

CAMBIOS EN LA MORFOMETRIA Y DINAMICA DE CRECIMIENTO DE GENITALES EXTERNOS EN HEMBRAS DE YACARÉ OVERO OBTENIDAS POR DETERMINACIÓN SEXUAL HORMONAL

Tavaliери Yamil Ezequiel^A

^A Cátedra de Patología Humana (FBCB-UNL). Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (CONICET-UNL).

Área: Ciencias de la Salud

Sub-Área: Veterinaria

Grupo: X

Palabras clave: especies de interés zootécnico, reproducción, *phallus*.

INTRODUCCIÓN

El yacaré overo (*Caiman latirostris*), una de las dos especies de caimanes que habitan los humedales del noreste argentino, cuenta con un patrón de determinación sexual dependiente de la temperatura (DST). Se ha verificado que la incubación de los huevos a una temperatura constante de 30°C permite obtener 100% de animales hembras, mientras que, si la incubación se produce a 33°C la totalidad de los embriones se diferencia a machos (Stoker y col., 2003). No obstante, también se conoce que, de huevos incubados a 33°C (temperatura de producción de machos) expuestos a 1,4 ppm de 17-β Estradiol (E₂), nacen hembras, superando el efecto de la temperatura sobre la determinación sexual (Stoker y col., 2003), fenómeno denominado determinación sexual hormonal (DSH).

Como muestra la **Fig 1**, en yacaré machos y hembras el *phallus* (pene-clítoris) presenta un sector redondeado (cabeza) sostenido, desde la base de la cloaca, por una estructura alargada (cuello). La cabeza posee una hendidura en el extremo opuesto a su unión con el cuello, cubierta por una estructura piramidal denominada tip. Sin embargo, por sus diferencias en el tamaño y coloración podemos decir que, al igual que en aligátors, es una estructura sexualmente dimórfica (Allsteadt y Lang, 1995; Otaño y col., 2010).

Este dimorfismo es utilizado para el sexado de animales en estudios de campo. Previamente demostramos que las dimensiones son susceptibles de ser modificadas por exposición a compuestos hormonalmente activos (Zayas y col., 2010).

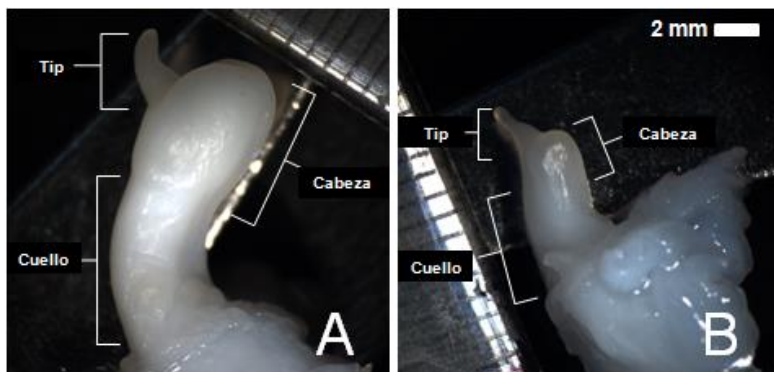


Figura 1: Características macroscópicas, vista sagital del *phallus* de macho (A) y hembra (B) de yacaré de 15 meses de edad y peso corporal similar.

Estas diferencias en el tamaño pueden deberse a diferencias histofuncionales, las cuales están siendo investigadas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si existen diferencias en las medidas morfométricas y en la dinámica de crecimiento del *phallus* de animales hembras obtenidas por DST y DSH. Esto es especialmente importante dado que la exposición de yacarés que habitan sitios contaminados con sustancias hormonalmente activas podría modificar el tamaño de los genitales externos, provocando efectos negativos sobre la reproducción y errores en el censado de poblaciones silvestres.

METODOLOGÍA

Tratamientos y grupos experimentales

Huevos de yacaré, obtenidos de zonas con baja a moderada intervención antrópica e incubados en condiciones controladas desde los primeros estadios del desarrollo embrionario, se topicaron en el estadio previo a la determinación sexual con una única dosis de estrógeno (17- β -estradiol 1,4 ppm) o con vehículo (etanol absoluto). La topicación se realizó sobre la "banda opaca" del huevo, sitio donde se encuentra adosado el embrión y caracterizado por poseer mayor irrigación. Los huevos se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

- Machos control: huevos incubados a 33°C topicados con el vehículo. En experiencias previas se ha demostrado que la topicación con etanol absoluto puede utilizarse como control negativo, ya que no existen diferencias entre éstos y los animales nacidos de huevos que no recibieron tratamiento (Stoker, 2004).
- Hembras control o DST: huevos incubados a 30°C topicados con el vehículo.
- Hembras DSH: huevos incubados a 33°C topicados con E₂.

