

1. Título.

Identificación de sexo por hormonas esteroides en orina y heces fecales de *Crocodylus acutus*.

Indice	Página
1.Titulo.....	1
2. Indice.....	2
3.Resumen.....	4
4. Introduccion.....	5
4.1 Importancia economica y ecologica de los cocodrilos	5
4.2 Panorama de las edades de los cocodrilos	7
4.3 Metodos utilizados para sexar reptiles	8
4.4 Clasificacion de los metodos de sexado	9
4.5 Metodos de sexado en aves y mamiferos	9
4.6 Que tecnica se propone y con cual objetivo	11

4.7 Comparacion del trabajo de tesis con articulos internacionales de referencia	12
5. Materiales y metodos.....	14
5.1 Procedencia de los cocodrilos	14
5.2 Identificacion del sexo por el metodo de palpacion	14
5.3 Recoleccion de muestras de orina y heces fecales	14
5.4 Determinacion de hormonas esteroides por inmunoensayo competitivo	14
6. Resultados y discusion.....	16
7. Conclusiones.....	22
8. Bibliografía.....	24

3. Resumen

En este trabajo describimos un método para identificar el sexo en *Crocodylus acutus*, evaluando testosterona y estradiol en heces fecales y orina. Este método tiene la ventaja de ser no invasivo, en el cual la determinación puede ser colorimétrica, cuando es cualitativa, además de ser cuantitativa, al utilizar un lector de ELISA. Donde las muestras de heces fecales mayores de 1 a 2 g., indican que es efectivo cuando los cocodrilos tienen tallas mayores de 130 cm, para la identificación de testosterona en concentraciones presentes en especímenes más jóvenes (subadultos), las cuales fueron aproximadamente de 1:5 o de 1:7. En relación a la concentración de estradiol de las hembras y de los machos, se evaluaron también muestras de heces fecales y orina, sin embargo, nuestros resultados no fueron consistentes. Por lo cual hasta este momento sugerimos que los niveles hormonales sean evaluados solo en heces fecales para testosterona.

4. Introducción

4.1 Importancia económica y ecológica de los cocodrilos. El término cocodrilos se refiere a las veintitrés especies vivientes que comprenden el orden Cocodrilo (lagartos, caimanes, cocodrilos y falsos lagartos) (King and Burke, 1989). La piel de los cocodrilos ha sido utilizada por los humanos por siglos, para propósitos funcionales y de moda. (Briton, 2002). Al menos quince especies de cocodrilos son o han sido comercializadas por su piel regularmente. También se han comercializado para otros fines (Brazitis, 1987). Hasta muy recientemente todas las pieles de cocodrilo provienen de animales salvajes (no en cautiverio).

Durante la época de los veinte las pieles fueron asociadas exclusivamente con artículos de lujo principalmente zapatos de altos precios, pero al principio de los años treinta estas comenzaron a ser utilizadas en artículos producidos masivamente. La mayor bonanza del comercio de pieles de cocodrilo fue de 1945 a 1960, durante este periodo, más de tres millones de pieles fueron vendidas cada año (Luxmoore, 1992). La piel de los cocodrilos en el mercado estuvo dividida desde entonces hasta la fecha en dos categorías, la clásica y la no clásica, esta distinción se hizo en base a la calidad de la piel. El alto valor y el bajo volumen caracterizó a la primera categoría y el bajo valor y alto volumen a la piel de caimanes de la segunda (Luxmoore, 1992). Aunque la evidencia es limitada se ha aceptado más recientemente que a principios de los setenta más de dos millones de pieles de cocodrilos fueron comercializadas cada año, de las cuales las tres cuartas partes fueron pieles de caimán (Hutton *et al.*, 2001). Para 1984, esto había sido reducido a menos de un millón. El nivel de la categoría clásica en el comercio en los años cincuenta y sesenta, pudo haber alcanzado las quinientas mil pieles por año, pero las estimaciones que se hicieron, sugirieron que esto ha decrecido alrededor de trescientas mil al principio de los setenta y a ciento cincuenta mil para 1984, estos números se pueden tomar como indicadores muy importantes que nos dicen que ha habido una sobre explotación de las poblaciones silvestres de estas especies (Luxmoore, 1992).

La situación de las diferentes poblaciones de cocodrilos se volvieron amenazadas globalmente (en peligro de extinción) y pensando a futuro algunas organizaciones se abocaron en poner restricciones, la mayoría de ellas pertenecen a la apéndice de CITES (Convención de Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Fauna y Flora Silvestre), procurando un alto nivel de protección. Para fines de los setenta esta protección fue procurada principalmente a los cocodrilos del norte de Australia, a fines de los sesenta y principio de los setenta. Todas las especies vivientes de cocodrilos fueron inmediatamente enlistadas por la CITES, que enumera las especies que pueden llegar a estar en peligro de extinción, si el comercio de las pieles no es regulado.

Su estado de conservación esta muy mejorado en relación a como estaba a los principio de los setentas. La cooperación entre productores de cocodrilos, comerciantes, curtidores, manufactureros, diseñadores, vendedores al mayoreo y organismos reguladores ha sido muy importante para el éxito de la conservación de los cocodrilos (Britton, 2002).

Desde los setentas una vez que el daño fue causado por la explotación no controlada que había sido realizada, la protección mejorada y controlada, rescato muchas poblaciones de cocodrilos de la continua desaparición. El uso sostenido, se convirtió en una palabra clave para la conservación de estas especies, básicamente después de haberse comprobado la factibilidad del uso de los esquemas sustentables de conservación, lo que fue realizado en varios países (Ross, 1998^a). Las dos ideas claves subyacentes del uso sustentable son la capacidad de reaccionar prontamente a cualquier disminución de los niveles poblacionales de cocodrilos, así como el principio fundamental de que la gente sobre explote un recurso en lugar de tener interés en conservarlo (Ross, 1998^a). Es también reconocido que es importante para el uso sostenido exitoso de cocodrilos, tenerlos en ranchos o granjas y en reproducción confinada. Aunque una vez que los programas de reproducción confinadas se hagan totalmente operacionales, estos pueden perder la relación con el recurso silvestre casi completamente. El uso sostenido ha beneficiado grandemente a los comerciantes y manufactureros en el comercio de estas especies, ganando la idea en el sector, de que los beneficios podrían crecer (o al menos no disminuir) con el uso de esquemas sustentables (Ross, 1998^a).

