



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**EL EFECTO DEL ESTRADIOL EN LA DIFERENCIACIÓN OVÁRICA
DE LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea***

TESIS

QUE PARA OBTENER POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
ALMA GUADALUPE VÁZQUEZ GÓMEZ

TUTOR(A)O TUTORES PRINCIPALES:
DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. FEDERICO ALBERTO ABREU- GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, MAZATLÁN

CD. MX., SEPTIEMBRE, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EL EFECTO DEL ESTRADIOL EN LA DIFERENCIACIÓN OVÁRICA DE LA TORTUGA MARINA *Lepidochelys olivacea*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

ALMA GUADALUPE VÁZQUEZ GÓMEZ

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:

DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. FEDERICO ALBERTO ABREU- GROBOIS

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, MAZATLÁN

MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2017

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

VOCAL: DRA. MARÍA DEL CARMEN URIBE ARANZÁBAL

SECRETARIO: DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ

1er. SUPLENTE: DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS

2º SUPLENTE: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE DESARROLLO GONADAL Y ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.

DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA.

EDIFICIO A, FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Verónica Díaz Hernández. Profesor Titular “A” de T.C. _____

SUSTENTANTE:

Bióloga Alma Guadalupe Vázquez Gómez _____

FINANCIAMIENTO Y PERMISOS DE COLECTA

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de los siguientes proyectos:

PAPIIT-UNAM IN202115. La tortuga marina *Lepidochelys olivacea* como modelo de determinación sexual por temperatura: Mecanismos moleculares en condiciones de laboratorio y naturales, a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios

PAPIIT-UNAM IN216717. Cambios morfológicos, ultraestructurales y funcionales durante el envejecimiento ovárico, a cargo de la Dra. Verónica Díaz Hernández

Este proyecto fue parcialmente financiado por la Facultad de Medicina, UNAM.

Este proyecto cuenta con el permiso de colecta: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT PAGM / DGVS / 03109715.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca Nacional otorgada para solventar mi manutención durante estos dos años de maestría y por el apoyo otorgado para realizar una estancia de investigación en el extranjero bajo la asignación de la Beca Mixta.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación profesional en distintos momentos de mi vida, y ahora como estudiante de posgrado.

A la Doctora Verónica Díaz Hernández por toda la confianza depositada en mi como estudiante para el desarrollo de este trabajo, por la disposición y paciencia que mostró para resolver mis dudas durante el proceso de tesis, por ser parte fundamental de mi crecimiento y maduración como estudiante de Posgrado, agradezco cada una de las oportunidades que me brindó para seguir creciendo y aprendiendo.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, investigador emérito del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por otorgar las facilidades académicas y administrativas para el desarrollo de este proyecto. Así como sus observaciones, comentarios, y su continuo interés en el desarrollo de este trabajo de investigación; y por ser parte del Jurado revisor.

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, por su invaluable apoyo en la coordinación de la obtención del material biológico, procesamiento de muestras y la obtención de los cortes por congelación, así como su asesoría a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Quiero agradecer a la M. en C. Martha Harfush Meléndez por su apoyo para la colecta de muestras en la Playa la Escobilla, su amistad y constante interés por mi desarrollo profesional.

A los Doctores Gabriel Gutiérrez Ospina y Federico Abreu Grobois por ser parte de mi Comité Tutoral y su constante revisión y comentarios para la mejora de este trabajo de investigación durante los cuatro semestres de maestría. A la Doctora María del Carmen Uribe Aránzabal por ser parte del Jurado de revisión, por sus comentarios y sugerencias para la mejora de este texto.

Agradezco a la Biól. Erika García Campos Directora del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), Mazunte, Oaxaca por las facilidades otorgadas para la colecta del material biológico.

Al Biól. Ángel Guillermo González Padilla por el apoyo en el Campamento Morro Ayuta para la colecta de muestras biológicas.

Al Biól. Andrés Mariano Alcántara por el apoyo brindado en el campamento Morro Ayuta.

A la Biól. Erika Peralta Buendía, por la colecta de huevo de tortuga, en la playa de La Escobilla, Oaxaca.

A la Biól. Teresa Luna Medina, por la colecta de huevo de tortuga, en la playa de La Escobilla, Oaxaca.

Al Técnico Anselmo Cervantes Rodríguez por el traslado y transporte de material biológico.

DEDICATORIA

Quiero agradecer de manera especial a mi familia.

A mi mamá, Lidia Gómez Hernández, por su apoyo inconmensurable en cada paso de mi vida, por las palabras y los abrazos precisos que siempre me ha brindado para salir adelante, por ser mi mejor amiga.

A mi papá, Andrés Vázquez Ariza, por ser mi mejor ejemplo de perseverancia, disciplina, trabajo y honestidad, agradezco su eterno apoyo para nosotros, sus hijos, para luchar por lo que soñamos aunque parezca imposible. Gracias a mis padres por haber tejido nuestras alas y dejarnos volar.

A mis hermanos, porque aunque nos encontremos lejos, aún me siguen acompañando en cada momento. A Andrea, gracias por ser mi ejemplo de superación y trabajo, por tu risa que siempre mejorará todo. Ely, gracias porque desde siempre me has ayudado en cada situación, por tu protección y cariño que valoro hasta el día de hoy, gracias por regalarnos tu alma noble. Al amigo que la vida me regaló desde los cuatro años, Francisco, que aunque pase el tiempo y cualquier situación, siempre vas a ser mi hermanito pequeño que me trajo alegría desde que era niña.

A mis sobrinos, que con su llegada han iluminado los días. A Andrés Alejandro porque a su edad me ha enseñado a ser fuerte y que a pesar de la distancia, podemos disfrutar cada momento que estamos juntos. Porque sé que con su inteligencia logrará cualquier cosa que se proponga. A Abril por regalarnos tantas sonrisas y bailes que nos demuestran que la vida puede ser tan sencilla. A Valeria, por iluminar nuestras vidas con su presencia, porque su llegada nos unió más.

Durante mis estudios de maestría me encontré con personas irrepetibles, que se convirtieron en grandes amigos, con quienes compartí tiempo, desvelos, sueños, risas, llantos, alegrías, tristezas, anhelos y frustraciones. A Víctor Hugo Salinas, Andrea Hernández, Jocelyn Álvarez, Sergio Cruz, Pedro Javier Robles, Gabriel Cervantes, Luis

Miguel Burciaga, Deborah Veranea, Josué Barranco, por todos los momentos gratos que vivimos. A Jesús Emmir Rosas, por su amistad y compañía los últimos meses en el laboratorio. Agradezco a todos aquellos amigos que me ayudaron a crecer.

A Francisco Javier, por su paciencia, su cariño y apoyo incondicional para hacer cada vez mejor las cosas, porque en tan poco tiempo logramos ser los mejores amigos.

A la memoria de José Andrés Camilo Ibarra. Cada paso que dé en la biología estará dedicado a ti, por el gran biólogo que fuiste y porque espero que esto es lo que te hubiera gustado que yo hubiera hecho, ojalá estés orgulloso de mí.

Parte de los resultados del presente trabajo de tesis fueron presentados en el XXVIII Congreso Nacional de Histología y III Congreso Iberoamericano de Histología celebrado del 26 al 28 de Octubre de 2016 en Tulancingo, Hidalgo; con el cartel titulado “El efecto del estradiol sobre la diferenciación ovárica de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*” y en el 37th Annual Symposium on the Sea Turtle Biology and Conservation celebrado del 15 al 20 de abril de 2017 en Las Vegas, Nevada; con el trabajo titulado “The effect of estradiol on the ovarian differentiation of marine turtle *Lepidochelys olivacea*”.

ÍNDICE

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Introducción.....	1
Determinación sexual.....	1
Diferenciación sexual	1
Mecanismos de determinación sexual en vertebrados	1
El papel de los estrógenos en la determinación sexual ambiental	4
Desarrollo gonadal	5
Diferenciación gonadal.....	8
Diferenciación del testículo.....	8
Diferenciación del ovario	9
Genes involucrados en la diferenciación gonadal.....	100
Hormonas esteroides involucradas en la determinación sexual en reptiles	155
Receptores a estrógenos.....	15
Regulación de los Niveles de Estrógenos en la Determinación Sexual por Temperatura	18
Inhibición de la aromatasa.....	18
Modulación selectiva del Receptor a Estrógenos	211
Antecedentes.....	25
Diferenciación ovárica en especies con DST	25
El efecto del estradiol exógeno sobre la diferenciación sexual gonadal de especies con determinación sexual por temperatura	26
El efecto del estradiol en la determinación sexual gonadal de tortugas marinas	300
El efecto del estradiol sobre la actividad de la aromatasa durante el desarrollo gonadal de especies con Determinación Sexual por Temperatura	322
Justificación	36
Hipótesis	37

Objetivos.....	37
○ GENERAL:	37
○ PARTICULARES:.....	37
Material y Métodos	38
Obtención del material biológico y traslado al laboratorio	38
Área de estudio	38
Colecta	39
Traslado al laboratorio	39
Incubación	39
Tratamientos con Etanol 70%, 17 β - estradiol, fadrozole y fulvestrant.....	40
Obtención de los complejos urogenitales.....	40
Inclusión en congelación	41
Obtención de cortes de congelación.....	41
Inmunofluorescencia para SOX9 y Citoqueratina	41
Inclusión en Epon	43
Obtención de cortes semifinos	43
Resultados	45
El tratamiento con etanol, no induce cambios en la diferenciación sexual gonadal de <i>L. olivacea</i>	45
El tratamiento con 17 β -estradiol lleva al desarrollo hipoplásico gonadal, independientemente de la temperatura de incubación.....	47
El tratamiento con fadrozole a temperatura feminizante inhibe la remodelación medular del ovario	47
El tratamiento con fulvestrant a temperatura feminizante inhibe la remodelación medular del ovario	48
La expresión de Sox9 disminuye en las gónadas de embriones tratados con 17 β -estradiol	51
La médula remodelada de las gónadas de los embriones tratados con fadrozole y fulvestrant a temperatura feminizante, no expresa Sox9.....	52

Los tratamientos con los inhibidores de la aromatasa modifican la morfología de las células que componen los remanentes de los cordones sexuales	52
Discusión.....	56
Conclusiones.....	60
Glosario.....	61
Referencias	78
ANEXO 1.....	87
Descripción de la especie <i>Lepidochelys olivacea</i>	87
ANEXO 2. Protocolos de obtención de fijadores.....	90
Fijador de Karnovsky	90
Paraformaldehído al 4%.....	91
Buffer de Cacodilato de Sodio 0.1 M	91
Epon puro.....	91
Azul de toluidina 0.5%.....	92
ANEXO 3. Protocolos de procesamiento para cortes semifinos e inmunofluorescencias.....	93
.....	93
Elaboración de navajas de vidrio para cortes semifinos.....	93
Gelatinización de laminillas para inmunofluorescencia.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gonadogénesis. Modificado de Clinton-Haines, 1999	7
Figura 2. Diferenciación gonadal de especies con Determinación Sexual por Temperatura. Modificado de Clinton- Haines, 1999.....	8
Figura 3. Señalización estrogénica. Los efectos de los estrógenos requieren de la activación de los RE y la estimulación de la transcripción de genes. Los Receptores a estrógenos también	

pueden provocar que otros factores de transcripción se unan a sus propios elementos de respuesta _____ 18

Figura 4. Inhibición de la acción de la aromatasa por el fadrozole _____ 200

Figura 5. Modo de acción del fulvestrant. AF1: Función de activación 1; AF2: función de activación 2; ER: receptor a estrógenos; ERE: elemento de respuesta a estrógenos; F: fulvestrant; RNA Pol II: Ácido ribonucleico polimerasa II. Modificado de Ciruelos et al., 2013.

_____ 24

Figura 6. El tratamiento con estrógenos en los embriones de *Emys orbicularis* induce cambios en la determinación y diferenciación sexual de las gónadas (Tomada de Dorizzi et al., 1991).

A) Gónada de un embrión de *E. orbicularis* del grupo control a TM (25° C) donde se observa un testículo bien diferenciado, B) Gónada de un embrión bajo el tratamiento de 50µg de E₂ a TM (25° C) donde se obtuvo un fenotipo ovárico _____ 27

Figura 7. El tratamiento con estradiol induce regresión de los cordones medulares a TM (Tomada de Wibbels et al., 1993). A) Gónada de un embrión de *T. scripta* del grupo control a TF (31° C) donde se observan las características de un ovario bien diferenciado. B) Gónada de un embrión de *T. scripta* bajo el tratamiento de 10µg de 17β estradiol a TM donde se observa

la regresión de cordones medulares y el desarrollo de una corteza ovárica _____ 29

Figura 8. El 17 β-estradiol reprime la expresión de Sox9 y la regresión de cordones sexuales en las gónadas de embriones incubados a TM (26° C) (Tomada de Barske y Capel, 2010). A) Gónada de un embrión de *T. scripta* del grupo control a TM donde se observa la expresión de Sox9 en los cordones medulares. B) Gónada de un embrión de *T. scripta* bajo el tratamiento

de 5µg de estradiol a TM donde se reprime la expresión de Sox9 y los cordones sexuales se revierten _____ 300

Figura 9. Gónada de un embrión de *L. olivacea* con el tratamiento con 12 µg de estradiol a TM donde se muestra una corteza ovárica y remanentes de cordones medulares. Barra de escala: 100 µm (Tomada de Merchant Larios et al., 1997). _____ 311

Figura 10. Gónadas hipoplásicas de un embrión en etapa 26 tratada con 12 µg de estradiol. A) Microfotografía de la histología de una gónada de *L. olivacea*, se observa el mesonefros (Mes), la corteza (C), y los cordones medulares (mc). Barra de escala = 50µm, B) Microfotografía de la inmunofluorescencia de una gónada de *L. olivacea*, se observa Sox9 positivo en la región medular (rosa), los núcleos celulares teñidos con TOTO-3 (azul) y las

células epiteliales marcadas con citoqueratina (verde). Barra de escala = 20µm (Tomada de Díaz-Hernández et al., 2015)	322
Figura 11. Después de 8 días a 35° C, los cordones epiteliales no son reconocibles y la corteza es más desarrollada. Gónada de un embrión de <i>E. orbicularis</i> donde se prueba que la exposición a TF induce un incremento en la actividad de la aromatasa donde se observa una médula reducida con cordones sexuales fragmentados. Barra de escala: 50 µm (Tomado de Desvages y Pieau, 1992)	333
Figura 12. A) Gónada de un embrión incubado a TM con estructuras histológicas típicas de in testículo. B) Después de tres aplicaciones de 2 µg de letrozole a TF se muestra un epitelio germinal formado por una sola capa de células y tubos testiculares. Barra de escala: 50 µm (Tomada de Dorizzi et al., 1994)	344
Figura 13. Área de Estudio. Playa la Escobilla	38
Figura 14. Fotomicrografía de alta resolución de cortes histológicos de la gónada de un embrión de <i>L. olivacea</i> en etapa 28 (Barra de escala: 100 µm)	46
Figura 15. Fotomicrografía de alta resolución de cortes histológicos de las gónadas de embriones de <i>L. olivacea</i> en etapa 28 (10X)	49
Figura 16. Fotomicrografía de alta resolución de cortes histológicos de las gónadas de embriones de <i>L. olivacea</i> en etapa 28 (40X)	50
Figura 17. Inmunofluorescencia para Sox9, citoqueratina y tinción de núcleos con TOTO-3 en gónadas de embriones de <i>Lepidochelys olivacea</i> en etapa 28. Barra de escala: 20µm	54
Figura 18. Inmunofluorescencia para citoqueratina y tinción con núcleos con TOTO-3 en gónadas de embriones de <i>Lepidochelys olivacea</i> , donde se muestra un aumento a la región medular para los grupos controles a TM y TF y para cada tratamiento a TF	55
Figura 19. Ejemplar de <i>Lepidochelys olivacea</i> . Foto: Alma Vázquez	87
Figura 20. Características morfológicas de la tortuga marina <i>Lepidochelys olivacea</i> adulta (Eckert et al., 2000)	88

RESUMEN

En tortugas con determinación sexual por temperatura, la expresión del gen Sox9 se mantiene en gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (TM). Mientras que a temperatura feminizante (TF), la aromatasa y los estrógenos están implicados en la diferenciación del ovario. El objetivo de este trabajo fue determinar el papel de los estrógenos en la diferenciación ovárica de *Lepidochelys olivacea*, considerando la región medular y la cortical. El efecto del estradiol fue evaluado en cortes semifinos de gónadas de embriones incubados a TM= 26° C y TF= 33° C tratados con dos inhibidores de estrógenos: fadrozole y fulvestrant en la etapa 23 del desarrollo. El análisis se realizó en la etapa 28, bajo microscopía óptica y microscopía confocal en inmunofluorescencia con anticuerpos contra Sox9 y citoqueratina. Los embriones tratados con fadrozole y fulvestrant a TM presentan gónadas con características testiculares y el mantenimiento de la expresión de Sox9. Mientras que a TF se observan gónadas con engrosamiento cortical y la presencia de cordones sexuales medulares, Sox9 negativos. Concluimos que los estrógenos contribuyen en controlar la diferenciación de los cordones medulares en *L. olivacea*, mientras que no parecen tener un efecto a nivel cortical.

Palabras clave: determinación sexual por temperatura, estrógenos, diferenciación ovárica, corteza, médula.

ABSTRACT

Temperature Sex Determination (TSD), among turtles shows that Sox9 gene expression maintains in gonads of incubated embryos at male-promoting temperature (MPT), while in incubated embryos at female-promoting temperature (FPT), aromatase expression and estrogens are involved in ovary differentiation. This study aims to determine the role of estrogen in ovarian differentiation, considering the medullar region and the cortical region. We examined the effect of estradiol by treating *Lepidochelys olivacea* embryos incubated at FPT and MPT at stage 23, with 12 μ g of 17 β -estradiol and two estrogen inhibitors: fadrozole and fulvestrant. The effect of estradiol was evaluated with light microscopy and immunofluorescence at stage 28. In embryos incubated at MPT and treated with fadrozole or fulvestrant, gonads manifested characteristics related to testes (positive Sox9); while at FPT gonads showed ovarian cortex with remodeling in the cellular morphology of the fragmented sexual cords in addition to the formation of lacunae. We conclude that estrogens are involved in remodeling the medullar region of the ovary. However, they do not appear to influence the development of the cortical region of *Lepidochelys olivacea* gonads.

Key words: temperature sex determination, estrogens, ovary differentiation, medullar region, cortical region.

Introducción

Determinación sexual

La determinación sexual hace referencia al compromiso molecular de un organismo que define el desarrollo de sus características sexuales. Esto ocurre a través de un conjunto de eventos moleculares que especificarán el destino del organismo como macho o hembra y da inicio en el momento de la fecundación (Díaz Hernández et al., 2008; Merchant-Larios et al., 2010).

Diferenciación sexual

La diferenciación sexual, puede integrarse en tres etapas que ocurren en tiempos y espacios específicos. La primera es la determinación, donde se lleva a cabo el establecimiento del sexo a nivel molecular en el momento de la fertilización. La segunda corresponde a la diferenciación donde se expresa el genoma que conduce la morfogénesis y la diferenciación del primordio gonadal en testículos u ovarios y el desarrollo de los genitales internos y externos. Posteriormente, pero aún como parte de la segunda etapa, ocurre la diferenciación sexual del sistema nervioso central y la adquisición de los caracteres sexuales secundarios. Por último, en la tercera etapa se determina la expresión fisiológica del individuo que termina con la actividad reproductora (Salame-Villalpando, 1998).

Mecanismos de determinación sexual en vertebrados

Un mecanismo de determinación sexual es un sistema biológico que determina el desarrollo de las características sexuales de un organismo. En los vertebrados se han desarrollado diversos mecanismos de determinación sexual que han sido clasificados de manera general en dos: 1) La determinación sexual genotípica (DSG) en la cual el sexo de un individuo es establecido por su genotipo fijado en el momento de la fertilización, y es mediada por la presencia de cromosomas sexuales, y 2) la determinación sexual ambiental (DSA) en la cual el sexo de un individuo estará modulado por diversas variables del

entorno (fotoperiodo, nutrición, humedad, condiciones sociales, pH, temperatura), durante el desarrollo temprano del organismo (Charnov y Bull, 1977; Vogt-Flores, 1986; Bull et al., 1988, Rhen et al., 2007).

Como ejemplos de determinación sexual genotípica se han observado los cromosomas sexuales en el cariotipo de muchas especies (Bull et al., 1988), dentro de ellas se encuentran aves, mamíferos, peces, insectos y algunos reptiles como lagartijas, serpientes y tortugas de los géneros *Staurotypus* y *Siebenrockiella* (Gorman, 1973; Carr y Bickham, 1981). La determinación del sexo en los mamíferos placentados es de las más estudiadas y hasta ahora se conoce que se lleva a cabo a través de tres etapas sucesivas durante el desarrollo. La primer etapa involucra el establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fertilización por la presencia de un cromosoma X o Y en el espermatozoide que penetra al ovocito, el cual aporta un cromosoma sexual X. El cigoto con cromosomas XX se desarrollará con un fenotipo femenino mientras que el que presenta cromosomas XY tendrá un fenotipo masculino. La segunda etapa es la determinación sexual gonadal en la cual se desencadenan procesos moleculares que guían la diferenciación de un ovario en las hembras o un testículo en los machos a partir de la gónada bipotencial que es indiferenciada morfológicamente (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008). En ese momento, la gónada comienza el desarrollo en función de la presencia o ausencia del cromosoma Y en el cual se encuentra el gen SRY, responsable de la determinación sexual, a partir del cual se inicia el desarrollo testicular (Berta et al.1990). Este gen actúa a través de una red de expresión génica precisa para el desarrollo testicular y es entonces cuando comienza la última etapa de determinación sexual, que es la diferenciación sexual somática donde ocurre el desarrollo del tracto y la diferenciación de los conductos de Wolff (masculinos) o Müller (femeninos) y del seno urogenital del cual se originarán los genitales externos y la uretra (Jost, 1947, revisado en Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008).

Por otro lado, en sistemas reproductivos donde la determinación sexual es definida por el ambiente, la temperatura es uno de los factores ambientales más estudiados. Este tipo es conocido como “Determinación sexual dependiente de la temperatura” (DST). En este tipo

de determinación sexual, el sexo es determinado por las condiciones térmicas experimentadas durante el desarrollo embrionario, en el periodo específico en el cual la gónada es sensible a la temperatura, designado como periodo termosensible (TSP), durante el cual los organismos dejan de responder de manera gradual a la temperatura de incubación o a los intercambios de temperatura realizados cuando se encuentra la gónada bipotencial (Bull et al., 1988; Merchant-Larios et al., 1997). Después de este periodo, la temperatura no tiene efecto sobre la diferenciación de la gónada (William et al., 1988); en este tipo de determinación sexual se encuentra la mayoría de los linajes de reptiles: tortugas (Pieau, 1974; Bull y Vogt, 1979, 1982; Bull, 1983; Silva, 1986; Merchant y Villalpando, 1990), lagartijas (Charnier, 1966; Wagner, 1976; Bull, 1980), todos los cocodrilos (Ferguson y Joanen, 1982), anfibios y algunas especies de peces (Bull, 1980, Pieau y Dorizzi, 2004, Ramsey-Crews, 2009).

En algunos estudios de laboratorio se ha demostrado que en 17 géneros de tortugas es posible controlar la proporción de sexos manipulando la temperatura durante el periodo de incubación de los huevos (Vogt y Bull, 1982; Bull, 1983; Vogt y Flores, 1986).

En las tortugas marinas, la temperatura de incubación de sus nidos, define la proporción sexual de las crías. Se ha reportado que a temperaturas elevadas hay una mayor producción de hembras, mientras que a temperaturas bajas hay una mayor producción de machos (Mrosovsky y Yntema, 1980, Merchant-Larios et al., 1997). En las diferentes especies de tortugas marinas se han llevado a cabo estudios sobre la temperatura y la proporción sexual: en *Lepidochelys olivacea* (Spotila et al., 1983, Merchant-Larios et al., 1997), en *Chelonia mydas* (Morreale et al., 1982, Spotila et al., 1981), en *Dermochelys coriacea* (Rimblot et al., 1985), en *Caretta caretta* (Yntema y Mrosovsky, 1979) y en *Lepidochelys kempii* (Aguilar, 1987).

En general, las especies con TSD carecen de cromosomas sexuales identificados, pero en los diferentes grupos de vertebrados se han catalogado algunos genes que participan en la cascada de determinación del sexo y que se encuentran conservados en su función y estructura, y se sugiere que éstos pueden formar parte de la cascada de eventos que

definen el sexo en especies con TSD debido a que al estudiar su expresión en distintas etapas del desarrollo gonadal la temperatura tiene efectos sobre su expresión (Shoemaker et al., 2007).

La determinación sexual dependiente de la temperatura (DST) es un ejemplo de la plasticidad del desarrollo donde la temperatura ambiental del embrión conduce la diferenciación de la gónada bipotencial como hacia un testículo o como un ovario. En algunas especies con DST el desarrollo gonadal puede ser modificado por la concentración de hormonas esteroideas en el entorno del embrión (Matsumoto et al., 2013). En los vertebrados con determinación sexual genotípica como algunos peces y anfibios, la manipulación del ambiente durante el desarrollo embrionario con hormonas esteroideas, frecuentemente inhibe la trayectoria gonadal precedida por el genotipo. Resulta significativo que la sensibilidad a las hormonas esteroideas generalmente coincide con el periodo termosensitivo y la manipulación de la temperatura, periodo durante el cual se puede conducir al establecimiento del sexo del embrión, los estrógenos son los esteroides inducidos más ampliamente estudiados en la determinación sexual (Ramsey-Crews, 2009).

El papel de los estrógenos en la determinación sexual ambiental

Los estrógenos son cruciales para el desarrollo del ovario en todos los grupos de vertebrados excepto para los mamíferos placentados; diversos tratamientos con estrógenos exógenos durante el desarrollo gonadal han revertido el sexo trascendentalmente en aves y permanentemente en reptiles, anfibios y peces (Scheib, 1983; Baroiller et al., 1999; Wallace et al., 1999). Se ha demostrado que la temperatura de incubación tiene la capacidad de regular la producción de estrógenos derivados de la aromatización de la testosterona en la gónada indiferenciada (Crews et al., 1966). Debido a que los estrógenos pueden inhibir el efecto de la temperatura, se ha propuesto la producción de estrógenos como un mecanismo a través del cual la temperatura ejerce su acción (Crews et al., 1994, Pieau y Dorizzi, 2004). La producción de aromatasa, que es la enzima responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, cuya actividad ha sido detectada en la gónada, cerebro, hígado y tejido adiposo de muchos vertebrados (Milnes

et al., 2002), ha sido considerada hipotéticamente como dependiente de la temperatura o que es afectada por un factor dependiente de la temperatura (Revisado en Rhen et al., 2007; Pieau et al., 1994) y de este modo el aumento de la producción de estrógenos en la gónada puede ser la causa de la diferenciación ovárica en embriones incubados a temperatura feminizante (Wibbels et al., 1993), y se mantiene la hipótesis de que los niveles de estrógenos endógenos en la gónada bipotencial están involucrados directamente en el proceso del compromiso ovárico o testicular (Bull et al., 1988; Pieau, 1974).