Después del nacimiento los animales se criaron en condiciones ambientales y sanitarias controladas en el bioterio de reptiles del ISAL.

Medidas morfométricas de genitales externos

Se extrajo la estructura pene-clítoris (*phallus*) de animales juveniles prepuberales de entre 12 y 31 meses de edad. El *phallus* fue fijado en formol buffer al 10% (pH 7.4) durante 6 horas a temperatura ambiente, lavado en buffer de fosfatos (PBS), y conservado en alcohol 70°, hasta su evaluación morfométrica. Utilizando una cámara color Spot Insight QE (Diagnostic Instruments, USA) acoplada a una lupa estereoscópica (Carl Zeiss; Oberkochen, Alemania), se obtuvieron imágenes digitalizadas del *phallus*, colocando un calibre en cada imagen como referencia para establecer la unidad de medida. Mediante el uso del *software* Image-Pro-plus 5.0 (Media Cybernetics, USA) se obtuvieron el largo del *phallus*, alto y ancho de la cabeza del *phallus*. Una vez obtenidas las imágenes se continuó con el procesado histológico hasta la inclusión en parafina.

Evaluación de la dinámica de crecimiento del *phallus* en machos y hembras

Para determinar si existe correlación entre las medidas de *phallus* y las variables biométricas de los animales -largo total (LT), longitud hocico-cloaca (SVL) y masa corporal (MC)-, y con ello elegir normalizadores que eviten diferencias inherentes al crecimiento, se empleó el *software* estadístico GraphPad Prism 5.

Se evaluó la distribución normal de los datos mediante el uso de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson y Sharpino-Wilk, con el fin de establecer el tipo de ensayo a aplicar (paramétrico o no) y evaluar las posibles diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Las correlaciones se realizaron utilizando el test de

Pearson cuando se verificó la distribución normal de los datos. Cuando los datos no cumplieron con las pruebas de normalidad, se empleó el test de Spearman. Se consideró estadísticamente significativo $p < 0,05$, $r < 0,5$.

RESULTADOS

Correlación entre las variables morfométricas estructurales del *phallus* y las variables biométricas del animal

En machos juveniles prepuberales, las medidas del *phallus* muestran correlación significativa con todas las variables biométricas, mientras que en las hembras (DST) el crecimiento del clítoris no acompaña al crecimiento del animal y solo se observa correlación significativa entre el ancho de cabeza y las variables biométricas (**Tab 1**).

	Variables biométricas	Medidas del <i>phallus</i>		
		Largo (mm)	Ancho de cabeza (mm)	Alto de cabeza (mm)
Machos	LT (cm)	0,8964*	0,7836*	0,8608*
	SVL (cm)	0,8994*	0,8294*	0,8687*
	MC (g)	0,9118*	0,8039*	0,8603*
Hembras	LT (cm)	0,3846	0,7678*	0,3501
	SVL (cm)	0,4308	0,7297*	0,3132
	MC (g)	0,4188	0,6862*	0,1842

Tabla 1: Correlaciones entre las medidas del *phallus* y variables biométricas para machos (n=17) y hembras (n=11) control. Los valores mostrados en la tabla corresponden a los coeficientes de correlación r de Pearson para machos y r de Spearman para hembras. El asterisco indica correlación estadísticamente significativa.

Las correlaciones obtenidas para las hembras DSH (**Tab 2**) difieren de las hembras DST. Las hembras DSH muestran un patrón de significancia en las correlaciones de características masculinas, aunque la fuerza de correlación es menor que las obtenidas para machos.

Medidas biométricas	Medidas del <i>phallus</i>		
	Largo (mm)	Ancho de cabeza (mm)	Alto de cabeza (mm)
LT (cm)	0,8623*	0,7619*	0,6739*
SVL (cm)	0,8654*	0,7474*	0,6783*
PESO (g)	0,8599*	0,6887*	0,5865*

Tabla 2: Correlaciones entre las medidas del *phallus* y las variables biométricas del animal para hembras DSH (n=13). Los valores mostrados en la tabla corresponden a los coeficientes de correlación r de Pearson. El asterisco indica correlación estadísticamente significativa.

