

Influencia de la Temperatura de Incubación en la Determinación del Sexo en Quelonios

Influence of incubation temperature in sex determination in chelonians

Arturo Salame-Méndez*

RESUMEN

En este trabajo se resumen las hipótesis propuestas que tratan de explicar cómo la temperatura de incubación (TI) determina el sexo y regula la diferenciación gonadal en tortugas. Asimismo, se describen y analizan las evidencias experimentales a partir de las cuales, se han estado esclareciendo los mecanismos de la determinación del sexo por la TI, así como la diferenciación gonadal en las siete especies de quelonios sexo-termodependientes más estudiadas.

Palabras clave: sexo, temperatura de incubación, tortugas, quelonios.

ABSTRACT

The hypothesis proposed to explain how the temperature acts in sex determination are summarized. Also, evidences that support these hypothesis are reviewed and analyzed, especially those related to the seven most studied temperature-dependent sex determination species of turtles.

Key words: sex, incubation temperature, turtles, chelonians.

Introducción

En la evolución de las especies, la reproducción ha sido el evento fundamental para su perpetuación. Este hecho biológico es la integración en el tiempo y el espacio de procesos etológicos, fisiológicos y moleculares que confluyen en el desarrollo y madurez sexual de las especies animales (Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, en prensa). Sin embargo, para reproducirse las especies han tenido que sortear diversas vicisitudes y así los vertebrados han experimentado estrategias reproductivas para adaptarse a los constantes cambios del ambiente como ocurre con el fotoperiodo (ciclos circadiano y circanual), cambios que resultan, a su vez, en fluctuaciones en la temperatura (Holmes, 1968; van Tienhoven, 1983). Las fluctuaciones ambientales han causado, por ejemplo, la extinción en masa de reptiles (v. gr., los dinosaurios, Reader, 1991), pero también han participado como moduladores de la reproducción (Sadleir, 1969). De hecho, algunas

especies de vertebrados de las clases Pisces (Conover y Heins, 1987; Lagomarsino y Conover, 1993), Anfibia (Dournon *et al.*, 1990; Chardard *et al.*, 1995) y Reptilia (Spotila *et al.*, 1994) han sacado ventaja del factor temperatura ambiental de tal manera que éste actúa como modulador epigenético en la determinación del sexo. En los reptiles, entre las más de 6500 especies reconocidas, se ha demostrado que en 52 de ellas, pertenecientes a los órdenes Chelonia, Crocodylia y Sauria (Janzen y Paukstis, 1991), la temperatura de incubación (TI) determina el sexo. Por ejemplo, los huevos de un nido al ser incubados en un intervalo de temperatura de 26-28°C el 100% de la descendencia es masculina (temperatura masculinizante) o al ser incubados a 30-32°C, el 100% de la descendencia será femenina (temperatura feminizante) (Vogt y Flores-Villela, 1986).

En este trabajo se presentan las hipótesis propuestas que tratan de explicar como la TI determina el sexo y regula la diferenciación gonadal en tortugas. También se describen las estrategias experimentales llevadas al cabo para estudiar la determinación del sexo por la TI y la diferenciación gonadal a partir

* Departamento de Biología de la Reproducción, División de C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Apartado Postal 55-535, México D.F. 09340.

de las hipótesis planteadas. Discutiéndose las evidencias obtenidas de cada estrategia experimental y, en base de estas, se han planteado algunos mecanismos que explican como se lleva a cabo la determinación del sexo por la TI, así como la diferenciación gonadal en quelonios sexo-termodependientes.

Antecedentes y evidencias

Con sus estudios sobre diferenciación sexual en anuros, Witschi (1914a,b;1929) demuestra que la temperatura del agua del acuario determinaba el sexo de las larvas que se desarrollaban ahí. Luego, Uchida (1937) y Yoshikura (1959) en urodolos y Harrington (1967) en peces, corroboraron lo mismo.

En reptiles, Risley (1933) encontró la primera evidencia sobre el efecto de la TI en la diferenciación gonadal en tortugas. Huevos de la tortuga *Sternotherus odoratus* que provenían de una TI mayor a los 30°C y los colocaba a una temperatura inferior a la de procedencia, los ovarios de los embriones se revertían en testículos. Treinta y tres años después el efecto de la TI fue observado en otro reptil. Charnier (1966) al estudiar la biología reproductiva de la lagartija *Agama agama*, demostró que si los huevos de esta especie los incubaba a una temperatura constante de 27°C se desarrollaban principalmente hembras y a 29°C machos.

A partir del trabajo de Charnier (1966) fue hasta la década de los 70's que se acrecentó el interés por estudiar el efecto que tiene la TI sobre la determinación del sexo como de la diferenciación gonadal en los reptiles. A partir de lo cual se han publicado trabajos sobre las implicaciones evolutivas (Bull, 1983), ecológicas (Vogt y Bull, 1982) y conservacionistas (Mrosovsky y Yntema, 1980), así como los aspectos básicos del dimorfismo sexual gonadal con estudios morfológicos (Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990; Merchant-Larios *et al.*, 1989, 1997) y bioquímicos (Pieau *et al.*, 1994a; Salame-Méndez *et al.*, 1998).

Las hipótesis

Raynaud y Pieau (1985) al trabajar con la tortuga *Emys orbicularis*, postulan la primera hipótesis para explicar la influencia de la TI en la determinación del sexo y la diferenciación del primordio gonadal en testículos u ovarios. Para lo cual se basaron en

el periodo termosensible o crítico, en el antígeno de histocompatibilidad H-Y, así como la producción de estrógenos. El periodo termosensible o crítico, es la etapa del desarrollo embrionario en la cual la TI determina el sexo; ni antes ni después de éste la temperatura produce algún efecto en la diferenciación sexual. Cabe mencionar que el antígeno H-Y fué propuesto como el factor determinante del testículo (FDT o TDF: testicular determining factor), independientemente de que se tratara de especies heterogaméticas XY o ZW (Wachtel y Koo, 1981). Sin embargo, McLaren *et al.* (1984) y Simpson *et al.* (1987) refutaron experimentalmente que este antígeno de histocompatibilidad fuera el FDT.

Raynaud y Pieau (1985) proponen que los embriones con un primordio gonadal H-Y⁺ y que se desarrollan a 29°C (temperatura feminizante) durante el periodo termosensible se estimula: i) la biosíntesis del antígeno H-Y y su receptor y ii) la producción de estrógenos y a partir de estos dos procesos se lleva al cabo la diferenciación de los ovarios (Fig. 1a). Por el contrario, si el primordio gonadal de los embriones es H-Y⁻ y se desarrollan a 27°C (temperatura masculinizante), la producción de los estrógenos será baja o nula resultando en la diferenciación de los testículos (Fig. 1a).