El cambio fundamental en la producción de piel de cocodrilo durante los últimos 25 años del siglo veinte se caracterizo por el establecimientos de cientos de granjas por todo el mundo (Luxmoore, 1992). Una granja de cocodrilos puede ser definida como la crianza de cocodrilos en cautiverio, para producción de pieles u otros productos o para la venta de animales vivos (Luxmoore, 1992). Donde los cocodrilos están confinados, referido a la producción de cocodrilos en cautiverio lo cual se origina tanto de la recolección de huevos silvestres o de individuos recién nacidos o de huevos producidos de adulto en cautiverio. Lo primero es llamado granja y lo segundo constituye lo que es en si, reproducción en cautiverio. Algunos productores se establecieron a principios de los 80 y otros aun antes. Los cocodrilos del nilo *Cocodrilos niloticus*, por ejemplo han sido reproducidos en Zimbabwe desde 1965, (Luxmoore, 1992). Pero se presento un repunte en el número de granjas establecidas a finales de los 80 s. Con el establecimiento de estas granjas, han sido posibles tres formas de producción de pieles, cosecha silvestre, granjas y reproducción cautiva.

No existe un estimado global confiable del valor total del comercio de la piel de cocodrilo, pero un estimado inicial del valor económico del comercio al momento de exportación en los países productores de 50 millones de dólares, aunque la cantidad real puede ser diez veces mayor (MacGregor, 2002). Existe una carrera de valores asociados a las diferentes especies, tipos y calidades, como por ejemplo, la situación de que las pieles de caimanes tienden a ser más baratas que las pieles clásicas y las pieles de grado uno pueden alcanzar cerca de la mitad de las pieles grados dos a lo más (MacGregor, 2002). La investigación ha indicado que esta carrera de valores está pobremente definida y es indudable que las pieles clásicas de bajo grado y de alto grado de caimán compiten fuertemente. El precio estimado unitario, de preexportación de piel de cocodrilo ha fluctuado ampliamente de acuerdo con varias fuentes de información citadas por MacGregor (2002). Los precios de la piel de cocodrilos parecen fluctuar grandemente en términos generales. El valor reportado en dólares de la piel para el *Alligátor mississippiensis*, en el momento de exportación desde Estados Unidos fue de 97 dólares (Caldwell, 2004), el promedio reportado para el caimán café *Cocodrilus fuscus*, al momento de exportarse desde Colombia para el mismo periodo, fue de 41 dólares (Caldwell, 2004).

4.2 Panorama de las edades de los cocodrilos. La estructura de la población de los cocodrilos se puede clasificar en cuatro clases de edad de acuerdo con la longitud hocico cloaca, (LHC), que estos presentan. Clase I, Adultos (A) mayor 151 cm. (Clase II) subadulto (SA), de 101 a 150 cm., clase III, juvenil (J) de 51 a 100 cm., y clase IV, cría (C) de menor a igual a 50 cm. (Leyte-Manrique y Ramírez Bautista, 2005).

Ugalde- Lezama (2001) en una población de *Crocodylus moreletti* del estado de Chiapas, encontró representantes de cada grupo de edad de ambos sexos (crías, juveniles, subadultos y adultos), sin embargo en el estudio anterior solo los machos estuvieron representados por las cuatro clases de edad, pero no así las hembras, que solo estuvieron representadas por juveniles y crías. La proporción de sexos de esta población fue de 7.6 (1 . 0.9 machos hembras). Con respecto a este dato, no se puede decir si la proporción de sexo encontrada en esta población es la esperada, ya que no se tiene antecedentes de esta población. Por otra parte y con relación a la presencia de individuos en edad reproductora, se puede decir que todos aquellos organismos registrados con una LT (Longitud total) mayor o igual a los 150 cm., se pueden considerar como organismos sexualmente maduros, si se toma en cuenta lo mencionado por Ross (1998^a), quien señala que en *Crocodylus moreletti* la talla mínima a la reproducción es de alrededor del 30% de la talla máxima del cuerpo de los organismos (de 150 cm.), lo cual concuerda con nuestros datos de esta población y que a pesar de que no se observó construcción de nidos ni apariencia de actividad reproductiva (cortejos), si se observaron organismos con tallas de LT de los 150 a los 240 cm., considerados sexualmente maduros.

Se pudo constatar que no se detectó la presencia de nidos, observándose únicamente crías. Lo cual indica que las hembras adultas se adentran a los terraplenes contiguos al subsistema, en dirección a la zona terrestre, en donde existe la presencia de ojos de agua. Siendo esta conducta de las hembras un patrón presente no solo en esta población sino en otras de la misma especie. Ugalde – lezama (2001), señala que después de la copula que ocurre en aguas profundas las hembras se dirigen a zonas aisladas de aguas más someras donde construyen sus nidos. Estos autores concluyeron que con relación a la LHC de hembras y machos, tomando en cuenta todas las clases de edad para ambos sexos se encontraron diferencias significativas, siendo más grandes los machos que las hembras. Por otra parte y considerando las tres clases de edad de crías, juveniles, y adultos de ambos sexos mezclados, se encontró que la talla media de la LHC fue de 22.0 mas menos 1.4 cm (20 – 27 cm), 48 mas menos 0.7 cm. (46 – 49 cm) y 100.7 mas menos 7.9 cm (85- 110 cm), respectivamente.

Ugalde –Lezama (2001) reportó un comportamiento similar en una población del estado de Chiapas, donde menciona que los factores ambientales no influyen de manera significativa en uno u otro sexo, sino más bien, la influencia está dada en la estructura de clases es decir hacia los diferentes grupos de edad y talla que integran la población. Por lo que, la presencia o ausencia de machos y hembras de *Crocodylus moreletti* dentro del subsistema no está determinada por estos factores ambientales.

4.3 Metodos utilizados para sexar reptiles. Singh (1984), menciona que la identificación de sexo en cocodrilianos se puede hacer por tacto en cloaca del pene ó por presión haciendo que lo expulse en cocodrilos de 70 a 80 cm. En la India se sexan con éxito *Crocodylus palustris* y *Crocodylus porosus* mediante observación por sonda. Sin embargo, este método no ha sido comprobado para Cocodrilo de la India (*Gavialis gangeticus*), ya que solo se puede observar o sentir el pene hasta que el organismo alcanza un talla de 120 cm. Y sus genitales miden 10 mm.

Hernández-Hurtado (1997), en *Crocodylus acutus* identifica por el método de tacto en cloaca en organismos adultos mayores a 200 cm. De longitud, y en crías de 45 cm. Utiliza un otoscopio para observar la estructura reproductora. Sin embargo dado lo difícil que es observar el pene de crías, sugiere volver a sexar los cocodrilos cuando alcancen una talla de 150 cm. De longitud.

