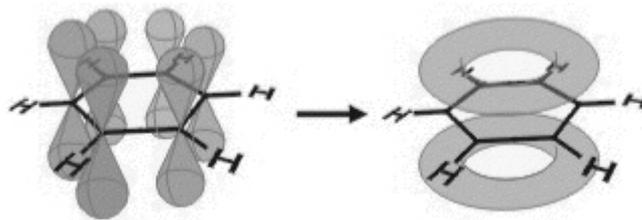


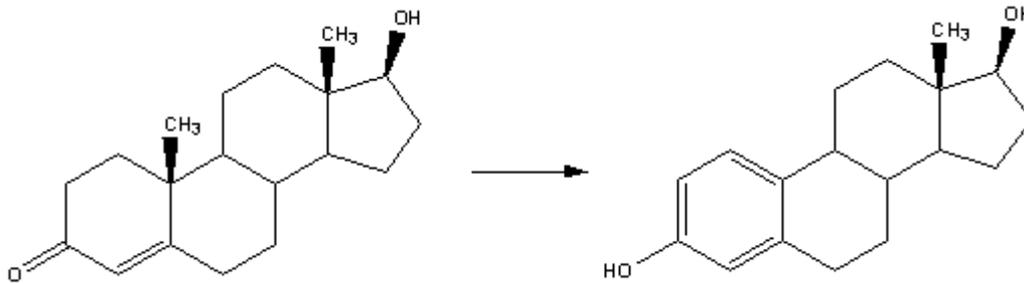
TSD: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS GÓNADAS EN EMBRIONES DE TORTUGA.

Txema López, 2007

En un artículo ya publicado con anterioridad en **Testudinae.com**, desgranábamos cómo las causas ambientales influían en la diferenciación sexual de los reptiles ovíparos en general y de las tortugas en particular. Vimos que la mayoría de las tortugas mostraban diferenciación sexual por temperatura (TSD), y algunas pocas especies, diferenciación genética (GSD) al estilo de los mamíferos, pero con mecanismos mucho más primitivos. Esta diferenciación de las gónadas, bien en ovarios o testículos, tiene lugar durante la primera mitad del primer tercio de la incubación, un periodo crítico dentro del desarrollo embrionario denominado periodo termosensitivo (TSP). Varios tratamientos realizados al embrión durante el TSP han demostrado la implicación de los **estrógenos** en la diferenciación gonadal. Los estrógenos son hormonas sexuales de tipo femenino producidos por los ovarios y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales. Los **estrógenos** inducen fenómenos de proliferación celular sobre los órganos diana, por lo que un tratamiento con estrógenos exógenos de un embrión a temperatura de incubación de machos da lugar a la diferenciación ovárica, produciendo, por tanto, hembras, mientras que un tratamiento con antiestrógenos o inhibidores de la **aromatasa** da lugar a la diferenciación testicular a temperatura de incubación de hembras. La **aromatasa** es una enzima de la superfamilia del Citocromo P450, cuya función es aromatizar andrógenos (hormonas masculinas) selectivamente. Una enzima es un biocatalizador, es decir, una sustancia que permite reacciones químicas complejas a temperatura ambiente y presión atmosférica, las llamadas condiciones vitales. La **aromatización** es una reacción química consistente en crear un ciclo aromático, donde las moléculas de carbono se unen formando enlaces dobles y simples alternativamente, dándose un fenómeno de resonancia, es decir, creándose una zona de libre circulación de electrones entre los átomos de carbono del ciclo, en una molécula susceptible de tenerlo. El benceno es una molécula aromática simple donde ocurre este fenómeno:



1. Molécula de benceno, mostrando la disposición de los orbitales P del carbono, de tal manera que existe una zona de libre circulación de electrones a lo largo de todo el ciclo.



2. *Reacción de aromatización de la testosterona (andrógeno) en estradiol (estrógeno) catalizada (causada) por la aromatasa.*

