

Efecto de la Temperatura de Incubación sobre la Actividad Esteroidogénica en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*

Incubation temperature effect on the steroidogenic activity in Crocodylus acutus and Crocodylus moreletii.

Xóchitl Aguilar-Miguel* , Joaquín Herrera Muñoz** ,
Horacio Merchant-Larios*** y Gustavo Casas-Andreu****.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura de incubación sobre la síntesis de hormonas esteroides sexuales (HES) en suero sanguíneo de cocodrilos recién nacidos (*Crocodylus acutus* y *C. moreletii*).

Los mecanismos fisiológicos a través de los cuales opera la determinación del sexo por efecto de la temperatura, son prácticamente desconocidos. Una hipótesis propuesta, se refiere a que la biosíntesis de estrógenos, modulada por la temperatura, regula a su vez la diferenciación de la gónada. Para contribuir a conocer los mecanismos antes mencionados, se determinó la actividad esteroidogénica en el complejo urogenital (gónada-mesonefros-adrenal), por medio de la técnica histoquímica $\Delta 5-3\beta$ hidroesteroide deshidrogenasa.

Se encontró una reacción fuertemente positiva en la glándula adrenal y muy débil en el mesonefros, pero fue negativa en la gónada. De manera que en estas especies de cocodrilos, la regulación metabólica de Hormonas Esteroides Sexuales (HES) parece llevarse a cabo en la glándula adrenal. La determinación y cuantificación de HES se hizo por medio de Radio Inmuno Análisis (RIA). Se encontró que la temperatura regula la actividad metabólica de estas hormonas, teniendo los niveles más altos a 34 °C, y siendo el estradiol y la testosterona más activas en machos; además, se presentaron diferencias significativas en el metabolismo de HES entre *C. acutus* y *C. moreletii*.

Palabras clave: Cocodrilos, esteroidogenesis, sexodeterminación, RIA

ABSTRACT

Incubation temperature effect on the synthesis of sexual steroid hormones (SEH) in blood serum of new born crocodiles (*Crocodylus acutus* and *C. moreletii*) was studied.

Physiological mechanisms operating on sex determination by mean of incubating temperature are practically unknown. A proposed hypothesis suggest that estrogen biosynthesis, modulated by temperature, regulates at the same time the gonadal differentiation. In order to know the mechanisms above cited, steroidogenic activity in the urogenital complex (gonad-mesonefros-adrenal) was determined,

*Facultad de Ciencias, UAEMex. Instituto Literario 100. C.P. 50000, Toluca, Edo de México, México.

** Departamento de Biología Reproductiva, Hospital "Luis Castelazo" Ayala, IMSS, México, D.F., México.

***Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., México.

**** Instituto de Biología, UNAM, Apdo. Postal 70-153. 04510, México, D.F. México.

by mean of the histochemistry $\Delta 5-3 \beta$ hidrosteroid deshidrogenase method. It was found that there were a strong positive reaction in the adrenal gland, very weak in the mesonefros and negative in the gonad, concluding that at least in *Crocodylus acutus* and *C. moreletii*, metabolic regulation of Sexual Steroid Hormones seem to take place in adrenal gland.

Determination and cuantification of SEH were obtained by mean of Radio Inmuno Analysis (RIA). Results show that temperature regulate the metabolic activity of these hormones, determining the higher activity at 34°C, been estradiol and testosterone the more active hormones in males; there were significative differences in metabolism of SEH between *C. acutus* and *C. moreletii*.

Key word: Sexdetermination, steroidogenesis, crocodiles, RIA.

Antecedentes

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

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

Actualmente, de las más de 6550 especies vivientes de reptiles, arriba de 1000 han sido cariotipificadas. Menos del 27% de ellas muestran DSG en la forma de cromosomas sexuales heteromórficos. Sólo 94 especies han sido examinadas para la presencia o ausencia de DSA, de éstas, 72 han presentado DSA (Janzen y Paukstis, 1991).

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

Los estudios de cambio de temperatura han sido diseñados específicamente para averiguar el período

crítico de la determinación sexual de las gónadas en especies con DST, además de inferir sobre los mecanismos que controlan el proceso de diferenciación sexual (Paukstis y Janzen, 1990).