Crews *et al.* (1989) proponen una segunda hipótesis a partir de sus resultados obtenidos en la tortuga *Chelydra serpentina*. Estos autores sugieren que la determinación del sexo en esta especie, así como para otras tortugas donde su sexo se determina por la TI como en *Chrysemys picta*, se debe a la regulación diferencial en la biosíntesis de hormonas esteroides sexuales (HES). En primer lugar, la TI en el vitelo regula la liberación tanto de precursores como de HES como son la pregnenolona (P5), progesterona (P4), testosterona (T) y estradiol (E2). Además la TI regula de manera diferencial la producción de andrógenos o estrógenos en las gónadas y/o interrenales embrionarias (Fig. 1b). La diferenciación gonadal femenina se lleva al cabo a través de que la TI feminizante estimula la acción de la aromatasa (enzima que biotransforma andrógenos como la T en estrógenos), lo que favorece la mayor producción de estrógenos. Los estrógenos como el E2, al antagonizar la acción de los andrógenos, estimularán el desarrollo de la región epitelial somática de la corteza del primordio gonadal, dando como resultado la diferenciación de los ovarios (Fig. 1b).

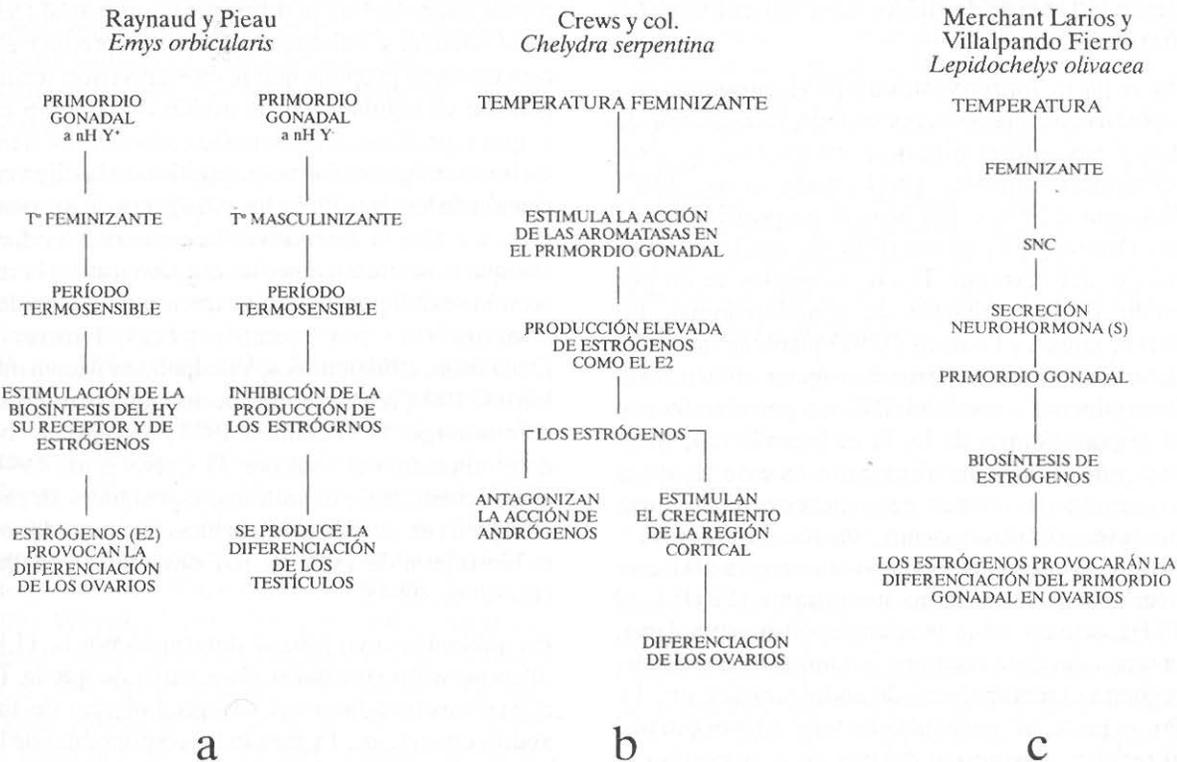


Fig. 1. Las tres primeras hipótesis propuestas sobre quelonios sexo-termodependientes que tratan sobre como la temperatura de incubación determina el sexo y la diferenciación gonadal. a) Hipótesis de Raynaud y Pieau (1985) basada en la tortuga *Emys orbicularis*. anHY⁺ = antígeno de histocompatibilidad HY positivo; T° feminizante = temperatura de incubación feminizante (29°C); HY = antígeno de histocompatibilidad; E2 = estradiol; anHY⁻ := antígeno de histocompatibilidad HY negativo; T° masculinizante = temperatura de incubación masculinizante (27°C). b) Hipótesis de Crews *et al.* (1989) basada en la tortuga *Chelydra serpentina*. E2 = estradiol. c) Hipótesis de Merchant-Larios y Villalpando-Fierro (1990) basada en la tortuga *Lepidochelys olivacea*. SNC = sistema nervioso central.

A partir de la hipótesis anterior Crews y Bergeron (1994) proponen que la determinación del sexo por la TI en la tortuga *Trachemys scripta* se debe a la regulación del metabolismo de la T. La diferenciación sexual gonadal masculina se debe a que la TI masculinizante, favorece la expresión de los genes de las reductasas como del gen que codifica para el receptor de la dihidrotestosterona (DHT). Tanto la TI masculinizante junto con la DHT inhiben el gen de la aromatasa como del receptor a estrógenos. De tal manera, la enzima 5 α -reductasa al biotransformar la T en DHT y al estar presente su receptor, esta hormona llevaría al cabo la diferenciación de los testículos. En el caso de la diferenciación sexual femenina, la TI feminizante regula tanto la expresión del gen de la aromatasa como la expresión del gen del receptor a estrógenos. De tal manera que la diferenciación de los ovarios se daría a partir de que el gen de la 5 α -reductasa al

permanecer de manera constitutiva, el E2 reprimiría al gen del receptor para la DHT o por un mecanismo de retroalimentación negativa el E2 reprimiría al gen de la 5 α -reductasa.