Se han realizado una serie de estudios buscando contenido de estrógenos, actividad de aromatasa y expresión génica de la aromatasa en los complejos GAM (gonadal/adrenal/mesonéfrico) (zona de tejido que debe diferenciarse) durante el desarrollo embrionario de tortugas y cocodrílidos. En sólo uno de esos estudios se encontraron diferencias entre temperaturas de generación de macho y de hembra durante el TSP. En otros estudios, se encontraron diferencias al final del TSP o no fueron encontradas durante y después del TSP. Por tanto, muchos autores determinaron que los estrógenos no estaban implicados de manera alguna en los estadios más tempranos de la diferenciación ovárica. Otros autores infirieron que la temperatura influye en tejidos extragonadales, en particular el adrenal y/o el mesonéfrico, ya que estos tejidos pueden ser el origen de los estrógenos que actúan en la diferenciación de las gónadas. Pieau y Dorizzi analizaron datos provenientes únicamente de las gónadas, en particular de galápagos y tortugas marinas, en las que no hay implicación de tejidos extragonadales. Este análisis concluyó que:

1. La temperatura influye directamente en la diferenciación sexual de las gónadas.
2. Durante el TSP, la actividad de la aromatasa en las gónadas depende de la temperatura de incubación de los huevos.
3. Los estrógenos son sintetizados en las gónadas durante el TSP y que esa síntesis depende de la temperatura.
4. Los estrógenos actúan tanto en la parte cortical de las gónadas como en la medular.

Con todos estos datos, se puede inscribir la TSD en un concepto más amplio, el de la diferenciación sexual gonadal. Podemos ir analizando y razonando cada uno de esos puntos, no sin antes repasar los eventos clave del desarrollo embrionario de una tortuga. Para facilitar la comparación en el desarrollo embrionario de las diferentes especies, particularmente para la familia *Emydinae*, existe un esquema estandar de 27 etapas en el desarrollo embrionario, inicialmente presentado para *Trachemys scripta* (Greenbaum, 2002). Las primeras etapas son prácticamente iguales para todos los taxones de tortugas, y sólo hay cambios significativos entre las etapas 12 y 26. No vamos a entrar en profundidad a enumerar las diferentes etapas del desarrollo, simplemente comentaremos que la definición de cada etapa está basada en el desarrollo de los miembros delanteros y la garras del embrión en formación, y que la primera clasificación de este tipo se hizo para *Chelydra serpentina* en un trabajo de Yntema (1968).

En los artículos comentados en la revisión de Pieau y Dorizzi la mayoría de los datos vienen de estudios realizados en *Emys orbicularis* (galápago europeo), *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfina) y *Dermochelys coriacea* (tortuga laúd). En el siguiente gráfico ilustramos los principales eventos morfológicos que tienen lugar en el desarrollo de *Emys orbicularis*:

La temperatura pivotal de esta especie es de 28,5°C, con lo que, a una temperatura de 25°C obtendríamos un 100% de machos y a 30°C un 100% de hembras. El TSP se extiende entre las etapas 16 y 22. Antes de llegar a este punto, las gónadas son indiferentes, o dicho de otra manera, bipotenciales. Están compuestas de **epitelio germinal**. El **epitelio** es el tejido formado por una o varias capas de células yuxtapuestas que constituyen el recubrimiento interno de las cavidades, órganos huecos, conductos del cuerpo y la piel y que también forman las mucosas y las glándulas. Los epitelios también forman el parénquima de muchos órganos, como el hígado. El epitelio germinal es el que forma la línea germinal. La **línea germinal** o **estirpe germinal** es el conjunto de células localizadas en las gónadas, que se convierten en gametos (óvulos y espermatozoides) a través de una división celular que sólo ocurre en las gónadas que es la meiosis. En la parte interior, sin embargo, están compuestas por finos cordones de células epiteliales, los llamados "**cordones sexuales**", entre **tejido mesenquimal** (El tejido mesenquimal, genéricamente denominado mesénquima es el tejido del organismo embrionario, de tipo conjuntivo laxo: con una abundante matriz extracelular, compuesta por fibras delgadas y relativamente pocas células, aunque la celularidad es muy variable). A 25°C, los primeros signos histológicos (relativo a los tejidos) de diferenciación de los cordones testiculares, los futuros cordones seminíferos aparecen en la etapa 17. Durante el TSP, el epitelio germinal se aplana, y las células germinales lo abandona para migrar entre las células epiteliales de los cordones testiculares. A 30°C, cuando se diferencian las células femeninas, durante el TSP los cordones sexuales se vuelven finos, aparecen fragmentados o evolucionan como pequeñas *lacunae* (del latín *lacuna*, en histología, un pequeño espacio), mientras que el epitelio germinal se transforma en córtex ovárico, cuyo desarrollo es principalmente debido al desarrollo in situ de células germinales. Al final del TSP, algunas células germinales entran en proceso de **meiosis**. En biología, **meiosis** (proviene del latín "hacer mas pequeño") es un proceso divisional celular, en el cuál una célula diploide (2n), experimentará dos divisiones celulares sucesivas, con la capacidad de generar cuatro células haploide (n).