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

Raynaud y Pieau (1985), presentaron la primera hipótesis que implica a la temperatura de incubación como agente causal de la determinación del sexo, particularmente, de la diferenciación sexual gonadal en la tortuga *Emys orbicularis*. Basándose en las proposiciones de Engel *et al.*, (1981) y Zaborski *et al.*, (1979) considerando la participación del antígeno H-Y, y de las hormonas esteroides sexuales (HES), en el proceso de la diferenciación sexual gonadal (Pieau, 1982), sugirieron que la temperatura de incubación podría modificar la biosíntesis de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis de HES, así como del antígeno H-Y. El primordio gonadal, se diferenciará en ovario, si la concentración de estrógenos es relativamente mayor durante su período termosensible, mientras que, si el primordio gonadal es H-Y, se diferenciará en testículo, cuando la concentración de estrógenos sea baja o nula en el mismo período. La hipótesis de estos investigadores se fortaleció a partir de los resultados experimentales de la expresión del antígeno H-Y después de un tratamiento hormonal o de ovariectomía en anfibios y aves. Para comprobar esta hipótesis Raynaud y Pieau (1989) sugirieron que era necesario llevar a cabo estudios de esteroidogénesis en la gónada (actividad enzimática y biosíntesis, de la expresión del antígeno H-Y), así como de biosíntesis de proteínas, durante los estadios primarios del desarrollo, principalmente antes del inicio del período termosensible gonadal en embriones (DST), provenientes de huevos incubados a diferentes temperaturas.

Otra hipótesis es la propuesta por Crews *et al.*, (1989), quienes sugieren que, en los reptiles sexotermodependientes, la determinación del sexo se lleva a cabo por la acción de una HES, regulada por la temperatura de incubación.

Esta variable física al activar diferencialmente enzimas lábiles a la temperatura, favorecería la obtención de precursores de HES del vitelo, o alternativamente, de la gónada y/o adrenales embrionarias. Asimismo, regularía la biosíntesis de estrógenos y éstos al antagonizar la acción de la(s) hormona(s) masculinizante(s), favorecerían la diferenciación del ovario al estimular la proliferación de la región cortical de la gónada en diferenciación.

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

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

Entre los cocodrilos, la ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos, implicaría que todos los cocodrilos vivientes exhibieran DST. Sin embargo,

los patrones de DST en los pocos representantes estudiados difieren sustancialmente y esta diversidad proporciona argumentos para estudiar a otras especies. Aguilar (1994), realizó un estudio, encontrando que la determinación del sexo por el efecto de la temperatura de incubación también se presenta en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*, lo cual llevó a la pregunta sobre que mecanismos actuarían en la determinación sexual en esas especies, que permitiesen comprender este fenómeno en el grupo.

Por lo anterior, se propuso la realización de ésta investigación, cuyo objetivo fue establecer, si las hormonas esteroides sexuales, constituyen un factor determinante del sexo en *C. acutus* y *C. moreletii*.

Métodos

HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

La actividad esteroideogénica se registró en 24 ovarios y 10 testículos de los embriones incubados a las temperaturas de 30, 32 y 34°C, en ambas especies. Se extrajo la gónada derecha a la cual se le realizó la técnica histoquímica para la detección de la actividad de $\Delta 5-3\beta$ hidroxisteroide-deshidrogenasa ($\Delta 5-3\beta$ BHSD). Congelando la gónada a -70°C en hexano, se realizaron cortes por congelación a 8 μ m. El medio de incubación se preparó con 20 mg de Nitro Blue Tetrazolium, (NBT, grado III de Sigma), en 20 ml de amortiguador Tris HCl 0.2 M, pH 7.6. Por separado se disolvieron 40 mg de NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleótido) también en 20 ml del amortiguador Tris HCl. Se mezclaron ambas soluciones y se separaron 20 ml para utilizarlos como control. El medio experimental se preparó agregando a los 20 ml restantes de la mezcla arriba descrita, 2 mg de la hormona esteroide (dehidroepiandrosterona), previamente disuelta en 0.5 ml de dimetilamina. Se incubaron a 37°C por una hora, lavándose y fijándose en formalina neutra al 10%, a temperatura ambiente; para definir mejor con esta reacción la estructura de la gónada, se utilizó además, la técnica inmunohistoquímica para la detección de laminina; los cortes anteriores se lavaron, realizándose dos bloques de la peroxidasa endógena, el primero con metanol y agua oxigenada y el segundo con albúmina disuelta en PBS. Después se incubaron con el anticuerpo primario (laminina) por dos horas, nuevamente se lavaron incubándose después con

el anticuerpo secundario IgG biotinilado, en albúmina, por una hora; se lavó y se incubó nuevamente con el anticuerpo conjugado AB en albúmina, se revelaron con diaminobenzidina, lavándose y montándose finalmente en glicerol.