Por otro lado, los embriones incubados a temperatura masculinizante inhiben el gen que activa a la aromatasas originando una reducción en la producción de estrógenos, conduciendo a una diferenciación testicular (Wibbels et al., 1993). De esta manera, tanto en especies con DST como en DSG, los estrógenos parecen jugar un papel importante en los eventos de determinación sexual que culminan en la diferenciación gonadal (Rhen et al., 2007).

Desarrollo gonadal

Las gónadas presentan un desarrollo embrionario particular debido a que poseen las vías para diferenciarse como un ovario en hembras o como un testículo en los machos, mientras que en el resto de órganos los primordios embrionarios pueden diferenciarse a sólo un tipo de órgano. Las células somáticas que están involucradas en el desarrollo de la gónada son derivadas del blastema mesenquimático de la cresta genital, del epitelio celómico y del mesonefros; sin embargo, aún no se conoce la contribución exacta de cada uno. Existe un periodo en el desarrollo embrionario denominado indiferenciado, donde las estructuras gonadales se encuentran morfológicamente indiferenciadas, es decir, no se puede distinguir si la gónada está destinada a ser un macho o una hembra (Merchant, 1975).

Posteriormente, las células germinales primordiales alcanzan la región de la cresta germinal, donde son rodeadas por células mesenquimáticas y mesoteliales con las que se asocian formando el primordio gonadal, que se desarrolla en la zona ventral del

mesonefros. En el primordio gonadal se lleva a cabo la diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual de este órgano a través de cambios tanto estructurales como moleculares que llevan a la diferenciación sexual de la gónada; posteriormente se inicia el depósito de una delgada lámina basal entre las células del primordio gonadal que lleva a la formación de los cordones sexuales, de tipo epitelial; de esta manera se establece la gónada indiferenciada con un componente epitelial formado por las células germinales primordiales y las células del epitelio celómico; en el componente estromático se encuentran los primeros vasos sanguíneos, las células precursoras del tejido conectivo de la gónada y las células intersticiales esteroideogénicas (Merchant, 1975).

Durante la gonadogénesis, hay un momento en que el desarrollo de los machos y hembras diverge: la gónada masculina tiene características testiculares, mientras que la gónada femenina se desarrolla con características ováricas. Tanto en machos como en hembras, las células de la gónada indiferenciada se diferencian en células especializadas y esteroideogénicas, las cuales forman cordones tisulares alrededor de las células germinales. La localización de estos cordones dentro de las gónadas, permite distinguir las diferencias estructurales distintivas entre el ovario y el testículo. De esta manera, se considera que las gónadas están compuestas por una médula interna y una corteza externa. En el testículo, los cordones sexuales están localizados en la región medular, los cuales continúan su desarrollo, y ocurre una reversión de la región cortical. En el ovario, los cordones medulares tempranos degeneran y los cordones secundarios se desarrollan y expanden en una corteza (Clinton, 1999).

En un nivel molecular, este proceso puede considerarse que está bajo el control de dos distintos eventos: 1) una cascada de genes que regulan la diferenciación de las células especializadas del testículo y el ovario, y 2) un mecanismo determinante del sexo, el cual controla la decisión de seguir una vía de desarrollo testicular u ovárica (Ramsey-Crews, 2009).

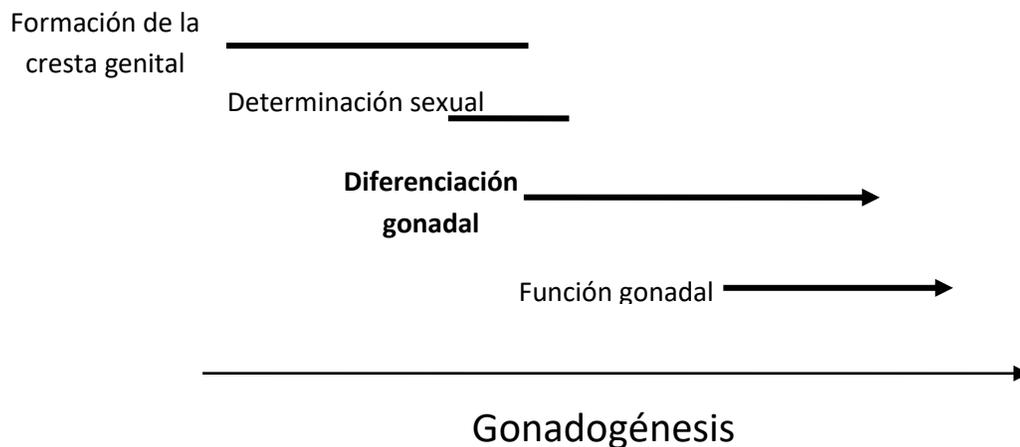


Figura 1. Gonadogénesis. Modificado de Clinton-Haines, 1999.

El desarrollo de la gónada puede ser considerado como una serie de fases secuenciales pero que pueden sobrelaparse, como se representa en la figura 1. Comienza con la formación de la cresta genital y va seguida de la determinación sexual, que una vez ocurrida, continúa con los cambios morfológicos necesarios para distinguirse como un ovario o un testículo. En este punto, las gónadas están diferenciadas histológicamente, y posteriormente ocurrirá una serie de eventos morfofuncionales que contribuirán con el mantenimiento del sexo, que involucra el funcionamiento de las gónadas.

Asimismo, se han elaborado estudios donde se han reportado altos niveles de estrógenos en hembras y altos niveles de andrógenos en machos, sugiriendo que existe un mecanismo donde los esteroides pueden regular la diferenciación específica del testículo y el ovario durante la formación de la cresta genital (Figura 2). Se reporta que la síntesis de estrógenos coincide con la expresión de la aromatasa y la temperatura feminizante a la que están expuestos los huevos, durante el periodo de incubación (Clinton-Haines, 1999). Por otro lado, se ha reportado la expresión de ciertos receptores a estrógenos en gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante, considerando la posibilidad de que los estrógenos y el receptor a estrógenos juegan un papel importante en la formación de la cresta genital y en eventos de determinación sexual.

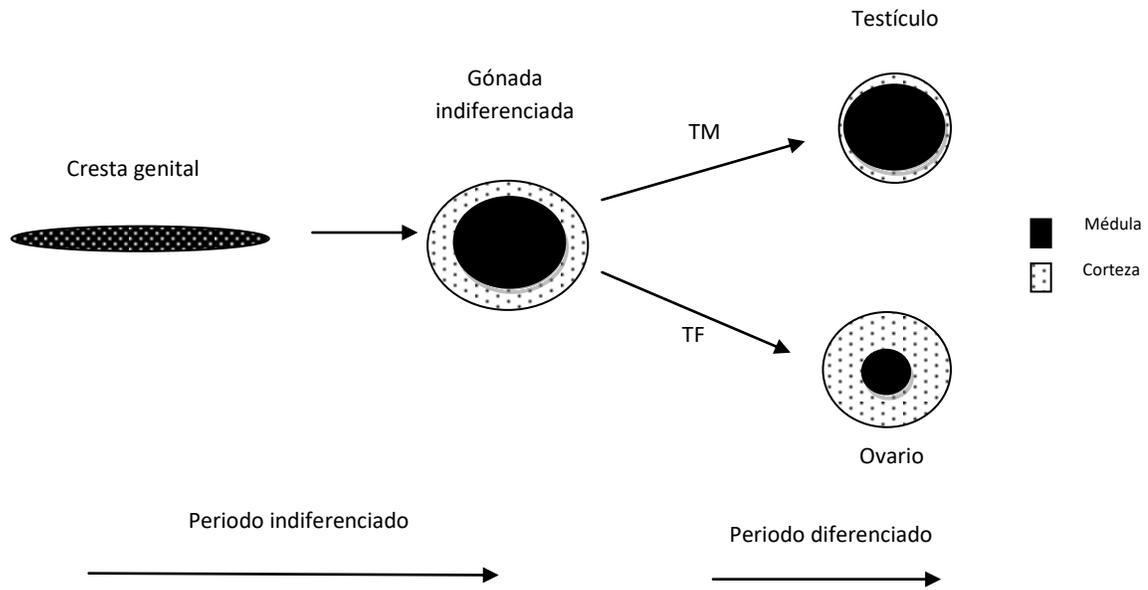


Figura 2. Diferenciación gonadal de especies con Determinación Sexual por Temperatura. Modificado de Clinton- Haines, 1999.

Diferenciación gonadal

Desde un punto de vista morfofuncional, se considera que una célula se diferencia cuando adquiere caracteres especiales para cumplir una función determinada dentro de un organismo.

Diferenciación del testículo

Como en los mamíferos, en los reptiles la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual se detecta en la gónada de los machos. Se observa una separación gradual de los cordones sexuales del epitelio superficial de la gónada por una capa de tejido conectivo derivada del mesotelio, y posteriormente ocurre el traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada como un movimiento morfogénico que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un depósito de las moléculas que forman la lámina basal. En la región medular, los cordones sexuales reciben el nombre de cordones seminíferos y están formados por células somáticas y germinales precursoras de las células de Sertoli y de los ovocitos o espermatozoides,

respectivamente. Los cordones seminíferos conectan con la rete testis (estructura de transición que conecta con los conductos eferentes derivados de los conductos mesonéfricos) en el lado del mesonefros.

El compartimento del estroma se distribuye en la cresta genital entre el mesonefros y el engrosamiento del epitelio celómico, en el cual se encuentran las células de Leydig, vasos sanguíneos, nervios, células mesenquimáticas, fibroblastos y una matriz extracelular que contiene fibronectina y fibras de colágena. Después de un tiempo de desarrollo, las células de Leydig se diferencian y empiezan con la síntesis y secreción de testosterona, necesaria para la diferenciación de los conductos sexuales masculinos al estimular el desarrollo de los conductos mesonéfricos (conductos de Wolff) y la diferenciación de los genitales externos masculinos. Por otro lado, las células de Sertoli producen la hormona antimülleriana en los cordones seminíferos, la cual es importante para la regresión de los conductos de Müller (precursores del tracto genital en las hembras) (Merchant, 1975).

Diferenciación del ovario

El desarrollo del ovario involucra dos eventos principales: la regresión de la región medular y la proliferación de la corteza. En las gónadas indiferenciadas los cordones sexuales primarios degeneran y algunos forman la rete ovarii, mientras que el epitelio celómico continúa con su proliferación y da origen a un segundo grupo de cordones denominados cordones ovígeros, los cuales forman la corteza del ovario. Las células somáticas epiteliales de estos cordones son las precursoras de las células foliculares y se conocen como células pregranulosas (Merchant, 1975).

Una característica distintiva del ovario es el número de células germinales que queda limitado en la vida fetal, ya que una vez iniciada la meiosis, los ovocitos no pueden proliferar después del nacimiento. Los ovocitos que se encuentran agrupados en el interior de los cordones sexuales, empiezan a ser separados por las células epiteliales. Este fenómeno ocurre en la región medular, donde los ovocitos inician su crecimiento. Posteriormente, se observa que las células epiteliales situadas alrededor de los ovocitos medulares adquieren una forma cúbica y tienden a separarlos, formando los primeros

folículos. La presencia de las células germinales es determinante para la formación del ovario, ya que en su ausencia no ocurre la diferenciación ovárica (Merchant, 1975).

La mayor parte de los cordones ovígeros está ocupada por las células germinales, las cuales están representadas por ovogonias en proliferación, que cuando inician la profase I de la meiosis se diferencian como ovocitos, después de ello, a partir de los cordones ovígeros, se lleva a cabo la foliculogénesis. Los cordones muestran un proceso de fragmentación que consiste en que algunas células epiteliales pregranulosas rodean a los ovocitos dándoles individualidad dentro de los cordones y forman los folículos primordiales al subdividir a los cordones ovígeros en unidades que permanecen como reserva folicular del ovario. Las células del estroma ovárico incluyen células mesenquimáticas, fibroblastos, vasos sanguíneos y a las células precursoras de las tecas.

La organización histológica del ovario consiste en un epitelio cúbico simple superficial que es continuación del mesotelio que recubre el meso-ovario y que por debajo de esta envoltura superficial el ovario presenta dos zonas: la corteza y la médula. La corteza ovárica es la zona periférica del ovario que está formada por el estroma cortical que es una capa superficial de tejido conectivo denso, subyacente al epitelio superficial, que continúa con un tejido conectivo laxo que tiene un predominio de haces de fibroblastos del estroma que rodean a los folículos ováricos del parénquima cortical. La médula ovárica se localiza en el centro de la gónada y está formada por tejido conectivo laxo con una gran cantidad de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas que entran por el hilio del ovario.

Genes involucrados en la diferenciación gonadal

Hasta ahora se han realizado estudios acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación gonadal en mamíferos, lo cual de alguna manera podría darnos referencia de lo que sucede en otros grupos de vertebrados.

En la gónada embrionaria morfológicamente indiferenciada de ambos sexos se establecen redes moleculares que determinan la formación de ovarios o testículos (Díaz Hernández y Merchant- Larios, 2008). Muchos de los genes involucrados en la determinación de la

gónada son necesarios para el mantenimiento y diferenciación morfológica de ovarios y testículos e indirectamente regulan la diferenciación dimórfica del sexo somático a través de factores neuroendócrinos (Díaz Hernández y Merchant-Larios, 2008).

A través de estudios realizados en 1947 por Alfred Jost en embriones de conejos antes de la diferenciación sexual somática, se conoce que los conductos y el seno urogenital siguen la vía feminizante de manera independiente a su sexo genético; de esta forma se puede decir que la diferenciación sexual fetal depende del proceso molecular conducente al establecimiento del testículo.

El gen SRY se encuentra en el brazo corto del cromosoma Y de los mamíferos, y actúa para iniciar el desarrollo gonadal del testículo, actuando como un gen maestro que se expresa durante el periodo crítico de la determinación sexual, desencadenando la vía de expresión de diversos genes involucrados en este proceso; se propone que los genes que se expresan después del SRY inducen y mantienen el desarrollo del testículo (Vidal et al., 2001; Kidokoro et al., 2005). SRY actúa como activador de la expresión de Sox9 en las células pre Sertoli de las gónadas XY, represor, o como proteína de interacción para regular los niveles de SOX9. La hipometilación de la región reguladora de SRY es importante para los factores de transcripción y coactivadores que regulan la expresión de SRY, pues permite el acceso a la maquinaria de transcripción y a factores de transcripción para regular positivamente su expresión (Nishino et al., 2004).

La activación del promotor de SRY se da por los factores de transcripción Wt1 y Sf1 que accesan a la región promotora del gen (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008). Asimismo, se ha sugerido que el factor de transcripción Gata-4 junto con su activador Fog2 accesan a la región reguladora de SRY para activar su expresión; sin embargo no se ha demostrado su interacción con el promotor de SRY. Por su parte, Gata-4 es capaz de unirse al promotor de Amh por lo que se piensa que probablemente regule la expresión de la hormona (Viger et al., 1998). Existe una alta accesibilidad de la región reguladora de SRY por parte de Wt1, Sf1 y Gata-4, incrementando los niveles de los transcritos de SRY (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008). Por otro lado, la glicoproteína Wnt4

probablemente regula la acción de SRY mediante interacciones proteína-proteína (Jeays-Ward et al., 2004).

Debido a que en especies no mamíferos no se encuentra el gen SRY y sus homólogos son ausentes, se ha encontrado que el gen SF1 es dimórficamente expresado en el desarrollo de las gónadas de reptiles con determinación sexual por temperatura (Western et al., 2000; Fleming and Crews, 2001; Ramsey et al., 2007). A su vez, el gen SF1 actúa como un transactivador de muchas enzimas esteroideogénicas, incluyendo a P450 aromatasa, y recientes estudios en especies con determinación sexual por temperatura han mostrado que el estradiol contrarresta el efecto de la temperatura masculinizante e induce la diferenciación ovárica.

Sox9 es un gen autosómico de la familia de SRY que se expresa en los cordones sexuales de los testículos (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996; Wilhem et al., 2005). Es capaz de unirse y transactivar al promotor de la Antimülleriana (Amh), siendo éste el único blanco de Sox9 y es considerado como el marcador de diferenciación de las células de Sertoli (De Santa Bárbara et al., 1998). SOX9 regula positivamente la expresión de Fgf9 y Pgd2 con quienes establece un eje de retroalimentación positiva. Aún no se conoce la vía mediante la cual SRY activa directa o indirectamente la expresión de Sox9, sin embargo se sabe que se regula en el testículo después de iniciarse la expresión de SRY, expresándose durante el proceso de determinación testicular (Kent et al., 1996; Bullejos y Koopman, 2001; Kidokoro et al., 2005).

El desarrollo sexual de las tortugas que tienen una determinación sexual por influencia del ambiente, comienza con una gónada bipotencial, la cual bajo la influencia de la temperatura o los estrógenos, se desarrollará como un ovario o como un testículo. Por su parte, Sox9 es un gen que se encuentra conservado en la expresión de la determinación sexual en los grupos de vertebrados y es expresado en la gónada bipotencial en embriones incubados a temperatura masculinizante y temperatura feminizante en los cordones medulares de organismos con determinación sexual por temperatura (Morrish and Sinclair, 2002; Merchant et al., 2010).

Cuando los niveles de Sox9 han aumentado lo suficiente, éste inhibe la expresión de Wnt4, promoviendo la esteroidogénesis y la diferenciación de las células de Leydig. Así mismo, es importante el mantenimiento de la expresión de Sox9 para la permanencia del testículo diferenciado (Kim et al., 2006).

Por su parte, Pgd2 también está involucrada en mantener la expresión de Sox9 y es capaz de inducir la expresión de Sox9 en células que no expresaron SRY (Wilhelm et al., 2007; Adams y McLaren, 2002). Diversos estudios realizados durante el periodo crítico de la determinación sexual del ratón muestran que se expresan varias decenas de genes de manera dimórfica entre los dos sexos, aunque no se conoce el papel que juegan en la determinación sexual (Nef et al., 2005; Beverdam y Koopman, 2006).

En cuanto a la determinación y diferenciación del ovario se ha propuesto que este proceso se da por la ausencia de un factor determinante del testículo, aunque también se ha referido la existencia de un factor determinante de ovario (Od), encargado de la formación del ovario (Eicher y Wasburn, 1986). Se sugiere también la existencia de una red compleja de expresión en las gónadas con la presencia de Od, que en ausencia de SRY, se establecería la red molecular feminizante inhibiendo la expresión de Sox9 e iniciando la cascada de expresión que conduce la formación del ovario, es decir, un gen o genes que cumplan una función análoga a la de SRY en la determinación testicular (Ottolengui et al., 2007).

Se han propuesto a los genes Wnt4, FoxL2, Dax1 y Rspo1 como determinantes del ovario, donde no se encuentra el SRY y hay bajos niveles de Sox9, y por lo tanto, no se inhibe la expresión de Wnt4, aumentando sus niveles y junto con Sf1 mantienen bajos los niveles de Sox9 (Vainio et al., 1999), es así como se propone que la función de Wnt4 es reprimir la vía de señalización de macho, bloqueando la migración de las células endoteliales a las gónadas de individuos XX (Yao et al., 2004), reprimiendo la esteroidogénesis en ambos sexos (Jeays-Ward et al., 2004). Un aumento en la expresión de Sox9 en el testículo lleva a la regulación negativa de la expresión de Wnt4, por lo que en el testículo se inicia la

actividad esteroidogénica en las células de Leydig, mientras que en los ovarios, la actividad de Wnt4 se mantiene inhibiendo la actividad esteroidogénica (Jeays-Ward et al., 2004).

Anteriormente se había postulado a Dax1 como factor determinante del ovario, sin embargo en un estudio con ratones se demostró que también es necesario para el desarrollo testicular (Yu et al., 1998), pues se ha reportado que Dax1 inhibe la interacción sinérgica de Sf1 con Wt1, por lo que funciona como un antagonista de la producción de Amh, que es considerado como el marcador de diferenciación de Sertoli (Niakan y McCabe, 2005). Por su parte, el gen FoxL2 muestra expresión específica en las gónadas de hembras en ratón, pollo, tortuga y peces durante la determinación sexual (Yao, 2005), considerándose como un factor importante en la vía de determinación del ovario al ejercer una función “antitestículo” demostrada en experimentos con ratones XX que mostraron reversión sexual parcial al nacimiento y sobreexpresión en gónadas XY, desorganizándose los cordones testiculares. Por otro lado, la expresión de Fog2 en el ovario inhibe la función de Gata-4 necesaria para la regulación positiva de Amh.

Otro gen que se ha propuesto como parte de la diferenciación ovárica es el gen Rspo1, que es parte de una familia de proteínas ligando huérfanas que actúan mediante la activación de las vías de señalización Wnt y β -catenina; esta última lleva a la degradación de Sox9, postulando a Rspo1 como el gen Z, al reprimir la vía de determinación testicular mediante la vía β -catenina (Capel, 2006). Por otro lado, la ausencia de Rspo1 no provoca una reversión sexual primaria, ocurre un proceso secundario de desdiferenciación ovárica debido a la muerte de las células germinales (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008).

No se han descrito el o los genes que de manera individual funcionen como organizador ovárico (Od), o como un antitestículo al inhibir la vía de desarrollo del testículo, así pues se propone que la expresión conjunta de varios genes lleva a la inhibición del desarrollo testicular (Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2008).

Hormonas esteroideas involucradas en la determinación sexual en reptiles

En especies con determinación sexual ambiental, aparentemente la temperatura no es el único factor que influye en la determinación sexual, pues se han reportado largas variaciones en los promedios de machos y hembras producidas en diferentes temperaturas pivotaes donde se esperaban encontrar proporciones 1:1 (Rhen y Lang, 1998). Lo cual podría indicar que otros factores como la contribución materna puede influenciar en el proceso de determinación sexual. Un factor que puede marcar las diferencias en la proporción de sexos de las nidadas puede ser la expresión de la hormona diferencial en la yema del huevo del embrión, como se ha reportado en especies de aves (Schwabl, 1996; Schwabl et al., 1997).

Así mismo, se ha demostrado que la administración exógena de estrógenos a embriones de peces, anfibios, reptiles y aves, con frecuencia lleva a la reversión sexual (Elbretch y Smith, 1992; Merchant-Larios et al., 1997, Pieau et al., 1999; Hayes et al., 1999). De manera que se ha propuesto que los estrógenos y sus receptores (RE α y RE β) participan en el proceso de determinación sexual de estas especies.

Receptores a estrógenos

La mayor parte de los efectos de los estrógenos en sus órganos blanco se deben a la cadena de eventos celulares conocida como “señalización estrogénica” la cual es una vía de transducción celular que comienza con la activación de los receptores a estrógenos. Estos receptores son nucleares y pertenecen a una superfamilia de factores transcripcionales relacionados, que regulan la acción de las hormonas liposolubles y otros compuestos sobre diferentes procesos fisiológicos (Thornton y De Salle, 2000). Estos compuestos, entre los que se encuentran los esteroides sexuales y adrenales, tiroxina, ácidos retinoicos, vitamina D, ácidos grasos, atraviesan las membranas celulares uniéndose a receptores específicos. La localización intracelular de los receptores nucleares puede variar en función del tipo de hormona, pudiéndose encontrar en el citoplasma, el núcleo o divididos entre el citoplasma y el núcleo (Walters et al., 1981).

Estos receptores funcionan como factores de transcripción los cuales contienen dominios funcionales donde existe una parte del receptor que se une al ADN y una parte que se une al ligando que es el sitio de reconocimiento y unión a la hormona específica y otras moléculas afines (Owen y Zelent, 2000). Cuando estos receptores se unen al ligando, sufren un cambio conformacional que los activa para reconocer y unirse a una secuencia específica de nucleótidos, lo que permite el reclutamiento de proteínas coactivadoras necesarias para activar la transcripción génica (Rosenfeld y Glass, 2001). Estas secuencias específicas de nucleótidos en el ADN son conocidas como elementos de respuesta hormonal. Cuando los complejos ligadores de receptores interactúan con el ADN alteran el nivel de transcripción del gen asociado, la familia de receptores esteroideos tienen tres dominios diferentes: un dominio de unión al ligando, un dominio ligado al ADN y un dominio regulador de la transcripción. Aunque se observa un efecto común de la actividad de transcripción alterada en respuesta a una interacción entre la hormona y su receptor, existen efectos específicos de los miembros de la familia por una interacción entre la hormona y su receptor. Varios receptores son introducidos para interactuar con otros mediadores transcripcionales en respuesta a la unión del ligando. La unión de los glucocorticoides conlleva a la traslocación del complejo ligando-receptor del citosol al núcleo (Riggs y Hartmann, 2003). Los receptores dimerizan y el complejo se transporta al núcleo, en donde se une a una porción de DNA llamada elemento de respuesta hormonal y da lugar a toda una serie de fenómenos bioquímicos que conducirán al efecto biológico (Kurman y Shih, 2010).

Cuando no está la presencia del ligando, los receptores permanecen inactivos pero se mantienen enlazados a proteínas chaperonas quienes los mantienen en una conformación que oculta sus péptidos. Cuando ocurre la unión del receptor con la hormona que le corresponde, hay cambios en la conformación, lo separan de las proteínas y descubren las señales de localización nuclear, haciendo posible la activación de la transcripción de genes blanco debido a la interacción con los elementos de respuesta a los estrógenos (Mosselman et al., 1996).

Los receptores a estrógenos (RE) pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares y se conocen principalmente dos: 1) RE α y 2) RE β . El RE α tiene una longitud de aproximadamente 600 aminoácidos y un peso molecular de 67 kDa, mientras que RE β tiene alrededor de 500 aminoácidos y un peso molecular de 55 kDa. Los receptores a estrógenos pueden interactuar de forma diferencial con otros factores de transcripción, activándolos y promoviendo la transcripción de un grupo de genes que no son sus blancos de manera original; también existe diferencia en la interacción con los ligandos, puesto que el RE α tiene aproximadamente 4 veces más afinidad con E₂ que el RE β . Ambos subtipos de receptores muestran una elevada afinidad por el 17 β -estradiol, siendo la del RE α superior a la de RE β (Mosselman et al., 1996). Generalmente, el estradiol es el principal ligando de RE β y ejerce efectos sobre la expresión de éste, así como en la expresión de RE α , actuando no sólo de manera antagónica a través de sus receptores, sino también regula su expresión en sentido contrario, por lo que es probable que bajo ciertas condiciones el estradiol promueva la expresión de un tipo de receptor mientras que en otras disminuya la del otro tipo, con la finalidad de mantener un equilibrio entre las funciones que son controladas por uno u otro receptor (Locia et al., 2013). Se han desarrollado trabajos con *Trachemys scripta* donde clonaron un receptor a estrógenos durante el periodo crítico en que los embriones, según la temperatura de incubación, se diferenciaban en machos o hembras. Dicho efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual está dirigido por los estrógenos a través de sus receptores (Bergeron et al., 1998).

