En esta tabla, se observa que los embriones incubados a temperatura masculinizante alcanzan las etapas 20 y 23 aproximadamente a los 18 y 27 días de incubación, respectivamente; mientras que los embriones incubados a temperatura feminizante alcanzan las etapas 24 y 26 aproximadamente a los 20 y 27 días, respectivamente. Lo anterior también se observa en la Gráfica 2. Entonces, la determinación de los dos sexos ocurre a edades muy parecidas y la diferencia en etapas de desarrollo es producto de que las dos temperaturas de incubación provocan diferente velocidad de desarrollo en los embriones: la temperatura de incubación baja (masculinizante) induce menor grado de desarrollo en los embriones que la temperatura de incubación alta (feminizante).

Tabla 16.- Correspondencia entre el día de incubación y la etapa de desarrollo alcanzada en función de la temperatura de incubación (Masculinizante ó Feminizante).

Días de Incubación	Temperatura de Incubación	
	Masculinizante	Feminizante
	Etapa de Desarrollo	Etapa de Desarrollo
15	19	22
18	20	23
20	21	24
24	22	25
27	23	26
31	24	27
35	25	28
40	26	29-30
45	27-28	31



Gráfica 2.- Experimentos de un cambio de temperatura: de 32°C a 27°C y de 27°C a 32°C.

Entonces, en la tortuga marina *L. olivacea* el período sensible a la temperatura para la determinación de machos abarca a embriones de las etapas 20 a 23. Cronológicamente este período puede iniciar del día 12 al 28 aproximadamente. A su vez, el período sensible a la temperatura para la determinación sexual de las hembras incluye a embriones de las etapas 24 a 26. Aunque también puede ocurrir en embriones de la etapa 21, siempre que tengan más de 20 días de incubación. Cronológicamente este período puede iniciar del día 20 al 28, aproximadamente. Para la determinación sexual de las hembras la edad (tiempo de incubación) parece ser determinante. En *L. olivacea* el período sensible conjuntamente para los machos y las hembras abarca embriones de las etapas 20 a 26.

En este estudio para caracterizar el grado de desarrollo de los embriones se utilizaron las claves de Miller ('85), mientras que en otros estudios para medir el grado de desarrollo se han empleado las claves descritas por Yntema ('68). En vista de estas diferencias, fue necesario hacer una correspondencia entre las etapas descritas por Miller ('85) con las etapas de Yntema ('68), dicha comparación se presenta en la Tabla 17. Con base en esta Tabla, se encontró que el período sensible abarca las etapas 13 a 21 de las claves de Yntema ('68) y para compararlo con el período sensible de otras especies se elaboró la Tabla 18. El período sensible a la temperatura en *L. olivacea* es un poco más amplio (nueve etapas) que para las otras especies de tortuga, además, el comienzo del período es anterior a las otras especies (de una a tres etapas) y éste mismo finaliza en etapas más o menos similares (con diferencia de una o dos etapas). Entonces, el período sensible a la temperatura en *L. olivacea* coincide de manera general al descrito para otras especies de tortuga. Por otra parte, en *L. olivacea* el período sensible a la temperatura abarca aproximadamente de diez hasta 16 días. En la tortuga *E. orbicularis*, el período sensible se extiende de 11 a 12 días (Pieau y Dorizzi, '81), a su vez, en la tortuga *C. serpentina* la duración del período es de 12 a 15 días (Yntema, '79). En estas especies, la

Tabla 17.- Correspondencia entre las etapas morfológicas de Miller ('85) y las de Yntema ('68).

Etapas de Miller	Etapas de Yntema
16	11+
17 y 18	12+
19 y 20	13+
21	14+
22	15*
23	16*
24	17 y 18*
25	19 y 20*
26	21*
27	22 y 23*
28	24*
29	24*
30	25*
31	26*

+ = correspondencia realizada en este estudio. * = comparación realizada por Desvages y col., ('93)

Tabla 18.- Períodos sensibles a la temperatura (PST) para la determinación del sexo en tortugas.

Especies	PST	PST
	Etapas	Amplitud
<i>Lepidochelys olivacea</i>	13-21	9
<i>Chelydra serpentina</i>	14-19	6
<i>Caretta caretta</i>	15-20	6
<i>Chrysemys picta</i>	16-20	5
<i>Gratemys ouachitensis</i>	16-20	5
<i>Trachemys scripta</i>	16-20	5
<i>Emys orbicularis</i>	16-22	7

Nota: Las etapas estan con base en Yntema ('68)

amplitud el período sensible a la temperatura es parecido. Además, en estas tres tortugas, la duración del período sensible es relativamente largo representando de 15 a 20% del desarrollo embrionario total (Pieau y Dorizzi, '81; Yntema, '79).

En *L. olivacea* los resultados mostraron que la determinación sexual de los machos ocurre antes que la determinación de la hembras. Similares hallazgos han sido reportados para las tortugas *E. orbicularis* (Pieau y Dorizzi, '81) y *G. ouchatensis* (Bull y Vogt, '81). Sin embargo, en otras especies esta situación se presenta a la inversa, es decir, la determinación sexual en las hembras es anterior a la de los machos, por ejemplo en la tortuga marina *C. caretta* (Yntema y Mrosovsky, '82), el gecko *E. macularius* (Bull, '87) el lagarto *A. mississippiensis* (Deeming y Ferguson, '88, '89) y la tortuga *T. scripta* (Wibbels y col., 91a). Para comparación de estas especies observar la Tabla 19.

La mayoría de los experimentos de temperatura en *L. olivacea*, sugieren que durante el período sensible a la temperatura los embriones deben permanecer en una temperatura por varias etapas de desarrollo para que la determinación sexual se alcance. Similares descubrimientos han sido reportados para las tortugas *C. serpentina* (Yntema, '79) *C. caretta* (Yntema y Mrosovsky, '82), *E. orbicularis* (Pieau y Dorizzi, '81) *G. ouachitensis* (Bull y Vogt, '81). Lo anterior parece indicar que la temperatura de incubación ejerce su efecto en la determinación sexual mediante un efecto acumulativo. Sin embargo, en este estudio resultados de algunos experimentos indican que no es necesario permanecer demasiado tiempo en una temperatura para adquirir el sexo específico, por ejemplo, pulsos de tres a seis días provocan el 100% de machos (Esquema 3, series 3, 11, 15 y 18), a su vez, un pulso de tres días indujo la eclosión de hembras (Esquema 4, serie 15). En *C. serpentina* ocurre algo similar, ya que pulsos feminizantes de tres y seis días provocan el desarrollo de algunas hembras y del 100% de hembras, respectivamente (Yntema, '79). Estos dos hallazgos, pueden indicar

Tabla 19.- Relación cronológica entre el período sensible a la temperatura (PST) y el de diferenciación morfológica de la gónada en algunos reptiles.