RADIOINMUNOANÁLISIS

Para cuantificar las hormonas esteroides en el suero sanguíneo, se obtuvo la sangre del cuello después de la decapitación. La sangre se colectó en tubos sin anticoagulante, dejándose en refrigeración (2-4°C) hasta la formación del coágulo y posteriormente se centrifugó a 900 xg/10 min. El volumen de suero en *C. acutus* fué de 1.2-1.3 ml y en *C. moreletii* de 0.5-1.0 ml, y se guardó a -4°C, hasta el momento de la medición de las hormonas.

En este trabajo se cuantificaron nueve hormonas esteroidogénicas, por el método de radioinmunoanálisis en una misma muestra biológica. En tubos cónicos de 50 ml con tapón esmerilado, se agregaron aproximadamente 1000 cpm de cada uno de los esteroides por cuantificar; al mismo tiempo se colocaron alícuotas iguales en viales de conteo. Estos esteroides radiactivos sirvieron como referencia para cuantificar las pérdidas durante todo el proceso. Posteriormente se añadieron las alícuotas del suero de los cocodrilos. Se realizó el proceso de extracción, adicionando 10 ml de tolueno y se agitaron en un mezclador de vibración; se congeló la fase acuosa en un baño de hielo seco-acetona y la fase orgánica, que contenía a los esteroides "libres", fue separada y evaporada a sequedad. A la fase acuosa se le agregó 20% de NaCl, se ajustó a pH 1 con ácido clorhídrico y se realizó una segunda extracción con 10 ml de acetato de etilo. La segunda fase acuosa se desechó y la fase orgánica se incubó a 37 °C durante 12 hrs, al término de las cuales se evaporó a sequedad. En la purificación, los residuos se transfirieron a cromatoplasmas de sílica-gel previamente desarrolladas en solución metanólica de EDTA 3mM y en éter etílico 100%. En zonas paralelas se aplicó un microgramo (mg) de cada uno de los esteroides por determinar, que sirvieron como punto de referencia. Las cromatoplasmas se desarrollaron inicialmente en benceno 100%; una vez secas, se pasaron a un sistema de benceno: acetato de etilo 1/8:2; finalmente y como en los casos anteriores, el frente del solvente se llevó hasta el borde superior de la cromatoplasma en el sistema saturado de benceno:metanol 1/95:5.

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

Para el análisis se construyó la curva tipo de cada esteroide, que se preparó agregando por duplicado alícuotas de una solución de concentración conocida con 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 y 250 nanogramos (ng), además de cuatro tubos de 0.0 ng. Tanto las alícuotas de las curvas tipo como las correspondientes a la muestra se evaporaron a sequedad en un horno a 40°C y al vacío. Se prepararon soluciones de anticuerpo en concentración de 1:1000 en una solución amortiguadora de fosfatos 0.2M a pH 7.0, conteniendo azida de sodio y gelatina, ambas al 1%; a estas soluciones se les agregó el esteroide radiactivo correspondiente, en cantidad suficiente para tener 5000 cpm en cada 500 ml de la solución.

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

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

Después de realizar el análisis, se determinó que los parámetros del control de calidad fueron aceptables, ya que con los sistemas de cromatografía

empleados se obtuvo una elevada especificidad; la sensibilidad, considerada como dosis mínima detectable fue de 5 pg/ml; los blancos fueron de 0.0 ng; en cuanto a precisión, en las diferentes dosis de la curva tipo se obtuvieron coeficientes de variación menores de 5%. La exactitud al tomarse como la recuperación de una cantidad conocida de masa fue superior al 70%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de los resultados obtenidos en la cuantificación de hormonas esteroides en sueros por RIA, se realizó un análisis de varianza (ANAVAS), que permitió la comparación de productos finales (testosterona y estradiol), en relación a la temperatura de incubación y con respecto al sexo, en las especies estudiadas, utilizando el paquete estadístico de SPSS.

Resultados

La actividad enzimática de la $\Delta 5-3\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa fue determinada por un precipitado denso, que es el diformazán.

En la región urogenital de organismos posteclosionados, ésta actividad se observó únicamente en la glándula adrenal (Fig. 1).