Las hormonas esteroides, además de ejercer sus efectos a través del mecanismo de unión a los receptores nucleares, también pueden desarrollar respuestas rápidas que implican la actuación de mecanismos alternativos a la transcripción genética. Si bien el complejo ligando-receptor implicado en la transcripción genética se localiza en el núcleo, el par hormona-receptor que está relacionado con las respuestas no genómicas de los esteroides, está asociado a las membranas plasmáticas y en este caso, los esteroides actúan mediante los mecanismos clásicos de los receptores asociados a las mismas a través de segundos mensajeros (Norman et al., 2004). Además de los receptores de

membrana acoplados a proteína G, los receptores nucleares también están implicados en las acciones rápidas de las hormonas esteroides. La activación del receptor a estrógenos por el 17β estradiol, desencadena la activación de una quinasa MAP que a su vez estimula la unión de AP1 al ADN e induce en última instancia, la transcripción génica (Figura 3) (Norman et al., 2004).

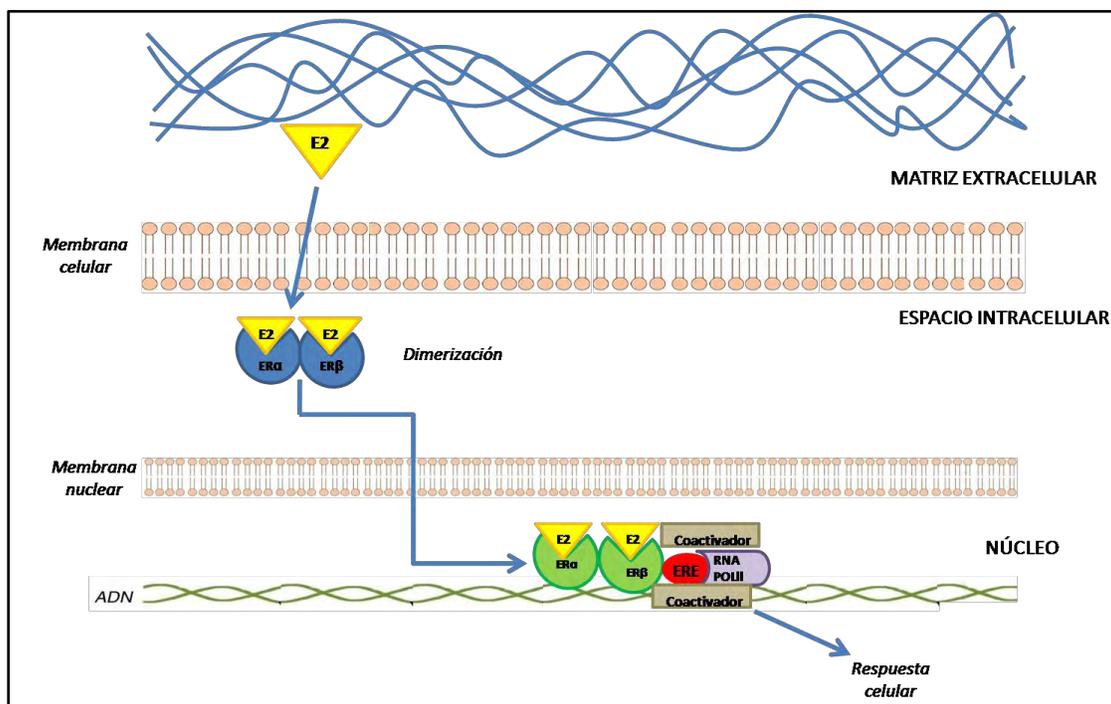


Figura 3. Señalización estrogénica. Los efectos de los estrógenos requieren de la activación de los RE y la estimulación de la transcripción de genes. Los Receptores a estrógenos también pueden provocar que otros factores de transcripción se unan a sus propios elementos de respuesta.

Regulación de los Niveles de Estrógenos en la Determinación Sexual por Temperatura

Inhibición de la aromatasa

La inhibición de la actividad de la aromatasa, la enzima requerida para la producción de estrógenos, resulta en la diferenciación de testículos (Wibbels y Crews, 1994; Barske y Capel, 2010). Lo cual nos proporciona información acerca del papel de los estrógenos en la determinación sexual o en la diferenciación de especies de reptiles con diferentes mecanismos de determinación sexual. Estudios con las tortugas de agua dulce *Emys orbicularis* y *Trachemys scripta* apoyan la hipótesis de una regulación directa o indirecta

de P450arom como un sensor que media la dependencia de la temperatura en la determinación sexual (Wibbels et al., 1991; Pieau y Dorizzi, 2004). Se ha investigado si los niveles de aromatasa en los complejos mesonefros-adrenal-gónada en temperaturas masculinizantes y feminizantes ocurren antes de la diferenciación morfológica, y estudios realizados en gónadas aisladas de *Chelydra serpentina* y *Trachemys scripta* mostraron diferencias (Rhen et al., 2007). La hipótesis de que la aromatasa juega un papel central en la diferenciación ovárica (Pieau et al., 1999) ha favorecido a que se realicen diferentes estudios al respecto.

Los inhibidores de P450 producen la diferenciación parcial o total del testículo en temperatura feminizante, la cual detalla la noción de que los niveles diferenciales de hormonas estrogénicas están involucrados en la determinación sexual gonadal y/o en la diferenciación testicular (Wibbels et al., 1991; Lance y Bogart, 1992; Ramsey et al., 2007). Resultados experimentales en *Trachemys scripta* sugieren que el estradiol regula directa o indirectamente la expresión de Sf1 (Fleming y Crews, 2001).

A través de diversas investigaciones se han desarrollado inhibidores para la enzima aromatasa, desacoplando su especificidad y reduciendo sus efectos. Los inhibidores de aromatasa no pueden detener a los ovarios de producir estrógenos, pero sí pueden bloquear la producción de estrógenos, y es a través de la inhibición de la enzima que esto se puede llevar a cabo. Los inhibidores de la aromatasa también han demostrado revertir la disminución en los niveles de testosterona y se han categorizado en dos tipos:

1) Inhibidores esteroideos derivados de la androstendiona, son irreversibles y forman una unión permanente con el complejo de la enzima aromatasa, provocando una pérdida funcional y 2) inhibidores no esteroideos tales como el fadrozole, aminoglutetimida, anastrozole y letrozole que inhiben la enzima por competición reversible.

Un componente no esteroideo identificado como un inhibidor de alta potencia y gran especificidad en la inhibición de la aromatasa es el fadrozole (Figura 4). Un estudio realizado en 1990 por Lipton y colaboradores, demuestra que el efecto del fadrozole es más potente que cualquier otro inhibidor de la aromatasa. La especificidad de la inhibición

de la enzima aromatasa con fadrozole no es absoluta, pues esta droga pertenece a la clase de agentes los cuales bloquean el citocromo P-450 que media las hidroxilaciones esteroideas en una forma competitiva. Una propiedad común a todos los componentes es su especificidad relativa de ciertas hidroxilaciones de P-450. La inhibición es específica para ciertas enzimas a bajas concentraciones, pero la inhibición de otras enzimas puede ocurrir a concentraciones más altas (Grodin et al., 1973).

Hasta ahora no se conoce el grado de capacidad del fadrozole para inhibir la aromatasa, y a pesar de muchos experimentos en aves, no se ha detectado la producción de andrógenos en las gónadas de machos o hembras recién nacidas y no se conoce un buen método para determinar la secreción de esteroides gonadales durante el desarrollo, por lo que ahora es importante determinar la secuencia de los acontecimientos y de las consecuencias directas de cada paso. Por ejemplo, en la actualidad no es claro cuántos eventos están involucrados, pero sí influyen en el desarrollo en una dirección masculina o femenina o si ambos procesos requieren mecanismos específicos que puedan intervenir activamente (Wade et al., 1999).

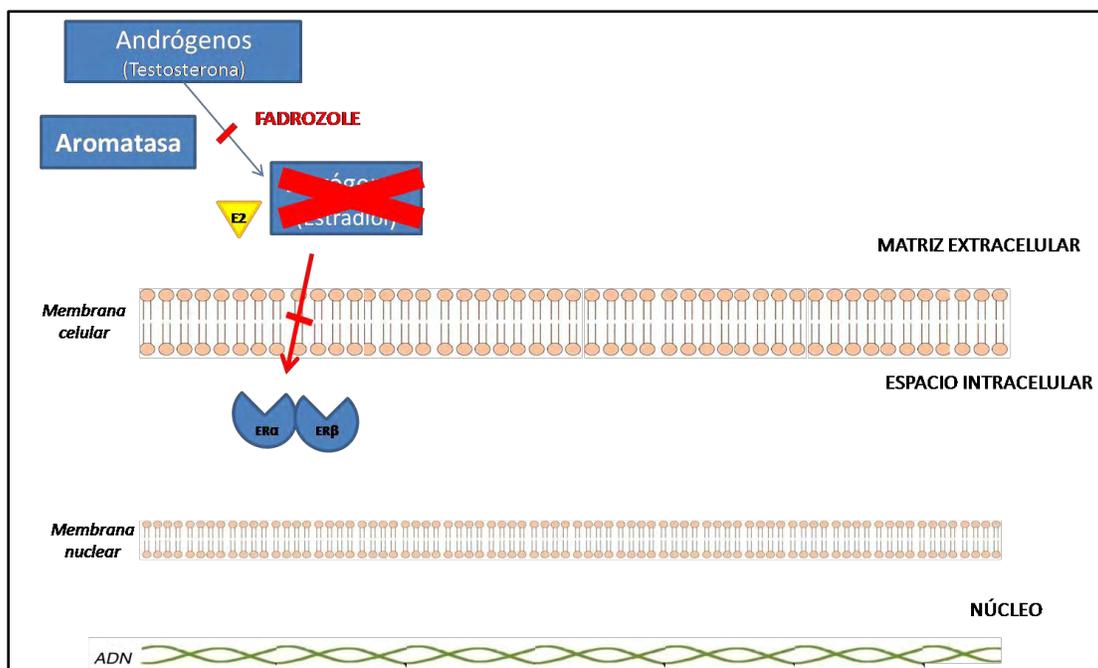


Figura 4. Inhibición de la acción de la aromatasa por el fadrozole.

Modulación selectiva del receptor a estrógenos (RE)

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno bloquean los efectos del estrógeno en los tejidos, éstos funcionan uniéndose a los receptores de estrógeno en las células, si un modulador selectivo se une al receptor del estrógeno no hay espacio suficiente para que el estrógeno se acople a la célula. Si el estrógeno no está unido a la célula, la célula no recibe las señales del estrógeno que le indican que debe crecer y multiplicarse. Cada receptor de estrógeno tiene una estructura ligeramente distinta de acuerdo al tipo de célula en que se encuentra (Grodin et al., 1973).

Se han reconocido cuatro mecanismos mediante los cuales el receptor a estrógenos puede regular el crecimiento y la proliferación celular:

- 1) La unión del ligando activa al receptor a estrógenos induciendo interacción con el DNA y ocurre la activación transcripcional de genes blanco.
- 2) Varias cinasas de las redes de señalización de factores de crecimiento logran activar al ER y sus proteínas correguladoras en ausencia del ligando.
- 3) Activación independiente de la unión del complejo hormona-receptor a su elemento de respuesta específico sobre el DNA. El receptor a estrógenos unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción utilizando los sitios de unión a DNA de éstos.
- 4) Activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor a estrógenos regulado, anclado a la membrana.

Estos cuatro mecanismos interactúan para llevar a cabo la regulación hormonal de un tejido blanco, sin embargo la regulación de cada mecanismo y su interacción entre ellos no se ha conocido en su totalidad. El mecanismo de acción más estudiado es el dependiente de un ligando, que cuando se une a un estrógeno el ER se activa, disociándose de las proteínas de choque térmico y sufre cambios conformacionales para lograr la unión con sus elementos de respuesta sobre el DNA en las regiones de regulación de los genes blanco. Los receptores unidos al DNA reclutan a los factores basales de

transcripción y la RNA polimerasa II por medio de su interacción directa o por medio de proteínas intermediarias.

Los corre reguladores son proteínas que interactúan con factores de transcripción y modulan su actividad positiva o negativamente, y desde un punto de vista funcional se clasifican en dos tipos: coactivadores y correpresores. 1) Los coactivadores no interactúan directamente con el ADN pero lo hacen a través de su asociación con factores de transcripción, entre los que se encuentra el receptor de estrógenos. La unión del ligando al receptor a estrógenos genera un cambio conformacional formando una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con coactivadores a través de una secuencia que está presente en una o varias copias en un gran número de coactivadores. Los coactivadores se presentan en complejos multiprotéicos que interactúan con factores de transcripción y modifican la cromatina para facilitar la transcripción a través de mecanismos de remodelación de cromatina, acetilación y metilación de histonas. Muchos de los receptores nucleares reprimen la transcripción en ausencia de su ligando o en presencia de ligandos antagonistas como el fulvestrant. Esta regulación negativa está mediada por los 2) correpresores. La unión de antiestrógenos causa un cambio conformacional diferente al creado por la unión de ligandos agonistas, lo cual bloquea la interacción coactivadores y permite la entrada de correpresores. Los correpresores se unen a los receptores donde la expresión en algunos correpresores es muy alta en tejidos que responden al estímulo hormonal y éstos a su vez presentan modificaciones postraduccionales como fosforilación y acetilación. Los correpresores forman parte de complejos multiprotéicos y reclutan desacetilasas de histonas que evitan el acceso a factores de transcripción y se reprime la transcripción. Existen repesores que inhiben la actividad transcripcional de los receptores nucleares mediante diferentes mecanismos, entre los que destacan: interrumpir la unión al DNA o la traslocación al núcleo del receptor, inhibir las interacciones entre los receptores y sus coactivadores o interrumpir el reclutamiento de la maquinaria de transcripción. Los correpresores como el fulvestrant compiten con los coactivadores por los sitios de unión en los receptores nucleares para modular la actividad transcripcional. O también puede existir una competencia indirecta

que puede unirse al mRNA del coactivador, conduciendo a la inhibición de la traducción del coactivador y a que como consecuencia de ello, se tenga una disminución en la actividad de estrógenos.

El fulvestrant es un antiestrógeno esteroideo que actúa como antagonista a los receptores a estrógenos, es selectivo de los receptores a estrógenos y puede bloquear la actividad transcripcional mediada por los receptores a estrógenos a través de la unión a los mismos receptores y la inducción de los mismos (Grodin et al., 1973; Jiang et al., 2013). Es un antagonista competitivo de los receptores a estrógenos cuya actividad consiste en la antiproliferación y la inducción de la apoptosis. El mecanismo de acción del fulvestrant está asociado con la regulación a la baja de los niveles de la proteína del receptor de estrógeno ya que se une competitivamente a los receptores a estrógenos con una afinidad de unión aproximadamente 100 veces mayor que el tamoxifen, que fue descrito anteriormente como el antagonista de los receptores a estrógenos puro. En modelos animales, esta unión atenúa la habilidad del receptor a estrógenos para activar o inhibir la transcripción de genes (Figura 5). Otra característica que distingue el modo de acción del fulvestrant de otros antiestrógenos es que reduce los niveles del receptor a progesterona, de una manera dosis-dependiente.

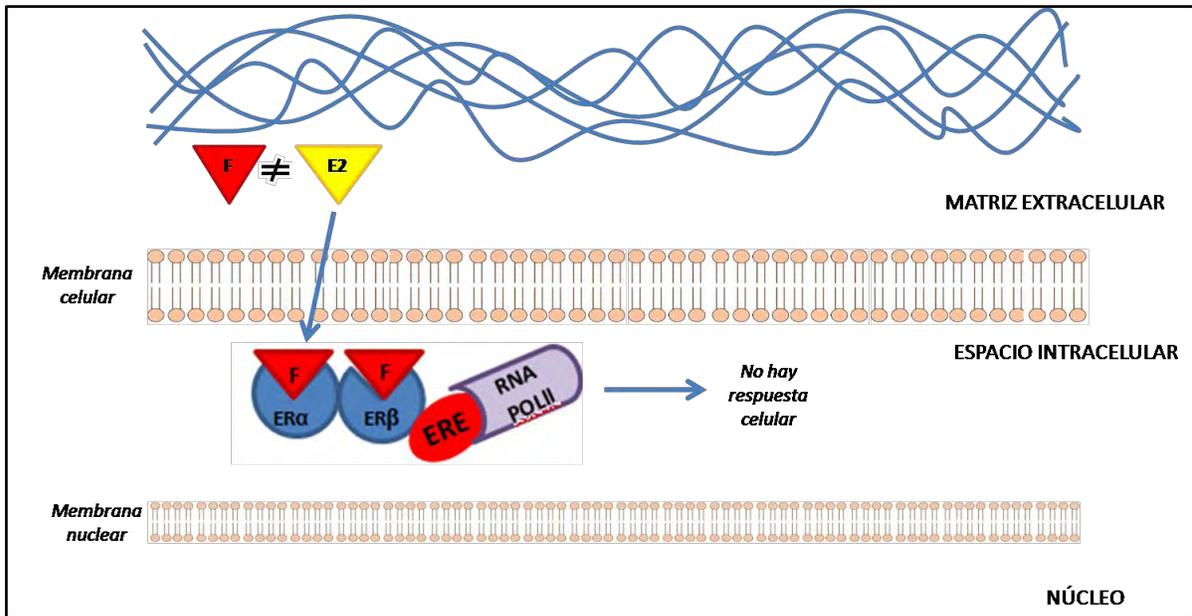


Figura 5. Modo de acción del fulvestrant. AF1: Función de activación 1; AF2: función de activación 2; ER: receptor a estrógenos; ERE: elemento de respuesta a estrógenos; F: fulvestrant; RNA Pol II: Ácido ribonucleico polimerasa II. Modificado de Ciruelos et al., 2013.

Antecedentes

Diferenciación ovárica en especies con DST

El estudio de las especies con determinación sexual por temperatura comienza a partir de un estudio realizado por Charnier (1966) con la lagartija *Agama agama*, donde demostró que a bajas temperaturas de incubación había una mayor producción de machos, mientras que a temperaturas altas, hubo una alta producción de hembras. De esta manera, se da inicio a distintos estudios sobre el desarrollo gonadal en especies con este tipo de determinación sexual.

Distintas hipótesis sobre la diferenciación gonadal ovárica, mencionan que la temperatura de incubación feminizante induce la morfogénesis gonadal femenina a través de la regresión de los cordones medulares; por otro lado, algunos estudios como los de Raynaud y Pieau en 1985, proponen que a una mayor producción de estrógenos ocurre la diferenciación ovárica a través de un crecimiento cortical de la gónada de *Emys orbicularis*.

A su vez, la hipótesis realizada por Crews et al. (1989), propone que la temperatura de incubación en especies con determinación sexual por temperatura, regula de manera diferencial la producción de andrógenos o estrógenos en las gónadas. Asimismo, la diferenciación ovárica se lleva a cabo a través de la temperatura de incubación feminizante que estimula la acción de la aromatasa, la cual es una enzima que biotransforma andrógenos como la testosterona en estrógenos.

Los estrógenos como el 17β -estradiol, al antagonizar la acción de los andrógenos, estimulan el desarrollo de la región epitelial somática de la corteza del primordio gonadal, dando como resultado la diferenciación ovárica (Salame-Méndez, 1998).

Por otro lado, se ha reportado que el estradiol inhibe la expresión del gen del receptor de andrógenos, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa que desencadena una cascada de señalización para la diferenciación ovárica y que su

presencia causa una regresión de cordones medulares y un aumento en la proliferación celular. A su vez, permite la formación de matriz celular estimulando el crecimiento del epitelio somático de la región cortical de la gónada, conllevando a una diferenciación ovárica (Browder et al. 1991, Pelliniemi et al., 1998)

Se han elaborado estudios donde se han reportado altos niveles de estrógenos en hembras y de andrógenos en machos, sugiriendo que existe un mecanismo en el cual los esteroides pueden regular la diferenciación específica del testículo y el ovario, desde la formación de la cresta genital. Estos estudios revelan que durante el periodo de incubación, la síntesis de estrógenos coincide con la expresión de la aromatasa y la temperatura feminizante a la que están expuestos los huevos (Clinton-Haines, 1999).

Años más tarde, en 2007, Ramsey y Crews mostraron que en *Trachemys scripta* una alta expresión de los receptores hormonales a los esteroides a temperatura feminizante en el momento en que comienza la diferenciación gonadal, revelando una probable implicación en el desarrollo ovárico.

El efecto del estradiol exógeno sobre la diferenciación sexual gonadal de especies con determinación sexual por temperatura

El efecto del estradiol sobre la diferenciación sexual gonadal ha sido evaluado por Crews et al. (1989) en sus estudios con *Chelydra serpentina* donde demuestra que la regulación en la biosíntesis de hormonas esteroides sexuales actúan sinérgicamente con la temperatura de incubación feminizante, con una mayor producción de aromatasa y por ende, una alta producción de estrógenos. Con ello, llevando a la diferenciación del ovario, a través de la estimulación del desarrollo de la región epitelial somática de la corteza del primordio gonadal.

Dorizzi et al.(1991) evaluaron el efecto de 17β estradiol y estrona a temperatura masculinizante en las gónadas de embriones de *Emys orbicularis* donde localizaron un engrosamiento en la región cortical e inhibición en los cordones medulares. Mientras que a temperatura feminizante el tratamiento con esteroides muestra una médula reducida.

Concluyendo que los estrógenos están involucrados en la determinación y diferenciación sexual de las gónadas, teniendo un efecto directo en la inhibición de los cordones testiculares y estimulando el desarrollo de la corteza en el ovario (Figura 6).

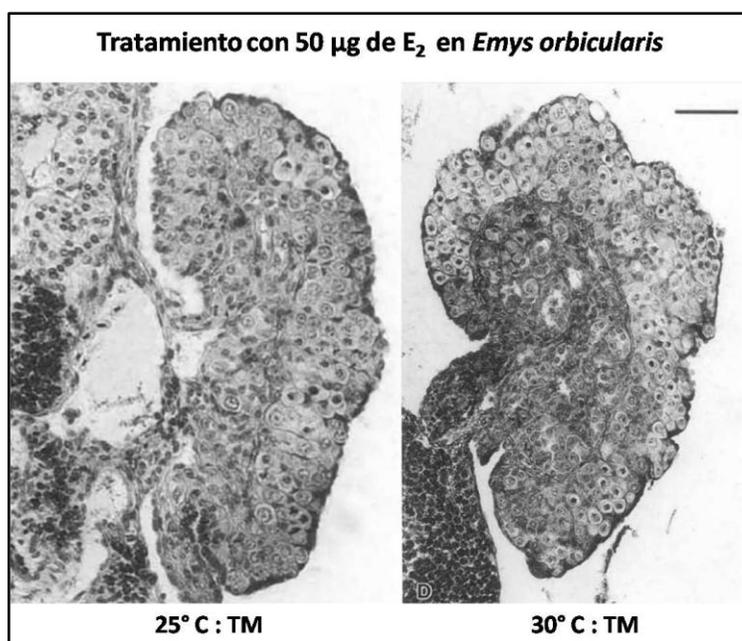


Figura 6. El tratamiento con estrógenos en los embriones de *Emys orbicularis* induce cambios en la determinación y diferenciación sexual de las gónadas (Tomada de Dorizzi et al., 1991). A) Gónada de un embrión de *E. orbicularis* del grupo control a TM (25° C) donde se observa un testículo bien diferenciado, B) Gónada de un embrión bajo el tratamiento de 50µg de E₂ a TM (25° C) donde se obtuvo un fenotipo ovárico.

El mismo año, el grupo de investigación de Crews et al. (1991) comprobó que en las gónadas de embriones de *Trachemys scripta* la aplicación de 17β estradiol y benzoato de estradiol induce la feminización a temperatura masculinizante, indicando que los estrógenos exógenos son capaces de coordinar el desarrollo cortical y medular en la gónada, proponiendo que el desarrollo gonadal puede involucrar un mecanismo de los estrógenos para la coordinación medular y cortical en una etapa de desarrollo temprana.

Asimismo, Desvages et al. (1991) en un experimento con *Emys orbicularis* detectaron que la síntesis de estrógenos es mayor en ovarios que en testículos. En tanto que la producción de testosterona es mayor en testículos que en ovarios. Los autores también demuestran que los ovarios se diferencian en un cierto nivel de estrógenos a

altas temperaturas y los testículos por debajo de este nivel. Asimismo aseguran que es necesario definir el papel de la aromatasa en la diferenciación sexual gonadal, comparando su actividad a ambas temperaturas de incubación.

Lance y Bogart (1992), con los estudios realizados en *Alligator mississippiensis* concluyen que los estrógenos juegan un papel importante en la diferenciación de los ovarios, al observar que el crecimiento ovárico de embriones incubados a TF es dependiente de estrógenos. Además, propusieron que los andrógenos pueden afectar la diferenciación testicular en los reptiles, sin embargo no tienen influencia en la determinación sexual primaria, y es probable que no jueguen un papel en la diferenciación de los ovarios.

Estudios realizados posteriormente por Wibbels et al.1993, evidenciaron que el 17β -estradiol induce la regresión de los cordones medulares de la gónada de la tortuga *Trachemys scripta* incubada a temperatura masculinizante. Este efecto es similar al que ejerce la temperatura feminizante sobre la diferenciación ovárica. Además, las gónadas de los embriones tratados resultaron ser más pequeñas que los grupos controles, sin embargo, los autores no discutieron sus resultados respecto a ello (Figura 7).