Especie	Machos		Hembras	
	PST Etapas	Diferenciación del Testículo (etapa)	PST Etapas	Diferenciación del Ovario (etapa)
<i>E. orbicularis</i>	16-21*	17*	16-22*	19*
<i>T. scripta</i>	16-21*	19-20*	16-19*	19-20*
<i>A. mississippiensis</i>	28-35 d.i.	34 d.i.	14-21 d.i.	47 d.i.
<i>L. olivacea</i>	20-23**	27**	24-26**	27**
<i>C. serpentina</i>	14-19*	?	14-19*	?
	14-16*	?	14-16*	?
<i>E. macularius</i>	33-37+	?	32-34+	?

*Etapas con base en Yntema ('68)

d.i.= días de incubación

**Etapas con base en Miller ('85)

?= no se conoce

+Etapas con base en Dufaure y Hubert ('61)

que la determinación sexual no siempre se debe a un efecto acumulativo de la temperatura de incubación o tal vez este efecto acumulativo es relativo, o probablemente exista gran variabilidad para que ocurra la determinación sexual, es decir, para inducir un sexo en algunos embriones se necesita poco tiempo de incubación, mientras que para otros embriones se requiera mayor tiempo de incubación. Sin embargo, lo que si parece cierto, es que entre más tiempo se experimente una temperatura se tiene mayor certeza de inducir el sexo en algún o algunos embriones, pero no necesariamente en todos.

Hasta el momento sólo se ha mencionado el período sensible a la temperatura de manera aislada, es decir, no se ha relacionado este mismo período con el de la morfogénesis de la gónada. De acuerdo a lo reportado en Merchant-Larios y col., ('89) y Merchant-Larios y Villalpando ('90), así como en observaciones de este estudio, en *L. olivacea* la diferenciación morfológica del ovario es evidente entre los días 31 y 33 de incubación (etapa 27, Figura 35), a su vez la diferenciación del testículo ocurre a los 45 días de incubación (etapa 27, Figura 36). Con base en lo anterior y al

hecho de que el período sensible a la temperatura ocurre antes del día 30 de incubación, parece entonces, que la determinación sexual (para machos y hembras) ocurre antes de que suceda la diferenciación histológica de las gónadas. Por tanto, la determinación sexual de la gónada (y con ello el período sensible a la temperatura) es un evento previo a la diferenciación morfológica de la gónada. Entonces, la temperatura de incubación comenzaría a actuar en etapas en donde la gónada esta morfológicamente indiferenciada. Estudios en otras especies han reportado hallazgos similares (Pieau y Dorizzi, '81; Wibbels y col., '91a; Demming y Ferguson, '88, '89). Sin embargo, en estas especies al relacionar el período sensible a la temperatura con el período de morfogénesis de la gónada, se observan ciertas diferencias, Tabla 19. En esta tabla podemos observar que hay un gradualismo en cuanto al solapamiento entre el período sensible a la temperatura y período de morfogénesis de la gónada. En la tortuga *E. orbicularis* la diferenciación de la gónada ocurre antes de que finalice el período sensible a la temperatura (Pieau y Dorizzi, '81), en *T. scripta* sucede algo parecido pero con un ligero desfase, ya que poco antes de que termine el período sensible a la temperatura inicia la diferenciación de la gónada (Wibbels y col., '91a); en *A. mississippiensis* hay un ligero empalme entre los dos períodos del macho (Deming y Ferguson, '88, '89); en *L. olivacea* no se presenta solapamiento entre el período sensible a la temperatura y la diferenciación histológica de ambas gónadas. La naturaleza de las anteriores diferencias no se conoce, pero puede deberse a variaciones interespecíficas. Lo que si parece claro es que la temperatura comienza a actuar en etapas en donde la gónada se encuentra histológicamente indiferenciada (Pieau y Dorizzi, '81; Bull, '87; Wibbels y col., '91a).

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA GÓNADA AISLADA

En los cultivos de gónadas aisladas de embriones de temperatura masculinizante, la temperatura de cultivo influyó parcialmente en la diferenciación de la gónada, Gráfica 3. La temperatura masculinizante provocó permanencia de los cordones medulares, mientras que, la temperatura feminizante indujo que los cordones medulares se disgregaran. Sin embargo, esta influencia de la temperatura en la gónada aislada, puede considerarse como una respuesta diferente al normal, ya que este período de sensibilidad se presenta cronológicamente mucho después del período sensible a la temperatura del embrión. En este estudio, solo se realizaron cultivos con embriones de las etapas 25 y 26 y para la elaboración de la Gráfica 3, fue necesario retomar resultados de los experimentos de Merchant-Larios y Villalpando ('90). Los autores encontraron que las gónadas en cultivo de embriones de la etapa 24 permanecieron indiferenciadas, a su vez, en las gónadas de embriones de etapas avanzadas (27 y 30), la temperatura de cultivo no modificó la diferenciación sexual.

En los cultivos de gónadas tomadas de embriones a temperatura feminizante, el efecto que induce la temperatura de cultivo en la gónada aislada depende de la etapa de desarrollo (edad) del embrión, Gráfica 3. En los cultivos realizados con embriones de etapas tempranas (etapa 22) y avanzadas (etapa 26) la temperatura de cultivo no influyó en la diferenciación de la gónada. En los primeros (etapa 22), las gónadas terminaron el cultivo indiferenciadas. En los segundos (etapa 26), la gónada se diferenció de manera independiente a la temperatura de cultivo. En cambio, la temperatura de cultivo sí tuvo un efecto parcial en la gónada aislada de embriones de etapas intermedias (etapas 23 y 25). En estos cultivos, la temperatura masculinizante provocó en la gónada que los cordones medulares permanecieran, mientras que la temperatura feminizante indujo en la misma que los cordones medulares se disociaran. Esta respuesta de la gónada aislada (de

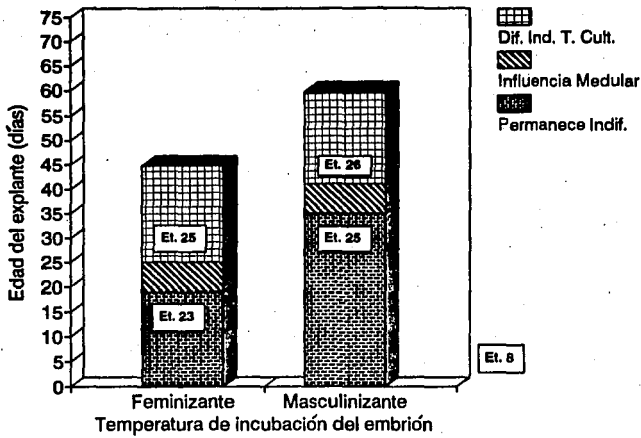
embriones de las etapas 23 y 25) a la temperatura de cultivo, puede considerarse fisiológicamente normal, ya que coincide cronológicamente con el período sensible a la temperatura (etapas 24 a 26 temprana), es decir, es cuando la gónada es susceptible de ser influida por la temperatura de incubación, Gráfica 3.