Con el empleo de la técnica inmunohistoquímica para laminina, se pudo observar mejor la estructura del testículo (Fig. 1a), en donde se evidencia la laminina, delimitando los cordones seminíferos. La actividad positiva de la enzima $\Delta 3\beta$ HSD, en los 10 complejos urogenitales de machos examinados, fue en la glándula adrenal.

Las hembras producidas a diferentes temperaturas, no presentaron variación en cuanto a la actividad de la $\Delta 5-3\beta$ HSD, siendo sólo positiva para la glándula adrenal, observándose la presencia de la laminina delimitando la zona cortical de la medular y rodeando las regiones medulares (Fig. 1b).

No se encontró actividad significativas de la enzima $\Delta 5-3\beta$ HSD, tanto en testículos, como en ovarios.

La cuantificación sérica de hormonas esteroides sexuales (HES), en organismos posteclosionados de las dos especies estudiadas, se determinaron por medio de RIA y presentándose como concentraciones en pg/ml.

En *C. acutus*, las concentraciones séricas de HES se muestran en la figura 2, encontrándose diferencias

significativas, entre los incubados a las temperaturas de 30 y 34°C, para testosterona [F(2,25)=92.99, p<0.05] y estradiol, [F(2,25)=315.95, p<0.05], observándose un incremento a la temperatura más alta (34°C).

Para *C. moreletii*, los niveles de HES, presentados en la figura 3, muestran diferencias significativas, a las tres temperaturas 30, 32 y 34°C, para pregnenolona [F(2,25)=315.95, p<0.05], androsterona [F(2,25)=7.41, p<0.05], testosterona [F(2,25)=136.84, p<0.05] y estradiol [F(2,25)=468.80, p<0.05], existiendo un incremento a mayor temperatura en la mayoría de las hormonas.

Se observaron diferencias entre las especies, en los niveles de pregnenolona, androsterona, dehidroepiandrosterona, con diferencias muy significativas en estradiol [F(5,60)=49.96, p<0.001] y en testosterona [F(5,60)=20.81, p<0.001].

En *C. moreletii*, a 30, 32 y 34°C, se puede ver el efecto de la temperatura de incubación, para estradiol y testosterona, en la figura 4.

Comparando los productos finales estradiol y testosterona, en ambas especies, a diferentes temperaturas, tenemos que, existen diferencias significativas entre hembras y machos, para el estradiol [F(4,48)=555.18, p<0.05] y testosterona [F(4,48)=115.26, p<0.05], como se muestra en la figura 5, encontrándose los niveles más altos para los machos.