Guillette *et al.* (1997), como parte de estudios reproductivos para hembras de *Alligator mississippiensis*. Se analiza en muestras de sangre para estradiol-17B (E₂), testosterona (T) y corticosterona por radioinmunoensayo específico. Formación de folículos vitelo-génicos por electroforesis en un gel de sodio

unidimensional dodecil sulfato-poliacrilamida. Y también se analizaron las proteínas totales, fósforo y calcio por espectrofotometría.

Morrish y Sinclair (2002), trabajan con *Alligator mississippiensis*, realizando la determinación del sexo en gónadas durante el periodo de embriogénesis. Los genes microsatelitales utilizados son SRY, SOX9, AMH, WT1, SF1, DAX1 y DMRT1.

4.4 Clasificación de los métodos de sexado. Invasivos; en estos se requiere manipular físicamente al organismo, introducir elementos ajenos al organismo y extracción de órganos ó muestras biológicas, su desventaja es que los organismos se estresan durante el manejo ó mueren.

No invasivos; en estos se trabaja con muestras o residuos fisiológicos, para lo cual no se necesita manipular a los organismos, su desventaja es que muchas veces no se sabe con exactitud de que individuo es la muestra, en el caso de hormonas y ADN puede contaminarse con facilidad sino se manejan adecuadamente.

4.5 Métodos de sexados en aves y mamíferos

4.5.1 Los métodos utilizados para sexar aves son los siguientes:

- Sotomayor-Tena y Ciriaco-Castañeda (2004), utilizan varias formas de diferenciar el sexo en codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japónica*), estas son; por la forma del huevo, examen a la cloaca y por características del plumaje (dimorfismo sexual) a los 25, 35 y 45 días de edad. Los porcentajes de certeza fueron de 51.1 y 59.9 % para la forma del huevo y examen a la cloaca respectivamente, y para las características del plumaje fueron 95.6, 98.2, y 100%.

- Wilson *et al.* (2001), para sexar pollitos de un día de nacidos menciona los siguientes métodos:

* Método Bioquímica/Histológico; este método involucra la identificación de cromosomas por cariotipo, o la caracterización bioquímica por el análisis del ADN o por otros métodos químicos. Este método se prefiere para pollitos muy costosos, porque de otra forma no es económico.

* Método por Instrumento; este método se realiza con un instrumento óptico (Instrumento Keeler) similar a un proctoscopio (utilizado por los doctores para revisar el recto). Un tubo óptico es insertado en el intestino grueso de los pollitos y se observan las gónadas directamente a través de la pared del intestino. Los

machos tienen dos testículos mientras que las hembras usualmente tienen solo un ovario localizado en el lado izquierdo.

* Sexado por Orificio (Cloaca); este método involucra el examen visual de la cloaca del pollito, siendo distinguido el sexo de acuerdo a diferencias anatómicas minuciosas. Este método requiere un entrenamiento extensivo por varios meses para lograr habilidad necesaria, pero es bastante acertado una vez que se ha logrado considerable experiencia. Las aves acuáticas y las corredoras tienen los órganos reproductivos más grandes lo cual hace más fácil su identificación.

* Autosexado; este método es la utilización de una característica ligada al sexo fácilmente observable para distinguir el sexo del pollito (dimorfismos sexual). Debido a que hay un número limitado de características ligadas al sexo que se pueden utilizar, y están presentes solo en un cierto número de razas de pollos, es necesario utilizar las razas acarreadas o introducir el gen ligado al sexo en la raza o estirpe deseada.

* Sexado por Color; en este método se basa en la observación del color del plumaje en ciertas razas, pues pueden tener barras o manchas en alguna parte del cuerpo. El sexo de los pollitos puede ser distinguido por el tamaño y la forma de una mancha en la cabeza cuando eclosionan (nacen). Los pollitos machos de un día tienen la mancha en la cabeza más grande. La mancha en las hembras es más pequeña y angosta. En los adultos, el macho tiene plumas con barras blancas más anchas que las de las hembras y, por lo tanto, es más ligera en el color. Otra característica que ha sido utilizada en algunas estirpes comerciales son los genes plateado (S) y oro (s). Los machos color oro son cruzados con las hembras plateadas y en la descendencia los machos son plateados y las hembras son oro.

* Sexado por las Plumas; con este método, el sexo del pollito es determinado cuando nace de acuerdo a lo largo de las plumas del ala (primarias y secundarias), los machos tienen relativamente las plumas de las alas más cortas que las hembras. En la hembra, las plumas de cobertura son más cortas que las plumas primarias. En el macho, las plumas de cobertura son más largas que las plumas primarias.

- Cañón-Ferreras (2006), utiliza el sexado universal mediante técnicas moleculares, SSCP-PCR ("*Single Strand Conformation Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*"), por medio de la visualización de una parte del gen CHD localizado en el cromosoma W y por tanto específico de las hembras. Al contrario de lo que sucede en mamíferos donde las hembras son homogámicas (XX) y los machos heterogámicos (XY), en aves la pareja de cromosomas sexuales son iguales en los machos (ZZ) y distintos en las hembras (ZW) (ver figura 3).

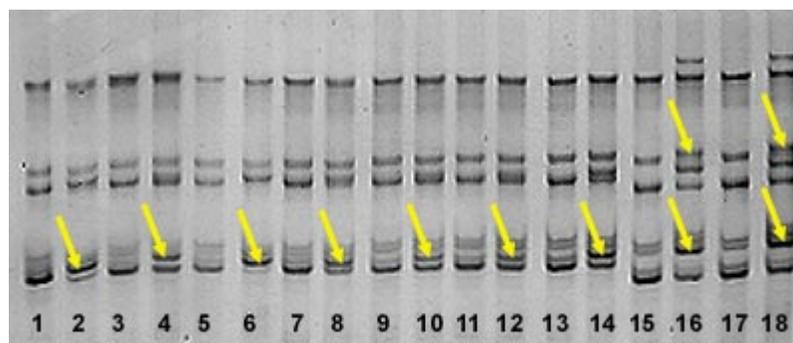


Figura 1. Cañón-Ferreras, 2006: Imagen de un gel de poliacrilamida donde se muestran respectivamente un macho y una hembra de: Águila imperial (1, 2); Búho real (3, 4); Halcón peregrino (5, 6); Cigüeña (7, 8); Yako (9, 10); Loro amazónico (11, 12); Guacamayo de pecho amarillo (13, 14); Perdiz (15, 16) y Codorniz (17, 18). Las flechas señalan las bandas específicas de las hembras.

4.5.2 Los métodos utilizados para sexar mamíferos son los siguientes:

- El método más común es por dimorfismo sexual, al tener los mamíferos en el caso de los machos los genitales expuestos es fácil su observación, para las hembras maduras además de los genitales, generalmente se observa las glándulas mamarias en el porción ventral.