En los cultivos de gónadas de embriones de temperatura feminizante en etapas tempranas (Tabla 11, serie 1) después de 15 días de cultivo se mantuvieron indiferenciadas. Resultados similares fueron reportados por Merchant-Larios y Villalpando ('90), en este último estudio, por ejemplo, las gónadas aisladas de embriones de 16 días de incubación al término de diez días de cultivo permanecieron indiferenciadas. Lo anterior puede deberse a que las gónadas iniciaron el cultivo morfológicamente muy indiferenciadas y aún durante el cultivo no lograron diferenciarse.

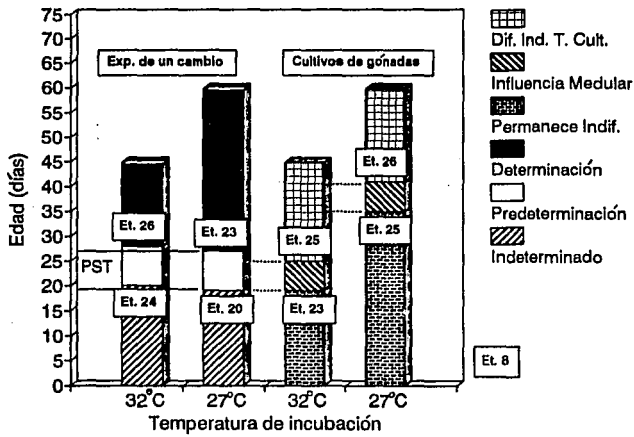
En las gónadas aisladas de embriones de temperatura feminizante de etapas avanzadas (Tabla 11, serie 4), la temperatura de cultivo no influyó en la diferenciación sexual de la gónada, estos hallazgos también fueron encontrados por Merchant-Larios y Villalpando ('90), tanto en cultivos con gónadas aisladas de embriones esta misma etapa como en cultivos de etapas más avanzadas. Lo anterior puede deberse a que cuando las gónadas iniciaron el cultivo ya estaban determinadas (como ovarios) y también a que probablemente algunas gónadas pudieron entrar al cultivo incipientemente diferenciadas como ovario. En la Gráfica 4 se muestran comparativamente los experimentos de cultivos de gónadas y el período sensible a la temperatura.

Los anteriores resultados indican que la gónada aislada puede responder parcialmente a la temperatura en condiciones de cultivo. Esta respuesta de la gónada aislada a la temperatura parece ser parcial en vista de que: a) a nivel de la corteza no se observa efecto consistente y b) en la región medular la respuesta no es completa, ya que el grado de influencia de la temperatura en la

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Gráfica 3.- Respuesta a la temperatura de cultivo de las gónadas aisladas.



Gráfica 4.- Experimentos de un cambio de temperatura y cultivos de gónadas.

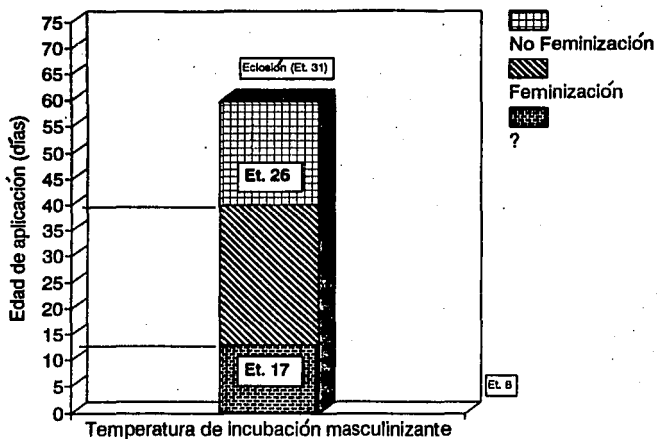
médula es variable. En este estudio el efecto de la temperatura en la gónada se volora de forma descriptiva, para un futuro sería interesante hacer realizar análisis cuantitativos del efecto de la temperatura en la gónada. Además, esta en duda de si la respuesta parcial, en parte puede deberse a que cuando las gónadas iniciaron el cultivo éstas estaban determinadas como machos o hembras.

Si bien los estudios *in vitro*, en primera instancia pueden ser cuestionables, los resultados obtenidos de este tipo de estudios, pueden descartar muchas incógnitas conociendo sus alcances. En la tortuga *L. olivacea*, el desarrollo de la gónada en cultivo es muy similar al desarrollo que ocurre en la gónada *in ovo* (Merchant-Larios y Villalpando, '90).

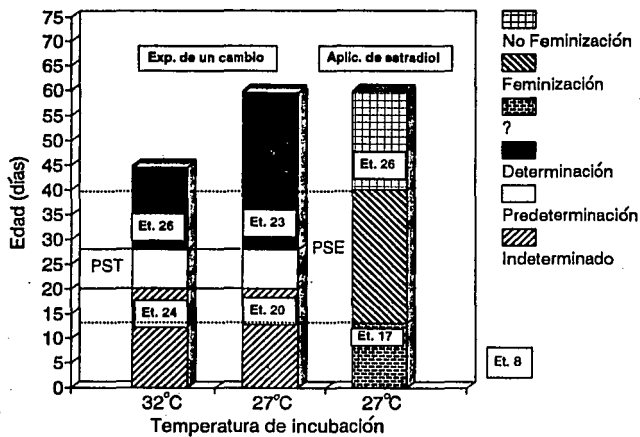
EFEECTO DEL ESTRADIOL EN LA GÓNADA

En este estudio se encontró que en la tortuga marina *L. olivacea*, la aplicación de estradiol a embriones de las etapas 17 a 26 (incubados a temperatura masculinizante) indujo feminización de la gónada. Si bien no se estudió el efecto de esta hormona en embriones de etapas previas tempranas (16, 15, 14...), el período de feminización parece ser muy amplio, Gráfica 5. En la Gráfica 6, se compara el período de feminización por el estradiol (etapas 17 a 26) con el período sensible a la temperatura (etapas 20 a 26). Observamos que el período de feminización por el estradiol es más amplio que el período sensible a la temperatura: inicia antes y termina después. Esta diferencia entre los dos períodos puede indicar que se trata de dos procesos diferentes.