Discusión

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

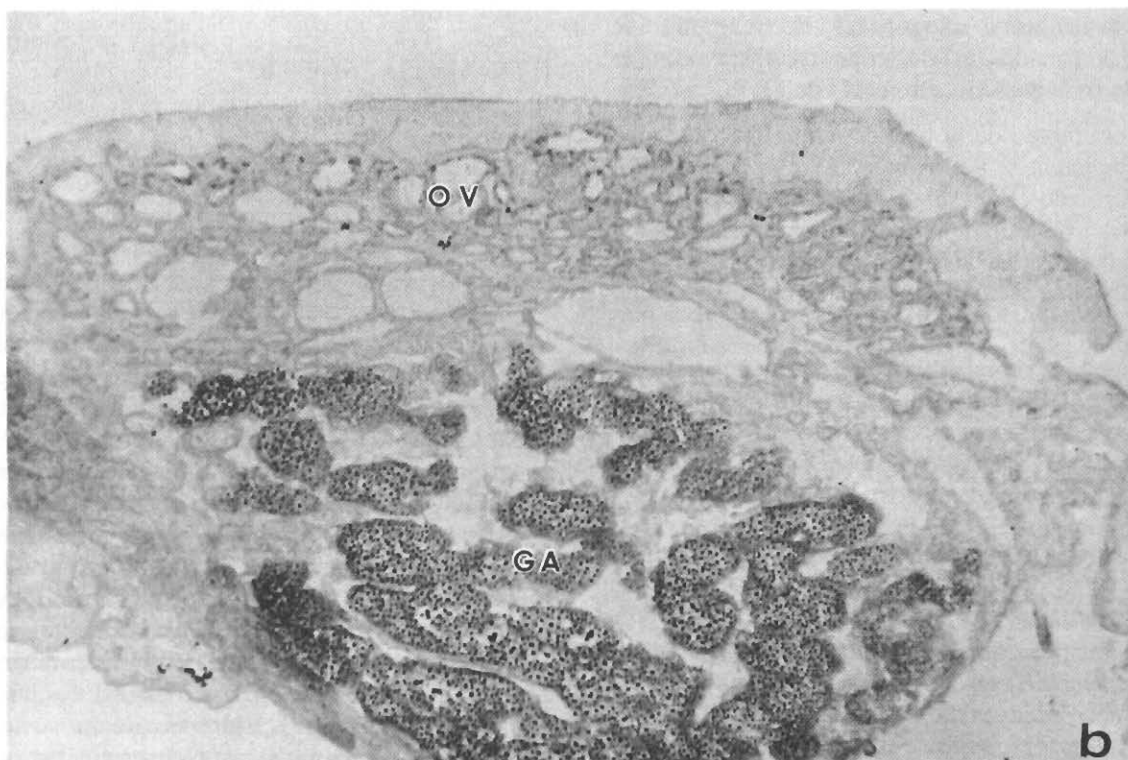
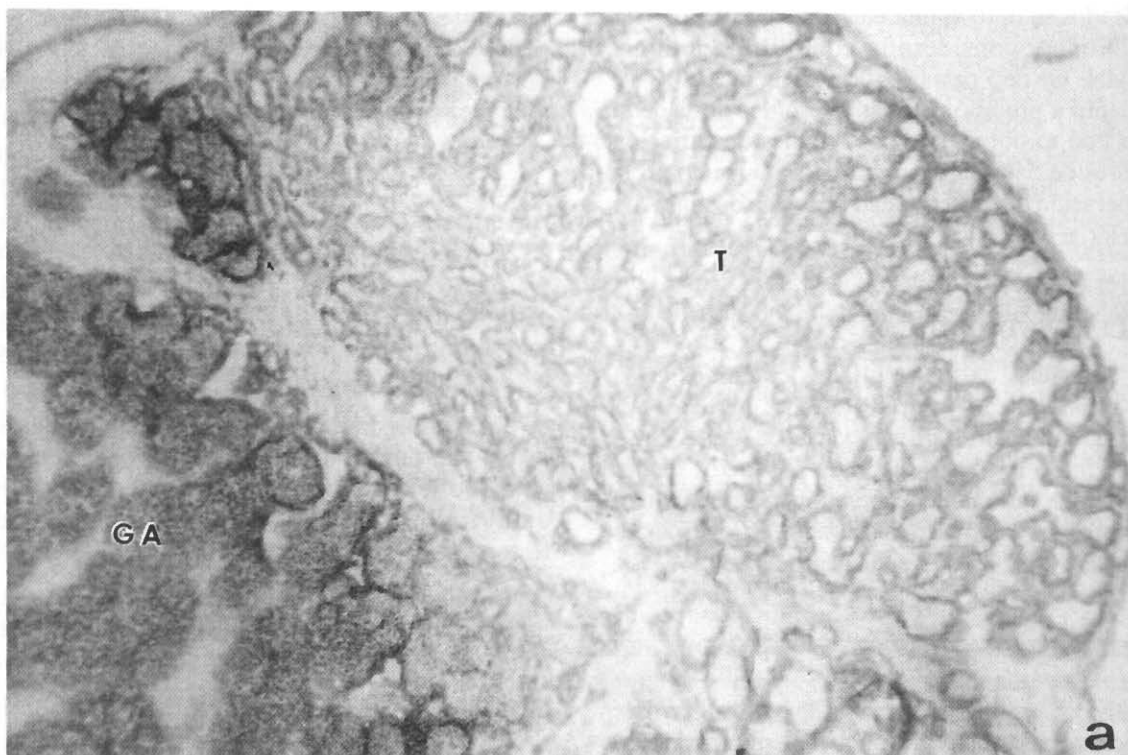


Figura 1. Micrograffa de luz, en la que se observa la reacción Δ 5-3 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa (5-3 β HSD) en complejos urogenitales. A. En machos, con reacción positiva en la glándula adrenal (GA), el Testículo (T) sin reacción X 20. B. En hembras, reacción positiva en la (GA) y sin reacción en el ovario (OV) X 16.