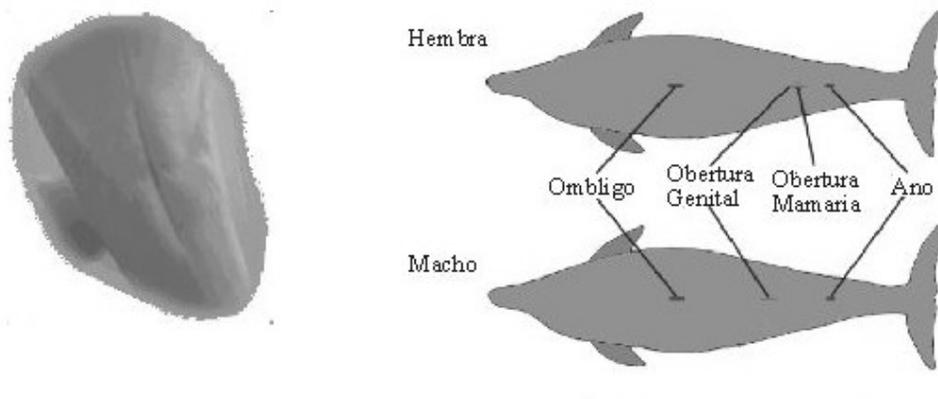
- Morrish y Sinclair (2002), trabajan con ratón, realizando la determinación del sexo en gónadas durante el periodo de embriogenesis. Los genes microsatelitales utilizados son SRY, SOX9, AMH, WT1, SF1, DAX1 y DMRT1.

- García-Garitagoitia *et al.* (2003), menciona que para el sexado por genes en Oso Pardo, la metodología utilizada es coleccionar muestras de heces y pelo, de los cuales se extrae el ADN de células epiteliales adheridas al excremento o a la raíz del pelo. Se utilizan los genes o microsatélites SRY (Sex-determining region del cromosoma Y) y el específico para osos MU64. Para la identificación de sexo se utiliza gel de agarosa, y se observa la aparición de bandas, si aparecen dos bandas correspondientes a los genes MU64 y SRY, significa que el individuo es un macho. Si solo aparece la banda del gen MU64, será una hembra, pudiendo

así distinguir a las hembras de las muestras en las que la PCR no haya funcionado correctamente, en cuyo caso no aparecerán bandas.

- Soto *et al.* (2004), realizan una valoración hormonal en Lobo Mexicano (*Canis lupus baileyi*), en el cual recogen heces fecales cuantificándose por inmunoensayo enzimático (EIA) las siguientes hormonas; progesterona (P4), testosterona (T) y estradiol (E2), determinándose la concentración de cada hormona en el espectrofotocolorímetro. El sexado se realiza a partir de concentración diferencial de testosterona.

- Plana (2006), menciona hay medidas morfométricas para poder sexar delfines adultos ó se puede observa la región ventral. Los machos tienen dos aberturas longitudinales siendo la más cercana a la cola el ano y la siguiente la cavidad genital. Las hembras tienen las mismas aberturas pero están más cercanas entre sí, prácticamente no se aprecia distanciamiento alguno, y a cada lado de la cavidad genital podemos ver dos pequeños pliegues que son donde se ocultan las mamas (ver figuras 3).



Figuras 3. Vista ventral del delfín, mostrando aberturas genitales, mamas y ano (WEB The Dolphins, 2006).

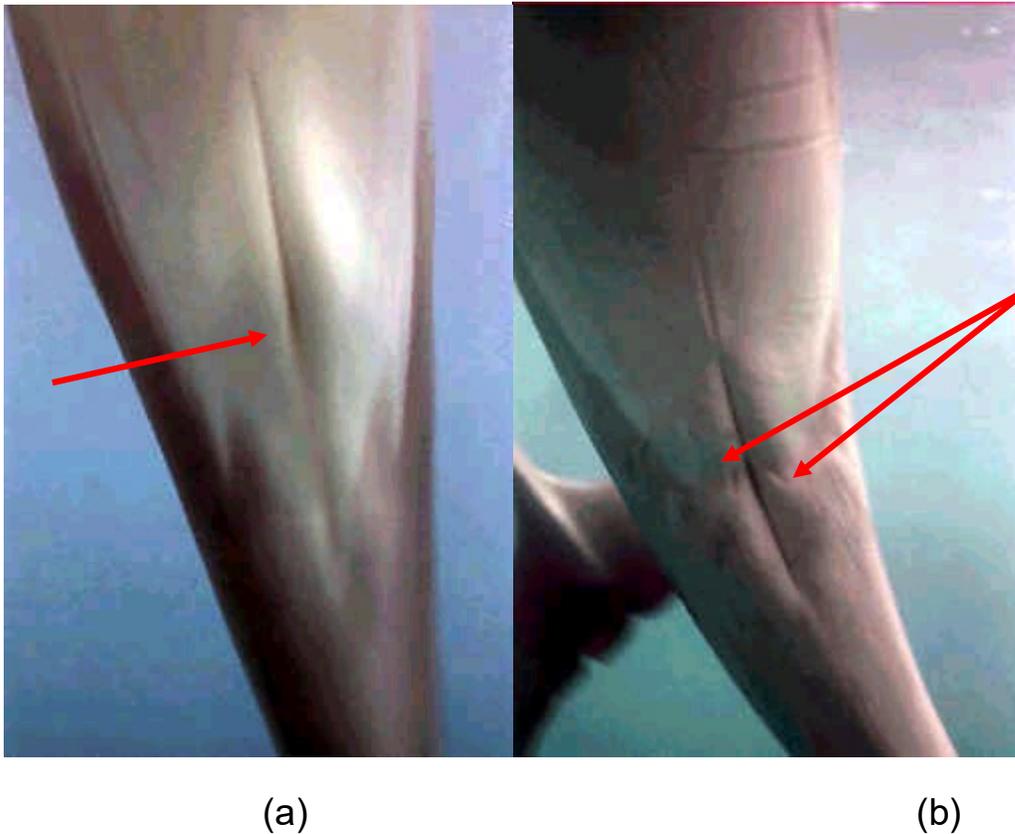


Figura 2. Vista ventral del delfín, (a) Macho la flecha indica su aberturas genital, (b) Hembra las flechas indican las aberturas de las mamas (WEB The Dolphins, 2006).