Al relacionar el período de feminización por el estradiol con el período sensible a la temperatura, Gráfica 6, podemos señalar lo siguiente. Cuando el estradiol se aplicó a embriones de etapas tempranas (etapas 17 a 18), la gónada no estaba determinada por la temperatura masculinizante (período de indeterminación sexual de la



Gráfica 5.- Efecto del estradiol en la gónada in ovo.



Gráfica 6.- Experimentos de un cambio de temperatura y aplicación de estradiol.

gónada), entonces, se puede decir que el estradiol feminizó la gónada mediante inducción, ya que esta misma no estaba determinada por la temperatura masculinizante. A su vez, cuando el estradiol se aplicó a embriones de las etapas 24 a 26, la gónada ya estaba determinada como testículo por la temperatura masculinizante (estas etapas incluyen el período de **determinación** total sexual) y sin embargo, la hormona feminizó la gónada. Entonces, se puede decir, que el estradiol feminizó la gónada revirtiendo el sexo determinado por la temperatura masculinizante. Regresando un poco, cuando el estradiol se aplicó a embriones de las etapas 20 a 23 (período de **predeterminación** sexual), la hormona provocó feminización en la gónada mediante a) inducción y b) reversión, según los embriones estén o no determinados como machos por la temperatura masculinizante. En un futuro, sería interesante comparar si son histológicamente semejantes un ovario inducido y un ovario revertido por la aplicación de estradiol. Entonces, surge una pregunta interesante, ¿porque el estradiol es capaz de revertir el sexo determinado por la temperatura masculinizante mientras que la temperatura feminizante no lo hace?. Lo anterior puede sugerir que los procesos de determinación sexual desencadenados por estos dos factores (temperatura y estradiol) son diferentes.

El estradiol no fue capaz de feminizar la gónada de algunos embriones cuando se aplicó en las etapas 25-26 y 26. Lo anterior puede deberse a que en estos embriones se activaron previamente eventos morfogenéticos que provocarán la diferenciación morfológica del testículo, es decir, el estradiol no feminizó la gónada porque en ésta se activaron genes relacionados con la diferenciación del testículo. A su vez, el estradiol no feminizó la gónada de embriones de la etapa 27 porque la gónada empezó a diferenciarse histológicamente como testículo. Otros estudios, también han encontrado que el estradiol no feminiza la gónada si se aplica a embriones de etapas avanzadas (Guzke y Chymiy, '88 y Wibbels y col. '91b).

Este estudio encontró que la aplicación de estradiol a embriones (de etapas 17 a 26) de *L. olivacea* indujo feminización de la gónada. La feminización gonadal inducida por esta hormona se ha reportado en las tortugas *T. graeca* (Pieau, '70), *E. orbicularis* (Pieau, '74), *C. picta* y *C. serpentina* (Gutzke y Bull, '86; Crews y col., '89; Wibbels y Crews, '92), *T. spiniferus*, el lagarto *A. mississippiensis* y el gecko *E. macularius* (Bull y col., '88). La feminización se ha logrado en reptiles con DSDT, así como en especies con DBG (Raynaud y Pieau, '85; Bull y col., '88). Cabe resaltar que este estudio, es el primero en donde se investiga el efecto feminizante del estradiol en una tortuga marina como es *L. olivacea*. Además, la feminización de la gónada inducida por el estradiol requiere la participación del receptor específico, que para *L. olivacea* se ha demostrado su presencia en el complejo gónada-mesonefros (Salame-Méndez, '92).

En forma más específica, el estradiol provocó en la gónada inhibición del crecimiento medular (incluidos cordones medulares y tejido estromático) y desarrollo del epitelio germinal. Estos hallazgos, confirman lo reportado por Pieau ('70 y '74) y Dorizzi y col., ('91). Parece entonces que, el estradiol tiene un efecto opuesto en estos dos componentes de la gónada: inhibe el desarrollo de la médula mientras que estimula o mantiene el crecimiento de la corteza (Dorizzi y col., '91).

Dos estudios han reportado que el período sensible de feminización por la aplicación exógena de estradiol coincide con el período sensible a la temperatura de incubación (Gutzke y Chymiy, '88; Wibbels y col., '91b). Como ya se mencionó, que en *L. olivacea* estos dos períodos no coinciden estrictamente, el período de feminización por estradiol es mucho más amplio que el período sensible a la temperatura. Estas diferencias pueden deberse a que son procesos y/o especies diferentes.

Mediante análisis morfométrico y estadístico se encontró que en *L. olivacea* los ovarios inducidos por la aplicación de estradiol son más pequeños que los provocados por la temperatura de incubación feminizante. De igual forma, otros reportes han señalado que la administración de estradiol induce el desarrollo de ovarios de tamaño reducido (Raynaud y Pieau, '85; Dorizzi y col., '91; Wibbels y col., '93). Sin embargo, el presente estudio muestra que la disminución del volumen de los ovarios tratados con estradiol, es consecuencia de la reducción en las dos regiones que conforman la gónada: la corteza y la médula. Sin embargo, de estas dos regiones la región medular resultó ser mayormente inhibida. De igual forma, Dorizzi y col., ('91), mencionan que la disminución en el volumen del ovario es provocada por la ausencia de cordones sexuales en la médula. También, puede ser posible que el estradiol al inhibir de manera importante el crecimiento de la médula tenga como consecuencia menor desarrollo la corteza y por lo tanto el ovario (como un todo) alcance un tamaño comparativamente menor. Aunque se ha observado y demostrado que el estradiol exógeno induce ovarios de tamaño reducido, la causa de este hecho no se conoce. Respecto a lo anterior, Wibbels y col., ('93,) han observado que al aplicar menor dosis de estradiol se producen ovarios de longitud normal. Para comprobar si lo anterior ocurre en *L. olivacea*, es necesario realizar experimentos empleando dosis menores a la utilizadas en este trabajo.