Merchant y Villalpando (1990) postulan una tercera hipótesis a partir de sus previos estudios en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989). Estos autores proponen que la TI feminizante actúa de manera indirecta, es decir, a nivel extragonadal llevándose al cabo la diferenciación de los ovarios a través de inducir a nivel del sistema nervioso central (SNC) la secreción de una(s) neurohormona(s). Su modelo es el siguiente (Fig. 1c), la TI feminizante modula la secreción de la(s) neurohormona(s) que actuaría como factor morfogenético sobre el primordio gonadal. En este tejido la neurohormona estimulará la aromatización y, los estrógenos producidos como el E2,

desencadenarán la diferenciación gonadal femenina.

Por su parte, Janzen y Paukstis (1991) proponen otra hipótesis que relaciona, por un lado, la regulación de genes sexo-determinantes en quelonios sexo-termodependientes (Nakamura *et al.*, 1987; Nakamura, 1989) y, por otro, la proposición hecha por Deeming y Ferguson (1989) de que la determinación del sexo por TI en cocodrilos se da por medio de la regulación de gonadotropinas. En breve, Jansen y Paukstis (1991) plantean que la TI determina el sexo a partir de regular un gen sexo-determinante a nivel del SNC y/o gonadal. Siendo el órgano blanco de la TI el hipotálamo; favoreciendo la TI masculinizante en este tejido la expresión de un gen sexo-determinante cuya proteína al actuar como "molécula efectora", propiciaría en el hipotálamo la secreción del factor liberador de la hormona luteinizante (FLHL). El FLHL actuará sobre la adenohipófisis estimulando la secreción de la hormona luteinizante, misma que regulará el metabolismo de andrógenos (v. gr., T). Por su parte, la "molécula efectora" a nivel gonadal al regular la expresión del gen de la aromatasa se llevará al cabo la biosíntesis de los estrógenos (v. gr., E2).

Es evidente que las hipótesis descritas no necesariamente son excluyentes sino concuerdan en que la TI directa y/o indirectamente: i) actúa en la determinación del sexo en un estadio específico del desarrollo (periodo termosensible o crítico) y ii) a partir de la regulación en la producción de estrógenos, se llevará a cabo la diferenciación sexual gonadal. A partir de estos puntos coincidentes, se estructura la siguiente hipótesis integrativa que es la que actualmente se toma como hipótesis de trabajo en este tema. En quelonios sexo-termodependientes: i) la TI feminizante durante el periodo termosensible determina el sexo y a nivel gonadal y/o del SNC estimula la biosíntesis de estrógenos (aromatización), resultando la diferenciación de los ovarios; ii) la TI masculinizante durante el periodo crítico, no estimula ni a nivel gonadal ni del SNC la aromatización, resultando la diferenciación de los testículos.

Discusión

El hecho de que las HES sean el común denominador en las hipótesis descritas, se fundamenta en la

teoría hormonal de la diferenciación sexual (Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, en prensa). En esta teoría se propone que la diferenciación sexual gonadal es regulada por la acción de las HES en etapas específicas del desarrollo embrionario, siendo los andrógenos los responsables de la diferenciación de los testículos y los estrógenos de los ovarios. La teoría hormonal tiene varias evidencias que la favorecen entre las que destacan: i) la reversión sexual por la administración de esteroides sexuales (ver por ejemplo peces, Hunter y Donaldson, 1983; anfibios, Villalpando y Merchant-Larios, 1990; reptiles, en especies cuyo sexo no se determina por la TI Gallien, 1973 y en especies con determinación del sexo por TI Crews *et al.*, 1994; aves, Scheib, 1983; mamíferos, marsupiales Burns, 1961) y ii) en ausencia de enzimas involucradas en la biosíntesis de HES no hay desarrollo gonadal (Luo *et al.*, 1994).

En quelonios cuyo sexo se determina por la TI la diferenciación gonadal se da a partir de que la TI masculinizante favorece el metabolismo de los andrógenos (v. gr., T), siendo los responsables de la diferenciación testicular. La TI feminizante favorecería el metabolismo de los estrógenos (v. gr., E2), siendo estos los moduladores de la diferenciación de los ovarios. Esta hipótesis integrativa ha sido puesta a prueba en siete especies de quelonios sexo-termodependientes, cinco de ellas dulceacuícolas -*Chelydra serpentina* (Crews *et al.*, 1994); *Emys orbicularis* (Pieau *et al.*, 1994b); *Malaclemys terrapin* (Jeyasuria *et al.*, 1994); *Testudo graeca* (Pieau, 1975) y *Trachemys scripta* (Wibbels *et al.*, 1991b), - y dos marinas -*Dermochelys coriacea* (Desvages *et al.*, 1993) y *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios y Villalpando-Fierro, 1990; Salame-Méndez *et al.*, 1998)-. En general, se han llevado a cabo tres estrategias experimentales: i) administrar HES como de agonistas de estas; ii) dilucidar su biosíntesis y iii) determinar la presencia de sus receptores.

Para abordar la primera estrategia se han administrado andrógenos: androstendiona (Crews *et al.*, 1995), T (Pieau, 1974; Gutzque y Bull, 1986; Gutzque y Chymiy, 1988; Crews *et al.*, 1989), DHT (Wibbels y Crews, 1995; Wibbels *et al.*, 1991b). Estrógenos: E2 (Pieau, 1969, 1970; Bull *et al.*, 1988b; Gutzque y Chymiy, 1988; Crews *et al.*, 1991; Dorizzi *et al.*, 1991; Wibbels *et al.*, 1991a; Crews *et al.*, 1994; Wibbels y Crews, 1995; Merchant-Larios *et al.*, 1997), estrona

(Crews *et al.*, 1995). Así como el de administrar anticuerpos contra T, E2 como de moléculas con mayor actividad (agonistas) androgénica o estrogénica (Crews *et al.*, 1989; Wibbels y Crews, 1995).