4.5 Que tecnica se propone y con cual objetivo. El objetivo de esta tesis consistió en determinar a través de las heces fecales del cocodrilo (*Crocodylus acutus*) los niveles de concentración de las hormonas testosterona y estradiol, como un indicador que nos ayude a determinar el sexo masculino y femenino, a través de un método no invasivo en esta especie, con el fin de mejorar los sistemas de producción de cocodrilos, a través de la identificación del sexo, optimizando adecuadamente el ciclo biológico de esta especie, con el método indicado para mejorar su reproducción en el tiempo óptimo, que puede ser utilizado en criaderos o granjas de cocodrilos y también con fines de conservación de la especie.

4.6 comparacion del trabajo de tesis con articulos internacionales de referencia. Muir, *et al.* (2001), investigo la presencia de 17B- Estradiol conjugado

de estrona y testosterona en muestras fecales y urinarias, aquí se utilizó la prueba de Elisa modificada para medir andrógenos y estrógenos durante la excreción, a partir de varias especies de gatos, pájaros, primates y también en la especie humana, que fue adaptada para ratones. Ellos reportaron la caracterización y la valoración del uso de este ensayo. Estas mediciones tuvieron como objetivo principal determinar la fertilidad de hembras principalmente con miras a una posible preñez y también en relación a la presencia de esteroides en machos.

Ishikawa *et al.* (2002), Realizaron un estudio para establecer sistemas simples para medir hormonas en esteroides fecales con el propósito de monitorear los perfiles reproductivos de los osos Hokkaido cafés. Se estudió la eficiencia del procesamiento de muestras fecales en los pasos de deshidratación y extracción, así como la correlación entre las concentraciones de esteroides entre muestras pareadas fecales y sanguíneas. Las concentraciones de hormona fueron cuantificadas usando inmunoensayos enzimáticos. Las concentraciones de progesterona y testosterona en muestras fecales y del plasma fueron correlacionadas en los dos sistemas. Los cambios en las concentraciones de progesterona y testosterona fecal fueron similares a aquellas concentraciones en suero de osos como había sido reportado previamente. En contraste, las concentraciones fecales de estradiol no correlacionaron con los niveles de plasma a causa probablemente del tiempo lag en la excreción. Sin embargo, los cambios en las concentraciones de estradiol-17B en heces en este estudio fueron similares a los reportados en suero. En conclusión, los sistemas de ensayo para progesterona y testosterona fecal resultaron prácticos para monitorear las actividades ovárica y testicular sin inmovilización, pensando que se deben hacer mejoras metodológicas, además de que una validación adicional pueden ser requerida.

García *et al.* (2004), Hicieron un estudio cuyo propósito fue validar técnicas endocrinas de monitoreo no invasivo en el venado de las pampas y para evaluar cambios estacionales en actividad testicular esteroideogénica y su correlación con el comportamiento reproductivo, ciclo estral y tamaño del grupo. Ellos observaron correlaciones significativas entre la testosterona fecal y el comportamiento reproductivo ($R = 0.490$) y entre testosterona fecal y las fases astales ($R = 0.239$). La aparición de las astas y su retoño, fue cuando se presentaron concentraciones bajas de testosterona, mientras que el esparcimiento de lana estuvo asociado con altas concentraciones de la misma. Se infiere que el venado de las pampas en sus diferentes etapas exhibe un ciclo estacional, que modifica el comportamiento sexual y el ciclo astal. En conclusión, encontraron que el análisis de esteroides fecales fue un método práctico, confiable y no invasivo para la evaluación de estatus endocrino del venado de las pampas de vida libre.

5. Materiales y metodos

5.1 Procedencia de los cocodrilos. La especie de los cocodrilos evaluados fueron *Crocodilus acutus* que provienen de la Unidad de Manejo (UMA) del Reptilario Cipactli del Centro Universitario de la Costa de la Universidad de Guadalajara, ubicado en Puerto Vallarta, Jalisco, México. Cada espécimen tiene asignado un número establecido por el Reptilario y fue el que se tomó para identificarlos en este estudio.

5.2 Identificación de sexo por el metodo de palpación. Inmediatamente después se les identifico el sexo físico por el método tradicional el cual consiste en hacer palpaciones a través de la cloaca si se encuentra el pene es macho, si se localiza el clítoris es hembra, posteriormente se espero a que defecaran directamente en tubos falcon de 50 ml., donde se les asigno el mismo numero para evitar confusiones.

5.3 Recolección de muestras de orina y heces fecales. Cada cocodrilo fue aislado en una jaula individual para recolectar las heces fecales y la orina por separado y directamente de cada individuo, cada muestra fue recolectada individualmente en tubos de ensayo de vidrio con 1 ml de dietil eter en el caso de heces fecales se adicionaron entre 1 a 2 g y se homogenizaron, con respecto a la orina fue entre 1 y 2 ml.

5.4 Determinación de hormonas esteroides por inmunoensayo competitivo. Se colocaron un gramo de heces fecales de cada uno de los cocodrilos en tubo de vidrio de 15 ml con tapón de vidrio, posteriormente se les adiciono 1ml de dietil ether y se agito con un vortex durante 5min. La eficiencia de extracción puede mejorar si se deja toda la noche. Posteriormente se adicionaron 3ml de dietil ether *baker num. De catalogo y se agito nuevamente con un vortex por 5 min. se colocaron los tubos en un extractor para que se evaporara el dietil eter toda la noche hasta un volumen de 10 microlitros, colocando la muestra en cada uno de los micropozos seleccionados asi como las replicas para lo cual se utilizo un kit de testosterona Biokwitech S.R.L. de C.V. Ensenada B.C. Mexico, imendiatemente después se adiciono 50 microlitros del conjugado testosterona peroxidasa y 50 micro del anticuerpo de conejo de antitestosterona seguido por mezclar suavemente por 30 segundos, la placa se metio en una bolsa de plastico y se incubo a 37 grados centigrados por 40 min, posteriormente se lavo 5 veces en agua destilada y se agrego a cada micropozo 100 microlitros de sustrato TMB* y se agito por 5 segundos y se incubo a temperatura ambiente por 20 min la reacción se detubo con 1N de HCl agitando subvente por 30 segundos , los resultados se observaron a ojo, para los resultados cualitativos, posteriormente

estos mismos resultados fueron evaluados cuantitativamente en un lector de ELISA a 450 nm, Marca Awareness, Modelo stat fax-2100 a través de la curva estandar.

6. Resultados y discusión

Tabla 1. Efecto de la talla y el peso de 0.5 g de las muestras de heces fecales de los cocodrilos muestreados.