Este proceso se lleva a cabo en dos divisiones nucleares y citoplasmáticas, llamadas, primera y segunda división meiótica o simplemente Meiosis I y Meiosis II. Ambas comprenden Profase, Metafase, Anafase y Telofase. Durante la meiosis I los miembros de cada par homólogo de cromosomas se unen primero y luego se separan y se distribuyen en diferentes núcleos. En la Meiosis II, las cromátidas hermanas que forman cada cromosoma se separan y se distribuyen en los núcleos de las células hijas. Entre estas dos etapas sucesivas no existe la etapa S (duplicación del ADN).

Los errores en la meiosis son responsables de las principales anomalías cromosómicas. La meiosis consigue mantener constante el número de cromosomas de las células de la especie para mantener la información genética.

1. La temperatura influye directamente en la diferenciación sexual de las gónadas.

El efecto directo de la temperatura en la formación de las gónadas se demostró por experimentos llevados a cabo in vitro con la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*. Los huevos incubados a 26°C dan lugar a machos y los incubados a 33°C resultan ser hembras. La masculinización de las gónadas fue caracterizada por la **expresión génica** de la proteína SOX9 durante el desarrollo embrionario normal. Entre las etapas 21 y 24 del desarrollo embrionario, la SOX9 se expresa a ambas temperaturas en las gónadas, que permanecen en estado bipotencial.

Posteriormente, SOX9 sigue dando positivo a 26°C en los cordones medulares de las gónadas masculinas ya diferenciadas. Este comportamiento se observa tanto en ensayos *in ovo* (dentro del huevo) como *in vitro* (tejido gonadal artificialmente propagado). La **expresión génica** es el 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. En todos los organismos, inclusive los eucariotes el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como "housekeeping genes". El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. Por ejemplo, genes que codifican proteínas responsables del transporte axonal se expresan en neuronas pero no en linfocitos en donde se expresan genes responsables de la respuesta inmune. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos. De alguna manera, pues, la temperatura influye en la expresión de la SOX9, y por tanto muestra el claro efecto de ésta en la diferenciación sexual de las gónadas.

2. Durante el TSP, la actividad de la aromatasa en las gónadas depende de la temperatura de incubación de los huevos.

Como antes decíamos, la aromatasa es el complejo enzimático que transforma los andrógenos en estrógenos. En diversos experimentos se midió la actividad de la aromatasa en las gónadas, separadas de los complejos GAM de las especies *Emys orbicularis* y *Dermochelys coriacea*. En el primer caso, se midió a 25°C y a 30°C. Al principio del TSP, la actividad de la aromatasa es muy baja en ambos casos, pero era algo superior a 30°C. Sin embargo, a medida que avanza el TSP la actividad de la aromatasa crece exponencialmente, alcanzándose un pico al final del desarrollo embrionario dando como resultado la diferenciación del tejido y la formación de ovarios. Se observó también que la actividad de la aromatasa a la temperatura pivotal de 28,5°C en *testes* y *ovotestes* (*testes* es el plural de *testis*, testículo en latín) era algo superior que la observada en testículos a 25°C e inferior en ovarios a 30°C. Sin embargo, estas condiciones ideales en que la temperatura se mantiene durante el TSP son poco dadas a ocurrir en la naturaleza. ¿Qué ocurre si invertimos la temperatura de incubación de embriones de macho a hembra y de hembra a macho? Hecho el experimento en diferentes estadios del TSP, un aumento o un descenso de la temperatura se traducía en un aumento o descenso simultáneo de la actividad de la aromatasa. Los cambios inducidos después del TSP no producían efecto alguno. Además, los experimentos demostraron que la temperatura actúa sobre la regulación síntesis de la aromatasa y no sobre la propia actividad de la proteína. Resultados similares se obtuvieron para *Dermochelys coriacea*, para la que un cambio de 27°C a 35°C durante la incubación, que tuvo lugar a 27°C entre las etapas 22 y 29, y luego a 35°C durante 6 días, produjo cambios importantes en la actividad de la aromatasa sólo entre las etapas 23 y 27. En el caso de *Lepidochelys olivacea*, se observaron cambios en la expresión de la proteína SOX9 durante ese mismo periodo. Por tanto, el periodo sensible a los cambios de temperatura que induce cambios en la actividad gonadal de la aromatasa en la tortuga laúd, y la expresión de la proteína SOX9 en la tortuga golfina coincide con el TSP para la diferenciación sexual de las gónadas en el galápagu europeo.