Los ovarios inducidos por la temperatura feminizante y los ovarios inducidos por la aplicación de estradiol, parecen ser diferentes entre sí cuantitativa y cualitativamente. Lo anterior puede sugerir que los procesos implicados para el desarrollo de cada ovario pueden ser diferentes o también, puede ser probable que las diferencias se deban a que la feminización es forzada por la aplicación exógena de estradiol o tal vez, sea un efecto de la dosis administrada (es decir, de una dosis elevada).

Se conoce que la aplicación de esteroides sexuales durante estadios embrionarios puede causar reversión sexual funcional en peces y anfibios (Takahashi, '75; Döler, '86). Estudios de este tipo en reptiles son escasos, probablemente por la misma biología de este grupo. No obstante lo anterior, en este trabajo, la feminización inducida en *L. olivacea* por el estradiol permaneció por lo menos durante un período de nueve meses posteclosión y además, en algunos de estos ovarios se detectó la presencia de folículos en desarrollo. En otro estudio, Bull y col., ('88) encontraron que la feminización inducida por el estradiol persistió durante los primeros 10 meses de vida. Otra estudio señala que las hembras (del geco *E. macularius*) obtenidas por la aplicación de estradiol pueden desarrollarse como individuos fértiles (Wibbels y col., '91b). Faltan estudios por realizar para conocer si en los reptiles las hembras obtenidas por la aplicación de estradiol son fértiles y a su vez, si éstas producen descendencia fértil.

En los experimentos de exposición de estradiol en la gónada aislada, se empleó una dosis de 1 μg de estradiol por ml de medio, en el laboratorio previamente se realizaron ensayos y sin embargo, el estradiol no provocó efecto consistente en la gónada. Para descartar si las dosis elevadas son la causa de que la hormona no influye en la diferenciación de la gónada, en estudios futuros se recomienda utilizar dosis más cercanas a las concentraciones fisiológicas.

Este es el primer estudio en donde se investiga el efecto del estradiol en condiciones de la gónada aislada. Se mencionó, que el estradiol no parece inducir clara feminización en la gónada aislada, sólo provocó un efecto parcial a nivel de la médula, mientras que a nivel de la corteza la hormona no indujo efecto visible. El hecho de que el estradiol no fue capaz de feminizar la gónada aislada puede ser explicado por lo siguiente: a) Sabemos que en *L. olivacea* el estradiol feminiza la gónada *in ovo*, sin embargo, no se conoce si el agente feminizante es directamente el estradiol

o si es algún metabolito de éste, resultado de alguna biotransformación en algún órgano del embrión (hígado, cerebro u otro tejido). Si este es el caso, entonces esto explica porque el estradiol no feminizó la gónada aislada, ya que quién dispara la feminización es un metabolito que en condiciones de cultivo no se produce, b) Probablemente la feminización de la gónada por el estradiol necesita la participación del sistema nervioso central, entonces, el estradiol por si solo no fue capaz de feminizar la gónada aislada. En este trabajo, se observó que el estradiol feminizó la gónada *in ovo*, probablemente con la intervención del sistema nervioso central. Otros hallazgos pueden sugerir la participación del sistema nervioso en la determinación del sexo de la gónada. En *L. olivacea*, se ha detectado la presencia de terminaciones nerviosas en las gónadas embrionarias (Merchant-Larios y col., '89), además, la temperatura de cultivo no afecta la diferenciación de la gónada aislada (Merchant-Larios y Villalpando, '90). Un estudio en la tortuga *T. scripta* encontró que el efecto del estradiol producido en la gónada puede ser indirecto mediante la participación del mesonefros y/o glándulas adrenales (Gahr y col., '92). Así también, White y Thomas ('92b), encontraron que las gónadas aisladas de embriones no respondieron al estímulo de gonadotropinas exógenas, mientras que el mesonefros y las interrenales si respondieron liberando esteroides al medio de cultivo. Este último hallazgo apoya la hipótesis de que la información a la gónada le puede llegar de manera indirecta. Entonces, los últimos hechos pueden sugerir la participación del sistema nervioso central.

Por otro lado, algunos estudios han sugerido que los estrógenos pueden participar en el proceso de determinación sexual natural de la gónada y se han encontrado las siguientes evidencias: a) La aplicación de estradiol a embriones incubados a temperatura masculinizante induce feminización de la gónada (Pieau, '70, '74; Raynaud y Pieau, '85; Gutzke y Bull, '86; Bull y col., '88; Crews y col., '89, '91; Wibbels y Crews, '92), b) En algunas

especies el período embrionario de sensibilidad al estradiol exógeno parece corresponder con el período sensible a la temperatura (Gutzke y Chymiy, '88; Wibbels y col., '91b), c) la temperatura feminizante y el estradiol actúan de manera sinérgica en la determinación sexual de la gónada (Wibbels y col., '91b), d) los cambios morfológicos inducidos en la gónada por la aplicación de estrógenos son similares a los cambios provocados en la gónada por la temperatura feminizante (Wibbels y col., '93). Además, en las tortugas *E. orbicularis* y *D. coriacea*, se ha encontrado que durante el período sensible a la temperatura, el contenido de estrógenos es mayor en las gónadas incubadas a temperatura feminizante que en las gónadas incubadas a temperatura masculinizante (Dorizzi y col., '91; Desvages y col., '93). Así también, para estas mismas especies y durante el mismo período sensible, la actividad de las aromatasas (P-450) se incrementa mayormente en los ovarios embrionarios respecto de los testículos (Desvages y Pieau, '92a y b; Desvages y col., '93).

Los anteriores hallazgos no se pueden generalizar a otras especies. En la tortuga *T. scripta*, no se detectaron diferentes concentraciones de esteroides en suero de los dos sexos (White y Thomas, '92c), tampoco se identificaron sitios específicos de incorporación de estradiol en la gónada (Gahr y col., '92), la actividad esteroidogénica en la gónada es prácticamente nula (White y Thomas, '92a) y además, la secreción de hormonas no se incrementa con el estímulo de gonadotropinas (White y Thomas, '92b). Además, en este estudio, en condiciones de gónada aislada, la temperatura y el estradiol no fueron capaces de inducir completamente el efecto biológico que ambos factores desarrollan en condiciones de la gónada *in vivo*. Es decir, solos la temperatura y el estradiol no fueron capaces de provocar los efectos biológicos conocidos. Conjuntamente, los presentes resultados dan elementos que parecen apoyar la hipótesis de que se requiere de algún factor o factores extragonadales que median el efecto de la temperatura para la diferenciación sexual en *L. olivacea*.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados se llegaron a las siguientes conclusiones:

1).- En los embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, el período sensible a la temperatura para la determinación sexual de la gónada se ubica entre las etapas 20 a 26 (con base en las claves de Miller, '85). Este mismo período expresado en términos de edad ocurre entre los días 12 al 30.