Especimen (0.5 gr)	Talla (m)	Peso (kg)	Estradiol ng/ml	Testosterona mg/ml
Arnold 1	2.13	30		
Arnold 2			705	42
Arnold 3			7442	75
Arnold 4			9 804	30
Arnold 5			46 505	79
Goliat 1	3.30	250	17 754	53
Goliat 2			42 353	57
93 – 3 (H)	1.22	4		
58	1.20	2.9	419	2
618	.97	3	3 022	18
461 (H)	1.33	6	877	3
461 a			13	.097
111-6	1.19	5		
111-7			6943	16
512 - 5	1.16	4 kg	1866	5

En la tabla 1 se puede observar que los resultados en concentraciones de testosterona para especímenes adultos Arnold y Goliat, se pueden considerar como concluyentes, aunque también se puede decir que por utilizar una muestra de 0.5 gramos, los resultados fueron dudosos para los otros individuos analizados al tomar en cuenta el peso y la talla. Con respecto a la hormona estradiol, se puede decir que los resultados no fueron muy confiables, tal vez por el tamaño de la muestra tan pequeña.

Tabla 2. Efecto de la talla y el peso en 1 gr de las muestras de heces fecales de los cocodrilos muestreados.

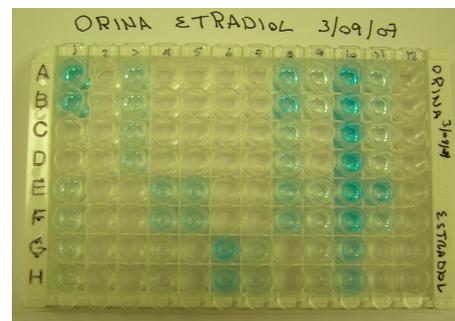
Especimen (1 gr)	Talla (m)	Peso (kg)	Estradiol ng/ml	Testosterona mg/ml
Arnold 1	2.13	30	1 677	68
Arnold 2			1 679	48
Arnold 3			14 784	79
Arnold 4			11 121	39
Arnold 5			27 084	89
Goliat 1	3.30	250	20 786	48
Goliat 2			39 510	59
93 – 3 (H)	1.22	4	291	1
58	1.20	2.9	5 180	15
618	.97	3		
461 (H)	1.33	6	5 338	10
111-6	1.19	5	4 907	7
111-7			39 678	50
512 - 5	1.16	4		

En la tabla 2 con respecto a lo observado en testosterona, se muestra que aquí los resultados fueron mas concluyentes que en la tabla anterior tanto para los machos adultos (Arnold y Goliat), como para los otros especímenes probados siempre y cuando tuvieran una talla mayor que 1.3 metros, debido al tamaño de la

muestra que fue mayor (1 gramo). Se observa también que en testosterona la concentración en proporción de adultos con respecto a los especímenes mas jóvenes fue de aproximadamente de 1 a 5 o 1 a 7. en relación a la concentración de estradiol, se observó lo mismo que en la tabla anterior que los resultados no son confiables, toda vez que Arnold y Goliat presentaron concentraciones mucho mas altas que las hembras, esto se debió a que las hembras son mas jóvenes, de menor talla y peso que los machos adultos mencionados.

Tabla 3 Resultados en prueba de ELISA en estradiol en orina

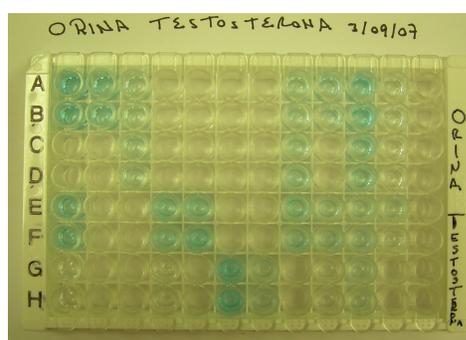
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	H	M					H	M	S	S	
B	M	H	M					H	M	S	S	
C			M					H		S	S	
D			M					H		S	S	
E	M			M	M			H	M	S	CN	
F	M			M	M			H	M	S	CP	
G	M			M		H	M		M	S		
H	M			M		H	M		M	S		



La tabla 3 es el diseño experimental de las concentraciones de estradiol en orina para la prueba de ELISA. En esta tabla se puede concluir que los resultados no fueron coherentes al comparar los dos métodos el tradicional invasivo con respecto al que fue probado en este estudio, por que se observo que en machos, el color no viro de azul a claro.

Tabla 4 Resultados en prueba de ELISA en testosterona en orina

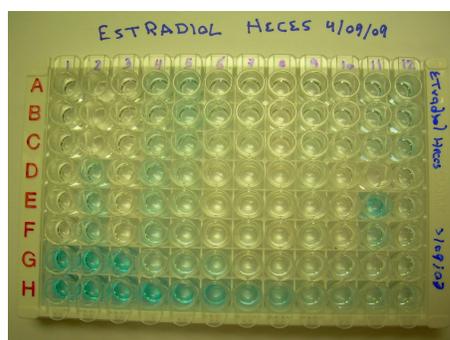
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	H	M					H	M	S	S	
B	M	H	M					H	M	S	S	
C			M					H		S	S	
D			M					H		S	S	
E	M			M	M			H	M	S	CN	
F	M			M	M			H	M	S	CP	
G	M			M		H	M		M	S		
H	M			M		H	M		M	S		



La tabla 4, con testosterona en orina, proporcionó resultados un poco mas acertados, pues si se observó que hubo un giro en el color (columnas 3 y 7) aunque muy tenue confirmándose que la prueba de ELISA no es muy confiable para la identificación de sexo en orina aun con esta hormona, tal vez por la dilución que presenta al estar en un medio liquido como lo es la orina.

Tabla 5 Resultados en prueba de ELISA en estradiol en heces fecales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
B	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
C	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
D	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M		H
E	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M	CN	H
F	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M	CP	H
G	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S



La tabla 5, muestra que los resultados de identificación de sexo, no son compatibles porque el estradiol debe virar a un color cristalino, por lo que su comportamiento, esta siendo parecido al de testosterona. Toda vez que las hembras de la columna dos permanecieron sin cambio en el color, en sentido contrario a los machos que en lugar de permanecer en color azul giraron a cristalino (columnas 1,3,6,7,8,9, y 10). Se puede concluir que esta prueba en estradiol no es confiable.

Tabla 6. Resultados en prueba de ELISA en testosterona en heces fecales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
B	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
C	M		M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
D	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M		H
E	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M	CN	H
F	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M	CP	H
G	M	H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S



La tabla 6, para la prueba de testosterona en heces fecales, muestra resultados muy concluyentes, pues se observa que todos los machos viraron de color azul a cristalino (columnas 1, 3,4,5,6,7,8,9,10 y 11), en cambio las hembras permanecieron conservando el color (columnas 2 y 12). Se puede concluir que la prueba de ELISA para identificar testosterona en heces fecales es el método más confiable para determinar el sexo en los cocodrilos.