3. Los estrógenos son sintetizados en las gónadas durante el TSP y esa síntesis depende de la temperatura.

Ya desde una etapa muy temprana, se observa que la esteroidogénesis comienza muy pronto en el desarrollo embrionario. Esto es muy importante, puesto que tanto los estrógenos como los andrógenos son de naturaleza esteroidea. Esto ocurre para *Emys orbicularis* a partir de la etapa 15, antes del TSP, donde ya se observa actividad de la 3β -HSD, una enzima que actúa sobre los esteroides. Esta hormona tiene en esta etapa más actividad a temperatura de producción de machos. Dado que las gónadas sintetizan estrógenos tan pronto como al principio del TSP, y la síntesis de estos depende de la temperatura durante este periodo, se puede inferir que sólo los estrógenos generados en las gónadas (de origen **endógeno**, no como los generados en el cerebro o los contenidos en la yema del huevo, de origen **exógeno**) actúan en la TSD.

4. Los estrógenos actúan tanto en la parte cortical de las gónadas como en la medular.

Para los reptiles en general, al final del desarrollo embrionario el epitelio superficial de los *testes* es muy fino, pero pueden quedar restos de epitelio germinal, quedando por tanto células germinales en él. El tratamiento con estrógenos de tortugas juveniles o recién nacidas (*Malaclemys terrapin*, Risley 1941, *Mauremys leprosa*, Vivién y Stefan 1958) induce la proliferación y entrada en meiosis de esas células germinales, produciéndose el desarrollo de córtex ovárico a partir del epitelio germinal, siendo este proceso controlado por estrógenos. Sin embargo, este proceso no destruye los cordones testiculares de la parte medular de las gónadas.

En la época del descubrimiento de la TSD, se hicieron experimentos inyectando estrógenos a temperatura de producción de machos en huevos de *Testudo graeca* y *Emys orbicularis*, observándose la inhibición del desarrollo de los cordones testiculares a etapas tempranas del desarrollo. Esa inhibición es proporcional a la dosis de estrógenos inyectada. En todos los casos se formaba córtex ovárico, lo cual no quiere decir que se formasen ovarios completos y funcionales en todos los casos (en muchas ocasiones se observaban hipoovarios u ovotestes). El periodo durante el cual este tratamiento es efectivo coincide con el TSP.

También se han realizado los experimentos contrarios, suministrar antiestrógeno o inhibidores de la aromatasa a temperatura de producción de hembras. Los tratamientos con Tamoxifen, un antiestrógeno en *Emys orbicularis*, y con los inhibidores de la aromatasa Fadrozol o Letrozol en *Emys orbicularis*, *Trachemys scripta* y *Chelydra serpentina*, dieron como resultado la diferenciación de los cordones testiculares en gónadas masculinas a temperatura de producción de hembras. Incluso después del TSP, el tratamiento con Letrozol funciona con el galápagos europeo, pero menos efectivamente.

Conclusión

Tomando todo esto en cuenta, para todos los reptiles que muestran TSD, las gónadas son las que sufren los efectos de la temperatura para que se produzca la diferenciación sexual, y son el lugar donde tiene lugar la acción de la aromatasa y de la síntesis de estrógenos durante el TSP. La síntesis de los estrógenos gonadales depende de la temperatura de incubación. A temperaturas de producción de hembras, a etapas tempranas del TSP los estrógenos endógenos actúan tanto en la parte medular como en la cortical de la gónada para producir la diferenciación sexual de los ovarios.

La termosensibilidad en la diferenciación sexual de las gónadas se ha observado también en peces y en anfibios, no sólo en reptiles. En estas especies no se distinguen cromosomas mitóticos sexuales por métodos clásicos, sin embargo su detección es posible, y eso implica que los efectos de la temperatura se imponen a la determinación genética del sexo (GSD).

Bibliografía

Greenbaum, E. Can. J. Zool. **80**(8): 1350–1370 (2002)

Pieau, C., Dorizzi, M. Journal of Endocrinology **181**: 367-377 (2004)

Torres Maldonado, L.C., Merchant Larios, H., Ciencia ergo Sum **13**(2):176-182 (2006)

Wikipedia (<http://www.wikipedia.org>)