2).- En las gónadas aisladas la temperatura de cultivo actúa parcialmente en la médula. Esto es, la temperatura masculinizante mantiene los cordones medulares, en tanto que la feminizante induce la regresión de los mismos.

3).- El estradiol feminiza la gónada cuando se aplica a embriones de etapas tempranas del desarrollo (17 a 25). Sin embargo, esta feminización parece ser diferente a la inducida por la incubación a temperatura feminizante. A la eclosión, los ovarios de las tortugas tratadas con estradiol son muy pequeños. Sin embargo, a los nueve meses parecen desarrollar folículos normales.

4).-El estradiol no provocó feminización en la gónada aislada mantenida en cultivo de órganos.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Miguel X. 1994. Efecto de la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México 66 p.
- Aguilar-Reyes H. 1987. Influencia de la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo y duración del período de incubación en la toruga lora (*Lepidochelys kempi*, Garman 1886). Tesis Profesional. Esc. Nal. de Ciencias Biológicas, IPN. México 58 p.
- Bellairs A. d'A. y J. Altridge. 1975. Los reptiles. Hutchinson & Co. (Publishers) Ltd. H. Blume Ediciones. España 261 p.
- Benabib-Nisenbaum M. 1984. Efecto de la temperatura de incubación, la posición del nido y la fecha de anidación en la determinación del sexo de *Dermodochelys coriacea*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México 78 p.
- Bhunya S.P. and P. Mohanty-Hejmadi. 1985. Citado en: Mohanty-Hejmadi, P. and M.T. Dimond. 1986. Temperature dependent sex determination in the olive ridley turtle. In: Progress in developmental Biology, Part A, Alan R. Liss, Inc. pp. 159-162.
- Bogart M.H. 1987. Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. J. Theor. Biol. 128:349-357.
- Bull J.J. 1980. Sex determination in reptiles. Q. Rev. Biol. 55:3-21.
- Bull J.J. 1985. Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. Experientia 41:1285-1296.
- Bull J.J. 1987. Temperature-sensitive periods of sex determination in a lizard: similarities with turtles and crocodylians. J. Exp. Zool. 241:143-148.
- Bull J.J., W.H.N. Gutzke and D. Crews. 1988. Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. Gen. Comp. Endocrinol. 70:425-428.
- Bull J.J., J.M. Legler and C.R. Vogt. 1985. Non-temperature dependent sex determination in two suborders of turtles. Copeia 1985:784-786.
- Bull J.J., R.G. Moon and J.M. Legler. 1974. Citado en Janzen F.J., and G.L. Paukstis. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, Evolution, and experimental design. Q. Rev. Biol. 66:149-179.
- Bull J.J. and R.C. Vogt. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtle. J. Exp. Zool. 218:435-440.
- Bull J.J., R.C. Vogt and M.G. Bulmer. 1982a. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. Evolution 36:333-341.
- Bull J.J., R.C. Vogt and C.J. McCoy. 1982b. Sex determining temperatures in turtles: a geographic comparison. Evolution 36:326-332.

- Carr J.L. and J.W. Bickham. 19814. Citado en Janzen F.J., and G.L. Paukstis. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, Evolution, and experimental design. Q. Rev. Biol. **66**:149-179.
- Charnier M. 1966. Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). Soc. Biol. Ouest. Afr. **160**:620-622.
- Cohen E.L., and C. Gans. 1970. The chromosomes of the order Crocodylia. Cytogenetics **9**:81-105.
- Conover D.O. and B.E. Kynard. 1981. Environmental sex determination: Interaction of temperature and genotype in a fish. Science **213**:577-579.
- Crews D., J.J. Bull and T. Wibbels. 1991. Estrogen and Sex reversal in turtles: A dose-dependent phenomenon. Gen. Comp. Endocrinol. **81**:357-364.
- Crews D., T. Wibbels and W.H.N. Gutzke. 1989. Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). Gen. Comp. Endocrinol. **76**:159-166.
- Dalrymple G.H., J.C. Hampp and D.J. Wellins. 1985. Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). J. Herpetol. **19**:158-159.
- Deeming D.C., and M.W.J. Ferguson. 1988. Environmental regulation of sex determination in reptiles. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. **322**:19-39.
- Deeming C.D. and M.W. Ferguson. 1989. The mechanism of temperature dependent sex determination in crocodylians: A hypothesis. Amer. Zool. **29**:973-985.
- Demas S., M. Duronslet, S. Wachtel, C. Caillouet and D. Nakamura. 1990. Sex-specific DNA in reptiles with temperature sex determination. J. Exp. Zool. **253**:319-324.
- Desvages G., M. Girondot and C. Pieau. 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.
- Desvages G. and C. Pieau. 1992a. Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. Differentiation **52**:13-18.
- Desvages G. and C. Pieau. 1992b. Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. **41**:851-853.
- Díaz-Aguilera C. y J. Alvarado-Díaz. 1988. Radio sexual natural en *Chelonia agassizi*. En: Memorias del V Encuentro Interuniversitario Sobre Tortugas Marinas en México. Biól. Sánchez-Pérez, R. (Comp.). Del 8 al 11 de Junio de 1988, Morelia, Michoacán, México. 43-48 pp.
- Dimond M.T. and P. Mohanty-Hejmadi. 1983. Incubation temperature and sex differentiation in a sea turtle. Amer. Zool. **23**:1017 (Abstr.).
- Döhler K.D. 1986. The special case of hormonal imprinting the neonatal influence of sex. Experientia **42**:759-769.