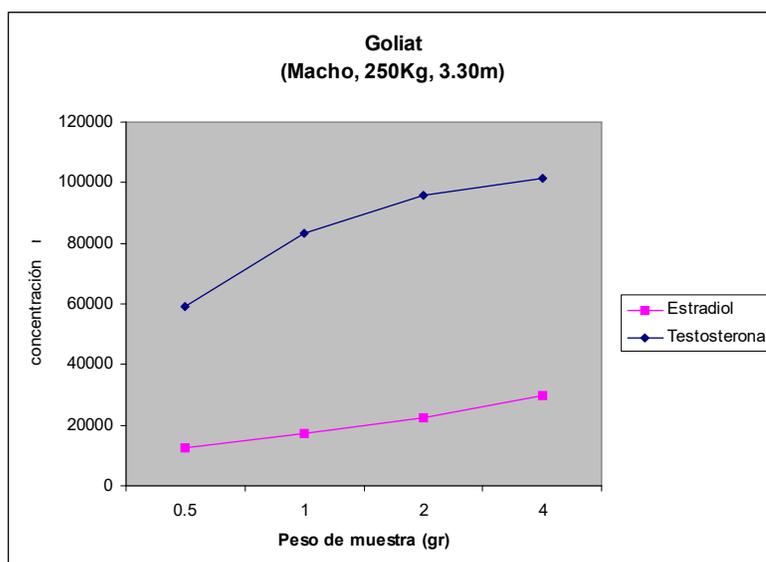


Figura 4. Relación de testosterona y estradiol en el macho Goliat en heces fecales.

En la gráfica de la figura 1 se anotan los datos para el macho Goliat, en donde se compara la concentración de testosterona y estradiol con respecto al peso de la muestra. Se observa que a medida que se aumenta el peso de la muestra se separan las dos gráficas de ambas hormonas, donde se puede concluir que el peso óptimo de la muestra es a partir de un gramo. Se puede ver en este macho Goliat que la concentración de testosterona aumenta significativamente con la talla del individuo y con el peso de la muestra, observándose además un decremento en la concentración de testosterona a medida que aumenta el peso de la muestra debido a la edad de este espécimen en particular.

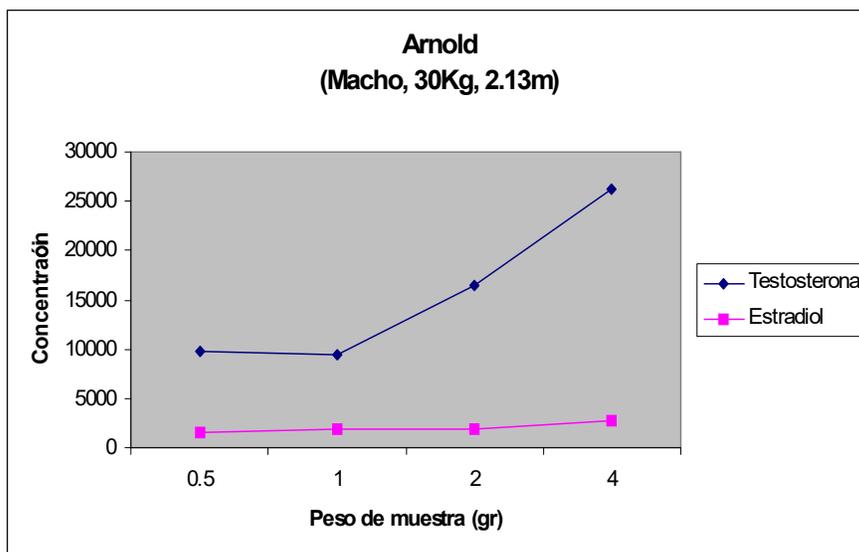


Figura 4. Relación de testosterona y estradiol en el macho Arnold en heces fecales.

En la grafica de la figura 2, se anotan también los mismos datos para el macho Arnold, el relación a las concentraciones de testosterona y estradiol con respecto al peso de la muestra. En esta grafica se observa un crecimiento exponencial en concentración de la testosterona, a medida que se incrementa el peso de la muestra y al igual que en la grafica de la figura anterior se ve que el tamaño óptimo de la misma se incrementa a partir de un gramo. Si la edad del individuo y el peso de la muestra son menores, los resultados pueden resultar confusos o no concluyentes, debido a que las concentraciones de ambas hormonas son muy bajas, las cuales arrojan datos insuficientes, que no permiten llegar a una conclusión confiable.

7. Conclusiones

Se pudo observar que a partir de la talla de 130 cm. En adelante, es más factible identificar el sexo en cocodrilo, de acuerdo con lo mencionado por Ugalde- Lezama (2001) en *Crocodylus moreletti*, al concluir que la edad y tallas óptimas para la identificación del sexo en esta especie era de 150 cm, que son sexualmente maduros. Estos autores concluyeron que con relación a la LHC de hembras y machos, tomando en cuenta todas las clases de edad para ambos sexos se encontraron diferencias significativas, siendo más grandes los machos que las hembras, lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo de investigación, de que al comparar machos con respecto a hembras, estas eran mucho más jóvenes que los machos, por tal motivo, se puede considerar que los resultados en hembras no pudieron ser comparados con los resultados de los machos adultos. Aunque ellos consideraban que los individuos de la talla mencionada al principio (130 cm) era de individuos subadultos (101 a 150 cm), de acuerdo también con la clasificación hecha por Leyte-Manrique y Ramírez Bautista, 2005.

Con respecto a las pruebas de ELISA, se pudo observar que la prueba de estradiol en orina no dio resultados efectivos para la identificación de sexo porque se observaron reacciones muy confusas para el cambio o giro en el color, por lo que se puede concluir que al utilizar estradiol en orina los resultados no son aceptables para identificar el sexo en los cocodrilos.

Para la prueba de ELISA de testosterona en orina, si se observó una reacción al girar el color de azul a claro para la identificación de machos, aunque este cambio fue muy tenue pues se siguió observando el color azul pero en tono muy pálido, esto se debió posiblemente a que la testosterona se encuentra muy diluida en el líquido de la orina. Por lo que se puede considerar que la prueba de testosterona en orina no es lo suficientemente confiable para la identificación del sexo.

Al realizar el ensayo de ELISA con estradiol en heces fecales, los resultados fueron contradictorios con respecto a lo esperado, porque el giro en el color fue totalmente inverso, es decir que en machos cambio de azul a claro y en hembras no se observó ningún cambio, en este ensayo se pudo concluir que la presencia de estradiol no funciona como una prueba efectiva para la identificación del sexo.