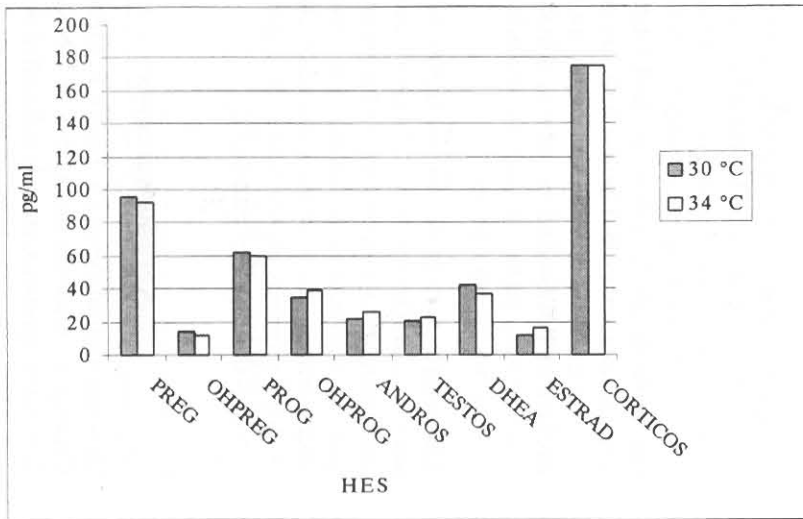


Figura 2. RIA (Concentración de HES en suero) en *Crocodylus acutus*.

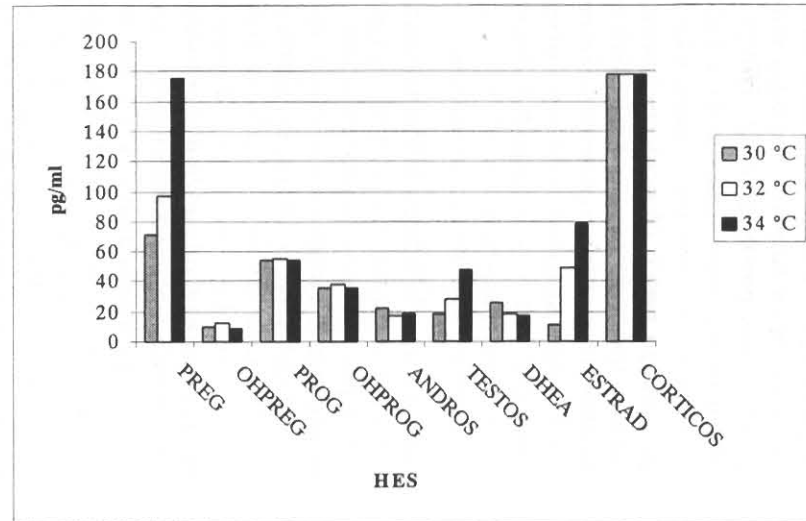


Figura 3. RIA (Concentración de HES en suero) en *Crocodylus moreletii*.

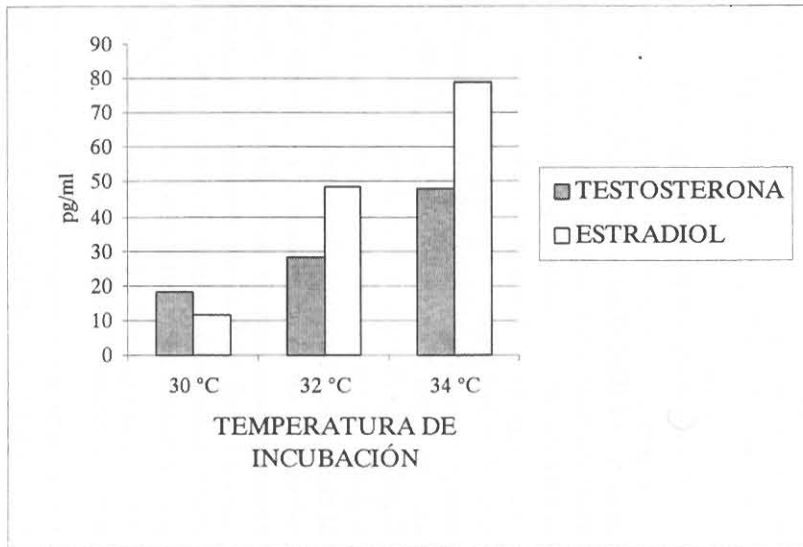


Figura 4. RIA (Concentración de productos finales de HES en suero), en *Crocodylus moreletii*.