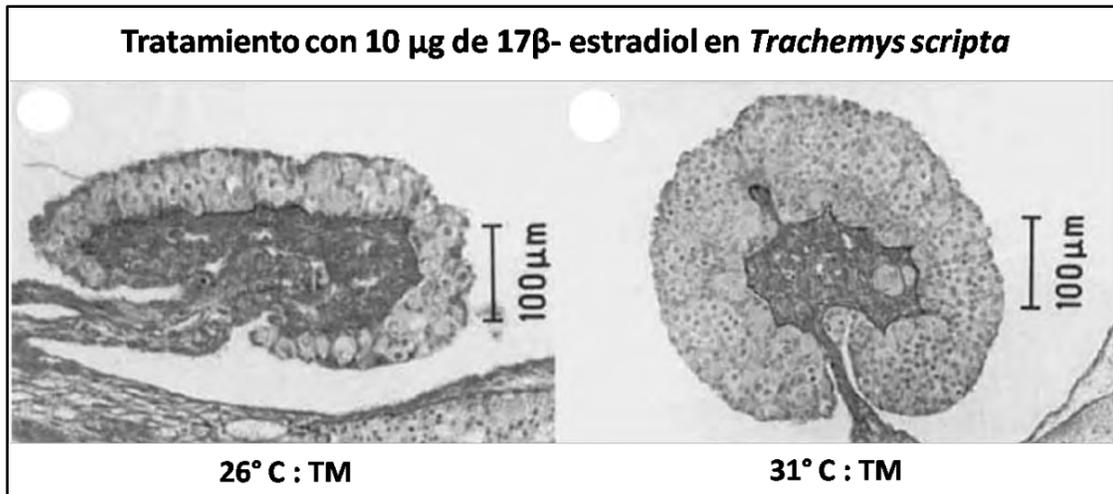


Figura 7. El tratamiento con estradiol induce regresión de los cordones medulares a TM (Tomada de Wibbels et al., 1993). A) Gónada de un embrión de *T. scripta* del grupo control a TF (31° C) donde se observan las características de un ovario bien diferenciado. B) Gónada de un embrión de *T. scripta* bajo el tratamiento de 10 μg de 17 β estradiol a TM donde se observa la regresión de cordones medulares y el desarrollo de una corteza ovárica.

Recientemente, un estudio realizado en *Trachemys scripta* por Barske y Capel (2010) demostró que el 17 β -estradiol reprime la expresión de Sox9 y la regresión de cordones sexuales en las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante (Figura 10). Mientras que la aplicación tópica de inhibidores de la señalización de estrógenos como letrozole e ICI (in ovo) provocan el mantenimiento de la expresión de Sox9 en las gónadas de los embriones incubados a temperatura feminizante. Por lo que los autores concluyen que los estrógenos contraponen el efecto de Sox9 sobre la diferenciación del testículo.

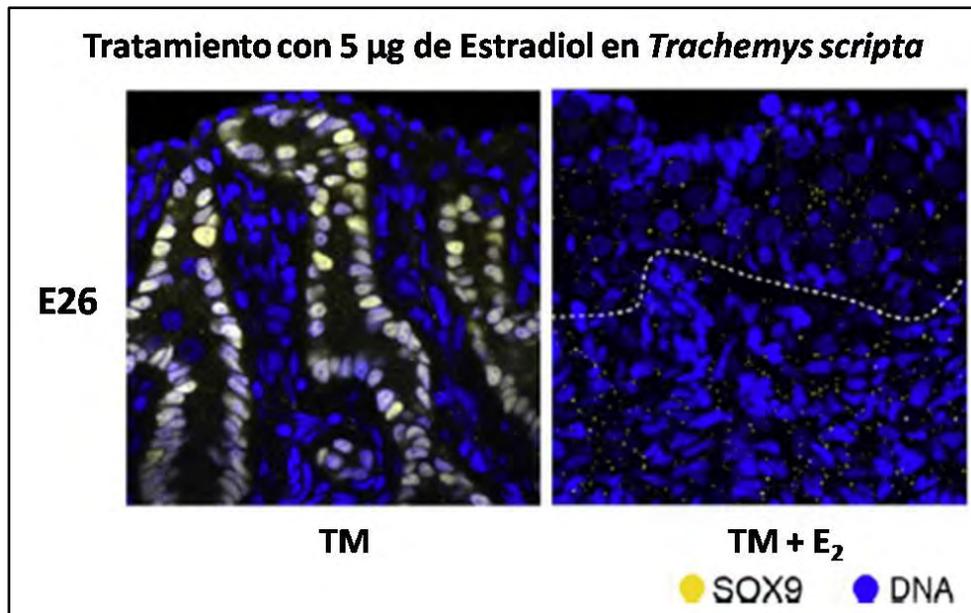


Figura 8. El 17 β -estradiol reprime la expresión de Sox9 y la regresión de cordones sexuales en las gónadas de embriones incubados a TM (26° C) (Tomada de Barske y Capel, 2010). A) Gónada de un embrión de *T. scripta* del grupo control a TM donde se observa la expresión de Sox9 en los cordones medulares. B) Gónada de un embrión de *T. scripta* bajo el tratamiento de 5 μ g de estradiol a TM donde se reprime la expresión de Sox9 y los cordones sexuales se revierten.

El efecto del estradiol en la determinación sexual gonadal de tortugas marinas

Merchant-Larios et al., en 1997 determinaron que la respuesta de las gónadas de los embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* tratados con 17 β estradiol a temperatura masculinizante fueron gónadas con características ováricas (inhibición del desarrollo de cordones testiculares y estimulación de la corteza gonadal) y de tamaño pequeño, estipulando que los estrógenos pueden mimetizar el efecto de la temperatura masculinizante (Figura 9).

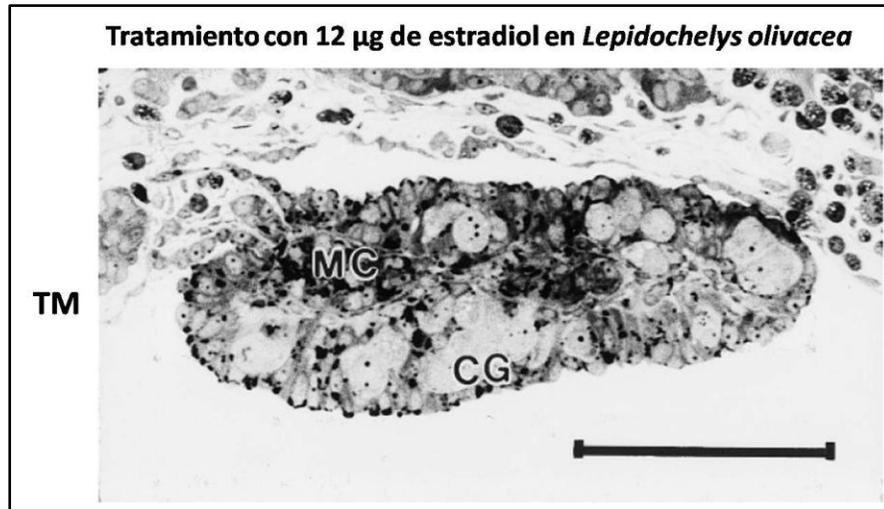


Figura 9. Gónada de un embrión de *L. olivacea* con el tratamiento con 12 μ g de estradiol a TM donde se muestra una corteza ovárica y remanentes de cordones medulares. Barra de escala: 100 μ m (Tomada de Merchant Larios et al., 1997).

Años más tarde, Díaz- Hernández et al., (2015) investigaron el efecto del estradiol en el desarrollo gonadal a través de la proliferación celular en las gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea*, y observaron que el tratamiento con estradiol presenta una morfología ovárica, pero con una reducción en la proliferación celular de la gónada en general. Por lo que el estradiol parece mimetizar el efecto de la temperatura masculinizante, y acontece la reversión sexual morfológica, pero con el desarrollo de gónadas hipoplásicas (Figura 10).

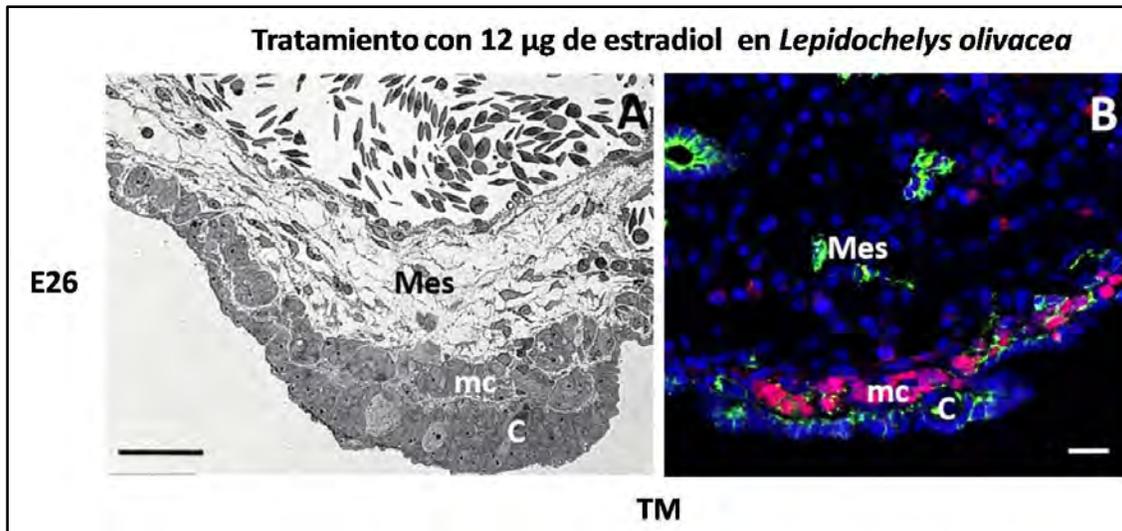


Figura 10. Gónadas hipoplásicas de un embrión en etapa 26 tratada con 12 μ g de estradiol. A) Microfotografía de la histología de una gónada de *L. olivacea*, se observa el mesonefros (Mes), la corteza (C), y los cordones medulares (mc). Barra de escala = 50 μ m, B) Microfotografía de la inmunofluorescencia de una gónada de *L. olivacea*, se observa Sox9 positivo en la región medular (rosa), los núcleos celulares teñidos con TOTO-3 (azul) y las células epiteliales marcadas con citoqueratina (verde). Barra de escala = 20 μ m (Tomada de Díaz-Hernández et al., 2015).

El efecto del estradiol sobre la actividad de la aromatasa durante el desarrollo gonadal de especies con determinación sexual por temperatura

El efecto del estradiol sobre la actividad de la aromatasa ha sido evaluado por Desvages y Pieau, que en 1992 probaron que es necesaria la exposición a temperatura feminizante para inducir un incremento en la actividad de la aromatasa y la correlación que existe con la diferenciación gonadal; así proponen que el incremento de la actividad de la aromatasa presenta gónadas de embriones con una médula reducida debido a la inhibición de los cordones sexuales medulares (Figura 11).

La temperatura feminizante induce el incremento de la actividad de la aromatasa en *Emys orbicularis*

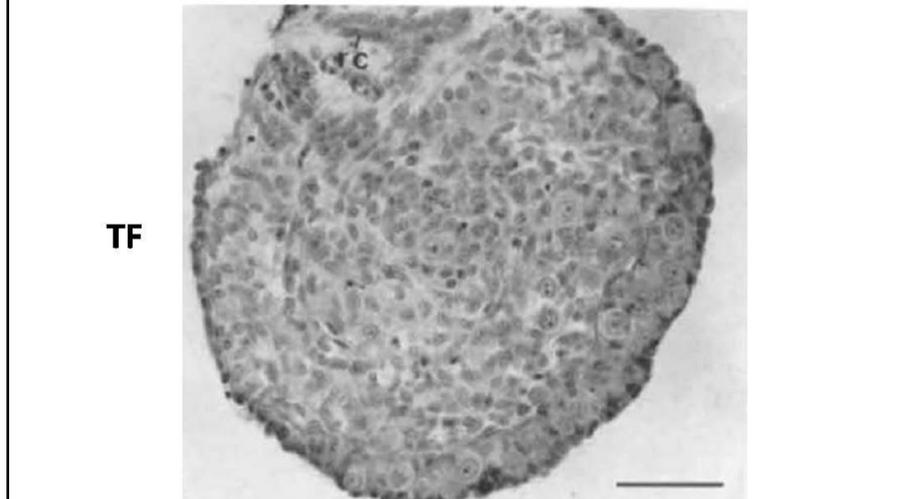


Figura 11. Después de 8 días a 35° C, los cordones epiteliales no son reconocibles y la corteza es más desarrollada. Gónada de un embrión de *E. orbicularis* donde se prueba que la exposición a TF induce un incremento en la actividad de la aromatasa donde se observa una médula reducida con cordones sexuales fragmentados. Barra de escala: 50 μ m (Tomado de Desvages y Pieau, 1992).

Desvages et al., en 1993 realizan un estudio con *Dermochelys coriacea* donde determinan que el periodo de sensibilidad de la actividad de la aromatasa corresponde con las etapas de diferenciación sexual a temperatura feminizante. Estableciendo que existe una correlación con los niveles de estrógenos contenidos en las gónadas y la expresión de la aromatasa. Se comprueba que altos niveles de estrógenos son requeridos para inhibir el desarrollo de cordones testiculares, mientras que bajos niveles parecen estimular la diferenciación cortical.

Posteriormente en 1994, Dorizzi *et al.* observaron que en *Emys orbicularis* los efectos del letrozole y CGS 16949A (inhibidores de la aromatasa) a temperatura feminizante desarrollan una morfología testicular en la médula, mostrando cordones medulares rodeados de un epitelio; comprobando así la implicación de los estrógenos en la diferenciación ovárica al prevenir la conversión de andrógenos a estrógenos por la inhibición de la aromatasa. Los autores proponen al gen de la aromatasa como un candidato para la activación de la diferenciación ovárica (Figura 12).

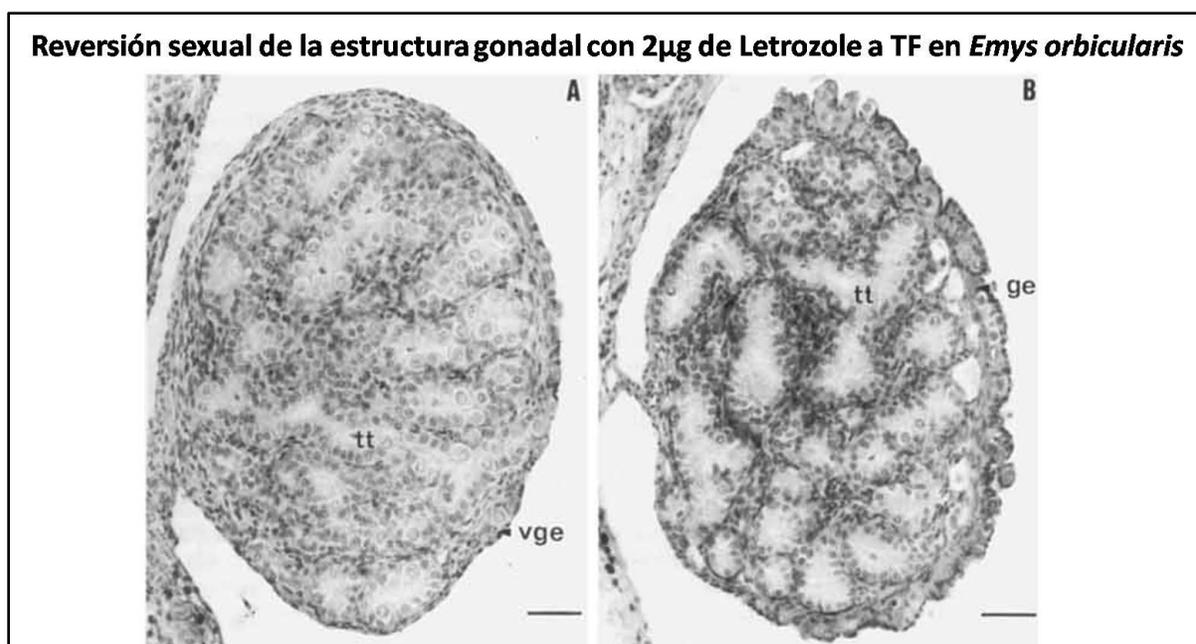


Figura 12. A) Gónada de un embrión incubado a TM con estructuras histológicas típicas de in testículo. B) Después de tres aplicaciones de 2 µg de letrozole a TF se muestra un epitelio germinal formado por una sola capa de células y tubos testiculares. Barra de escala: 50 µm (Tomada de Dorizzi *et al.*, 1994).

En el 2002, Milnes *et al.* evaluaron los efectos de la temperatura de incubación en la actividad de la aromatasa en las gónadas de embriones de *Alligator mississippiensis*, determinando que la actividad de la aromatasa en la gónada está asociada con el desarrollo ovárico e incrementa en las etapas de diferenciación gonadal en los embriones incubados a temperatura feminizante y en las gónadas de los embriones tratados con estradiol, sugiriendo que la exposición de los embriones al estradiol y la temperatura de incubación afecta los niveles de la enzima aromatasa y/ o su actividad en las gónadas.

Matsumoto et al., (2013), identificaron que el incremento en la expresión de la aromatasa en las gónadas de *Trachemys scripta* coincide con el periodo termosensible del desarrollo. Asimismo, que la administración de estrógenos a temperatura masculinizante incrementa la expresión de la aromatasa a partir del periodo termosensible.

Justificación

La especie de tortuga marina, *Lepidochelys olivacea*, es un modelo idóneo para estudiar los mecanismos que regulan la determinación y diferenciación sexual gonadal en especies con determinación sexual por temperatura. En base a estudios con esta especie se ha determinado que la totalidad de embriones que se incuban a 26° C se determinan como machos (TM) y los que se incuban a 33° C se determinan como hembras (TF). Además el desarrollo gonadal de esta especie es susceptible al estradiol exógeno (Merchant-Larios et al., 1997), lo que la hace un buen modelo para determinar el efecto del estradiol sobre la diferenciación ovárica. A pesar de que los estrógenos que se producen en el ovario de vertebrados adultos es un requisito indispensable para el mantenimiento de la función reproductiva, no se conoce si tienen efecto sobre la diferenciación del ovario. En los mamíferos, el estradiol no parece tener un efecto sobre la determinación ovárica; sin embargo, es una hormona importante para el mantenimiento de la diferenciación del ovario adulto y la fragmentación de los nidos de ovocitos durante la formación de los folículos. Sin embargo, poco se conoce del papel de esta hormona en el proceso de la determinación y la diferenciación sexual gonadal en especies con determinación sexual por temperatura. El presente trabajo aportará evidencia morfológica del papel del estradiol en la diferenciación del ovario lo cual nos llevará a entender más sobre la diferenciación del sexo en tortugas marinas.

Hipótesis

El estradiol exógeno tiene un efecto sobre la remodelación de los cordones medulares del ovario de embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

El estradiol exógeno tiene un efecto sobre el engrosamiento de la región cortical del ovario de embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Objetivos

GENERAL:

Determinar el efecto del estradiol sobre la remodelación de los cordones medulares y el engrosamiento de la región cortical del ovario de embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

PARTICULARES:

- Determinar el efecto del estradiol exógeno en la morfología medular y cortical de las gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante y masculinizante.
- Determinar el efecto de los inhibidores de la síntesis y acción de los estrógenos (fadrozole y fulvestrant) sobre la morfología medular y cortical de las gónadas de embriones incubados a temperatura feminizante y masculinizante.

Material y Métodos

Obtención del material biológico y traslado al laboratorio

Área de estudio

El material biológico se obtuvo en la playa La Escobilla que se localiza en el Municipio de Santa María Tonameca, en el Estado de Oaxaca (Figura 13). Se encuentra en las coordenadas: 15°43" latitud Norte y 96° 44" longitud oeste. Su altura media es de 10 msnm; al norte colinda con los bienes comunales de San Francisco Cozoaltepec y Santa María Tonameca; al oeste con el Río Cozoaltepec; al sur con el Océano Pacífico; y al este con el río Tonameca. El clima es tropical subhúmedo con lluvias en verano, con una temperatura media anual superior a 22° C; con un rango de precipitación del mes más seco menor a 600 mm (SEMARNAT, 2009; INEGI, 2013).

La playa la Escobilla es un Área Natural Protegida con categoría de Santuario debido a que presenta el fenómeno conocido como arribada, caracterizado por la presencia de un numeroso grupo de hembras anidando en una porción de playa definida en un periodo de tiempo corto, tiene una longitud de 17 km. En México es una de las tres principales playas de anidación para *Lepidochelys olivacea*; a nivel mundial es reconocida como una de las playas más importantes con las arribadas más numerosas en todo el planeta (Solís et al., 2008).

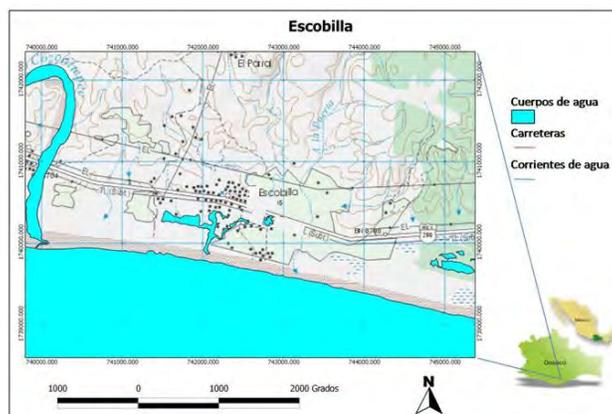


Figura 13. Área de Estudio. Playa la Escobilla

Colecta

El proyecto cuenta con el permiso de SEMARNAT oficio SGPA/DGVS/03109/15.

La colecta de nidos se realizó durante la temporada de ovoposición de *Lepidochelys olivacea* mediante recorridos nocturnos (entre las 10:00 pm y las 6:00 am), ésta consiste en la localización de hembras anidantes a lo largo de la playa. Una vez identificada la tortuga, se procede a esperar a que ésta termine de desovar para evitar su perturbación y se realiza la excavación manual hasta la profundidad donde se encuentran los primeros huevos del nido. Para la manipulación de los huevos es necesario manejarlos con extremo cuidado sin cambiar su orientación; los huevos fueron colocados con arena del interior del nido en una bolsa de plástico para su transporte al campamento. Se utilizaron nidos de 7 diferentes nidadas (2011- 2016).

Traslado al laboratorio

Los huevos de cada nido fueron reubicados en el campamento en cajas de unicel en el transcurso de 0-5 horas después de haber sido desovados (para asegurar la sobrevivencia de los embriones); los huevos fueron empaquetados y cubiertos con vermiculita húmeda, se alternaron capas de vermiculita evitando la formación de espacios para impedir el movimiento de los huevos dentro de la caja. Los nidos fueron trasladados al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en las 24-48 horas siguientes a la colecta, por vía terrestre.

Incubación

La incubación y mantenimiento de los nidos se realizó en colaboración con el Dr. Horacio Merchant Larios en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Una vez en el laboratorio, los huevos fueron reubicados en recipientes con vermiculita húmeda previamente esterilizada y se distribuyeron al azar en 2 grupos para ser incubados a las dos temperaturas establecidas: a 26°C (temperatura masculinizante) y a 33°C (temperatura feminizante). La orientación original de los huevos se mantuvo todo el tiempo durante su incubación. La humedad se verificó periódicamente y se registró la temperatura mediante termómetros (tipo HOBO modelo UA-001-08).

Tratamientos con Etanol 70%, 17 β -estradiol, fadrozole y fulvestrant

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo en embriones incubados a temperaturas tanto masculinizante como a temperatura feminizante en la etapa 23 del desarrollo, periodo en el cual la gónada es susceptible al efecto de químicos exógenos.

Los tratamientos se aplicaron sobre el cascarón de cada huevo a mediante un tubo hecho de una cápsula de Beem fijada con parafina, de acuerdo a lo siguiente:

- a) Tratamiento control con Etanol 70%: 20 embriones incubados a temperatura masculinizante y 30 huevos incubados a temperatura feminizante tratados con 60 μ l de etanol.
- b) Tratamiento 17 β -estradiol (Cat E8875, Sigma Aldrich): 20 embriones incubados a temperatura masculinizante y 30 huevos incubados a temperatura feminizante tratados con 12 μ g de 17 β -estradiol disuelto en 60 μ l de etanol al 75%.
- c) Tratamiento fadrozole (Cat F3806, Sigma Aldrich): 20 embriones incubados a temperatura masculinizante y 30 huevos incubados a temperatura feminizante tratados con 200 μ g de fadrozole en 60 μ l de etanol al 75%.
- d) Tratamiento fulvestrant (Cat I4409, Sigma Aldrich): 20 embriones incubados a temperatura masculinizante y 30 huevos incubados a temperatura feminizante tratados con 50 μ g de fulvestrant en 60 μ l de etanol al 75%.

Obtención de los complejos urogenitales

Los complejos urogenitales, que se componen de la unión de la gónada con el mesonefros, se disecaron cuando los embriones alcanzaron la etapa 28 del desarrollo, cuando es posible distinguir las gónadas completamente diferenciadas.

Se realizó la extracción de los embriones a través de un corte realizado en la superficie del cascarón retirando al embrión de sus capas extraembrionarias, los embriones fueron colocados en una caja petri donde se sacrificaron por decapitación con ayuda de un bisturí; enseguida se obtuvieron los complejos urogenitales bajo el microscopio óptico y se colocaron en PBS 1x frío. Posteriormente un complejo fue fijado en paraformaldehído al

4% y el contralateral en fijador de Karnovsky, para su posterior procesamiento e inclusión en congelación y Epon, respectivamente.

Inclusión en congelación

Los complejos urogenitales fueron fijados con paraformaldehído al 4% toda la noche, al día siguiente fueron lavados con PBS 1x y procesados con sacarosa al 10%, 20% y 30%, después se embebieron en sacarosa 30% y medio OCT (Optimal Cutting Temperature) que es un incluyente hecho a base de polivinil-alcohol y polietilen-glicol (Tissue-Tek catálogo 4583, Sakura) en proporción 1:1 para su criopreservación. Posteriormente fueron incluidos en OCT puro y congelados a -20° C, se obtuvieron cortes de aproximadamente 20 µm en un Criostato (KD-2850, Kede) para ser procesados para inmunofluorescencia.

Obtención de cortes de congelación

Las gónadas que fueron incluidas en OCT puro y congelados a -20° C fueron procesadas para obtener cortes de 20 µm en un Criostato (KD-2850, Kede), colocando las inclusiones en una base de metal dentro de la cabina del criostato y fijadas con medio OCT puro para ser colocadas en la base frontal de la cabina, posteriormente se colocó la navaja en la base y se orientó el antiroll para evitar que cada corte se enrollara; se procedió a girar el brazo derecho del criostato hasta encontrar la gónada, una vez localizada se realizaron los cortes y se montaron en los portaobjetos dirigiendo la gónada hacia un solo lado para su fácil localización. Posteriormente las laminillas fueron congeladas a -20° C para ser procesadas posteriormente para inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia para Sox9 y Citoqueratina

Las laminillas que fueron congeladas a -20° C deben ser transportadas en hielo seco y descongeladas durante 5 minutos en un vaso coplin y se lavan durante 5 minutos en PBS y posteriormente en diferentes grados de etanol de forma ascendente y descendente durante 15 minutos cada uno (25%, 50%, 75%, 100%, 100%, 75%, 50%, 25%), se mantienen durante 5 minutos en PBS, en constante agitación.

Mientras tanto se puede comenzar a poner la olla de presión a 95° C, durante una hora, se llena de agua y se espera a que llegue a la temperatura adecuada.

Se retira a las laminillas el exceso de PBS con una gasa y se cambian a un vaso coplin que contenga citrato de sodio pH 6.0, hasta cubrir todos los tejidos, una vez obtenida la temperatura adecuada las laminillas se mantienen durante 60 minutos en la olla sin presión para la exposición del antígeno.