- Dorizzi M., T.M. Mignot, A. Guichard, G. Desvages and C. Pieau. 1991. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. Differentiation 47:9-17.
- Dournon C., C. Houillon and C. Pieau. 1990. Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. Int. J. Dev. Biol. 34: 81-92.
- Dufaure J.P. and J. Hubert. 1961. Table de developpement du lezard vivipare: *Lacerta* (Zootica) vivipara Jacquin. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp. 50:309-328.
- Dutton P.H., C.P. Whitmore and N. Mrosovsky. 1985. Masculinization of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* hatchlings from eggs incubated in styrofoam boxes. Biol. Conserv. 31:249-264.
- Ernst H.C. and W.R. Barbour. 1989. Turtles of the world. Smithsonian Institution Press. Washington D.C. and London, 313 p.
- Ferguson M.W.J. and T. Joanen. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. Nature 296:850-853.
- Gahr M., T. Wibbels and D. Crews. 1992. Sites of estrogen uptake in embryonic *Trachemys scripta*, a turtle with temperature-dependent sex determination. Biol. Reprod. 46:458-463.
- Georges A. 1988. Sex determination is independent of incubation temperature in another chelid turtle, *Chelodina longicollis*. Copeia 1988:248-254.
- Gutzke W.H.N. and J.J. Bull. 1986. Steroid hormones reverse sex in turtles. Gen. Comp. Endocrinol. 64:368-372.
- Gutzke W.H.N., and D.B. Chymiy. 1988. Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtle. Gen. Comp. Endocrinol. 71:265-267.
- Gutzke W.H.N. and G.L. Paukstis. 1983. Influence of the hydric environment on sexual differentiation of turtles. J. Exp. Zool. 226:467-469.
- Gutzke W.H.N. and G.L. Paukstis. 1984. A low threshold temperature for sexual differentiation in the painted turtle, *Chrysemys picta*. Copeia 1984:546-547.
- Head G., R.M. May and L. Pendleton. 1987. Environmental determination of sex in the reptiles. Nature 329:198-199.
- Janzen F.J., and G.L. Paukstis. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, Evolution, and experimental design. Q. Rev. Biol. 66:149-179.
- Karnovsky J.M. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27:137A.
- Koopman P., A. Münsterberg, B. Capel, N. Vivian and R. Lovell-Badge. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 348:450-452.
- Lescure J., F. Rimblot, J. Fretey, S. Renous y C. Pieau. 1985. Influence de la température d'incubation des oeufs sur la sex-ratio des nouveaux-nés de la tortue luth, *Dermochelys coriacea*. Bull. Soc. Zool. France 110:355-359.

- Limpus C.J., P. Reed and J.D. Miller. 1983. Islands and turtles. The influence of choice of nesting beach on sex ratio. Pp. 397-402. In: Proceedings: Inaugural Great Barrier Reef Conference, J.T. Baker, R.M. Carter, P.W. Sammarco and K.P. Stak (eds.). James Cook University Press; Townsville.
- Limpus C.J., P. Reed and J.D. Miller. 1985. Temperature dependent sex determination in Queensland sea turtles: intraespecific variation in *Caretta caretta*. In: Biology of Australasian Frogs and Reptiles. G. Grigg, R. Shine and H. Ehmann (Eds.). Royal Zoological Society, New South Wales, pp. 343-3541.
- Márquez-Millán R. 1990. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known date. FAO Species Catalogue. FAO Fisheries Synopsis Vol. 11., FAO-ROME, FIR/S 125:81 p.
- Márquez-Millán R., J. Vasconcelos-Pérez y C. Peñaflores-Salazar. 1990. XXV años de investigación, conservación y protección de la tortuga marina. Instituto Nacional de la Pesca SEPESCA, 49 p.
- McBee K., J.W. Bickham, A.G.J. Rhodin and R.A. Mittermeier. 1985. Karyotypic variation in the genus *Platemys* (Testudines: Pleurodira). Copeia 1985:445-449.
- McCoy C.J., R.C. Vogt and E.J. Censky. 1983. Temperature controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. J. Herpetol. 17:404-406.
- McGehee M.A. 1990. Effects of moisture on eggs and hatchlings of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Herpetologica 46(3):251-258.
- Merchant-Larios H., I.V. Fierro and B.C. Urruiza. 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. Herpetol. Monogr. 3:43-61.
- Merchant-Larios H. and I. Villalpando. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle. *Lepidochelys olivacea*: an organ culture study. J. Exp. Zool. 254:327-331.
- Millán-Gómez L. 1988. Estudio sobre la proporción de sexos de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), cuyos huevos son incubados masivamente en el Centro Biológico de Mazunte, Oaxaca. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, 59 p.
- Miller J.D. 1985. Embryology of marine turtles. In: Biology of the Reptilia. E. Gans, F. Billet and F.A. Maderson, Eds. John Wiley and Sons, New York, Vol. 14:270-328.
- Miller D.J. and C.J. Limpus. 1981. Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas* L. Procc. Melbourne Herpetol. Symp. 66-73 pp.
- Mohanty-Hejmadi P., M. Behra and M.T. Dimond. 1985. Temperature dependent sex differentiation in the olive ridley *Lepidochelys olivacea* and its implications for conservation. In: Symposium on Endangered Marine Animals and Marine Parks, 12-18 January, paper 25. Marine Biological Association of India; Cochin, pp. 1-5.

- Mohanty-Hejmadi P. and T. Dimond. 1986. Temperature dependent sex determination in the olive ridley turtle. In: Progress in Developmental Biology, Part A. Alan R. Liss; New York. 159-162 pp.
- Morreale S.J., G.J. Ruiz, J.R. Spotila and E.A. Standora. 1982. Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. Science 216:1245-1247.
- Mrosovsky N. and C. Pieau. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. Amphibia-Reptilia 12:169-179.
- Mrosovsky N. and C.L. Yntema. 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. Biol. Conserv. 18:271-280.
- Muth A and J.J. Bull. 1981. Sex determination in desert iguanas: does incubation temperature make a difference? Copeia 1981:869-870.
- Osgood D.W. 1980. Citado en Bull J.J. 1980. Sex determination in reptiles. Q. Rev. Biol. 55:3-21.
- Packard G.C., M.J. Packard and L. Benigan. 1991. Sexual differentiation, growth and hatching success by embryonic painted turtles incubated in wet and dry environments at fluctuating temperatures. Herpetologica 47(1):125-132.
- Paukstis G.L., and F.J. Janzen. 1990. Sex determination in reptiles: summary of effects of constant temperatures of incubation on sex ratios of offspring. Smithson Herpetol. Info. Serv. 83:1-28.
- Pieau C. 1970. Effets de L'oestradiol sur L'appareil génital de L'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp. 59,4: 296-318.
- Pieau C. 1971. Sur la proportion sexuelle chez les embryos de deux Chéloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'oeufs incubés artificiellement. C. R. Hebd. Séanc. Sci. Paris (Ser. D) 274:3071-3074.
- Pieau C. 1974. Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). Effets des hormones sexuelles. Annls. Embryol. Morph. 7:365-394.
- Pieau C. 1976. Données récentes sur la différenciation sexuelle en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). Bull. Soc. Zool. Fr. 101 (Supp. 4):46-53.
- Pieau C. and M. Dorizzi. 1981. Determination of the temperature sensitive stages for sexual differentiation of gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. J. Morphol. 170:373-382.
- Raynaud A. and C. Pieau. 1972. Effets de diverses températures d'incubation sur le développement somatique et sexuel des embryons de Lézard vert (*Lacerta viridis* Laur.). C.R. Séances Acad. Sci. Paris D, 275:2259-2262.