La segunda estrategia experimental, que es la determinación de la biosíntesis de HES, se ha abordado de la siguiente manera: i) caracterizar histoquímicamente la actividad de enzimas esteroideogénicas en tejidos urogenitales durante diversos periodos del desarrollo embrionario (Pieau, 1972, 1973, 1974; Merchant-Larios *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1992); ii) evaluar la actividad de la aromatasa (proceso de aromatización) (Desvages y Pieau, 1992a, b; Desvages *et al.*, 1993; Crews y Bergeron, 1994; Crews *et al.*, 1994; Jeyasuria *et al.*, 1994), así como la de bloquear farmacológicamente su actividad (Crews y Bergeron 1994; Rhen y Lang, 1994; Dorizzi *et al.*, 1994; Wibbels y Crews, 1994); iii) evaluar los niveles circulantes de diversos esteroides sexuales (Pieau *et al.*, 1982; Dorizzi *et al.*, 1991; White y Thomas, 1992b; Salame-Méndez *et al.*, 1998); iv) determinar la biosíntesis *in vitro* de andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, así como determinar sus concentraciones endógenas en tejidos urogenitales, que incluyen gónadas, mesonefros e interrenales en diferentes etapas de la diferenciación sexual gonadal (Desvages y Pieau, 1991; Salame-Méndez, 1992; White y Thomas, 1992a; Desvages *et al.*, 1993; Salame-Méndez *et al.*, 1998), así como en el cerebro (Salame-Méndez *et al.*, 1998).

Con respecto a la tercera estrategia, se ha establecido la presencia del receptor a estrógenos, complejo citoplasmático 9S, en las gónadas, mesonefros e interrenales de embriones de ambos sexos (Salame-Méndez, 1992) y por autorradiografía en órganos urogenitales embrionarios (Gahr *et al.*, 1992). También, se ha bloqueado este receptor durante la diferenciación gonadal femenina (Dorizzi *et al.*, 1987, 1991; Crews *et al.*, 1994; Wibbels y Crews, 1995).

Otras estrategias experimentales que se han llevado al cabo son las siguientes: i) determinación de antígenos de superficie como el H-Y (Engel *et al.*, 1981; Zaborski *et al.*, 1988); ii) presencia de proteínas de shock térmico (Schlesinger, 1989) y iii) determinar la presencia de genes sexo-determinantes previamente demostradas en otras clases de vertebrados (ZFY, Bull *et al.*, 1988a; SRY, Tiersch

et al., 1991; Coriat *et al.*, 1994; Spotila *et al.*, 1994), así como de secuencias de ADN del cromosoma W (Bkm) (Demas y Wachtel, 1990; Demas *et al.*, 1990). Los resultados de esta última estrategia experimental, han demostrado que estos genes o algunas de sus secuencias, están presentes en animales de ambos sexos. Sin embargo, resta determinar su presencia en tejidos embrionarios, así como el estudiar en que momento de la ontogenia de la diferenciación sexual gonadal estos genes se expresan y que es lo que regulan.

Los resultados obtenidos en las siete especies de quelonios sexo-termodependientes a partir de la estrategia experimental de la administración de estrógenos como de agonistas, así como de bloquear tanto la aromatización como el receptor a estrógenos, se resumen como sigue: i) los estrógenos administrados vencen el efecto de la TI masculinizante, de tal manera que se desarrollan ovarios; ii) los anticuerpos contra estrógenos y el bloqueo de la aromatización provocan que se diferencien testículos en los embriones desarrollados a la TI feminizante y iii) al inhibir el receptor a estrógenos en embriones desarrollados a la temperatura feminizante, se desarrollan testículos. Estas evidencias claramente dejan ver que la TI feminizante por medio de los estrógenos, se lleva al cabo la diferenciación de los ovarios.

Es importante remarcar que a pesar de que estas evidencias apoyan la hipótesis de que la diferenciación sexual femenina en tortugas sexo-termodependientes es estrógeno-dependiente, son evidencias experimentales de tipo farmacológico, por lo que tal vez no sean aplicables a las condiciones fisiológicas de los organismos. Por ejemplo, el E2 administrado a embriones desarrollados a la TI masculinizante en efecto, provoca la formación de ovarios (Wibbels *et al.*, 1992) pero son de menor tamaño que los desarrollados normalmente (Merchant-Larios *et al.*, 1997) o causar efectos teratogénicos (Pieau, 1975), así como de observarse un efecto paradójico al administrar T a embriones desarrollados a la TI masculinizante (Gallien, 1973; Pieau, 1975).

Por su parte, los resultados referentes a los estudios de la segunda estrategia experimental que se refiere a la producción de HES, se agrupan en dos patrones: i) la existencia de una relación entre la TI, el favorecimiento de la producción de HES a

nivel gonadal y su subsecuente diferenciación, y ii) la existencia de una relación entre la TI y el favorecimiento de la producción de HES a nivel de las interrenales, así como del SNC durante los periodos de la diferenciación sexual gonadal.

Con respecto al primer patrón hay dos variantes. La primera, ha sido demostrada en las tortugas *Emys orbicularis* (Desvages y Pieau, 1991, 1992a, b), *Malaclemys terrapin* (Jeyasuria *et al.*, 1994) y *Dermochelys coriacea* (Desvages *et al.*, 1993). Durante la etapa de la diferenciación gonadal femenina y bajo el efecto de la TI feminizante en las tres especies es mayor la actividad de la aromatasas, lo que sugiere que la producción de estrógenos se favorece. Sin embargo, hay evidencias que no apoyan la proposición anterior. Pieau (1972, 1973, 1974) en *E. orbicularis* al evaluar histoquímicamente la actividad de la enzima 3 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3 β -HED), sólo la encontró enzimática en tejidos urogenitales masculinos. Por otra parte Pieau *et al.* (1982) al determinar en *E. orbicularis* los niveles circulantes de HES (v. gr., E2) la concentración de los estrógenos no es mayor que la de los andrógenos en los embriones desarrollados a la TI feminizante. Además, en esta misma especie, al estudiar durante el periodo termosensible la biotransformación de precursores a estrógenos (Desvages y Pieau, 1991), así como el determinar por cromatografía de alta presión (HPLC) diversos esteroides en las gónadas de embriones desarrollados a la temperatura feminizante (Desvages y Pieau, 1991) sólo hay trazas de estrógenos (estradiol y estrona), siendo además muy bajos los niveles endógenos de estos estrógenos (Dorizzi *et al.*, 1991; Desvages y Pieau, 1992a).

La segunda variante se encuentra en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*. En esta especie, al determinar los niveles circulantes y endógenos en las gónadas, los mesonefros y en las interrenales de esteroides sexuales (pregnenolona, P5; dehidroepiandrosterona, DHA; progesterona, P4; 17-hidroxiprogesterona, 17P4; androstendiona, A y corticosterona, C), así como de analizar la capacidad de biotransformar precursores de HES en T y E2, así como de otros metabolitos (DHA, P4, 17P4, A y C) durante las etapas de predeterminación y determinación sexual, la concentración de la T en las hembras es mayor a nivel sérico como gonadal (Salame-Méndez, *et al.* 1998). Además, en

los ovarios y testículos de embriones no hay diferencia en la biosíntesis de E2 (Salame-Méndez, 1992; Salame-Méndez *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que en *L. olivacea* la TI regula a nivel gonadal la expresión del gen y/o la actividad de la enzima 17 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 β -HED) que biotransforma la androstendiona en testosterona y no de las aromatasas.