Posteriormente se enfrían en hielo en el vaso coplin y se lavan con PBS 1X. Las laminillas se colocan en los racks, asegurando que no tengan burbujas y que el líquido baje en cada una al mismo tiempo, después se permeabilizan con un volumen de 100 µl durante 10 minutos en Tritón 0.5% en PBS. Después de ello se bloquean con tritón al 10% durante 2 horas con un volumen de 100 µl y se lavan con PBS 1X en un tiempo de cuatro minutos. Se incuba con 100 µl de Sox9 (1:20) en DaVinci Green (menos el negativo) y se mantienen a 4°C durante 17 horas. Al día siguiente, las laminillas se lavan con PBS 3X y se realiza la aplicación de 100 µl del anticuerpo secundario CY3 550 αRb (1:600) (todas las laminillas) diluida en PBS tritón 0.5% durante 15 minutos, las muestras se lavan en PBS 3X durante cuatro minutos. Durante 10 minutos se les aplica 100 µl de paraformaldehído y se vuelven a lavar con PBS 3X; posteriormente se permeabiliza durante 10 minutos con 100 µl de Tritón 0.5% en PBS y se bloquea con tritón 10% durante 30 minutos. Se incuba con 100 µl de citoqueratina (1:50) en Da Vinci, en cada laminilla, menos el negativo y se mantienen a 4° C durante 17 horas.

Al día siguiente se lavan con PBS 2X, asegurando que no haya burbujas y que el líquido recorra al mismo tiempo en cada laminilla. Posteriormente se colocan 100 µl del anticuerpo secundario (488α ms) (1:200) en PBS tritón 0.5%, durante 30 minutos. Las laminillas se lavan con PBS 3X. Posteriormente se tiñen los núcleos con TOTO-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen)(1:500) en PBS tritón 0.5% durante 10 minutos y se lavan con PBS 3X durante cuatro minutos, se fijan con paraformaldehído 4%(100µl) durante 10 minutos y lavan con PBS 3X por cuatro minutos. Finalmente las laminillas se montan con DAKO y se observan mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Pascal- LSM5).

Inclusión en Epon

Los complejos urogenitales fueron fijados con fijador de Karnovsky toda la noche, el cual es un fijador hecho a partir de una mezcla de fijadores (glutaraldehído y paraformaldehído) para proporcionar una mejor estructura, estabilidad y dureza al tejido. Se lavaron con un buffer de cacodilatos de sodio al 0.1 M durante 2 horas y se procedió a la posfijación con tetróxido de osmio bajo una campana de extracción durante 2 horas; se lavaron con agua destilada. Las muestras fueron deshidratadas en diferentes grados de etanol (70%, 80%, 90%) durante 20 minutos cada uno y se realizaron dos cambios de etanol al 100% de una duración de 30 minutos cada uno, enseguida se realizaron dos cambios de acetonitrilo (Baker, cat. 9011-02) de 30 minutos, posteriormente fueron impregnadas con Epon (Embed 812, cat. 14900, Electron microscopy sciences): acetonitrilo en proporción 1:1 durante una hora y Epon: acetonitrilo en proporción 2:1 durante una hora, finalmente fueron incluidas en Epon puro en moldes adecuados previamente identificados, se incubaron toda la noche a 60° para su polimerización, y se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicrotomo (Power Tome Microtomy XL, RMC).

Obtención de cortes semifinos (1 µm)

En los prismas de Epon se procedió a localizar las gónadas con ayuda de un ultramicrotomo (Power Tome Microtomy XL, RMC), cortando con una navaja de metal la superficie superior de manera uniforme, haciendo la forma de una pirámide una vez localizada la gónada. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor con ayuda de las navajas de cristal elaboradas anteriormente, las cuales fueron fijadas en la base del ultramicrotomo y orientadas correctamente para realizar los cortes de los prismas de Epon, que fueron fijados en el brazo del aparato. Una vez orientados de manera paralela tanto el prisma de Epon como la navaja de cristal se procedió a acercar con extremo cuidado la navaja con ayuda del objetivo del ultramicrotomo, la base fue fijada y posteriormente se realizaron los cortes girando la palanca ubicada a un costado del brazo hasta obtener cortes completos y brillantes, las navajas de cristal fueron llenadas con agua bidestilada y con ayuda de asas se trasladaron al colorante para ser teñidas.

Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina 0.5%, el cual fue calentado previamente a una temperatura constante a través de una estufa eléctrica (Type 1900, model HP-A1915B), posteriormente se retiró el exceso de colorante en una caja de cultivo con agua bidestilada y alcohol de 96° para después ser montados en portaobjetos sobre una estufa con ayuda de una asa, y finalmente para su fotodocumentación con un microscopio (AxioCam HRc, Zeiss).

Resultados

El tratamiento con etanol, no induce cambios en la diferenciación sexual gonadal de *L. olivacea*

El uso de 70% etanol como vehículo en los tratamientos *in ovo* para *L. olivacea*, se ha reportado previamente (Díaz-Hernández et al., 2015). Para corroborar lo antes publicado, en este trabajo se muestran las descripciones histológicas tanto del vehículo como de los animales que no recibieron el vehículo.

A continuación, se describen detalladamente las muestras de gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* que fueron procesadas con epon y obtenidas de cortes semifinos y analizados mediante microscopía de alta resolución. Se utilizó un total de 20 huevos para cada tratamiento en cada temperatura de incubación a TM=26° C y TF=33° C.

Las muestras que forman parte del grupo control (sin tratamiento) y tratados con el vehículo (Etanol 70%) en etapa 23, fueron analizados en la etapa 28 del desarrollo embrionario. Las gónadas incubadas a TM tanto en el grupo control como en las tratadas con etanol como vehículo, presentan una morfología testicular, ya que se encuentran cubiertas por un epitelio celómico plano monoestratificado, mientras que en la región medular se observan cordones seminíferos continuos que contienen a las células germinales y a las células de Sertoli. También es posible apreciar un abundante tejido conjuntivo que contiene células mesenquimáticas y vasos sanguíneos. (Figuras 14A, 14B).

Las gónadas de embriones incubados a TF tanto en el grupo tratado con etanol o sin él, presentan características de un ovario diferenciado, caracterizado por presentar una corteza engrosada compuesta por varias capas de células pseudoestratificadas, donde se observan algunas células germinales (Figura 14C). En la región medular se observa la presencia de cordones medulares que no muestran continuidad con la corteza. Las células epiteliales que integran a los cordones se encuentran conformando estructuras lagunares, donde se aprecian células cúbicas (Figura 14D) y células planas. El estroma se encuentra conformado por abundantes células mesenquimatosas y a mayor aumento se puede apreciar la presencia de vasos sanguíneos (Figura 14D).

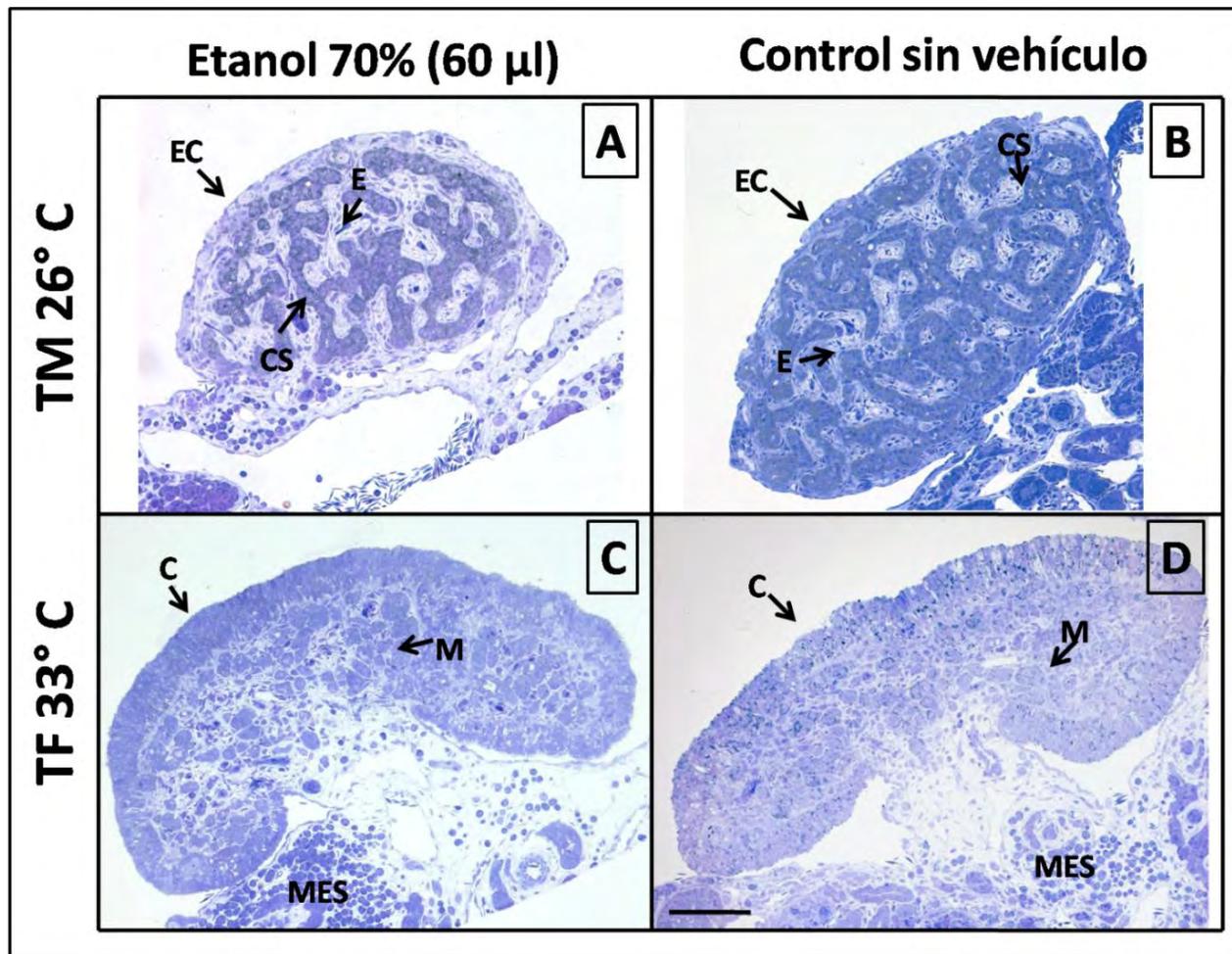


Figura 14. Fotomicrografía de alta resolución de cortes histológicos de la gónada de un embrión de *L. olivacea* en etapa 28. A) Testículo de un embrión incubado a 26° C y B) Testículo de un embrión incubado a 26°C tratado con etanol 70% (60 μ l), en ambos se observa epitelio celómico (EC) que los recubre y la región medular con cordones seminíferos continuos (CS) así como el compartimento que contiene al estroma. C) Gónada de un embrión incubado a TF y D) Ovario de un embrión incubado a 33° C tratado con etanol 70% (60 μ l), mostrando la corteza engrosada (C) compuesta por un epitelio pseudoestratificado, la región medular (M) con cordones sexuales fragmentados. MES= mesonefros (Barra de escala: 100 μ m).

El tratamiento con 17 β -estradiol ocasiona un desarrollo hipoplásico gonadal, independientemente de la temperatura de incubación

Las gónadas de los embriones incubados a TM tratados con 12 μ g 17 β -estradiol, presentan una reducción del tamaño general de la gónada como previamente ha sido reportado (Merchant-Larios et al., 1997; Díaz-Hernández et al., 2015). Se observa la región medular reducida de tamaño tanto en su componente estromático como epitelial (Figuras 15B, 16B). Con respecto a la región cortical, se puede apreciar el desarrollo del epitelio superficial que se convierte en una corteza engrosada conformada por un epitelio pseudoestratificado. Asimismo, se pueden apreciar varias células germinales de un tamaño mayor al presentado en las gónadas de los grupos controles (Figura 16B).

Las gónadas de embriones incubados a TF y tratadas con 17 β -estradiol también se aprecian de menor tamaño. Sin embargo, no es tan evidente como a temperatura masculinizante (Figuras 15B, 15F). Se puede apreciar un engrosamiento en la región cortical y con una región medular evidentemente reducida de tamaño conformada por tejido estromático y algunos cordones medulares (Figura 16F).

El tratamiento con fadrozole a temperatura feminizante inhibe la remodelación medular del ovario

Si bien el efecto del estradiol exógeno a TM, ha hecho proponer un papel en la diferenciación ovárica, decidimos inhibir la síntesis y la acción de los estrógenos, para evidenciar con mayor detalle el papel de los estrógenos en la diferenciación ovárica considerando el estudio de dos territorios histológicos: la corteza y la médula del ovario.

Los resultados previamente publicados por varios autores en tortugas de agua dulce (Dorizzi et al. 1991, 1994; Rhen y Lang 1994; Ramsey y Crews 2007; Barske y Capel 2010), son muy controversiales, ya que el efecto es heterogéneo reportándose una gama de fenotipos, que van desde el desarrollo de ovarios normales, ovotestis y testículos normales. De manera que ha sido imposible asegurar un papel de los estrógenos en la determinación ovárica, teniendo a *T. scripta* como modelo de estudio.

La histología de las gónadas de embriones que fueron incubados a temperatura masculinizante y tratados con fadrozole (200 µg) no muestran diferencias morfológicas a los grupos controles que fueron incubados a TM (Figura 15C). A mayor aumento, se observa que presentan un epitelio superficial con una única capa de células planas, y una región medular compuesta por cordones sexuales continuos. En la región del estroma se observan células mesenquimatosas y vasos sanguíneos (Figura 16C).

En el caso de los embriones incubados a temperatura feminizante y tratados con 200 µg de fadrozole, observamos la presencia de la región cortical engrosada, pero a diferencia de los grupos controles, presenta un mayor número de invaginaciones. Mientras que la región medular se aprecia evidentemente más grande, con abundante tejido estromático y la presencia de cordones medulares que no mantiene una continuidad con el epitelio, y se forman estructuras lagunares (Figura 15G). A diferencia de los ovarios controles, las estructuras lagunares están formadas por células epiteliales cúbicas (Figura 16G).

El tratamiento con fulvestrant a temperatura feminizante inhibe la remodelación medular del ovario

Los cortes histológicos de las gónadas de embriones que fueron incubados a TM y tratados con 50 µg de fulvestrant en la etapa 23 del desarrollo, mostraron las características de un testículo diferenciado (Figura 15D). Se observa a mayor aumento un epitelio celómico simple con una sola capa de células planas y cordones sexuales continuos, con un estroma compuesto por células mesenquimatosas y algunos vasos sanguíneos (Figura 16D).

Por otro lado, las gónadas de embriones incubados a TF y que fueron tratados con fulvestrant, muestran una morfología ovárica (Figura 15H). La histología de las gónadas a mayor aumento se observa con una corteza ovárica compuesta por varias capas de células pseudoestratificadas y una médula con algunos cordones sexuales que no fueron disgregados por completo en el momento de la diferenciación sexual gonadal, formando estructuras lagunares (Figura 16H).

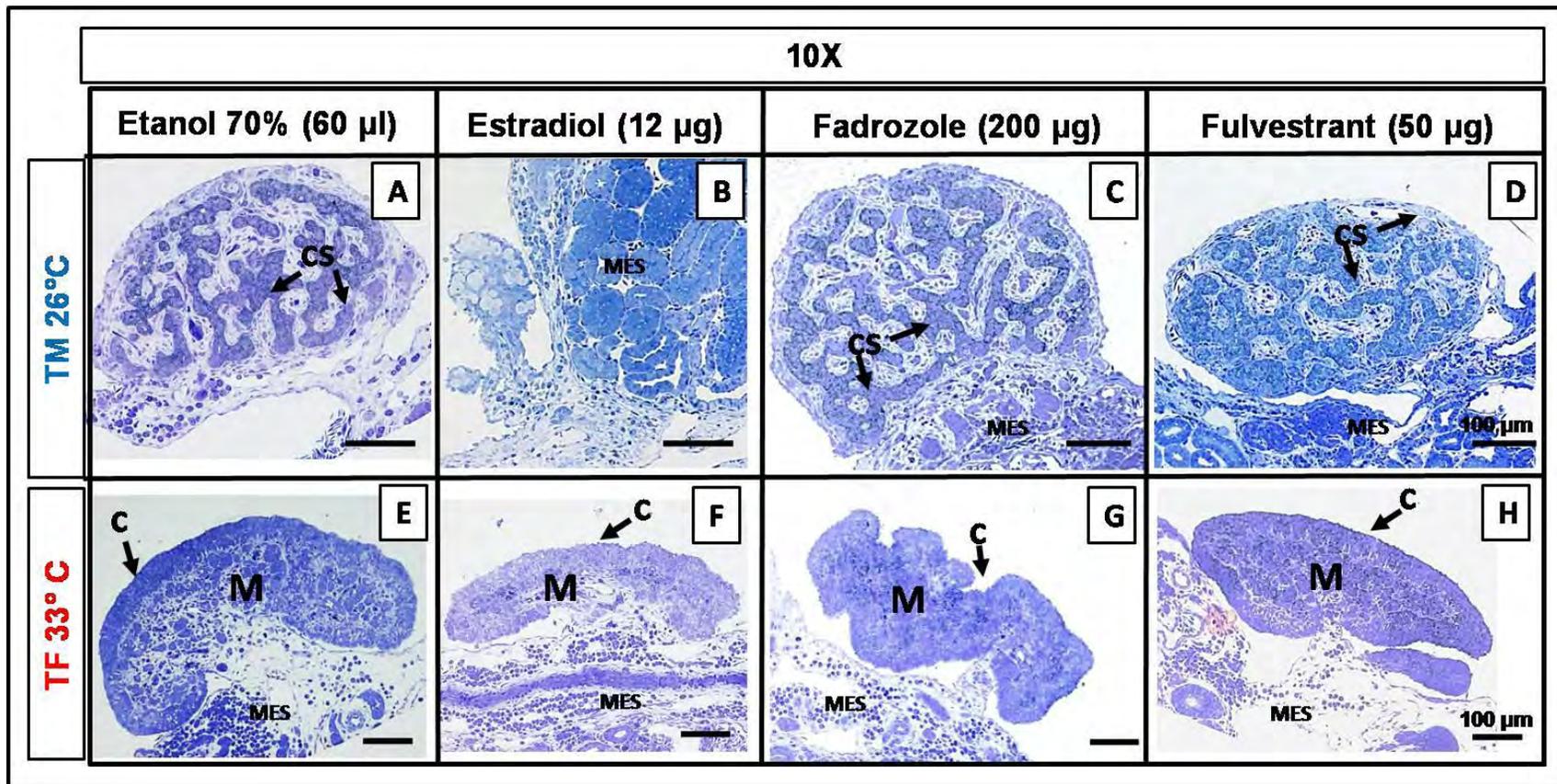


Figura 15. Fotomicrografía de alta resolución de cortes histológicos de las gónadas de embriones de *L. olivacea* en etapa 28 (10X). A) Testículo de un embrión incubado a 26° C tratado con etanol 70% en la etapa 23 del desarrollo, donde se muestra la región medular con cordones sexuales continuos (CS). B)Gónada de un embrión incubado a 26°C tratado con estradiol (12 µg), muestra una corteza engrosada y la región medular reducida. C)Gónada de un embrión incubado a TM tratado con fadrozole (200 µg) donde se muestran los cordones sexuales (CS). D) Testículo de un embrión incubado a 26° C tratado con fulvestrant (50 µg), se muestran los cordones sexuales continuos (CS). E)Ovario de un embrión con etanol 70% donde se muestra la región medular y la región cortical. F)Gónada de un embrión tratado con estradiol (12 µg), muestra una corteza engrosada y la región medular reducida. G)Ovario de un embrión tratado con fadrozole (200 µg) que muestra una corteza con abundantes pliegues y una región medular con cordones sexuales fragmentados. H)Ovario de un embrión incubado a TF tratado con 50 µg de fulvestrant, muestra las regiones cortical y medular. MES: Mesonefros.

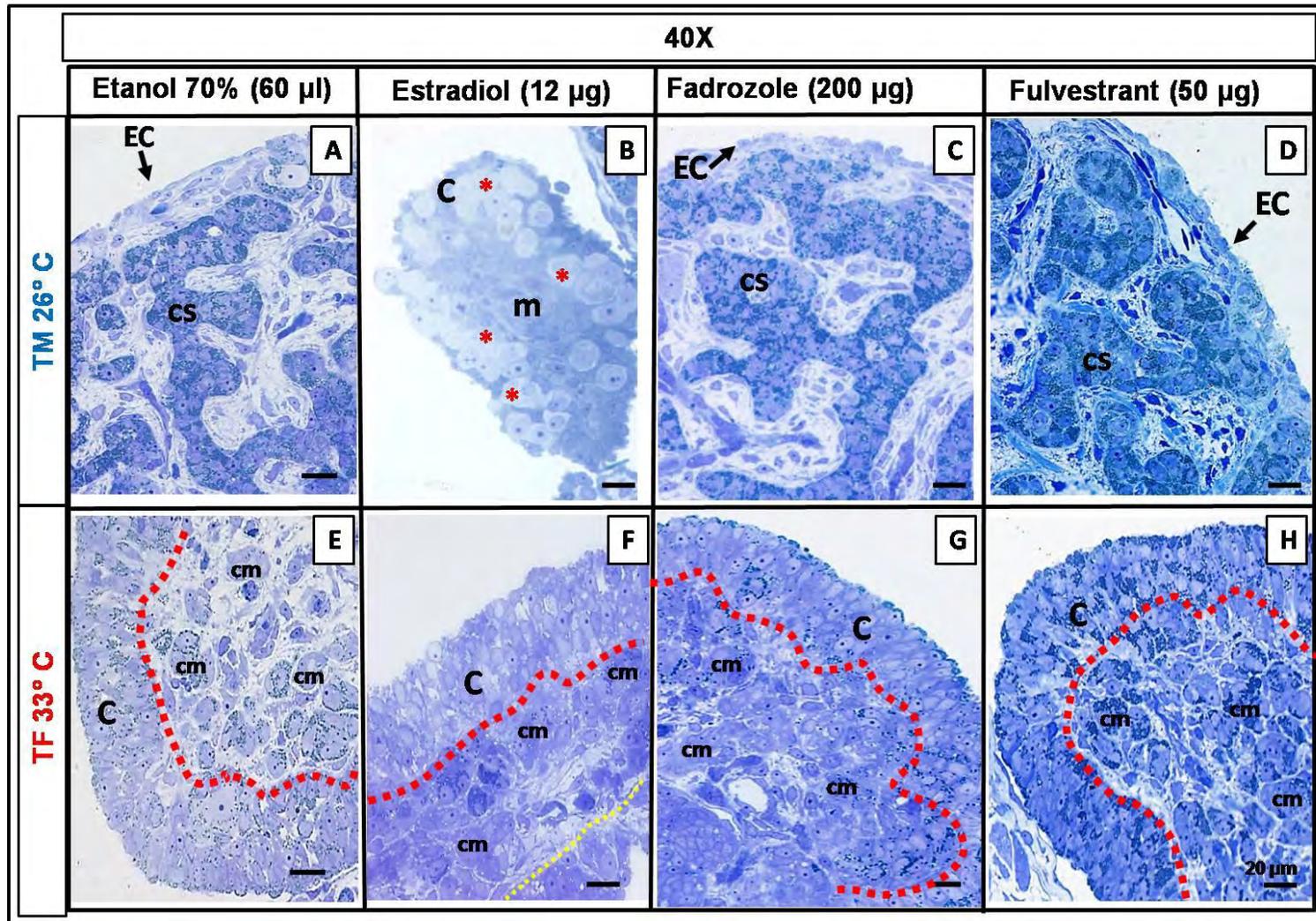


Figura 16. Fotomicrografía de alta resolución de cortes histológicos de las gónadas de embriones de *L. olivacea* en etapa 28(40X). A) Aumento de 17A, se observa el epitelio celómico (EC) y los cordones sexuales (CS). B) Gónada de un embrión tratado con estradiol (12 μ g), muestra una corteza engrosada (C) y la región medular reducida (m). C) Aumento de 17C, se observa epitelio celómico (EC) y cordones sexuales (CS). D) Aumento de 17D, se muestra el epitelio celómico (EC) y los cordones sexuales (CS). E) Aumento de 17E, se observa la corteza (C) y los cordones medulares (CM). F) Aumento de 17F, se observa la corteza (C) y la médula con cordones medulares (cm). G) Aumento de 17G, se observa la corteza (C) y la médula con cordones medulares (cm). H) Aumento de 17H, se muestra la corteza (C) y los cordones medulares (cm). La marca en rojo señala la regionalización de la gónada en corteza y médula.

La expresión de Sox9 disminuye en las gónadas de embriones tratados con 17 β -estradiol

La expresión del gen Sox9 fue analizada en las gónadas tanto de los embriones incubados a temperatura masculinizante (26° C), como a temperatura feminizante (33° C) en la etapa 28 del desarrollo (Figuras 17 y 18). Las gónadas fueron comparadas con la expresión del factor de transcripción presente en las gónadas incubadas a TM en el grupo control. Por lo cual se observó que las gónadas de los embriones incubados a TM en etapa 28, correspondientes a un testículo diferenciado, expresan positivamente el factor de transcripción Sox9 en los núcleos de las células de Sertoli, que se encuentran en los cordones sexuales, en la región medular, lo cual representa el mantenimiento de la diferenciación testicular (Figuras 17A, 18E). Mientras que las gónadas de los embriones incubados a TF en etapa 28, propias de un ovario diferenciado, no expresan dicho marcador (Figuras 17E, 18F).

Asimismo, las gónadas de los embriones incubados a TM tratados con 17 β - estradiol expresan un pequeño dominio de Sox9 en la región medular, así como la formación de estructuras lagunares que son propias del territorio medular en los ovarios diferenciados (Figura 17B).

El análisis histológico y los resultados de inmunofluorescencia nos revelan la presencia de células germinales en la región cortical, así como una reducción notable de la región medular, en las gónadas de los embriones tratados con estradiol a temperatura masculinizante (Figura 17B). Además es posible apreciar a partir de las inmunofluorescencias, que a pesar de que las gónadas sean de menor tamaño que en el grupo control, existe una clara expresión del gen Sox9 en la región medular a temperatura masculinizante (Figura 17B).

La médula remodelada de las gónadas de los embriones tratados con fadrozole y fulvestrant a temperatura feminizante, no expresa Sox9

A través de la inmunofluorescencia, se observa que las gónadas de los embriones incubados a TM tratados con fadrozole (Figura 17C) y fulvestrant (Figura 17D) expresan positivamente el factor de transcripción Sox9 en los cordones sexuales, en la región medular de la gónada, de la misma manera que se ve expresado en las gónadas de embriones incubados a TM en el grupo control (Figura 17A).