- Raynaud A. and C. Pieau. 1985. Embryonic development of the genital system. In: Biology of Reptilia. C. Gans and F. Billet (eds.). Vol. XV John Wiley & Sons, New York, pp. 149-300.
- Rimblot F., J. Fretey, N. Mrosovsky, J. Lescure and C. Pieau. 1985. Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). Amphibia-Reptilia 6:83-92.
- Rubin A.D. 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). Copeia 1985(1):233-235.
- Ruiz G.J., E.A. Standora, J.R. Spotila, S.J. Morreale, M. Camhi and D. Ehrenfeld. 1981. Artificial incubation of sea turtle eggs affects sex ratio of hatchlings. Proc. Ann. Meet. Herp. League, Memphis, TN, p. 68.
- Salame-Méndez P.A. 1992. La temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroides sexuales y su relación en el establecimiento gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, 177 p.
- Sharma G.P., P. Kaur and U. Nakhasi. 1975. Female heterogamety in the Indian cryptodiran chelonian, *Kachuga smithi* Gray. In: K. K. Tiwari and C. B. Srivistava (eds.), Dr. R.S. Chauhan Commemoration Volume, Zoological Society of India, Orissa 359-368 pp.
- Shaver D.J., D.W. Owens, A.H. Chaney, C.W. Caillouet, Jr., P. Burchfield and R.M. Marquez. 1988. Styrofoam box and beach temperatures in relation to incubation and sex ratios of Kemp's ridley sea turtles. National Oceanic and Atmospheric Administration. Technical Memorandum NMFS-SEFC, 214:103-108.
- Silva-Bátiz F.A., J.A.J. Arciniega-Flores, J. Mariscal-Romero, F.A. Velasco-Vázquez del M., E. Godínez-Domínguez, E.A. Parra-Sánchez y B. Palma-Colín. 1986. La temperatura como factor determinante de la diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea*. Tiempos de Ciencia Univer. de Guad. 2: 17-20.
- Standora, E. A., and J. R. Spotila. 1985. Temperature dependent sex determination in sea turtles. Copeia. 1985:711-722.
- Takahashi H. 1975. Functional masculinization of female guppies, *Poecilia reticulata*, influenced by methyltestosterone before birth. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 41(5):499-506.
- Tiersch T.R., M.J. Mitchell and S.S. Wachtel. 1991. Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. Human Genet. 87:571-573.
- Thompson M.B. 1988. Influence of incubation temperature and water potential on sex determination in *Emydura macquarii* (Testudines: Pleudodira). Herpetologica 44:86-90.
- Tokunaga S. 1985. Temperature dependent sex determination in *Gekko japonicus* (Gekkonidae, Reptilia). Dev. Growth Differ. 27:117-120.
- Tousignant A. y D. Crews. 1994. Effect of exogenous estradiol applied at different embryonic stages on sex determination, growth, and mortality in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). J. Exp. Zool. 268:17-21.

- Villalpando I. and H. Merchant-Larios. 1990. Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. Int. J. Dev. Biol. **34**:281-285.
- Vogt R.C. y O.A. Flores-Villela. 1986. Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. Ciencia **37**:21-32.
- Vogt C.R. and J.J. Bull. 1982a. Genetic sex determination in the spiny soft-shell *Trionyx spiniferus* (Testudines: Trionychidae). Copeia **1982**:699-700.
- Vogt C.R. and J.J. Bull. 1982b. Temperature controlled sex-determination in turtles: ecological and behavioral aspects. Herpetologica **38**:156-164.
- Wagner, E. 1980. Citado en Bull J.J. 1980. Sex determination in reptiles. Q. Rev. Biol. **55**:3-21.
- Webb G.J.W. and A.M.A. Smith. 1984. Sex ratio and survivorship in a population of the Australian freshwater crocodile *Crocodylus johnstoni*. In: The Structure, Development and Evolution of Reptiles (Ed. M.W.J. Ferguson). Academic Press, London, pp. 319-355.
- White R.B. and P. Thomas. 1992a. Adrenal-kidney and gonadal steroidogenesis during sexual differentiation of a reptile with temperature-dependent sex determination. Gen. Comp. Endocrinol. **88**:10-19.
- White R.B. and P. Thomas. 1992b. 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.
- White R.B. and P. Thomas. 1992c. Whole-body and plasma concentrations of steroids in the turtle, *Trachemys scripta*, before, during, and after the temperature-sensitive period for sex determination. J. Exp. Zool. **264**:159-166.
- Wibbels T., J.J. Bull, and D. Crews. 1991a. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. J. Exp. Zool. **260**:371-381.
- Wibbels T., J.J. Bull, and D. Crews. 1991b. Synergism of temperature and estradiol: A common pathway in sex determination? J. Exp. Zool. **260**:130-134.
- Wibbels T. and D. Crews. 1992. Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. J. Endocrinol. **133**:121-129.
- Wibbels T., P. Gideon, J.J. Bull and D. Crews. 1993. Estrogen- and temperature-induced medullary cord regression during gonadal differentiation in a turtle. Differentiation **53**:149-154.
- Wolf K. 1979. Cold-blooded vertebrate cell and tissue culture. In: Methods in Enzymology. W.B. Jacobsky and I.H. Pastan, Eds. Academic Press, New York, Vol. **58**:465-474.
- Yntema C.L. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. J. Morphol. **125**:219-252.
- Yntema C.L. 1976. Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. J. Morphol. **159**:17-27.

- Yntema C.L. 1979. Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. J. Morphol. 159:17-28.
- Yntema C.L. and N. Mrosovsky. 1979. Incubation temperature and sex ratio in hatchling loggerhead turtles: a preliminary report. Marine Turtle Newsl. 11:9-10.
- Yntema C.L. and N. Mrosovsky. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. Can. J. Zool. 60(5):1012-1016.
- Zaborski P., M. Dorizzi and C. Pieau. 1988. Temperature-dependent gonadal differentiation in the turtle *Emys orbicularis*: concordance between sexual phenotype and serological H-Y antigen expression at threshold temperature. Differentiation 38:17-20.
- Zetterqvist H. 1956. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. thesis, Karolinska Instituted, Stockholm.
-