En el segundo patrón también se presentan dos variantes. La primera corresponde a *Trachemys scripta* donde Thomas *et al.* (1992) al estudiar por histoquímica la actividad de tres hidroxilasas (3 α -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa; 3 β -HED y la 17 β -HED) sólo encontraron su actividad en el complejo tisular mesonefros-interrenal sin diferencias entre embriones masculinos y femeninos. Este hallazgo fue corroborado por White y Thomas (1992a, b, c) quienes al estudiar la biosíntesis de P4, T, E2 y C, demostraron que únicamente el complejo tisular mesonefros-interrenal lo lleva a cabo antes de la diferenciación gonadal femenina. Con estas evidencias, así como lo demostrado por Merchant-Larios *et al.* (1989) de que sólo en las interrenales se hace evidente la actividad de la enzima 3 β -HED, White y Thomas (1992a, b) proponen que a partir del complejo mesonefros-interrenal se regula la diferenciación sexual gonadal. Por otro lado, en las gónadas de embriones de *Emys orbicularis* desarrollados a la temperatura feminizante la concentración de los estrógenos son mayores (Desvages y Pieau, 1992a).

La segunda variante se da en *Lepidochelys olivacea*, especie en la cual, la concentración de T y E2, así como de P5 y P4 son mayores en el cerebro (diencéfalo) de las hembras durante los periodos de determinación del sexo, antes y durante la diferenciación morfológica de la gónada (Salame-Méndez *et al.*, 1998). Lo anterior apoya la hipótesis de Merchant y Villalpando (1990), quienes proponen que el sensor primario de la TI es el SNC y que la diferenciación gonadal se da a partir de la producción de factores neurohormonales, los cuales podrían ser regulados por la acción de las HES biosintetizadas en el diencéfalo. Especulando que las neurohormonas fuesen las mismas hormonas esteroides, como por ejemplo, la P5 y/o la P4. Se ha demostrado que la P5 y la P4 como sus metabolitos 5 α -reducidos regulan la neurotransmisión como la mielinización, de tal manera que a nivel del SNC se consideran como neuroesteroides (Koenig *et al.*, 1995).

Tanto los resultados obtenidos en *T. scripta* como en *L. olivacea* apoyan la hipótesis de Merchant y Villalpando (1990) más que la proposición de que la TI determina el sexo a partir de regular el metabolismo de HES (v. gr., E2) a nivel gonadal como lo postulan Pieau *et al.* (1987) y Crews *et al.* (1989). Por tal motivo, la regulación de la esteroidogénesis es independiente de que se lleve a cabo directa o indirectamente sobre las células gonadales. Además las evidencias aportadas por Merchant-Larios *et al.* (1997) y Salame-Méndez *et al.* (1998) en *L. olivacea* ponen aún más en tela de juicio la proposición de Pieau *et al.* (1987) de que la TI feminizante de manera directa, es decir a nivel gonadal, favorezca la producción de los estrógenos.

Los patrones anteriormente descritos, permiten apreciar lo complejo que hasta la fecha ha sido, al menos para estas siete especies de quelonios sexo-termodependientes, establecer un modelo general que describa como la TI determina el sexo y regula la subsecuente diferenciación gonadal a través de una producción diferencial de HES. Además, el de correlacionar durante la morfogénesis gonadal el efecto de la TI como el de las HES. A este respecto Pieau (1978) propuso en *Emys orbicularis*: i) la TI modula la morfogénesis gonadal femenina, debido a que provoca la regresión de los cordones medulares; a mayor temperatura mayor regresión, y ii) la TI feminizante es responsable de iniciar la profase meiótica, así como del crecimiento de los ovocitos. Por su parte, Ruiz-Ramírez (1995) demuestra que el E2 promueve la regresión de los cordones medulares. De tal manera que se puede plantear que la TI feminizante estimula la diferenciación gonadal a partir de favorecer su crecimiento, debido tanto al aumento celular (estimulación de la mitosis) como a la conformación de matriz extracelular. Mientras que el E2 endógeno provoca la regresión de los cordones medulares.

Tratando de describir la acción de las HES en la diferenciación gonadal en las especies cuyo sexo se determina por la TI, estas tendrían un efecto de tipo parácrino y/o autócrino (O'Malley, 1989). La T producida por las células esteroidogénicas gonadales, paracrinamente regulará el desarrollo de los cordones medulares a través de inhibir la acción de los estrógenos a nivel medular como cortical, dando lugar a la morfogénesis de los testículos. Por su parte, el E2 autócrinamente provocará la regresión de los cordones medulares y estimular

el crecimiento de la región cortical, dando lugar a la morfogénesis de los ovarios. A nivel del SNC, las HES actuarían parácrinamente regulando la secreción de neurohormonas; las neurohormonas directa o indirectamente regularán a nivel gonadal el metabolismo o la actividad de los andrógenos y/o estrógenos, a partir de lo cual se llevará a cabo la diferenciación morfogenética de los testículos u ovarios.

Para conformar un modelo de la diferenciación sexual gonadal para *L. olivacea* (Fig. 2) se propone lo siguiente: i) la TI masculinizante a nivel del diencéfalo (hipotálamo) inhibe la secreción de neurohormonas. ii) A nivel de la región medular (estroma gonadal) se favorece la producción de T a través de la regulación de la expresión y/o actividad de la enzima 17 β -HED. iii) La T producida por las células esteroidogénicas de manera parácrina, inhibe la acción del E2 lo que favorece el desarrollo de los cordones medulares (testiculares) como del estroma gonadal, dando lugar a que se lleve a cabo el desarrollo de los testículos. Por su parte i) la TI feminizante a nivel del diencéfalo (hipotálamo) favorece el metabolismo de HES. ii) La P5 y/o P4 (neuroesteroides) o la T como el E2 de manera parácrina, regularán la secreción de neurohormonas. iii) Las neurohormonas a través de las terminaciones nerviosas inhiben a nivel gonadal la acción inactivadora de la T sobre el E2. iv) El E2 secretado por las células esteroidogénicas de la región medular o estroma gonadal, de manera parácrina llevará a cabo la muerte celular o apoptosis de los cordones medulares, así como el de estimular el crecimiento y diferenciación del epitelio somático que conforma a la región de la corteza. v) La TI feminizante estimula el crecimiento gonadal a partir de favorecer el aumento celular (estimulación de la mitosis) como la conformación de matriz extracelular.