Por otro lado, las gónadas de embriones incubadas a TF, tratadas con los inhibidores de la aromatasa y el antagonista al receptor a estrógenos: fadrozole (Figuras 17F1, 18G) y fulvestrant (Figuras 17G, 18H), como se puede observar en el análisis histológico, en la región medular permanecen algunos remanentes de cordones sexuales, los cuales no expresan Sox9 en la inmunofluorescencia, sin embargo, se registró que cuatro de quince muestras analizadas con el tratamiento de fadrozole a TF expresaron positivamente Sox9 en la región medular (Figura 17F2). Además se observa que estos tratamientos no intervienen de manera negativa en el desarrollo de una corteza, la cual se muestra positiva a citoqueratina.

Los tratamientos con los inhibidores de la aromatasa modifican la morfología de las células que componen los remanentes de los cordones sexuales

A través de la inmunofluorescencia realizada para las muestras de gónadas de embriones incubados a TF y que fueron sometidas bajo los tratamientos de fadrozole y fulvestrant, se puede observar que la región medular presenta un abundante tejido estromático y que los cordones sexuales que fueron remodelados en el momento de la diferenciación, los cuales no mantienen una continuidad con el epitelio, presentan células cúbicas y de un mayor tamaño a las del grupo control a TF, las cuales presentan cordones sexuales con células que tienen una morfología aplanada.

En la figura 18 se logra apreciar un aumento de la región medular donde se observa la histología de la región medular en las gónadas de embriones incubados a TM y los incubados a TF bajo los tratamientos de etanol, fadrozole y fulvestrant, donde se observan

la continuidad de los cordones medulares en las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante y los remanentes de cordones medulares en los tratamientos sometidos a temperatura feminizante. En la inmunofluorescencia para citoqueratina y la tinción de los núcleos con TOTO-3 se observan los cordones medulares, los cuales permanecen continuos y mantienen una continuidad con el epitelio en las gónadas de embriones incubados a TM (Figuras 18A, 18E), mientras que a temperatura feminizante se observan los cordones medulares fragmentados (Figuras 18B, 18F).

Estos resultados nos ayudan a inferir que el papel de los estrógenos en la diferenciación ovárica consiste en la remodelación de los cordones sexuales en la región medular, interviniendo en la conformación de la morfología celular de dichos cordones y por consiguiente, del espacio que ocupan dentro de la médula.

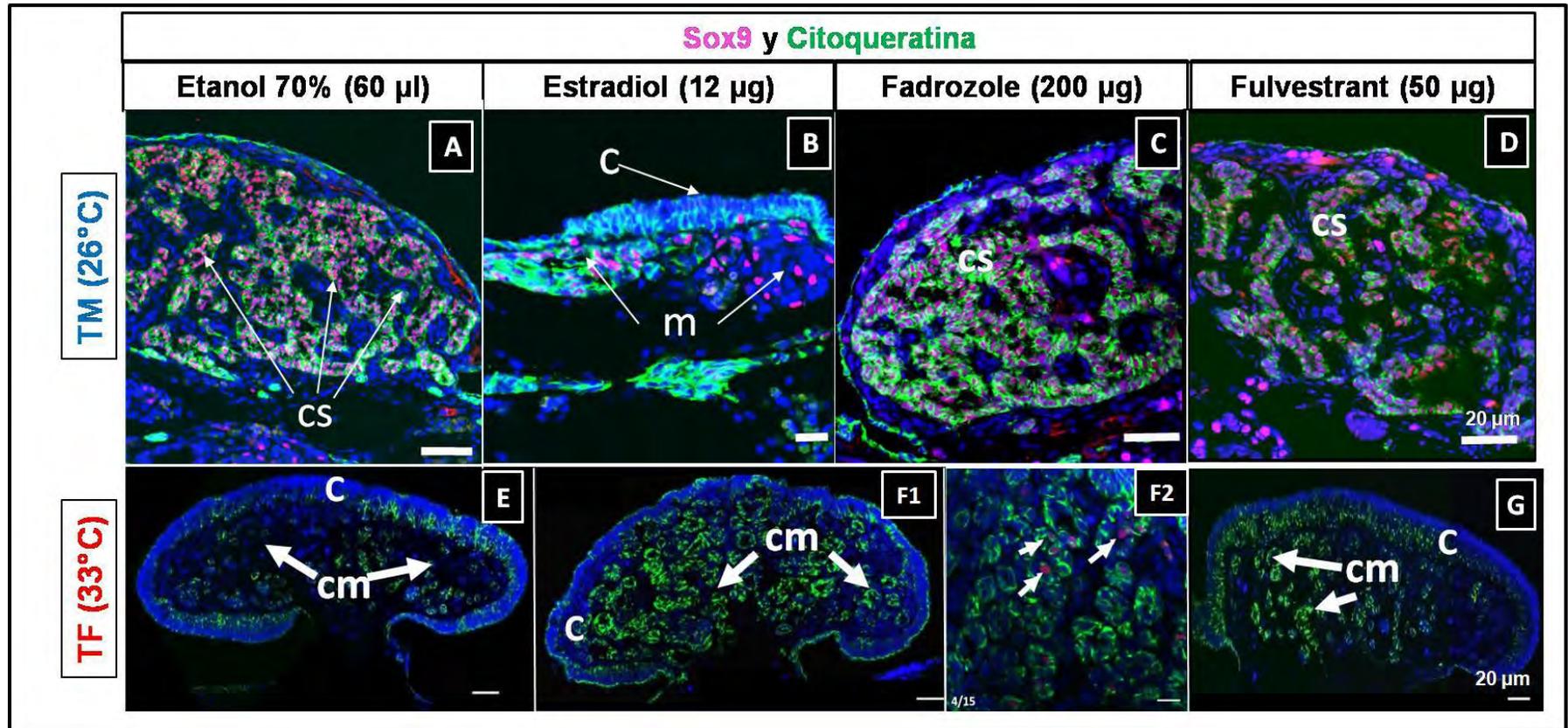


Figura 17. Inmunofluorescencia para Sox9, citoqueratina y tinción de núcleos con TOTO-3 en gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 28. A) Grupo control a TM. B) Tratamiento con estradiol a TM. C) Tratamiento con fadrozole a TM. D) Tratamiento con fulvestrant a TM. E) Grupo control a TF. F1) Tratamiento con fadrozole a TF. F2) Tratamiento con fadrozole a TF. G) Tratamiento con fulvestrant a TF. Barra de escala: 20µm.

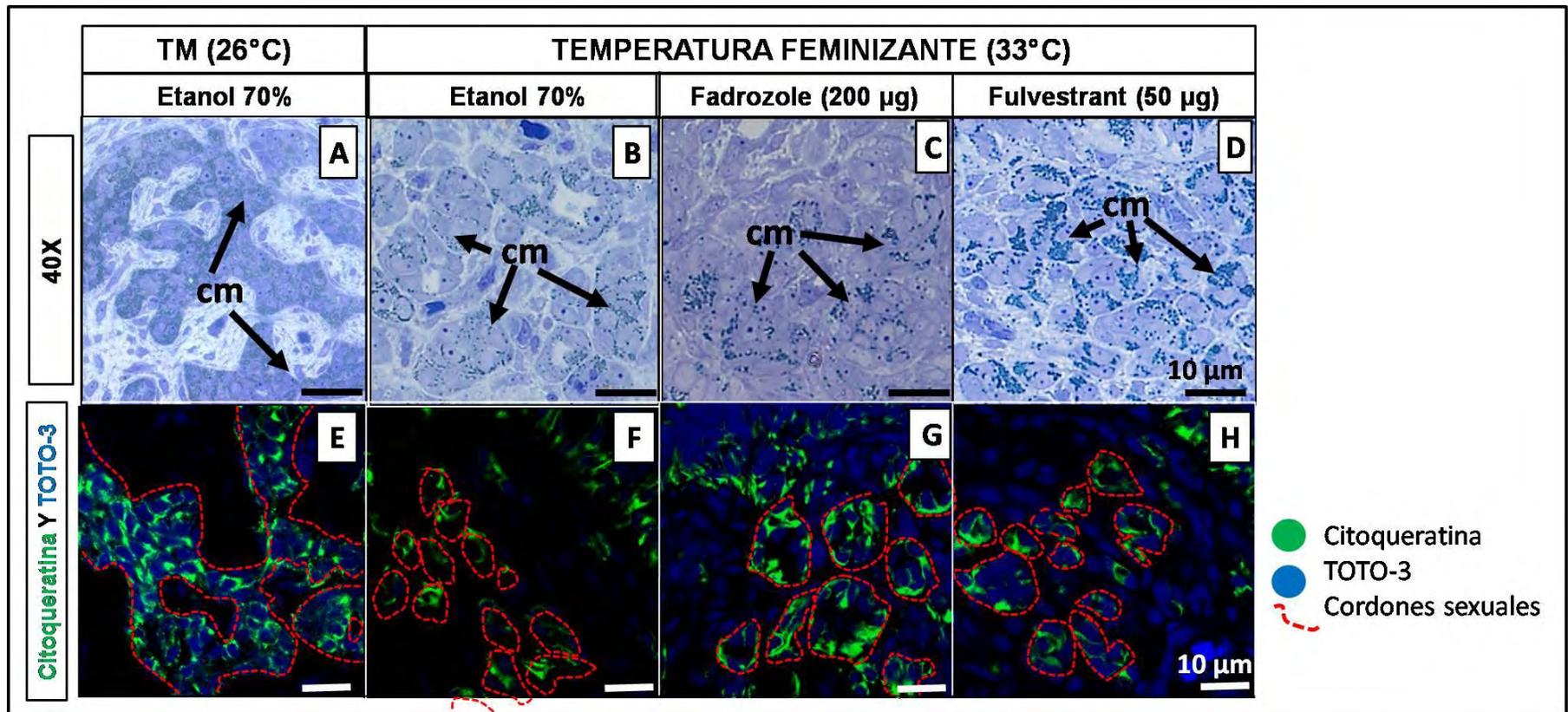


Figura 18. Cortes semifinos a 40X donde se muestra la región medular de los grupos controles a ambas temperaturas de incubación A) TM y B) TF, y los tratamientos con fadrozole y fulvestrant a TF C) fadrozole y D) fulvestrant, se hace referencia a la continuidad de los cordones medulares (cm). Por otro lado se muestra la inmunofluorescencia para citoqueratina y tinción con núcleos con TOTO-3 en gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea*, donde se muestra un aumento a la región medular para los grupos controles a TM y TF y para cada tratamiento a TF. En las líneas continuas marcadas en rojo se observan los cordones sexuales que no fueron disgregados al momento de la diferenciación gonadal en los tratamientos a TF y la continuidad de los cordones sexuales a TM.

Discusión

En especies con determinación sexual por temperatura (DST) como *Lepidochelys olivacea*, se han descrito las gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante, y se ha determinado que éstas se desarrollan como un testículo conformado por un epitelio superficial que contiene una sola capa de células planas y una región medular formada por cordones sexuales continuos. Mientras que a temperatura feminizante se presenta un ovario diferenciado conformado por una corteza pseudoestratificada, en la región medular se observan cordones sexuales fragmentados y un estroma compuesto por algunos vasos sanguíneos y células mesenquimatosas (Merchant, 1975).

Con el fin de determinar el papel de los estrógenos en la diferenciación sexual gonadal de especies con DST, se han llevado a cabo experimentos con la aplicación tanto de estrógenos exógenos como de inhibidores de la aromatasa, durante el periodo bipotencial.

Diversos reportes proponen que los tratamientos con estradiol o con inhibidores de la aromatasa, anulan el efecto de la temperatura de incubación e inducen una “reversión sexual” en especies con DST (Dorizzi et al., 1994; Crews y Bergeron, 1994, Wibbels y Crews, 1994). Por lo anterior, se ha considerado que los niveles de estrógenos durante el periodo sensible a la temperatura (TSP), juegan un papel central en la determinación y/o la diferenciación sexual gonadal.

Sin embargo, estudios recientes con *Trachemys scripta*, realizados por Barske-Capel (2010) y Bieser-Wibbels (2014), donde utilizaron letrozole (un inhibidor de la aromatasa) (10µg y 20µg, respectivamente) y fulvestrant (55.6 µg) a temperatura feminizante, suponen que la inhibición de la acción y síntesis de los estrógenos no inducen la reversión sexual completa de hembras a machos, obteniendo fenotipos gonadales que van desde ovarios, testículos y ovotestis. Estos autores otorgan un papel importante a las bajas dosis utilizadas,

concluyendo que el tratamiento con letrozole reduce los niveles de estrógenos pero no de forma suficiente para inhibir la respuesta de la temperatura feminizante.

En embriones de *Emys orbicularis* incubados a temperatura feminizante, tratados con 2 o 10 μg de letrozole en aplicaciones sucesivas (Richard-Mercier et al., 1995), o con una única dosis de 50 μg de fadrozole (Dorizzi et al., 1994), se indujeron varios grados de “reversión sexual”. Esto sugiere que el grado de reversión sexual es dependiente de la etapa de tratamiento (Belaid et al., 2001).

Por su parte, el tratamiento con 100 μg de fadrozole en los embriones de *Chelydra serpentina* incubados a TF, incrementó el porcentaje del desarrollo de machos (Rhen y Lang, 1994).

Sin embargo, la temperatura anula el efecto del estradiol exógeno o los inhibidores de la aromatasas fallan en imitar la trayectoria del desarrollo de la diferenciación sexual gonadal inducida por la temperatura masculinizante o feminizante. En consecuencia, los tratamientos con exógenos parecen alterar el patrón de las gónadas en desarrollo, en lugar de imitar el efecto de la temperatura de incubación en el sexo gonadal (Díaz-Hernández et al., 2015; Murdock y Wibbels, 2006; Ramsey y Crews 2007, 2009).

En el presente trabajo, los resultados demuestran que las gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a temperatura feminizante tratados con 200 μg de fadrozole y 55.6 μg de fulvestrant, no inducen reversión sexual gonadal completa de hembras a machos, ya que se observan gónadas con una región cortical propia de un ovario y la permanencia de cordones sexuales en la región medular. Nuestros análisis histológicos y las inmunofluorescencias nos llevan a inferir que la diferenciación ovárica no está completamente determinada por la síntesis y acción de los estrógenos, pudiendo existir otro mecanismo adicionalmente involucrado en la feminización. La diferenciación del fenotipo característico del ovario se observó sin importar la dosis que fue aplicada, lo que es relevante ya que en trabajos anteriores se ha considerado que el problema es que las dosis aplicadas de estrógenos no habían sido suficientes para llevar a cabo la feminización. Para aclarar será necesario conocer los niveles de estrógenos que están

presentes en las gónadas antes de la aplicación de los estrógenos y cuál es la concentración que está presente al final de la aplicación, para verificar hay cambios y sus efectos sobre el fenotipo resultante. En este aspecto también sería relevante considerar que el porcentaje de absorción máxima de los inhibidores no permite que ocurran más cambios morfológicos en la gónada.

Asimismo, resultan interesantes los fenotipos encontrados por los distintos grupos de trabajo que han sido reportados anteriormente, ya que los autores caracterizaron ovotestis y ovarios completamente diferenciados. En estos estudios, las herramientas metodológicas se conformaron por inclusiones en parafina y tinciones con hematoxilina-eosina y las muestras fueron revisadas bajo microscopía óptica. En el presente trabajo todos los fenotipos fueron identificados como ovarios, con una caracterización a través de inclusiones en resina epóxica y microscopía de luz a distintos aumentos, lo cual nos ofrece una mayor claridad de los componentes celulares de la gónada a distintos niveles, así como poder realizar una regionalización gonadal.

Resulta aparente que las herramientas metodológicas de cada grupo de investigación, han sido determinantes de sus interpretaciones y caracterizaciones histológicas en los distintos estudios donde se aplicaron los inhibidores. Además, los límites en la resolución de la microscopía y el procesamiento de las muestras definen el nivel de la caracterización de las gónadas.

En el análisis de la región medular se identificó que en el estudio de Barske y Capel (2010) con *Trachemys scripta* en donde se aplicó letrozole, se reportó la presencia de cordones testiculares. Por otro lado, en el estudio de Belaid et al., (2001) con *Emys orbicularis* se reportan ovotestis con distintas características en la región medular de acuerdo a la etapa de la aplicación del tratamiento: en la etapa 23 se presentan los cordones medulares y lagunas, donde la médula está infiltrada por tejido linfóide perteneciente a la corteza, mientras que la etapa 25 del desarrollo, en los ovotestis caracterizados no se encontraron cordones testiculares, mientras que los cordones testiculares diferenciados formarán cordones epiteliales delgados, que en adelante formarán túbulos seminíferos fértiles con

ovocitos inmaduros, obteniendo así machos maduros, proponiendo que el tratamiento con letrozole no es efectivo para la reversión sexual gonadal de hembras a machos.

En el presente estudio, se utilizó citoqueratina como marcador de las células epiteliales en los dos compartimentos gonadales: los cordones medulares y el epitelio superficial. Asimismo, la expresión de Sox9 en los cordones medulares fue comparada entre las gónadas del grupo control y las gónadas de embriones tratados con los inhibidores de la aromatasa. Las gónadas de embriones incubados a TF que fueron tratados con fadrozole o fulvestrant, reportaron cuatro de quince muestras que mantuvieron algunas células epiteliales positivas a Sox9 en la etapa 28 del desarrollo.

Aunque la inhibición de la aromatasa en la tortuga golfinia retrasó el proceso de la fragmentación de los cordones medulares, la regulación de Sox9 en la mayoría de las gónadas tratadas fue mantenida como en el grupo control. Esto contrasta con la expresión prolongada del factor de transcripción encontrado en los cordones medulares de *T. scripta* tratados con aromatasa (Barske y Capel, 2010).

En cuanto a la región cortical se desarrolló de manera normal en todos los grupos lo cual sugiere que, a una temperatura feminizante, los niveles más altos de estrógenos parecen estar involucrados en la regulación de la formación de lagunas, y no resultan ser necesarios para el engrosamiento de la región cortical. En los estudios realizados en la tortuga de agua dulce *Trachemys scripta* (Barske y Capel, 2010) se reporta que una dosis de 10 µg de letrozole no es suficiente para inhibir el engrosamiento de la corteza. Además, Bieser y Wibbels (2014) demostraron que aún con la aplicación de una doble dosis de letrozole no fue posible prevenir la expansión cortical.

Asimismo, los resultados que presentamos en este trabajo de investigación, dejan en claro que tanto la temperatura de incubación, como las hormonas esteroideas y los genes interactúan para llevar a cabo la determinación y diferenciación sexual gonadal en las especies con DST. Respecto a las hormonas esteroideas, nuestros datos demuestran que el estradiol exógeno tiene un efecto sobre la remodelación de los cordones medulares del ovario de embriones de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Conclusiones

- El tratamiento con etanol no induce cambios en la diferenciación sexual gonadal de *L. olivacea*.
- El tratamiento con 17β - estradiol lleva al desarrollo hipoplásico gonadal, independientemente de la temperatura de incubación.
- Los tratamientos con fadrozole y fulvestrant a temperatura feminizante inhiben la remodelación medular del ovario a través de la fragmentación de los cordones medulares.
- La expresión de Sox9 disminuye en las gónadas de embriones tratados con 17β -estradiol a temperatura masculinizante y no es expresada en las gónadas de los embriones tratados con fadrozole y fulvestrant a temperatura feminizante.
- Los tratamientos con los inhibidores de la aromatasa alteran la morfología de las células que componen los remanentes de cordones sexuales.
- La diferenciación sexual de los cordones medulares requiere de diferentes mecanismos regulados por la temperatura, como la regulación de la proliferación celular por estrógenos endógenos.
- El patrón de desarrollo en la corteza es similar en las gónadas del grupo control a TF y las gónadas tratadas en ambas temperaturas de incubación, por lo que los estrógenos no están involucrados en el desarrollo de la misma.

Glosario

Acetilación: Reacción en la que se introduce un grupo acetilo en un compuesto químico.

Ácido aminogamma butírico: Es el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral. Deriva del ácido glutámico.

Andrógenos: Hormonas sexuales masculinas que corresponden a la testosterona, androsterona y androstenediona. Hormonas esteroideas derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno, cuya función principal es estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos.

Antagonista: Es un tipo de ligando de receptor o fármaco que bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas en lugar de provocar una respuesta biológica.

Anticuerpo: Proteína que interactúa en un sitio específico (epítipo) sobre un antígeno y que facilita la eliminación de éste a través de diversos mecanismos.

Antígeno: Cualquier sustancia que induce la producción de un anticuerpo al que se une de forma específica.

Apoptosis: Es el proceso de muerte celular programado por la misma célula. Este programa requiere de la activación de un programa molecular. Es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas, en el mantenimiento de la homeostasis, del número de células y en la defensa frente a patógenos.

Aromatasa: Enzima que cataliza reacciones de oxidación de esteroides, en el ovario es la responsable de la conversión de andrógenos procedentes de la teca en estrógenos (sobre todo en 17 β - estradiol), en la biosíntesis de los estrógenos.

Aromatización: Es el proceso químico mediante el cual una molécula orgánica (o una parte de ella) es convertida en un anillo bencénico (también llamado anillo aromático).

Autócrino: Se refiere a un tipo de secreción química que afecta a la misma célula que secretó la sustancia, como una hormona por ejemplo.

Cambio conformacional: Es la habilidad de una proteína enzimática de alterar su forma para poder captar sustratos y favorecer reacciones químicas.

Cardioprotectores: fármacos o sustancias que ayudan a la prevención del daño vascular coronario y los miocitos cardiacos, lo cual se obtiene por mecanismos internos del organismo. Involucra la vasodilatación, inhibición de la generación de radicales libres del oxígeno, aumento de los niveles de ATP tisular y reducción del daño microvascular.

Cariotipo: Conjunto de cromosomas ordenado que define a una especie; es decir, son los tipos, variedades, formas, dimensiones y número de cromosomas que constituyen el patrimonio genético de una especie. El número y tipos de cromosomas son constantes y característicos de una especie.

Células de Leydig: Células distintivas de los testículos, su forma es redonda o poligonal con un núcleo central, citoplasma rico en lípidos, su función principal es la producción de andrógenos.

Células de Sertoli: Células ubicadas en los túbulos seminíferos de los testículos, proporcionan soporte estructural y metabólico a las células durante la espermatogénesis.

Células germinales: Son las células precursoras de los espermatozoides y ovocitos.

Células mesenquimáticas: Células que poseen prolongaciones citoplasmáticas que se unen entre sí, dan origen a las células de tejido conectivo fibroso, células musculares lisas, células adiposas y células sanguíneas.

Células somáticas: Células que conforman el crecimiento de los tejidos y órganos de un ser vivo pluricelular y que no tienen la capacidad de transmitir la información genética a la siguiente generación.

Choque térmico: Se refiere al colapso que ocurre al sufrir un cambio drástico de temperatura. Sucede cuando algún material se quiebra al someterse a un aumento o descenso de la temperatura.

Cinasa: También conocidas como quinasas, son un tipo de enzima que modifica otras moléculas (sustratos), mediante fosforilación. Necesitan un ión metálico divalente para transferir el grupo fosfato. Ocupan un lugar central en los mecanismos de señalización celular, la cascada de respuesta ante una señal química que llegue a la célula y las respuestas celulares al estímulo.

Citoqueratina: Proteína que forma parte del grupo de los filamentos intermedios del citoesqueleto, de las células epiteliales. Su función es la organización de la estructura tridimensional de la célula.

Colágeno: Proteína que conforma a la matriz extracelular del tejido conjuntivo, óseo y cartilaginoso, en mamíferos y aves constituye una proporción muy importante de las proteínas totales.

Colesterol: Esterol presente en el plasma sanguíneo unido a proteínas y esterificado con ácidos grasos. Componente esencial para el mantenimiento de la integridad estructural y la fluidez de la membrana celular así como precursor de las hormonas esteroides, los ácidos biliares y la vitamina D.

Complejo multiprotéico: Grupo de dos o más proteínas, su estructura es cuaternaria. Las proteínas en un complejo están enlazadas mediante enlaces no-covalentes (interacciones proteína-proteína). Diferentes complejos tienen diferentes grados de estabilidad dependiendo de su función. La formación de un complejo proteico, sirve para activar o inhibir la unión de otro componente, en un momento determinado una proteína puede interactuar con otra en cortos lapsos de tiempo (transducción de señales) o se pueden establecer interacciones fuertes y duraderas (caderinas, unión de células epiteliales).

Comunicación endócrina: Las moléculas señalizadores (hormonas) son secretadas por células endocrinas especializadas y se transportan por el sistema vascular sanguíneo o linfático, actuando sobre células diana localizadas en lugares alejados del organismo.

Conductos mesonéfricos: Conductos de Wolff que derivan directamente del mesonefros (riñón primitivo). En el sexo masculino, se diferencian en los conductos deferentes y las vesículas seminales.

Conductos paramesonéfricos: Conductos de Müller, se forman a partir de una invaginación longitudinal del epitelio celómico. En el sexo femenino se diferenciarán en las tubas uterinas, el útero y la parte superior de la vagina.

Cordones ovígeros: Cordones sexuales ubicados en la corteza ovárica conformados por células pre granulosa y ovogonias, limitados por una membrana basal, rodeados por mesénquima.

Cordones seminíferos: Los cordones sexuales primarios forman los cordones seminíferos y éstos a su vez los túbulos seminíferos, túbulos rectos y la rete testis del testículo.

Correguladores: Los correguladores de la transcripción son proteínas que interaccionan con factores de transcripción para activar o reprimir la transcripción de genes específicos. Los que activan la transcripción de un gen son coactivadores y los que la reprimen son correpresores.

Corteza adrenal: Es la corteza de la glándula adrenal que secreta hormonas vitales para el cuerpo, esta está dividida en tres zonas, las células de la zona más externa o zona glomerular, secretan mineralocorticoides, la zona intermedia o fascicular es la principal productora de glucocorticoides, mientras que la zona interna o zona reticular produce glucocorticoides y andrógenos.

Cortisol: Forma parte de los esteroides, hormonas derivadas del colesterol. Se produce en la corteza de la glándula suprarrenal (parte cortico suprarrenal). Participa en la distribución de las grasas buenas y en la regulación del sistema inmunitario.

Cresta gonadal: Territorio del cuerpo del embrión donde se desarrollan las gónadas. Se trata de un relieve situado en la cara medial del mesonefros. Este territorio va a ser

colonizado por las células germinales primordiales precursoras de los futuros gametos masculinos o femeninos.

Cresta urogenital: Órgano ovoide voluminoso originado a partir del mesonefros, situado en el lado interno de éste y es la gónada en desarrollo.

Cromatina: Está formada por el ADN con la información genética y las proteínas que lo empaquetan que se encuentran dentro del núcleo. Es una estructura dinámica que adapta su estado de compactación y empaquetamiento para optimizar los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN.