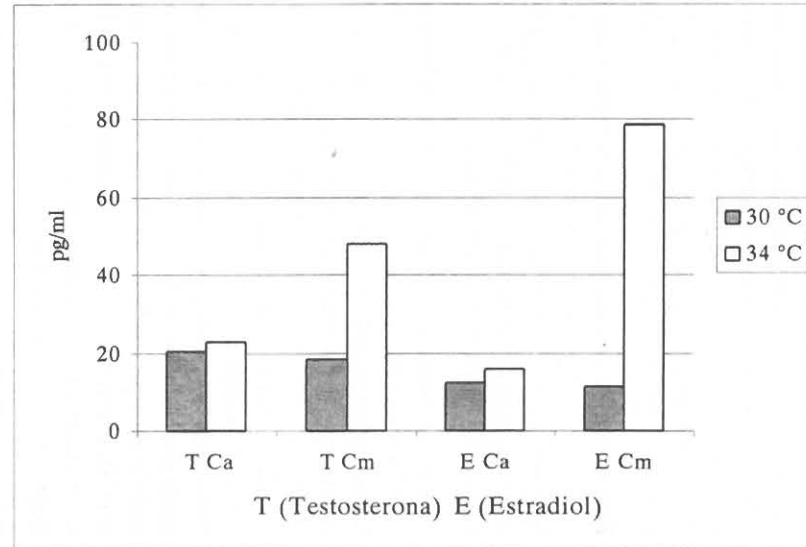


Figura 5. RIA (Concentración de productos finales de HES en suero) en *Crocodylus acutus* (Ca) y *C. moreletii* (Cm).

exógenos (y en algunos casos andrógenos), causando una feminización parcial o completa en muchas especies con DST, cuando son administrados en el período sensible de la diferenciación gonadal (Gutzke and Bull, 1986; Bull, Gutzke and Crews, 1988; Crews and Bull, 1987; Crews *et al.*, 1989; Pieau *et al.*, 1989).

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

Una de las enzimas que más se han estudiado es la $\Delta 5$ - 3β hidroxisteroide deshidrogenasa ($\Delta 5$ - 3β HSD). La actividad de ésta enzima se determina através de un proceso de oxidación-reducción, el cual es dependiente del Nicotinamide Adenine Dinucleótido (NAD) en su forma oxidada. El resultado de ésta reacción es un precipitado morado insoluble llamado "formazán", cuyo depósito nos permite localizar el tejido esteroideogénico. Esta técnica proporciona información de tipo cualitativo, de tal manera que, la reacción enzimática puede ser clasificada como positiva si hay detección del precipitado y permite identificar *in situ* el tejido que lo presente.

En el caso particular de reptiles con determinación del sexo dependiente de la temperatura, la actividad enzimática de la $\Delta 5$ - 3β HSD, ha sido determinada en embriones de *Emys orbicularis*, en los que muchos andrógenos se encontraron a más altas concentraciones en testículo, que en ovario y con intensa actividad de la $\Delta 5$ - 3β HSD (Pieau, *et al.*, 1982). Joss (1989), hizo una observación similar para *A. mississippiensis*; en este estudio los resultados no denotan actividad esteroideogénica en la gónada, en contraste con lo registrado por Joss, sin embargo, esta actividad es muy positiva en la glándula adrenal, de igual forma a lo citado por Merchant-Larios *et al.*, (1989), para *Lepidochelys olivacea*. Las evidencias mencionadas sugieren que: la diferenciación sexual gonadal se da, al regularse el metabolismo de andrógenos y/o estrogénos en *E. orbicularis* y en el caso del *A. mississippiensis*, aunque se señala la reacción positiva de la $\Delta 5$ - 3β HSD en gónada, no se presenta evidencia morfológica de la reacción; para *C. acutus* y *C. moreletii*, aquí estudiadas, así como para *L. olivacea*, la regulación metabólica de HES, parece darse mediante la glándula adrenal.

En relación con la cuantificación de los niveles de hormonas esteroideas sexuales en suero de los cocodrilos, resulta difícil hacer una comparación,

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

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

A manera de conclusión, se puede decir que, en las dos especies de cocodrilo estudiadas, la actividad esteroideogénica del complejo urogenital, fue detectado solamente en la glándula adrenal, por lo que parecería que la gónada no está interviniendo directamente en el metabolismo de las hormonas esteroideas sexuales. Sin embargo, no hay que excluir la posibilidad de que la gónada posea aromatasas, para la transformación de los andrógenos en estrógenos.

Los niveles séricos de las hormonas esteroideas sexuales (HES), mostraron diferencias cualitativas, entre hembras y machos. Sin embargo, se observó que la temperatura regula los niveles de androsterona, testosterona y estradiol. Asimismo, existen diferencias en los niveles de algunas HES, entre las dos especies estudiadas.