Por último, cabe destacar que visto así, el problema multifacético de la diferenciación sexual gonadal en vertebrados, tiene ahora en los reptiles, (Lance, 1997), peces (Conover y Heins, 1987) y anfibios (Dournon *et al.*, 1990; Chardard *et al.*, 1995) sexo-termodependientes, un modelo experimental que coadyuvará a enriquecer las evidencias obtenidas a partir de los modelos clásicos de estudio (anfibios, Witschi, 1967; aves, Wolff y Wolff, 1951 y mamíferos, Byskov, 1986).

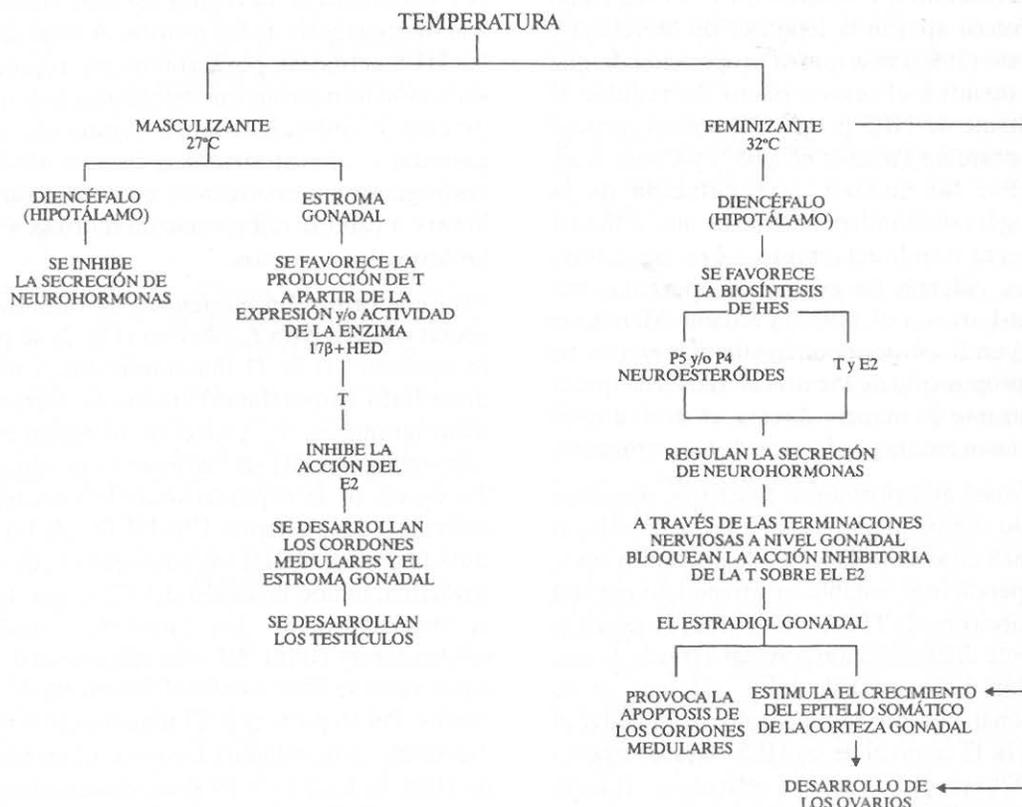


Fig 2. Modelo a partir del cual se describe la diferenciación sexual gonadal en la tortuga marina sexo-termodependiente *Lepidochelys olivacea*. T = testosterona; 17 β -HED = 17 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa; E2 = estradiol; HES = hormonas esteroides sexuales; P5 = pregnenolona; P4 = progesterona.

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Morali de la Brena y al Dr. Horacio Merchant Larios agradezco sus comentarios sobre este trabajo que fue presentado en un tópic selecto del Doctorado en Investigación Biomédica Básica. A la Dra. Alondra Castro Campillo y al Dr. José Ramírez Pulido mi agradecimiento por sus sugerencias hechas sobre la versión final de este trabajo. Se agradece a la Srita. Laura Martínez Gómez por su asistencia secretarial, así como al Arq. Raymundo González Coronel por el desarrollo de las figuras.

Literatura citada

- Bull, J. J., 1983. *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, C A.
- Bull, J. J., D. M., Hillis, and S. O' Steen, 1988a. Mammalian ZFY sequences exist in reptiles of sex-determining mechanism. *Science*, 242:567-569.

Bull, J. J., W. H. N. Gutzke, and D. Crews, 1988b. Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70:425-428.

Burns, K. R., 1961. *Role of hormones in the differentiation of sex*. pp. 76-158 in *Sex and Internal Secretions* (E. Allen, ed.). 1st ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.

Byskov, A. G., 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev.*, 66(1):71-117.

Conover, D. O., and S. W. Heins, 1987. Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in fish. *Nature*, 326:496-498.

Coriat, A. E., Valleley, M. W. J. Ferguson, and P. T. Sharpe, 1994. Chromosomal and temperature dependent sex determination, the search for the conserved mechanism. *J. Exp. Zool.*, 270:112-116.

Crews, D., and J. M. Bergeron, 1994. Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle

- with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.*, 143:279-289.
- Crews, D., T. Wibbels, and W. H. N. Gutzke, 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., J. J. Bull, and T. Wibbels, 1991.** Estrogen and sex reversal in turtles: A dose-dependent phenomenon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81:357-364.
- Crews, D., A. R. Cantu, J. M. Bergeron, and T. Rhen, 1995.** The relative effectiveness of androstenedione, testosterone, and estrone, precursors to estradiol, in sex reversal in the reared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 100:119-127.
- Crews, D., J. M. Bergeron, J. J. Bull, D. Flores, A. Tousignat, J. K. Skipper, and T. Wibbels, 1994.** Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev. Genet.*, 15:297-312.
- Chardard, D., G. Desvages, C. Pieau., and C. Dournon, 1995.** Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles walli* (Urodele. Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *G. Comp. Endo.*, 99:100-107.
- Charnier, M., 1966.** Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae. Lacertilien). *Comp. Rend. Sean. Soc. Biol.*, 160:620-622.
- Demas, S., and S. Wachtal, 1990.** DNA fingerprinting in reptiles: Bkm hybridization patterns Crocodilia and Chelonia. *Genome*, 34:472-476.
- Demas, S., M. Duronslet, S. Wachtel, C. Caillouet, and D. Nakamura, 1990.** Sex-specific DNA in reptiles with temperature sex determination. *J. Exp. Zool.*, 253: 319-324.
- Deeming, C., and M. Ferguson, 1989.** The mechanism of temperature dependent sex determination in crocodylians: an hypothesis. *Amer. Zool.*, 29:973-985.
- Desvages, G., and C. Pieau, 1991.** Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of the eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 39:203-213.
- Desvages, G., and C. Pieau, 1992a.** Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41:851-853.
- Desvages, G., and C. Pieau, 1992b.** Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. *Differentiation*, 47:9-17.
- Desvages, G., M. Girondot, and C. Pieau, 1993.** Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92:54-61
- Dorizzi, M., Desvages, G. et Pieau, C., 1987.** Effets de la temperature, de l'oestradiol et du tamoxifène sur la differenciation sexuelle des gonades chez les tortues. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 73(3):204.
- Dorizzi, M., T. M. Mignot, A. Guichard, G. Desvages, and C. Pieau, 1991.** Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation*, 47:9-18.
- Dorizzi, M., N. Richard-Mercier, G. Desvages, M. Girondot, and C. Pieau, 1994.** Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 58:1-8.
- Dournon, C., C. Houillon, and C. Pieau, 1990.** Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.*, 34:81-92.
- Engel, W., B. Klemme, and M. Schmid, 1981.** H-Y antigen and sex-determination in turtles. *Differentiation*, 20:152-156.
- Gahr, M., T. Wibbels, and D. Crews, 1992.** Sites of estrogen uptake in embryonic *Trachemys scripta*, a turtle with temperature-dependent sex determination. *Biol. Reprod.*, 46:458-463.
- Gallien, L., 1973.** *Differénciation et organogenése sexuelle des métazoaires. Maitreses de Biologie*, 250 pp. Masson et. C, editores. Paris.
- Gutzke, W. H. N., and J. J. Bull, 1986.** Steroid hormones reverse sex in turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 64:368-372.
- Gutzke, W. H. N., and D. B. Chymiy, 1988.** Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71:265-267.

- Harrington, R. W. Jr., 1967.** Environmental controlled induction of primary male gonochoris from eggs of the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *P. Boll. Bull.*, 132:179-199.
- Holmes, R. L., 1968.** *Reproduction and Environment*. Oliver and Boyd, London-Edinburgh.
- Hunter, G. A., and E. M. Donaldson, 1983.** *Hormonal sex control and its application to fish culture*. Vol. 9B:223-303 in *Fish Physiology* (W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. Donaldson, eds.). Academic Press, New York/London.
- Janzen, F. J., and G. L. Paukstis, 1991.** Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *Quart. Rev. Biol.*, 66(2):149-179.
- Jeyasuria, P., Roosenburg, W. M., and Place, A. R., 1994.** Role of P-450 aromatase in sex determination of the diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *J. Exp. Zool.*, 270:95-111.
- Koenig, H. L., M. Schumacher, B. Ferzaz, A. N. Do-Thi, A. Ressouches, R. Guennoun, Y. Jung-Testas, P. Robel, Y. Akawa, and E. M. Baulieu, 1995.** Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268:1500-1503.
- Lagomarsino, Y. V., and D. O. Conover, 1993.** Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evolution*, 47:487-494.
- Lance, V. A., 1997.** Sex determination in Reptiles: an update. *Amer. Zool.*, 3:504-513.
- Luo, X., Y. Ikeda, and K. L. Parker, 1994.** A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77:481-490.
- Merchant-Larios, H., and I. Villalpando-Fierro, 1990.** Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *J. Exp. Zool.*, 254:327-331.
- Merchant-Larios, H., I. Villalpando-Fierro, and B. Centeno-Urruiza, 1989.** Gonadal morphogenesis under controlled temperature in sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3:43-61.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramírez, S., Moreno-Mendoza, N., and Marmolejo-Valencia, A., 1997.** Correlation among thermosensitive period, estradiol response and gonadal differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107:373-385.
- McLaren, A., E. Simpson, K. Tomonari, P. Chandler, and H. Hogg, 1984.** Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312:552-555.
- Mrosovsky, N., and C. L. Yntema, 1980.** Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implication for conservation practices. *Biol. Conserv.*, 18:271-280.
- Nakamura, D., 1989.** *Evolutionary aspects of vertebrate sex determination*. pp. 3-14 in *Evolutionary Mechanisms in Sex Determination* (S. S. Wachtel, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nakamura, D., S. S. Wachtel, V. Lance, and W. Becab, 1987.** On the evolution of sex determination. *Proc. R. Soc. Lond. (B)*, 232:259-180
- O'Malley, B. O., 1989.** Did eucaryotic steroid receptors evolve from intracrine gene regulators?. *Endocrinology* 125:1119-1120.
- Pieau, C., 1969.** Sur une anomalie des conduits génitaux observée chez les embryon de tortue grecque (*Testudo graeca* L.) traités par le benzoate d'oestradiol. *C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 268:364-367.
- Pieau, C., 1970.** Effets de l'oestradiol sur l'appareil génital de l'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). *Arch. Anat. micros. Morph. exp.*, 59:295-318.
- Pieau, C., 1972.** Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 274:719-722.
- Pieau, C., 1973.** Variation de l'activité enzymatique D5-3b-hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les glandes génitales d'embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien), en fonction de la température d'incubation. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 276:197-200.
- Pieau, C., 1974.** Differentiation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chelonian); effets des hormones sexuelles. *Ann. Embryol. Morph.*, 7:365-394.
- Pieau, C., 1975.** *Temperature and sex differentiation in embryos of two chelonians, Emys orbicularis* L. and *Testudo graeca* L. Pp. 332-339 in *Intersexuality in*