Cromosoma sexual: Cromosoma responsable de la determinación del sexo de la descendencia, transporta genes que transmiten los caracteres y enfermedades ligados al sexo.

Cuerpo lúteo: Es la transformación del folículo maduro una vez que ha expulsado el ovocito y tiene un papel en la secreción hormonal de progesterona. Si el óvulo es fecundado sigue produciendo progesterona durante los primeros meses del embarazo, lo que permite a la mucosa uterina desarrollarse para acoger la nidación y permitirá el crecimiento del huevo.

Desarrollo: Construcción progresiva y dinámica de la actividad bioquímica y fisiológica de un organismo a través del tiempo.

Desarrollo embrionario: Periodo desde la fecundación hasta el nacimiento del nuevo ser, aunque no exista fecundación, como sucede en el caso de partenogénesis. Consta de las fases de fecundación, segmentación, gastrulación y organogénesis.

Deshidratación: Proceso que se da cuando un organismo pierde una excesiva cantidad de sus fluidos naturales a partir de factores externos e internos.

Determinación: Acción y efecto de determinar, especificar, fijar los términos de algo.

Determinación sexual: Mecanismo que involucra el conjunto de eventos moleculares que especifican el destino sexual de un organismo.

Diferenciación: Es el proceso por el cual las células de un linaje celular (el linaje celular se determina en el momento de la formación del embrión) sufren modificaciones en su expresión génica, para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de tipos celulares del organismo.

Diferenciación sexual: Proceso que implica la expresión de genes que conducen hacia la diferenciación morfológica y funcional de un organismo.

Diferenciación gonadal: Proceso por el cual las células germinales migran por el mesenterio hacia el pliegue gonadal, sufriendo sucesivas mitosis y un incremento en su número, reconociendo en los pliegues gonadales una región cortical y una medular, dando un destino final a la gónada.

Dimerización: Reacción química en la que dos moléculas de subunidades idénticas (monómeros) forman una estructura química única, denominada dímero.

Dimetilación: Adición de un grupo metilo a una molécula. Es fundamental en la regulación del silenciamiento de los genes y puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin que se produzca una alteración en la secuencia del ADN, siendo uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica.

Dimorfismo sexual: Conjunto de diferencias morfológicas y fisiológicas que caracterizan y diferencian a los dos sexos de una misma especie, en mayor o menor grado; es la diferencia física entre machos y hembras.

Elementos de respuesta hormonal: Elemento de respuesta específico de hormonas, que consiste en una secuencia de ADN dispuesta en el promotor de un gen, a la cual puede unirse de forma específica un receptor de hormonas y así regular la transcripción.

Endocrino: Mecanismo de señalización por el cual células secretoras especializadas liberan una hormona hacia la sangre, alcanzan células diana que se encuentran a distancia y producen una respuesta en éstas.

Enzima: Proteínas complejas que producen un cambio químico específico. Por ejemplo, pueden ayudar a descomponer los elementos que consumimos para que el cuerpo los pueda utilizar.

Epitelio: Constituye el tejido fundamental de los animales. Recubren superficies corporales, tanto internas como externas. Los derivados epiteliales son las principales células secretoras del organismo y en algunos casos, como el hígado, forman el propio parénquima de los órganos. Tienen diferentes funciones como protección frente a la desecación o la abrasión, filtración, absorción selectiva, transporte de sustancias por su superficie, y pueden poseer células que actúan como órganos sensoriales y de secreción.

Epitelio celómico: Conjunto de células epiteliales que se encuentran recubriendo la cavidad del celoma.

Especificidad: Cualidad y condición de específico. Sirve para expresar la adecuación de algo al fin al que se destina.

Espermatozoide: Célula reproductora masculina de los animales, destinada a la fecundación del óvulo, compuesta de una cabeza que contiene el material cromosómico y de una cola o flagelo que actúa como propulsor.

Esteroides: Lípidos secretadas por glándulas endócrinas (glándulas que liberan hormonas) presentes tanto en el humano como en los animales y los vegetales. Incluyen el colesterol, las hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos), los glucocorticoides (cortisona y cortisol), la aldosterona (hormona secretada por glándulas suprarrenales), que desempeña un papel importante en la función del riñón.

Esteroides sexuales: Hormonas esteroides que interactúan con los receptores androgénicos o estrogénicos de vertebrados. Sus efectos están mediados por mecanismos

genómicos lentos a través de receptores nucleares como también por mecanismos no-genómicos a través de receptores de membranas y cascadas de señales.

Esteroidogénesis: Incluye la formación de más de 40 esteroides derivados del ciclo pentano-perhidrofenantreno, pero los que tienen mayor importancia fisiológica son sólo unos pocos. En estas transformaciones actúa el citocromo P450, la reacción inicial (colesterol a pregnenolona) se realiza en la mitocondria gracias a la acción de una enzima de la membrana interna (CYP11A1).

Estradiol: Hormona esteroide del grupo de los estrógenos encargada del desarrollo y mantenimiento de las características sexuales femeninas.

Estrógenos: Principal hormona sexual en las mujeres, esencial para la reproducción y menstruación.

Estroma: Tejido conectivo de las glándulas.

Estrógenos endógenos: Hormonas sexuales femeninas que son producidas dentro del organismo, son inherentes a él.

Estrógenos exógenos: Hormonas sexuales que se forman en el exterior de un individuo, o en virtud de causas externas.

Expresión de genes: Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

Factor de transcripción: Proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Interaccionan con regiones específicas del ADN, con elementos de la maquinaria de transcripción como la ARN polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. Conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales.

Fecundación: Fase de la reproducción sexual en la cual el elemento reproductor masculino se une con el femenino para iniciar el desarrollo de un nuevo ser.

Fenotipo: La clase de la que se es miembro de acuerdo a las cualidades físicas observables en un organismo, incluyendo su morfología, fisiología y conducta a todos los niveles de descripción.

Fibroblastos: Célula más común y menos especializada del tejido conjuntivo. Se encarga de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular y presenta gran capacidad para diferenciarse dando lugar a otros tipos celulares más especializados del tejido conjuntivo.

Fibronectina: Glicoproteína adhesiva presente en forma soluble en plasma e insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. Interacciona con diversos componentes de la coagulación y fibrinólisis.

Folículo: Estructura anatómica de disposición glandular, secretora o excretora y en forma de saco pequeño, depresión o cavidad, especialmente la situada en la piel o en las mucosas.

Foliculogénesis: Maduración del folículo ovárico, una capa densa de células somáticas que contiene un ovocito inmaduro. Describe la progresión de una serie de pequeños folículos primordiales en grandes folículos preovulatorios que entran en el ciclo menstrual.

Fosforilación: Transferencia de un grupo fosfato desde ATP a un sustrato específico o diana. Adición de un grupo fosfato o no fosfato molecular criogenizado inorgánico a cualquier otra molécula.

Gametos: Células sexuales haploides porque contienen un solo juego de cromosomas, o en su defecto, la mitad del número normal de cromosomas en las células diploides (dos series de cromosomas) las cuales, se generan por meiosis a partir de las células diploides.

Gen: Unidad física básica de la herencia que contiene la información necesaria para precisar los rasgos de la descendencia. Están dispuestos uno tras otro en estructuras llamadas cromosomas.

Genotipo: Contenido genético de un organismo. La clase de la que se es miembro según el estado de los factores hereditarios internos de un organismo, sus genes y por extensión de su genoma.

Glándula: Órgano del cuerpo que tiene la función de sintetizar sustancias para secretarlas. Su liberación se puede dar en el torrente sanguíneo, como las hormonas, o en el interior de una cavidad corporal, o en la superficie exterior.

Glicoproteínas: Son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono, simples o compuestos. Una de sus funciones es el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas.

Glomérulos: Red de capilares finos en forma de ovillo, rodeados por la cápsula de Bowman que forma parte de la nefrona (unidad funcional del riñón).

Glucocorticoides: Hormonas esteroideas y cortico esteroideas. Son la cortisona y el cortisol que se producen de forma natural por el cuerpo humano pero en pequeñas cantidades: las hormonas se secretan para paliar la insuficiencia suprarrenal.

Gónada: Órgano sexual masculino (testículo) o femenino (ovario) que produce las células reproductoras, espermatozoides y óvulos respectivamente.

Gónada bipotencial: Condición bajo la cual las estructuras genitales se encuentran por una etapa morfológicamente indiferenciada y facultada para desarrollarse hacia testículo u ovario, en el periodo denominado indiferente.

Gonadotropinas: Hormonas que actúan o estimulan las gónadas.

Hidroxilación: Adición de un grupo hidroxilo en la cadena carboxilo terminal de los átomos.

Hipotálamo: Glándula hormonal situado en el centro del cerebro, que controla y regula cada glándula y a la vez, cada una de las funciones del organismo. Su función principal es

la homeostasis, que es el proceso de devolver alguna cosa a la neutralidad, a su punto de partida.

Homólogo: Caracteres que tienen semejanza en el origen y en las relaciones con otros caracteres, aunque puede ser que se diferencie en su aspecto y función.

Hormona: Cualquier sustancia que se sintetiza y secreta por células especializadas y que induce una respuesta específica en células diana.

Hormona Antimülleriana: Glicoproteína dimérica que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller en los embriones masculinos, es producida por las células de Sertoli inmaduras y células de la granulosa postnatales.

Hormonas esteroideas: Sustancias endocrinas generadas por la corteza adrenal, los ovarios y la placenta, sintetizadas usualmente a partir del colesterol.

Hormonas liposolubles: Hormonas que difunden desde la sangre al líquido intersticial, y de la capa lipídica de la membrana al interior de las células blanco para unirse a los receptores localizados en el citosol (esteroideas), o en el núcleo (tiroideas).

Incubación: Periodo de tiempo dependiente de la temperatura en el que los huevos fecundados se desarrollan hasta el momento de la eclosión.

Inducción: Acción de causar o producir el inicio de algo, hacer que una cosa ocurra como reacción o respuesta a otro acto.

Inhibidor: Moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad.

Kispeptinas: Familia de péptidos cuya expresión es alta en regiones cerebrales y regula la secreción de GnRH, son un eslabón fundamental del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, al activar la secreción de GnRH para mantener la función reproductiva del adulto.

Lámina basal: Capa fina de matriz extracelular que separa el tejido epitelial y muchos tipos de células, como las fibras musculares o las células adiposas del tejido conjuntivo. Se encuentra constituida por proteínas fibrosas (elastina, colágeno, fibronectina),

proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Es de vital importancia en la señalización celular, la interacción que establece a través de la laminina con las integrinas.

Ligando: Molécula capaz de ser reconocida por otra provocando una respuesta biológica. Se pueden encontrar ligandos como las hormonas implicados en la señalización intercelular, o ligandos que actúan como reguladores de la actividad enzimática uniéndose a las enzimas que modulan.

Señal de localización nuclear: Es una secuencia de aminoácidos que etiquetan una proteína para la importación en el núcleo de la célula por el transporte nuclear.

Meiosis: Es el mecanismo de reducción celular a la mitad del número de cromosomas de una célula diploide para dar lugar a gametos haploides.

Mesenterio: Bicapa de peritoneo que conecta a las vísceras con la pared del cuerpo o entre sí. Proporciona las vías para los nervios, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos además de contribuir a sostener los órganos en el abdomen.

Mesodermo: Capa de células intermedia del embrión que dará origen a: 1) el sistema cardiovascular: corazón, arterias y venas, 2) la sangre, 3) el sistema músculo-esquelético: músculos, cartílagos, huesos y articulaciones, 4) el sistema urinario: riñones y vías excretoras, 5) el sistema reproductor y 6) la parte interna de la piel: la dermis.

Mesonefros: Uno de los sistemas renales que se forman durante el desarrollo embrionario, deriva del mesodermo intermedio de los segmentos torácicos y lumbares superiores.

Metabolismo: Conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo.

Metabolismo energético: Reacciones bioquímicas que liberan energía o que utilizan la energía liberada para recomponer enlaces químicos y construir componentes de las células, como las proteínas y los ácidos nucleicos.

Metabolismo óseo: Reacciones bioquímicas llevadas a cabo principalmente por dos tipos de células: osteoblastos y osteoclastos regulando los niveles de las hormonas de dichas reacciones, como ingesta de calcio, vitaminas, y otros factores.

Mineralocorticoides: Hormonas secretadas por la zona glomerulosa de la glándula adrenal, cuya función es el aumento de minerales en el líquido extracelular.

Modulador selectivo: Compuesto que se une a los receptores estrogénicos de las células, simulando la actividad de los estrógenos en ciertos tejidos, mientras que inhiben su acción en otros.

Morfogénesis: Proceso por el cual se van desarrollando en un embrión los órganos diferenciados de un adulto a partir de estructuras indiferenciadas.

Neuroprotectores: Cualquier sustancia o molécula química o biológica con efectos protectores en el sistema nervioso que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de enfermedades como el Alzheimer o lesiones cerebrales.

Órganos blanco: Aquél en el cual se presenta el mayor daño, dependiendo del daño, puede haber uno o más órganos blanco.

Ovario: Órgano del aparato reproductor femenino productor de óvulos y secretor de estrógenos y progesterona.

Ovocito: Célula sexual femenina que se forma en el proceso de ovogénesis y que da lugar a los óvulos.

Oxidación: Proceso y resultado de oxidar a partir de una reacción química. Pérdida de electrones, ya que este proceso implica que uno de los elementos se desprenda de electrones y que otro los asimile.

Paracrina: Tipo de comunicación celular por secreción química que afecta a una célula vecina a la célula emisora.

Péptidos: Tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Perfil lipídico: También denominado lipidograma y perfil de riesgo coronario, es un grupo de pruebas o exámenes diagnósticos para determinar el estado del metabolismo de los lípidos corporales, comúnmente en suero sanguíneo.

Periodo indiferenciado: Tiempo en el cual no se pueden observar las diferencias de si el embrión será macho o hembra.

Periodo termosensible: Lapso de tiempo durante el desarrollo embrionario fuera del cual la manipulación de la temperatura ya no ejerce influencia sobre el fenotipo sexual.

Pituitaria: Glándula que está en la base del cráneo y se encarga de controlar la actividad de otras glándulas y de regular determinadas funciones del cuerpo, como el desarrollo o la actividad sexual.

Plasticidad: Propiedad de aquello que puede cambiar de forma y conservarla de modo permanente.

Pregnenolona: Hormona esteroide involucrada en la esteroidogénesis. Primer y principal metabolito del colesterol en la esteroidogénesis que puede dar lugar a la progesterona.

Primordio: Primera fase reconocible en el desarrollo embrionario y en la diferenciación de un determinado órgano, tejido o estructura. Esbozo de un órgano en el periodo inicial de organogénesis.

Primordio gonadal: En él se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual gonadal.

Progestágenos: Grupo de hormonas en el que se incluye a la progesterona, uno de las cinco clases principales de hormonas esteroides.

Proliferación celular: Incremento en el número de células por división celular, fundamental en la regeneración de tejidos y el correcto funcionamiento del organismo.

Proteínas coactivadoras: Proteínas que incrementan la expresión génica mediante su unión a un activador o un factor de transcripción que contiene un dominio de unión a ADN.

Proteínas chaperonas: Conjunto de proteínas presentes en todas las células, muchas de las cuales son proteínas de choque térmico, cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas en la síntesis de proteínas.

Receptor: Organización molecular compleja, localizada generalmente en la membrana celular cuya interacción específica con sustancias como neurotransmisores, hormonas, toxinas, medicamentos, etc. Inicia los correspondientes mecanismos de respuesta.

Rete-testis: Compleja organización de conductos interconectados, situados en la parte superior del testículo, recubiertos por un estroma fibroso que está en continuidad con la túnica albugínea, el cual es un sitio frecuente de cambios quísticos benignos.

Rete ovarii: Estructura formada a partir de los cordones sexuales primarios en las hembras.

Reversión sexual: Estado patológico poco frecuente, genéticamente heterogéneo, que se caracteriza por la presencia de desarrollo testicular en ausencia de cromosoma Y.

Seno urogenital: Estructura embrionaria donde se originan los genitales externos y la uretra. Cavidad elongada, formada por la división de la cloaca en el desarrollo embrionario precoz, a la que se abren los uréteres, los conductos mesonéfrico y paramesonéfrico y la vejiga.

Sinergia: Acción conjunta de varios órganos en la realización de una función. Incremento de la acción de diversas sustancias debido a que actúan conjuntamente.

Sistema urogenital: Conjunto de órganos del sistema urinario y el aparato reproductor.

Sox9: Gen que regula la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la diferenciación testicular así como en la regulación de la transcripción de la hormona antimülleriana (AMH).

SRY: Gen que desencadena la vía de expresión de genes involucrados en el proceso de determinación testicular en mamíferos. Relacionado con la diferenciación de las células de Sertoli y con la proliferación de las células en las crestas genitales.

Temperatura: Propiedad que mide la energía cinética de las moléculas de un cuerpo.

Temperatura de incubación: Temperatura a la que se encuentran los huevos fecundados durante su desarrollo embrionario hasta el momento de la eclosión.

Temperatura pivote: Temperatura de incubación a la cual la proporción sexual de una nidada es 1:1.

Testículo: Órgano del aparato reproductor masculino productor de espermatozoides y testosterona.

Testosterona: Hormona sexual masculina segregada especialmente en el testículo, pero también, y en menor cantidad, en el ovario y en la corteza suprarrenal, que tiene efectos morfológicos y metabólicos.

Transcripción: Segundo proceso de la expresión génica, mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del ADN hacia la secuencia de proteína utilizando diversos ARN como intermediarios.

Transducción: Proceso de la síntesis proteica, ocurre tanto en el citoplasma, donde se encuentran los ribosomas, como en el retículo endoplasmático rugoso (RER). Los ribosomas están formados por una subunidad pequeña y una grande que rodean al ARN.

Traslocación: Anomalía cromosómica debida al cambio de posición de un segmento cromosómico. El segmento traslocado puede situarse en el cromosoma (traslocación intracromosómica) o en otro cromosoma (traslocación intercromosómica).

Túnica albugínea: Envoltura fibrosa que se compone de aproximadamente un 5% de elastina, un tejido extensible que se compone sobre todo de los aminoácidos glicina, valina, alanina y prolina.

Uréter: Conducto por el que se transporta la orina desde el riñón hasta la vejiga; está ubicado en la región visceral abdomino-pélvica, compartiendo lugar con el páncreas, parte del hígado y la columna vertebral.

Referencias

- Adams I, McLaren A. 2002. Sexually Dimorphic Development of mouse primordial germ cells switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*. 129: 1155-1164.
- Aguilar RH. 1987. Influencia de la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo y la duración del periodo de incubación en la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*, Garman 1880). Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 58 p.
- Baroiller J, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *CMLS*. 55: 910-31.
- Bergeron J, Willingham E, Osborn C, Rhen T, Crews D. 1998. Developmental synergism of steroidal estrogens in sex determination. *Environ. Health Perspect.* 108, 93.
- Barske, L., Capel, B. 2010. Estrogen represses SOX9 during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*. *Developmental Biology* 341, 301-314.
- Beverdam, A.; Koopman, P. 2006. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of Sex Determination Reveals Novel Candidate Genes for Human Sexual Dysgenesis Syndromes. *Hum. Mol. Gen.* 13: 417-431.
- Berta, P.; Hawkins, J.; Sinclair, A. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*. 348: 448-50.
- Boon, W.; Chow, J.; Simpson, E. 2010. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Progress in Brain Research* 181, 209-232.
- Browder L., Erickson C., and Jeffery W. 1991. Organogenesis: gonad development and sex differentiation. *Developmental Biology*, pp. 661-683, Browder L., Erickson C., Jeffery W. (eds.), Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Bull, J. 1980. Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.*, 55:3-21.
- Bull, J. 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin, Cummings, Menlo Park, California.
- Bull, J. 2015. Reptile sex determination goes wild. *Nature*. Vol. 523: 43-44.
- Bull, J. y Vogt, R. 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 206: 1186-1188.
- Bull J. and Vogt, R. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *J. Exp. Zool.*, 218: 435-440.
- Bull, J.; Vogt, R. 1982. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution* 36,333-341.
- Bull, J., Hillis, D, O'Steen, S. 1988. Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex determining mechanism. *Science*, 242: 567-569.
- Ballejos, M.; Hoopman, P. 2001. Spatially Dynamic Expression of Sry in Mouse Genital Ridges. *Dev. Dyn.* 221: 201-205.

- Capel, B. 2006. Responding tips the balance in Sex Determination. *Nature Genetics*. 38: 1233-1234.
- Carlson, B. 2009. Getting ready for the pregnancy 3-25. In *Human Embryology and Developmental Biology*, 4^a Edition. Editorial Mosby Elsevier. Chapter 1.
- Carr, JL y Bickham, JW. 1981. The karyotype and chromosomal banding patterns of the Central American river turtle *Dermatemys mawwi*. *Herpetologica*, 37 (2), 92-95.
- Charnier, M. 1966. Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertien). *Société Biologie de L'ouest Africain*, 160: 620-622.
- Charnov, E.; Bull, J. 1977. When is sex environmentally determined? *Nature* 266: 828-887.
- Ciruelos, E., Pascual, T., Arroyo, M., Blanco, M., Manso, L., Parrilla, L., Muñoz, C., Vega, E., Calderón, M., Sancho, B., Cortes-Funes, H. 2013. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor- positive breast cancer. *The Breast* 23, 201-208.
- Clinton M, Haines L. 1999. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55, 876-886.
- Crews, D.; Wibbels, T.; Gutzque, W. 1989. Action of sex steroids hormones on temperature- induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76: 159-166.
- Crews, D.; Bull, J.; Wibbels, T. 1991. Estrogen and Sex Reversal in Turtles: A dose-dependent phenomenon. *General and Comparative Endocrinology* 81, 357- 364.
- Crews, D. 1996. Temperature Dependent-sex determination: The interplay of steroid hormones and temperature. *Zoological science*. 13:1-13.
- Crews, D.; Cantú, A.; Rhen, T.; Vohra, R. 1996. The relative effectiveness of estrone, estradiol- 17 β and estriol in sex reversal in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol*. 102: 317-326.
- Crews, D.; Bergeron, J.; Bull, J.; Flores, D.; Tousignant, A.; Skipper, J.; Wibbels, T. 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev. Genet.*, 15:297-312.
- De Santa Bárbara, P.; Bonneaud, N.; Boizet, B.; Desclozeaux, M.; Moniot, B.; Sudbeck, P.; Scherer, G.; Poulat, F.; Berta, P. 1998. Direct Interaction of SRY-related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human anti-Mullerian Hormone Gene. *Mol. Cell. Biol*. 18: 6653-6665.
- Devlin, T.; Canals, F.; Cuchillo, C.; Segura, S., Suau, P. 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4^a Edición. Barcelona España: Reverte. 1248 pp.
- Desvages, G.; Pieau, C. 1991. Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*. Vol. 39, No. 2, pp. 203- 213.

- Desvages, G.; Pieau, C. 1992. Time required for temperature- induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. *Differentiation* 52: 13-18.
- Desvages, G.; Girondot, M.; Pieau, C. 1993. Sensitive stages for the effects of temperature on Gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *General and Comparative Endocrinology* 92, 54- 61.
- Díaz- Hernández, V.; León del Río, A.; Zamora, M.; Merchant-Larios, H. 2008. Expression profiles of SRY and Sox9 in rabbit gonads: the classical model of mammalian sex differentiation. *Sex. Dev.* 2: 152-166.
- Díaz-Hernández, V., Merchant-Larios, H. 2008. Bases Moleculares de la Determinación sexual en mamíferos. *Ciencia ergo sum* 15: 287-296.
- Díaz- Hernández, V., Marmolejo, A., Merchant, H. 2015. Exogenous estradiol alters growth and timing of temperature sex determination in gonads of sea turtle. *Dev- Biol.*
- Dorizzi, M.; Mignot, T.; Guichard, A.; Desvages, G.; Pieau, C. 1991. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation* 47: 9-17.
- Dorizzi, M.; Mercier, N.; Desvages, G.; Girondot, M.; Pieau, C. 1994. Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation* 58: 1-8.
- Eicher, E.; Washburn, L. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann. Rev. Genetic.* 20: 327-360.
- Elf, P. 2003. Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *General and Comparative Endocrinology* 132, 349- 355.
- Ferguson, M.; Joanen, T. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature*, 296: 850-853.
- Fleming, A.; Crews, D. 2001. Estradiol and incubation temperature modulate SF1 expression in the embryonic red-eared slider turtle. *Endocrinology* 142 (4), 1403-1411.
- Gorman, G. 1973. The Chromosomes of the Reptilia, a Cytotaxonomic Interpretation, in Chiareli AB, Capanna, E. (eds.): *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*, pp 349- 424. Academic Press, London, New York.
- Grodin, J., Sitteri, P., Mc Donald, O. 1973. *J. Clin. Endocrin. Metabolism.* 36, 207.
- Guyton, A. y Hall, J. 2011. *Tratado de Fisiología Médica*. University of Mississippi. 12ª Edición. Elsevier Saunders.
- Harry, J., Williams, K. 1991. Differential growth of male and female urogenital systems of *Caretta caretta* within the sex-determining period. *The journal of experimental zoology*, 258: 204-211.
- Hsu, H.; Hsu, N.; Hu, M.; Chung, B. 2006. Steroidogenesis in zebrafish and mouse models. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248, 160-163.
- Hu, M.; Feng-Lin, E.; Tong, S.; Lai, W.; Hsu, N.; Chi-Kwang, L.; Chung, B. 2001. Regulation of steroidogenesis in transgenic mice and zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 171, 9-14.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI, 2013. <http://www.inegi.org.mx/>
- Jeays- Ward, K.; Dandonneau, M.; Swain, A. 2004. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev. Biol.* 276: 431-440.
- Jeyasuria, P. y Place, A. 1998. Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *J. Exp. Zool.* 281, 428-449.
- Jiang, D.; Huang, Y.; Han, N.; Xu, M.; Xu, L.; Zhou, L.; Wang, S.; Fan, W. 2013. Fulvestrant, a selective estrogen receptor down-regulator, sensitizes estrogen receptor negative breast tumors to chemotherapy. *Cancer Letters* 346, 292-299.
- Jost, A. 1947. Recherches sur la differenciation de l'embryon de lapin: 3eme partie: rôle des gonads foetales dans la differenciation sexuelle somatique, *Arch d' Anatomie Morph Exp.* 36: 271-312.
- Kent, J.; Wheatley, C.; Andrews, E.; Sinclair, H.; Koopman, P. 1996. A male specific role for Sox9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122: 2813-2822.
- Kidokoro, T.; Matoba, S.; Hiramatsu, R.; Fujisawa, M.; Kanai-Azuma, M.; Taya, C.; Kurohmaru, M.; Kamakami, H.; Hayashi, Y.; Kanai, Y.; Yonekawa, H. 2005. Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic SRY expression during early phases of testis differentiation in mice. *Developmental Biology.* 278: 511- 525.
- Kim, Y.; Kobayashi, R.; Sekido, R.; DiNapoli, L.; Brennan, J.; Chaboissier, E.; Poulat, F.; Behringer, R.; Lovell-Badge, R.; Capel, B. 2006. Fgf9 and Wnt4 act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS biology.* 4: 1000-1009.
- Kurman, R., Shih, leM. 2010. The Origin and Pathogenesis of Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 34: 433-43.
- Lance, V.; Bogart, M. 1992. Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86, 59-71.
- Lipton, A.; Harold, A.; Harvey, M.; Laurence, M.; Hanagan, M.; Mulagha, M.; Kochak, G.; Fitzsimmons, S.; Sanders, S.; Santen, R. 1990. A new Aromatase Inhibitor. A phase I Trial of CGS 16949A. *Cancer.* Vol.65, 1279-1285.
- Locia- Espinoza, J., Hernández, M., Aranda, G., Rojas, F., Manzo, J., Coria, G., Yerena, C., Soto, A. 2013. El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *Neurobiología* 4 (8): 300813.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence, Z., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2005. *Biología Celular y Molecular.* Ed. Panamericana. Capítulo 11.
- Matsumoto, Y.; Buemio, A.; Chu, R.; Vafae, M.; Crews, D. 2013. Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (cyp19a1) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red Eared Slider Turtles. *PLoS ONE,* 8.
- Merchant, L. 1975. Rat gonadal and ovarian organogénesis with and without germ cells. *Dev. Biol.* 44: 1-21.