Agradecimientos

Deseamos agradecer al Dr. Fausto R. Méndez de la Cruz del Instituto de Biología de la UNAM, al Dr. Luis Felipe Jiménez García de la Facultad de Ciencias de la UNAM y al Dr. Enrique Pedernera Astegiano

de la Facultad de Medicina de la UNAM y a dos revisores anónimos, por las críticas y sugerencias que contribuyeron a enriquecer este trabajo. Al Biól. Luis Octavio de Luna Cuevas por el apoyo logístico en la costa de Jalisco. Finalmente a la Fundación Ecológica de Cuixmala, A.C., al Hotel Careyes de la costa de Jalisco, por permitirnos el ingreso a sus instalaciones y al Gobierno del Estado de Tabasco por habernos permitido utilizar material de la Granja de Cocodrilos de Buenavista.

Literatura citada

- Aguilar-Miguel, X. 1994.** *Efecto de la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo en *Crocodylus acutus* y *C. moreletii**. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, Univ. Nal. Autón. México. 63 p.
- Bogart, M. H. 1987.** Sex determination: A Hypothesis based on steroid ratios. *J. Theor. Biol.*, 128: 349-357.
- Bull, J. J. 1980.** Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.* 55: 3-21
- Crews, D., and J.J. Bull. 1987.** Evolutionary insights from reptilian sexual differentiation. In F. P. Haseltine, M.F. Mc Clure, and E. H. Goldberg (eds.), *Genetic Markers of Sex differentiation*. Pp. 11-26. Plenum, New York.
- Crews, D., J.J. Bull, and A. J. Billy. 1988.** Sex determination and sexual differentiation in reptiles. In J. M. D. Sitsen (ed.), *Handbook of Sexology Vol. 6: The Pharmacology and endocrinology of Sexual Function*. Pp. 98-121. Elsevier Science Publ., New York.
- Crews, D. T. Wibbles, and W. H. N. Gutzke. 1989.** Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen Comp. Endocrinol.*, 76: 159-166.
- Engel, W., B. Klemme, and M. Schmid. 1981.** H-Y antigen and sex determination in turtles. *Differentiation*, 20: 152-156.
- Gutzke, W. H. N. 1987.** Sex determination and sexual differentiation in reptiles. *J. Herpetol.*, 1: 122-125.
- Gutzke, W. H. N. and D. Crews. 1988.** Embryonic temperature determines adult sexuality in a Reptile. *Nature*, 332: 832-83.
- Janzen, J. F. and G. L. Paukstis. 1991.** Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology* 2: 149-179.
- Joss, J. M. P. 1989.** Gonadal development and differentiation in *Alligator mississippiensis* at male and female producing incubation temperatures. *J. Zool. Lond.*, 218: 679-687.
- Merchant-Larios, H., I. Villalpando Fierro and B. Centeno Urriza. 1989.** Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3: 43-61.
- Merchant-Larios, H., and I. Villalpando. 1990.** Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *J. Exp. Zool.*, 254: 327-331.
- Paukstis, G. L., and F. J. Janzen. 1990.** Sex determination in reptiles: Summary of effects of constant temperatures of incubation on sex ratios of offspring. *Smithson. Herpetol. Info. Serv.*, 83: 1-28.
- Pieau, C., T. Mignot, M. Dorizzi, and A. Guichard. 1982.** Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L.: A preliminary study in embryos, hatchings, and young as a function of the incubation temperature of eggs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47: 392-398.
- Pieau, C., M. Dorizzi, and G. Desvages. 1989.** *Mechanisms involved in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in amphibians and reptiles*. In T. Halliday, K. Baker, and L. Hosie (eds), First World Congress of Herpetology, 11-19. September 1989 (abstr). University of Kent, Caterbury.
- Reynaud, A. and C. Pieau. 1985.** *Embryonic development of the genital system*. In: Biology of Reptilia. Vol. 15, Development B. C. Gans, and F. Billeteds. John Wiley & Sons, Ney York. pp. 149-300.
- RaymoSalame-Méndez, P. A. 1992.** *La Temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroides sexuales y su relación en el establecimiento gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1929)*. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, Univ. Nal. Autón. México
- Zaborski, P., M. Dorizzi, and C. Pieau. 1979.** Sur l'utilisation desérum anti-H-Y de souris pour la détermination du sexe génétique chez *Emys orbicularis* L. (Testudines Emydidae). *C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris (Ser. D)*, 288: 351-354.