- the Animal Kingdom (R. Reinboth, ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Pieau, C., 1978.** Effets de températures d'incubation basses et élevées sur la différenciation sexuelle chez des embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien). *C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci., Paris, Série D*, 286:121-124.
- Pieau, C., Dorizzi, M. et Desvages, G., 1987.** Une hypothèse sur l'implication des hormones oestrogènes dans la différenciation sexuelle des gonades chez les amphibiens, les reptiles et les oiseaux. *J. Physiol.*, 30A (resumen).
- Pieau, C., Th. M. Mignot, M. Dorizzi, and A. Guichard, 1982.** Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L.: A preliminary study in embryos, hatchling, and young as a function of the incubation temperature of eggs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47:392-398.
- Pieau, C., M. Girondot., N. Richard-Mercier, G. Desvages, M. Dorizzi, and P. Zaborski, 1994a.** Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: hormonal involvement. *J. Exp. Zool.*, 270:86-94.
- Pieau, C., M. Girondot., M. Dorizzi, N. Richard-Mercier, and P. Zaborski, 1994b.** *Environmental Control of Gonadal Differentiation*. Pp 433-448 in *The Differentiation Between the Sexes* (Short, R. V. and E. Balabou, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Raynaud, A., and C. Pieau, 1985.** *Embryonic development of the genital system*. Pp. 149-299 in *Biology of the Reptilia* (S. Gans. and F. Billeu, eds.). John Wiley and Sons, New York.
- Reader, J., 1991.** *The rise of life: the first 3.5 billion years*. Crescent Books. New York.
- Rhen, T., and J. W. Lang, 1994.** Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: Manipulation of the embryonic sex steroid environment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96:243-254.
- Risley, P. L., 1933.** Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 18:459-543
- Ruiz-Ramírez, S., 1995.** Diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea*: Período sensible a la temperatura, efecto de la temperatura y el estradiol en la gónada. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 97 pp.
- Sadleir, R.M.F.S., 1969.** *The ecology of reproduction in wild and domestic mammals*. Methuen. Londres.
- Salame-Méndez, A., 1992.** La temperatura de incubación como modulador de hormonas esteroides sexuales y su relación en el establecimiento gonadal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 208 pp.
- Salame-Méndez, A. y Villalpando-Fierro, I., en prensa.** La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. *Acta Zool. Mex.* (n.s.).
- Salame-Méndez, A., J. Herrera-Muñoz, N. Moreno-Mendoza, and H. Merchant-Larios, 1998.** Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Exp. Zool.*, 280:304-313.
- Scheib, D., 1983.** Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation*, 23 (Suppl.):587-592.
- Schelesinger, M. J., 1989.** Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell. Biol.*, 1103:321-325.
- Simpson, E., P. Chandler, E. Goulny, C. M. Diteche, M. A. Ferguson-Smith, and D. C. Page, 1987.** Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on the human Y chromosome. *Nature* 336:780-783.
- Spotila, J. R., C. D. Spotila., and N. F. Kaufer. 1994.** Molecular mechanisms of TSD in Reptiles: A search for the magic bullet. *J. Exp. Zool.*, 270:117-127.
- Tiersch, T. R., M. J. Mitchel, and S. S. Wachtel, 1991.** Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Human. Genet.*, 87:571-573.
- Thomas, E. O., P. Licht, T. Wibbels., and D. Crews, 1992.** Hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with sexual differentiation in embryos of the turtle *Trachemys scripta*. *Biol. Reprod.*, 46:140-145.
- Uchida, T., 1937.** Studies on the sexuality of Amphibia. III. Sex transformation in *Hynobius retardatus* by high temperature. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. 6* 6:35-58.
- Van Tienhoven, A., 1983.** *Reproductive physiology of vertebrates*. Custom Publishing Associates, Cornell University Press.
- Villalpando, I., and Merchant-Larios, H., 1990.** Determination of the sensitive stages for gonadal

- sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *Int. J. Dev. Biol.*, 34:281-285.
- Vogt, R. C., and J. J. Bull, 1982.** Temperature controlled sex-determination in turtles: ecological and behavioral aspects. *Herpetológica*, 38:156-164.
- Vogt, R. C. y O. A. Flores-Villela, 1986.** Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. *Ciencia*, 37:21-32.
- Wachtal, S. S., and G. C. Koo, 1981.** H-Y antigen in gonadal differentiation. pp. 255-299 in Mechanisms of Sex Differentiation in Animals and Man (C. R. Austin and R.G. Edwards, eds.). Academic Press, New York.
- White, R. B., and P. Thomas, 1992a.** Adrenal-kidney and gonadal steroidogenesis during sexual differentiation of a reptile with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp. Endocrinol.*, 88:10-19.
- White, R. B., and P. Thomas, 1992b.** Whole-body and plasma concentrations of steroid in the turtle, *Trachemys scripta*, before, during, and after temperature-sensitive period for sex determination. *J. Exp. Zool.*, 264:159-166.
- White, R. B., and P. Thomas, 1992c.** Stimulation of *in vitro* steroidogenesis by pituitary hormones in a turtle (*Trachemys scripta*) within the temperature-sensitive period for sex determination. *Biol. Reprod.*, 47:952-959.
- Witschi, E., 1914a.** Experimentelle untersuchungen ueber die untersuchungen der keimdruesen von *Rana temporaria*. *Arch. Mikr. Anat. Entw.*, 85:9-113.
- Witschi, E., 1914b.** Studie ueber die geschlechtsbestimmung bei freschen. *Arch. Mikr. Anat. Entw.*, 86:1-50.
- Witschi, E., 1929.** Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. II. Sex reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. Exp. Zool.*, 52:267-292.
- Witschi, E., 1967.** *Biochemistry of sex differentiation in vertebrate embryos*. Vol. II:139-225 in Biochemistry of Animal Development (R. Weber, ed.). Academic Press, New York and London.
- Wibbels, T., and D. Crews, 1992.** Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *J. Endocrinol.*, 138:121-129.
- Wibbels, T., and D. Crews, 1994.** Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.*, 141:295-299.
- Wibbels, T., and D. Crews, 1995.** Steroid-induced sex determination at incubation temperatures producing mixed sex ratios in a turtle with TSD. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 100:53-60.
- Wibbels, T., J. J. BULL, and D. Crews, 1991a.** Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination?. *J. Exp. Zool.*, 260:130-134.
- Wibbels, T., J. J. BULL, and D. Crews, 1991b.** Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool.*, 260:371-381.
- Wibbels, T., J. J. BULL, and D. Crews, 1992.** Steroid hormone induced male sex determination in amniotic vertebrate. *J. Exp. Zool.*, 262:454-457.
- Wolff, Et., and Em. Wolff, 1951.** The effects of castration on bird embryos. *J. Exp. Zool.*, 116:59-97.
- Yoshikura, M., 1959.** The action of the pituitary in sex differentiation and sex reversal in Amphibians. II. Effects of high temperature on the gonadas of hypophysectomized frog larvae. *Kunamoto J. Sci., Ser. B, Sect. 2* 4:69-101.
- Zaborski, P., M. Dorizzi, and C. Pieau, 1988.** Temperature-dependent gonadal sex differentiation in the turtle *Emys orbicularis*: concordance between sexual genotype and serological H-Y antigen expression at threshold temperature. *Differentiation*, 38:17-20.