- Merchant-Larios, H.; Villalpando, I. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: an organ culture study. J. Exp. Zool. 254, 327-331.
- Merchant-Larios, H., Ruíz Ramírez, S., Moreno Mendoza, N., Marmolejo Valencia, A. 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. General and Comparative Endocrinology 107, 372- 385.
- Merchant-Larios, H.; Díaz-Hernández, V.; Marmolejo-Valencia, A. 2010. Gonadal morphogenesis and gene expression in reptiles with temperature-dependent sex determination. Sex. Dev., 4: 50-61.
- Milnes, M.; Roberts, R.; Guillette, L. 2002. Effects of incubation temperature and estrogen exposure on aromatase activity in the brain and gonads of embryonic alligators. Environ. Health Perspect, 110: 393-396.
- Miller, WR; Forrest, APM. 1976. Oestradiol synthesis from C19 steroids by human breast cancers, Br J Cancer 33: 116- 118.
- Morais da Silva, S.; Hacker, A.; Swain, A. y Lovell-Badge, R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. Nature genetics. 4: 62-68.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V., Merchant, H. 2001. Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. Developmental Biology 229,319-326.
- Morreale, S., Ruíz, G., Spotila, J. y Standora, E. 1982. Temperature dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. Science, 216: 1245-1247.
- Morrish, B. y Sinclair, A. 2002. Vertebrate sex determination: many means to an end. Reproduction 124, 447- 457.
- Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. 1996. ERB: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. Federation of European Biochemical Societies Letters. 392, 49-53.
- Mrosovsky, N. 1994. Sex Ratio of sea turtles. The Journal of Experimental Zoology. 270:16-27.
- Mrosovsky, N.; Yntema, C. 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implication for conservation practices. Biol, Conserv. 18: 271-280.
- Murdock, C.; Wibbels, T. 2003. Dmrt1 mRNA levels in the embryonic adrenal/kidney/gonadal complexes of *Trachemys scripta*. SICB Annual Meeting. Toronto, Canadá. Final Program and Abstracts. 62.4, p. 257.
- Nakamura, M. 2010. The mechanism of Sex determination in Vertebrates- are sex steroids the key- factor?. Journal of Experimental Zoology. 313A: 381-398.
- Nef, S.; Schaad, O.; Stallings, N.; Cederroth, C.; Pitetti, J.; Schaer, G.; Malki, S.; Dubois- Daouhin, M.; Boizet-Bonhoure, B.; Descombres, P.; Parker, K.; Vasali, J. 2005. Gene Expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. Dev. Biol. 287: 361-377.

- Niakan, K.; McCabe, E. 2005. Dax origin, function and a novel role. *Dev. Gen. Metabolic.* 86: 70-83.
- Nishino, K.; Hattori, N.; Tanaka, S.; Shiota, K. 2004. DNA methylation mediated control of SRY gene expression on mouse gonad development. *J. Biol. Chemistry.* 279: 22306-22313.
- Norman, A.; Mizwicki, M.; Norman, D. 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Reviews.* 3, 27-41.
- Ottolenghi, C.; Pelosi, C.; Tran, J.; Colombino, M.; Douglas, E.; Nedorezov, T.; Cao, A.; Forabosco, A.; Schlessinger, D. 2007. Loss of Wnt4 and FoxL2 leads to female to male sex reversal extending to germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 16: 2795-2804.
- Owen, G.; Zelent, A. 2000. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 57, 809-827.
- Payne, A.; Hales, D. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to activate steroid hormones. *Endocrine Reviews.* 25, 947-970.
- Pelliniemi L., Frojdmann K., Sundstrom J., Pollanen P. and Kuopio T. 1998. Cellular and molecular changes during sex differentiation of embryonic mammalian gonads. *J. Exp. Zool.* 281: 482-494.
- Pieau, C. 1974. Differentiation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien) effets des hormones sexuelle. *Ann. Embryol. Morphog.* 7, 365-394.
- Pieau, C.; Dorizzi, M. 2004. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads, *J. Endocrinol.* 181, 367-377.
- Pieau, C.; Girondot, M.; Richard-Mercier, N.; Desvages, G.; Dorizzi, M.; Zaborski, P. 1994. Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: Hormonal environment. *J. Exp. Zool.* 270, 86-94.
- Pieau, C.; Dorizzi, M.; Richard-Mercier, N. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 887-900.
- Place, A.; Lang, J.; Gavasso, S.; Jeyasuria, P. 2001. Expression of P450arom in *Malaclemys terrapin* and *Chelydra serpentina*: a tale of two sites. *J. Exp. Zool.* 290, 673-690.
- Prieto, G.; Velázquez, P. 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. *Rev.Fac. Med. UNAM*, Vol. 45. No. 6.
- Ramsey, M.; Shoemaker, C.; Crews, D. 2007. Gonadal expression of Sf1 and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 75: 978-991.
- Ramsey, M.; Crews, D. 2007. Steroid signaling and temperature-dependent sex determination- Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 20, 283-292.

- Raynaud, A.; Pieau, C. 1985. Embryonic development of the genital system, in Gans C, Billett (eds.): Biology of the reptilian, Development B (Wiley-Interscience, New York).
- Rhen, T.; Lang, J. 1998. Among-family variation for environmental sex determination in reptiles. *Evolution* 52 (5), 1514-1520.
- Rhen, T.; Metzger, K.; Schroeder, A.; Woodward, R. 2007. Expression of putative sex determining genes during the thermosensitive period of gonadal development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Sex.Dev.* 1, 255-270.
- Riggs, B. y Hartmann, L. 2003. Selective estrogen- receptor modulators: mechanisms of action and application to clinical practice. *N. Engl. J. Med.* 348: 618-629.
- Rimblot, F., Fretey, N., Mrosovsky, J., Lescure, J., Pieau, C. 1985. Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibian Reptilia*, 6: 83-92.
- Rosenfield, M.; Glass, C. 2001. Corregulators codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *The Journal of Biological Chemistry.* 276, 36865-36868.
- Salame, M.; Villalpando, F. 1998. La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. *Acta Zool. Mex.* 73: 89-110.
- Salame, M.; Herrera, M.; Moreno, N.; Merchant, H. 1998. Response of Diencephalon but not the gonad to female- promoting temperature with elevated Estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *The Journal of Experimental Zoology.* 280: 304-313.
- Salame, M. 1998 Influencia de la Temperatura de Incubación en la Determinación del Sexo en Quelonios. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 48: 125-136.
- Scheib, D. 1983. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation.* 23, S83-S92.
- Schirman-Hildesheim, T.; Bar, T.; Ben-Aroya, N.; Kock, Y. 2005. Differential gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression patterns in different tissues of the female rat across the estrous cycle. *Endocrinology.* 146, 3401-3408.
- Schwabl, H. 1996. Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comp. Biochem. Physiol.* 114^a, 271-276.
- Schwabl, H.; Mock, D.; Gieg, J. 1997. A hormonal mechanism for parental favoritism, *Nature* 386, 231.
- SEMARNAT. 2009. Estudio previo justificativo para establecer el Área Natural Protegida en Categoría de *Santuario Playa de Escobilla*, Santa María Tonameca, Oaxaca.
- Shoemaker, C.; Ramsey, M.; Queen, J.; Crews, D. 2007. Expression of Sox9, Mis and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 236: 1055-1063.
- Smith, HM y Taylor EH. 1950. An annotated check list and key to the reptiles exclusive of the snakes. *Bulletin of the United States National Museum*, (199): i- iv, 1- 253.

- Solís, D., Orrego, C., Blanco- Segura, R., Harfush- Meléndez, M., Albavera, E. y Valverde, R. 2008. Estimating Arribada Size: going global. En: Alan F. Rees, Michael Frick, Aiki Panagopoulou y Kris Williams (eds.). Proceedings of the twenty-seventh annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-569.P. 249.
- Spotila, J., Standora, S., Morreale, S., Ruiz de Clark, G. 1981. Effects of incubation temperature on the sex of hatchling Caribbean green turtles. Final Report to Rutgers University for sub-grant activity on USFWS Project 14-16-002-80-222-29 pp.
- Spotila, J., Standora, E., Morreale, S., Ruiz G., Puccia, C. 1983. Methodology for the study temperature related phenomena affecting sea turtle eggs. Endangered species report 11. US. Fish and wildlife service. Albuquerque, New Mexico. 51 pp.
- Thornton, J.; De Salle, R. 2000. A new method to localize and test the significance of incongruence: detecting domain shuffling in nuclear receptor superfamily. *Systematic Biology*. 49, 183-201.
- Treguerres, J., Tesguerras, C., Salamé, F. 2000. Reproducción II. El eje hipotálamo-hipófiso- ovárico. En: Treguerres, J., Aguilar, Devesa, Moreno (eds). *Tratado de Endocrinología Básica y Clínica*. Madrid. Síntesis; 621-653.
- Vainio, S.; Heikkila, M.; Kispert, A.; Chin, N.; McMahon, A. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature*. 397; 405-409.
- Vidal, V.; Chaboissier, M.; de Rooij, D.; Schedl, A. 2001. Sox9 induces Testis development in XX Transgenic Mice. *Nature genetics*. 28: 216-217.
- Viger, R.; Mertineit, J.; Trasler, M.; Nemer, M. 1998. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic during mouse gonad development and is a potent activator inhibiting substance promoter. *Development*. 125: 2665-2675.
- Vogt, R.; Bull, J. 1982. Genetic sex determination in the spiny soft-shell *Trionyx spiniferus* (Testudines: Trionychidae). *Copeia* 1982: 699-700.
- Vogt, R., Flores, O. 1986. Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. *Ciencia*. 37: 21-32.
- Wade, J., Swender, D., McElhinny, T. 1999. Sexual Differentiation of the Zebra Finch Song System Parallels Genetic, Not Gonadal, Sex. *Hormones and Behavior* 36, 141-152.
- Wagner, C. 1976. Temperature-dependent sex determination in a gecko lizard. *Q. Rev. Biol.*, 55: 21.
- Wallace, H.; Badawy, G.; Wallace, B. 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell. Mol. Life Sci*. 55: 901-909.
- Walters, M.; Hunziker, W.; Norman, A. 1981. A mathematical model describing the subcellular localization of non-membrane bound steroid, sex-steroid, and thyronine receptors. *The Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology*. 15, 491-495.
- Weltzien, F.; Anderson, E.; Andersen, O.; Shalchian-Tabrizi, K.; Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comparative Endocrinology*. 131, 87-96.

- Western, P.; Harry, J.; Marshall, G.; Sinclair, A. 2000. Temperature-dependent sex determination in the *American alligator*: expression of SF1, Wt1, and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241; 223-232.
- Wibbels, T.; Bull, J.; Crews, D. 1991. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool.* 260, 371-381.
- Wibbels, T., Gideon, P., Bull, J., Crews, D. 1993. Estrogen and temperature induced medullary cord regression during gonadal differentiation in a turtle. *Differentiation* 53: 149-154.
- Wibbels, T. y Crews, D. 1994. Temperature-dependent sex determination-a mechanistic approach. *Journal of Experimental Zoology*, 270, 71-78.
- Wilhelm, D.; Martinson, F.; Bradford, S.; Megan, A.; Combes, A.; Beverdam, A.; Bowles, J.; Mizusaki, H. y Koopman, P. 2005. Sertoli cell differentiation is induced both cell autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 287: 111-124.
- Wilhelm, D.; Hiramatsu, R.; Mizusaki, H.; Widjaja, L.; Combes, A.; Kanai, Y.; Koopman, P. 2007. Sox9 regulates prostaglandin D. Synthase Gene Transcription in vivo to ensure testis development. *J. Biol. Chemistry.* 282: 10553-10560.
- William, H., Futzke, N., Dale, B. 1988. Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtles. *General and comparative endocrinology.*
- Wong, T.; Zohar, Y. 2004. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Endocrinology.* 145, 5210-5220.
- Yao, H. 2005. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol. Gen. Metabol.* 86: 70-83.
- Yao, H.; Matzuk, M; Jorgez, C.; Menke, D.; Page, D.; Swain, A. 2004. For listatin operates downstream of Wnt-4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev. Dyn.* 230: 210-215.
- Yntema, C.L. and Mrosovsky, N. 1979. Incubation temperature and sex ratio in hatchling loggerhead turtles: a preliminary report. *IUCN/SSC Marine Turtle Newsletter*, 11: 9-10.
- Yu, R.; Ito, M.; Saunders, T.; Camper, S.; Jameson, J. 1998. Role of Nr0b1 in gonadal development and gametogenesis. *Nat. Genet.* 20: 353-357.

ANEXO 1.

Descripción de la especie *Lepidochelys olivacea*

Lepidochelys olivacea (Figura 19) es una especie de tortuga marina que pertenece a la familia Cheloniidae, se conoce comúnmente como la tortuga lora o golfinia. Está declarada como vulnerable bajo la UICN (2009), esta especie de tortuga tiene una longitud promedio de 66 cm y puede llegar a pesar de 35 kg hasta 50 kg, su frecuencia de reanidación ocurre de 2 a 6 veces por temporada con un promedio de nidada igual a 92.6 huevos por nido (Torres y Urteaga, 2006), el intervalo de reanidación es de 14 a 28 días (solitaria y por arribada respectivamente), se ha reportado un periodo de re migración de 1 a 2 años (Pritchard y Mortimer, 2000).



Figura 19. Ejemplar de *Lepidochelys olivacea*. Foto: Alma Vázquez

Esta especie tiene una coloración verde oscuro, la forma de su caparazón es casi redondo y plano, la cabeza tiene forma triangular y mide hasta 13 cm de ancho (Fig. 20), presenta dos pares de escamas prefrontales, 6-9 pares de escudos laterales que algunas veces son impares, el plastrón es de color crema y contiene un poro pequeño y distintivo cerca del margen posterior de cada uno de los cuatro escudos inframarginales (Fig. 20) (Smith y Taylor, 1950), presenta dos uñas en cada aleta delantera (Gulko y Eckert, 2004).

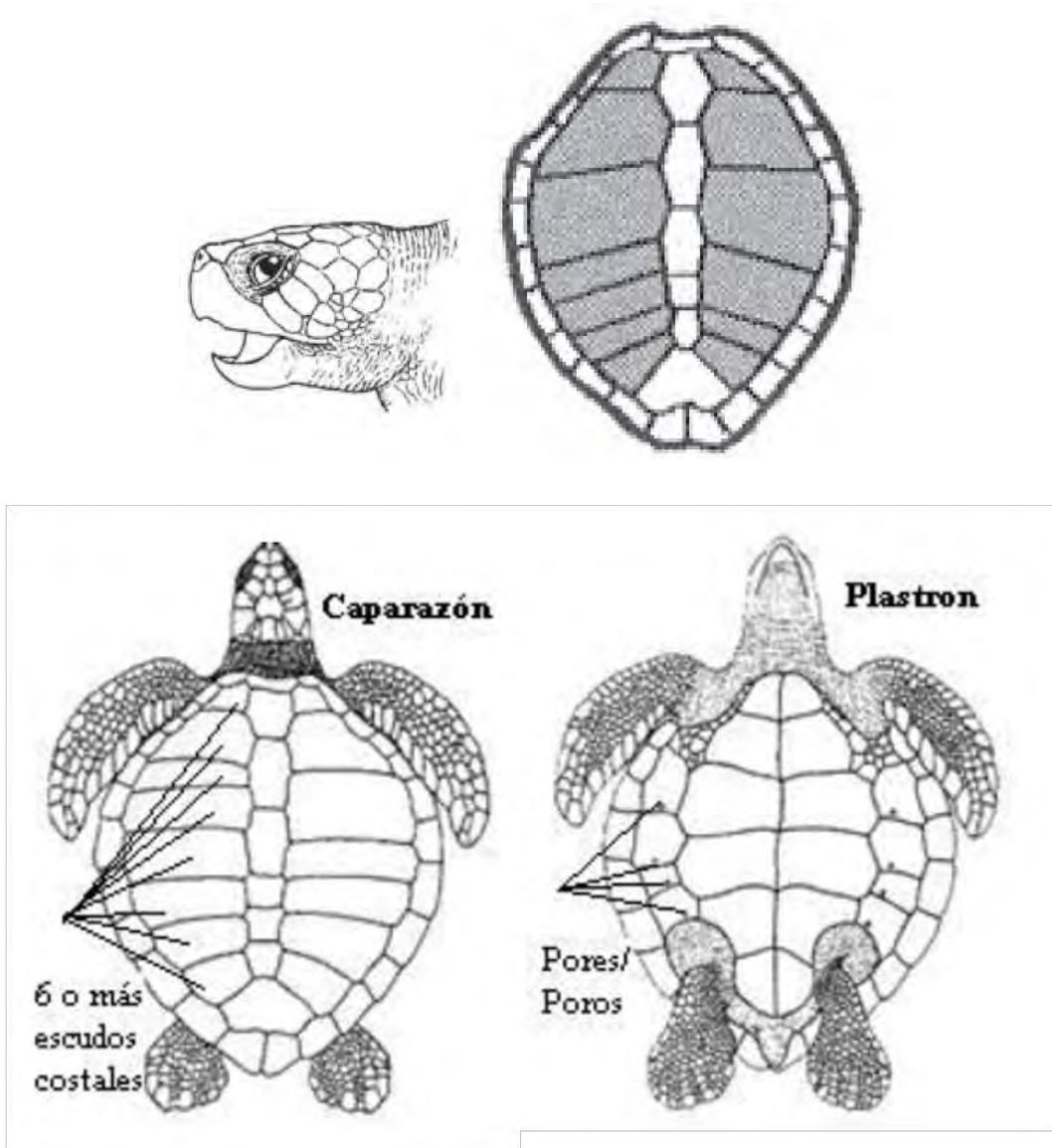


Figura 20. Características morfológicas de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* adulta (Eckert et al., 2000).

La distribución de *Lepidochelys olivacea* se encuentra en aguas tropicales del Océano Pacífico, Índico y Atlántico del Sur (Smith y Taylor, 1950), su alimentación está basada en peces, moluscos y crustáceos ocurre principalmente en aguas costeras, bahías y estuarios. Pueden bucear a profundidades de hasta 150 metros para alimentarse de crustáceos que se encuentran en el lecho marino. En el Pacífico Oriental tienen un rango desde México hasta Colombia y ocasionalmente se encuentran en la costa suroeste de los Estados

Unidos (Pritchard y Mortimer, 2000). Las principales playas de anidación masiva están en Centro América y se encuentran en Nicaragua en las playas La Flor y Chacocente, y en el resto de América se encuentran en México (Ixtapilla, La Escobilla y Morro), Costa Rica (Ostional y Nancite) y en Panamá en las Islas Cañas. En el litoral Pacífico el periodo de anidación ocurre aproximadamente todo el año y dura de 44 a 50 días (Torres y Urteaga, 2006). Además anidan en las costas del Atlántico Occidental en Surinam, Guyana Francesa y Guyana, algunos individuos (no anidando) se encuentran en la Isla de Margarita, Venezuela y Trinidad y Tobago; sin embargo, muy rara vez se encuentran más adentro en el Caribe (Pritchard y Mortimer, 2000).

La tortuga golfina anida en forma masiva en eventos llamados “arribadas”, además de llevar a cabo anidaciones solitarias. Durante este fenómeno, que puede ser pronosticado por las fases de la luna y las mareas, salen miles de tortugas para ovipositar en un periodo corto de 3 a 5 días. Se cree que la población de anidación más grande del mundo se encuentra en el Océano Índico, con un promedio de casi 400 000 hembras anidando por año (Eckert et al., 2000).

ANEXO 2. Protocolos de obtención de fijadores

Fijador de Karnovsky

Preparación:

Colocar 10 gramos de Paraformaldehído 1% (Sigma-Aldrich, cat. P6148-500G) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, agregar 250 ml de agua bidestilada, calentar a fuego lento mezclando suavemente para que se integre el paraformaldehído con el agua, cuando esté un poco caliente agregar de 2 a 3 perlas de Hidróxido de Sodio (J.T. Baker, cat. 3722-01), continuar calentando y mezclando hasta observar que el paraformaldehído esté disuelto. Dejar enfriar y filtrar con papel filtro.

(Nota: Hay que evitar la sobre ebullición por calentamiento, tapar el matraz Erlenmeyer para evitar lo más posible la evaporación).

Preparar 500 ml de Cacodilato de Sodio (Electron Microscopy Sciences, cat. 12310) 0.1 M, en un vaso de precipitados de 1 l, agitando con mosca magnética. (El peso molecular de Cacodilato de Sodio= 214.02) (21.402 g de cacodilato de Sodio en 500 ml de agua bidestilada).

Mezclar las soluciones con agitación magnética, agregando los 250 ml de paraformaldehído filtrado a los 500 ml de la solución de Cacodilato de Sodio 0.1 M. Agregar 100 ml de Glutaraldehído (J.T.Baker, cat. 2127-01) al 25 % continuando con el mezclado magnético y finalmente agregar 150 ml de agua bidestilada. El volumen final es de 1000 ml.

Por último llevar la solución a pH 7.2 titulando con ácido clorhídrico (J.T. Baker, cat. 9535-02) al 37%. Debe quedar una solución transparente con las concentraciones finales mencionadas al inicio y almacenar en una botella (plástico o vidrio) a 4° C.

Paraformaldehído al 4%

Preparación:

Para preparar 50 ml, pesar 2 gr. de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, cat. P6148) y disolver a baño maría de 1:30 a 2:00 hrs. en PBS 1X (Sigma L. S., cat. D5758) pH 7.4, vortexear constantemente, enfriar a 4° C.

Posteriormente se congela y almacena a -20° C. Para utilizar se descongela a temperatura ambiente y se utiliza en frío (hielo).

Nota: Una vez descongelado, no es recomendable volver a congelar

Buffer de Cacodilato de Sodio 0.1 M

Preparación:

Disolver el Cacodilato de Sodio (Electron Microscopy Sciences, cat. 12310) en agua bidestilada con agitación magnética, llevar a pH 7.3 con HCl.

(21.402 g de Cacodilato de Sodio en 1000 ml de agua bidestilada, concentración final 0.1 M). Almacenar en una botella (plástico o vidrio) a 4° C.

Epon puro

La preparación del epon (Ember 812, cat. 14900, Electron Microscopy Sciences) puro se realizó por medio de dos mezclas:

Mezcla A: 50 ml = DDSA (Duodecynylsuccinic Anhidrido cat. 18022, Ted Pella, Inc.) (30.5 ml) + Epon (Ember 812, cat. 14900, Electron Microscopy Sciences) (19.5 ml)

Mezcla B: 50 ml = NMA (Nadic Methyl Anhidride, cat. 18032, Ted Pella, Inc.) (22.8 ml) + Epon (Ember 812, cat. 14900, Electron Microscopy Sciences) (27.1 ml)

Preparación:

Se realiza la mezcla de A y B más un catalizador con las concentraciones siguientes:

Mezcla A: 7.0 ml + Mezcla B: 3.0 ml

DMP-30 (2,4,6 tri dimethylaminomethyl phenol, cat. 00553, Polisciencias, Inc.) (Catalizador o epoxi acelerador): 0.15 ml

Una vez obtenido el epon se utiliza a temperatura ambiente, bajo una campana de extracción, después de usarse debe guardarse en refrigeración.

Azul de toluidina 0.5%

Preparación:

Para 1 litro (1 l) disolver el colorante en 300 ml de agua destilada, agregar el borato de sodio y aforar a 1 l, hervir por 15 minutos y filtrar una vez que esté frío.

Conservar a temperatura ambiente y filtrar cada vez que se utiliza.

ANEXO 3. Protocolos de procesamiento para cortes semifinos e inmunofluorescencias

Elaboración de navajas de vidrio para cortes semifinos

Para la obtención de cortes semifinos de muestras incluidas en epon fue necesario elaborar navajas de cristal de la siguiente manera: se lavó una barra de cristal de aproximadamente 60 cm de largo por 4 cm de ancho con jabón y agua destilada, se colocó sobre el cortador y se fijó con la palanca del mismo, se marcaron y cortaron cuadros de cristal de aproximadamente 4 cm de lado; para cortar los triángulos que forman las navajas, se colocaron los cuadros cambiando el ángulo a unos 45°, se fijaron con ayuda de la palanca, se marcaron y fueron cortados. Posteriormente se montó en uno de los ángulos una tira de masking tape y fue fijada con barniz; las navajas fueron montadas en una caja de cartón y conservadas para ser utilizadas en los cortes semifinos.

Gelatinización de laminillas para inmunofluorescencia

Las laminillas para los cortes incluidos en congelación fueron preparadas con una disolución de grenetina 0.5% (Hycell H., cat. 136) y sulfato de cromo $\text{Cr}(\text{SO}_4)_3$ (0.05% (J. T. Baker, cat. 1630) en agua destilada a baño maría (60° C), la solución debe ser filtrada.

Se utilizan racks (de preferencia dejar 1 espacio entre cada laminilla) y se sumergen en la solución a 35° C, se ponen a secar en el horno durante 20 minutos a 50° C; este procedimiento se repite 3 veces. Una vez que las laminillas están secas, se guardan en el refrigerador a 4° C.

Si las laminillas son reutilizadas se lavan bajo campana de extracción se dejan en etanol 70% durante diez minutos, se sumergen en acetona por cinco minutos y enjuagan con agua corriente y después agua destilada; se secan en el horno a 50° C. Se realiza el procedimiento mencionado anteriormente.