Diferencias en la dinámica de crecimiento del *phallus* entre hembras DST y DSH

Como muestra la **Fig 2**, en machos, el *phallus* se encuentra en crecimiento durante el estadio juvenil prepuberal y, posiblemente, continúa incrementando su tamaño durante la adultez. Por otro lado, en hembras (DST), el clítoris ya ha alcanzado, o está a punto de alcanzar, su tamaño máximo.

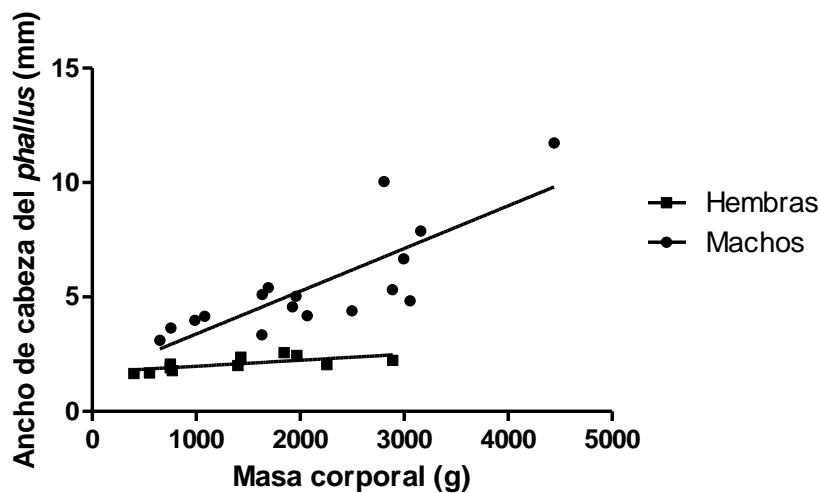


Figura 2: Dinámica de crecimiento del ancho de cabeza del *phallus* respecto de la masa corporal del animal en machos y hembras control.

En hembras DSH ocurre un leve incremento en el crecimiento del clítoris respecto de lo observado en hembras DST (**Fig 3**). Este resultado es indicativo de que el crecimiento continúa durante el estadio juvenil, de forma similar a lo que ocurre en machos.

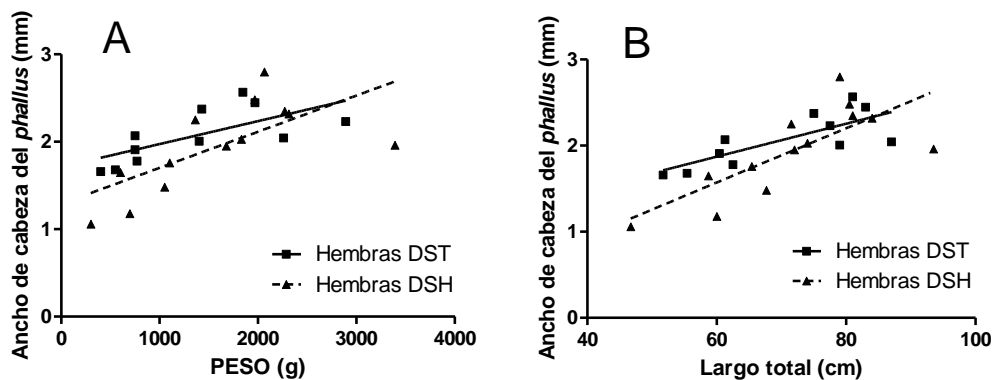


Figura 3: crecimiento del ancho de cabeza del *phallus* respecto de la masa corporal (A) y el largo total (B) del animal, y efecto de la exposición a 17- β Estradiol (E_2), a dosis de 1,4 ppm, sobre dicho crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Allsteadt J., Lang J. W.,** 1995. Sexual dimorphism in the genital morphology of young American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Herpetologica*, 51, 314-325.
- Otaño N., Imhof A., Bolcatto P., Larriera A.,** 2010. Sex Differences in the Genitalia of Hatchling Caiman latirostris. *Herpetol. Rev.*, 41, 32-35.
- Stoker C., Rey F., Rodríguez H., Ramos J.G., Sirosky P., Larriera A., Luque E.H., Muñoz-de-Toro M.,** 2003. Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 133, 287-296.
- Stoker C.,** 2004. Caiman latirostris como monitor biológico de contaminación ambiental por xenoestrógenos. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral.
- Zayas M., Durando M., Galoppo G., Stoker C., Rodríguez H., Luque E., Muñoz-de-Toro M.,** 2010. Alteraciones en genitales externos de yacarés overos expuestos in ovo a agroquímicos. *Medicina (Buenos Aires)*, 70, 213.