Finalmente, con el inmunoensayo de ELISA de testosterona en heces fecales, los resultados esperados fueron absolutamente confiables, toda vez que al comparar los dos métodos, tanto invasivo como el no invasivo, se observó una coincidencia total, porque los resultados fueron idénticos. En machos el color azul giro a cristalino y en hembras no se detectó ningún cambio. Por lo tanto se puede afirmar que la prueba de ELISA aplicada para determinar testosterona en heces fecales es efectiva para la determinación de sexo de los cocodrilos. Además se

puede concluir que el peso de muestra de heces fecales debe ser de 1 a 2 gr. Y también que el peso y edad del cocodrilo es determinante para la identificación del sexo a través del método propuesto.

En conclusión esta metodología, nos permite identificar el sexo en organismos en cautiverio, lo cual nos puede ayudar a seleccionar y diferenciar características fenotípicas o genotípicas que se deseen, desde subadultos hasta adultos para reproducirlos. Lo anterior sirve a las granjas dedicadas a la cría comercial, pero también es de suma importancia en proyectos dedicados a la conservación de especies en riesgo o peligro de extinción, ya que con estos métodos conservamos el acervo genético de las especies (biodiversidad).

8. Bibliografía.

- Brazitis, P. (1987). Identification of crocodylian skins and products. In' Webb, G.J.W., Manolis, S.C. and Whitehead, P.J. (Eds). *Wildlife Management. Crocodiles and Alligators*. Surrey Beatty and Sons Pty Ltd in association with The Conservation Comisión of the Northern Territory. Cited Jenkins and Broad (1994).
- Britton A. (2002). A Brief History of Crocodylian Conservation. www.flmnh.ufl.edu/cnhc/cbd-con-le.htm.
- Cañón-Ferreras, J. 2006. *Sexado de aves mediante técnicas moleculares*. Complutencno: Agricultura, Ganadería y Recursos Marinos, Universidad Complutense de Madrid. Pagina Web:
http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/tec_jcanon3.htm
- Caldwell, J. (2004). Word Trade in Crocodylian Skins, 2000-2002. Report prepared as part of the International Alligator and Crocodile Trade Study. UNEP-WCMC, Cambridge, UK.
- García Garitagoitia, J.L., I. Rey Fraile y I. Doadrio Villarejo. 2003. *Estudio genético del Oso Pardo Cantábrico en Asturias*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Museo Nacional de Ciencias Naturales de España. Conserjería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras, Principado de Asturias. España. 57 pp.
- Garcia *et al.* 2004. Seasonal Changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*) *Theriogenology*, vol. 63, 8, pp 2113- 2125, ISSN 0093-691X.
- Guillette, L. J., A. R. Woodward, D. A. Crain, G.R. Masson, B.D. Palmer, S.M.C. Cox, Q. You-Xiang y E.F. Orlando. 1997. *The reproductive cycle of the female American Alligator (Alligator mississippiensis)*. *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 108: 87-101.
- Hernández-Hurtado, H. 1997. *Recomendaciones para el desarrollo de un centro de acopio de cocodrilos en el Rancho Ecologico El Quelele, Municipio de Bahía de Banderas, Nayarit*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. 60 pp.
- Hutton, J., Ross, J.P. and Webb, G. (2001). *Using the market to Create Incentives for the Conservation of Crocodylians. A Review*. IUCN\SSC Crocodile Specialist Group. 28 pp.

Ishikawa *et al.* 2002. Efficiency of fecal steroid hormone measurement for assessing reproductive function in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*).

- King, F.W. and Burke, R.L. (1989). *Crocodylian, Tuatara and Turtle Species of the World. A taxonomic and geographic reference.* Assoc. Systematics Collections. Washinton D.C. xxii + 216 pp.

- Morrish, B. C. y A. H. Sinclair. 2002. *Vertebrate sex determination: many means and end.* Society for Reproduction and Fertility, Reproduction Review. Vol.124: 447-457.

- Muir, C *et al.* 2001 Enzyme Immunoassay of 17 β - Estradiol, Estrone Conjugates, and Testosterone in Urinary and Fecal Samples From Male and Female Mice. Hormone and Metabolic Research, vol. 33, n 11, pp. 653- 658., ISSN 0018-5053.

- Leyte-Manrique A. 2005. Estudio preeliminar del Estado de Conservación de *Crocodylus moreletti* en el Sistema de Ciénegas Progreso-Chicxulub, Yucatan. Depto. Oceanografía y Biología Marina. Estaciona de Investigación Oceanográfica de Progreso. Secretaria de Marina. Reporte tecnico EIO-PROG-02.

- Luxmoore, R.A. (Ed.) (1992). *Directory of Crocodylian Farming Operations. 2nd edition.* IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. 350 pp.

- MacGregor, J. (2002) International Trade in Crocodylian Skins. Review and Analisis of the Trade and Industry Dynamics for Market-based Conservation. Report for the Crocodile Specialist Group. <http://www.flmnh.ufl.edu/herpetology/CROCS/MacGregorfinalDec2002.doc>. Viewed July 2006.

- Ross, J.P. (Ed.) (1998a). *Crocodyles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2nd edition.* IUCN\SSC Crocodile Specialist Group. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK, UK. Viii + 96 pp.

- Singh, L.A.K. 1984. *Developments in crocodylian research and management.* Establishment of the Wildlife Institute of India, Food and Agriculture Organisation of the United Nations. India. 120 pp.

- Sotomayor-Tena, J. y P. Ciriaco-Castañeda (2004). *Evaluación de diferentes métodos de sexado de la Codorniz Japonesa (Coturnix coturnix japonica L.).* Pagina Web: <http://www.appaperu.org/appa2004/resumenes/manejo/092.doc>.

- Soto, M.A., A. Salame-Mendez, J. Ramírez-Pulido, L. Yañez y M.A. Armella. 2004. *Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de Lobo Mexicano (Canis lupus baileyi) en cautiverio*. Acta Zoológica Mexicana Vol. 20 (2): 187-196.

- Ugalde-Lezama, S. 2001. Estudio Poblacional y desarrollo de una propuesta de uso sustentable para la conservación y manejo del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletti*) en la comunidad de Zamora de Pico de Oro, Marques de comillas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

- Wilson, H.R., J.P. Jacob, F.B. Mather y J.C. García L. 2001. *Métodos de sexado en pollitos de un día de edad*. es uno de una serie de publicaciones del Departamento de Animal Science, Servicio de Extensión Cooperativo de la Florida, del Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. PS-21S, 1-4 pp. Pagina web:

<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/AN/AN09600.pdf>.