SARS Final Report
Efectos de temperaturas fluctuantes sobre la histomorfología genital en *Alligator mississippiensis*

Micaela Mazaratti

CICyTTP-CONICET/Prov. Entre Ríos/UADER, España 149, Diamante 3105, Entre Ríos, Argentina
(micaelamazaratti@hotmail.com)

Abstract

Temperature-dependent sex determination in reptiles is strongly influenced by incubation temperature during a critical thermosensitive period. Although most studies have focused on constant incubation temperatures, natural nests experience daily thermal fluctuations that may affect embryonic development beyond gonadal differentiation. This study evaluated the effects of constant and fluctuating incubation temperatures on the histomorphology of external genitalia in *Alligator mississippiensis* hatchlings. Seventeen nests were collected from the Tom Yawkey Wildlife Center and incubated under five thermal treatments: female-producing temperature (FPT, 30 °C), male-producing temperature (MPT, 34 °C), intermediate constant temperature (IPTC, 31.2 °C), and high-amplitude fluctuating temperature (IPTF2, 31.2 ± 2.8 °C). External genitalia were collected three months after hatching and processed for histological analysis. Morphometric and qualitative analyses were performed on the shaft and glans regions of the cliterophallus. MPT produced exclusively males, whereas all remaining treatments produced females. Significant histological and morphometric differences were observed among treatments. MPT hatchlings exhibited a higher fibrous body ratio and lower sulcus ratio than FPT individuals. Fluctuating treatments, particularly IPTF2, showed intermediate or partially masculinized phenotypes, including altered fibrous body proportions, reduced nerve density, and muscle fiber organization resembling that of MPT individuals. In addition, fluctuating treatments displayed greater intra-group variability compared with constant temperatures. Development of the corpus spongiosum also differed among treatments, with MPT exhibiting more advanced developmental levels than FPT. These findings demonstrate that thermal fluctuations during embryonic development influence external genital differentiation independently of gonadal sex. The increased phenotypic variability observed under fluctuating temperatures suggests that thermal instability may alter developmental pathways associated with reproductive morphology, highlighting the importance of incorporating ecologically realistic thermal regimes into studies of crocodilian development under climate change scenarios.

Introducción

Muchas especies de reptiles presentan determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD), un sistema en el cual la temperatura de incubación durante un período crítico del desarrollo embrionario, denominado período termosensible (PTS), determina si la descendencia será macho o hembra (Lang and Andrews, 1994; Kohno et al., 2014; Piña et al., 2003). En *Alligator mississippiensis*, el PTS ocurre aproximadamente entre los días 7 y 21 de incubación. Temperaturas ≤30 °C producen una descendencia 100 % femenina, mientras que temperaturas ≥34 °C generan una descendencia 100 % masculina (Lang and Andrews, 1994; Ferguson and Joanen, 1982).

La mayor parte de la evidencia disponible sobre TSD proviene de estudios realizados bajo condiciones de incubación a temperaturas constantes, los cuales han aportado información fundamental para

comprender los mecanismos involucrados en este proceso. Sin embargo, dado que en la naturaleza las temperaturas de los nidos fluctúan diariamente y a lo largo del desarrollo embrionario, resulta esencial desarrollar investigaciones que reproduzcan con mayor precisión las condiciones térmicas naturales para comprender este fenómeno en contextos ecológicos reales. En este sentido, la incubación con temperaturas fluctuantes constituye una aproximación más representativa de las condiciones naturales.

En los últimos años se han investigado los efectos de la incubación a temperaturas fluctuantes en diversas especies de reptiles con TSD (Bock et al., 2021; Breitenbach et al., 2020; Simoncini et al., 2019; Bowden et al., 2014; Warner y Shine, 2011; Les et al., 2007). Tanto en *A.mississippiensis* como en *Caiman latirostris* se ha demostrado que las fluctuaciones térmicas no solo influyen en las proporciones sexuales, sino también en otros aspectos del desarrollo, como el período de incubación y las características morfológicas de la descendencia (Bock et al., 2021; Simoncini et al., 2019). En particular, Bock et al. (2021) observaron en crías de *A. mississippiensis* una marcada influencia de la amplitud de la variabilidad térmica durante la incubación sobre la longitud corporal, el área cefálica y el tamaño de la yema residual. Esta variación fenotípica podría explicarse por el efecto del entorno térmico experimentado durante el desarrollo y su interacción con la provisión de recursos maternos (Bock et al., 2021).

En este contexto, resulta relevante evaluar si las fluctuaciones térmicas durante la incubación también pueden afectar el desarrollo y la diferenciación de las estructuras reproductivas, particularmente considerando que estos procesos ocurren durante el período termosensible. En *C. latirostris*, factores externos como la administración de estrógenos exógenos pueden revertir el sexo a temperaturas productoras de machos (33°C), dando origen a hembras fenotípicas que presentan diferencias histológicas y en la expresión de receptores hormonales en sus estructuras reproductivas respecto de hembras originadas por temperaturas constantes de 31°C (Tavaleri et al., 2018).

Por lo tanto, con el objetivo de profundizar el conocimiento sobre los efectos de las fluctuaciones térmicas durante etapas críticas del desarrollo embrionario, en este trabajo se evaluó si existen diferencias en la histo-morfología de la genitalia externa (clítoris y falo) entre crías de *A. mississippiensis* incubadas bajo temperaturas constantes y fluctuantes. Dado que tanto la determinación sexual como el desarrollo morfológico están fuertemente influenciados por el ambiente térmico, este estudio podría aportar información relevante sobre los posibles efectos del cambio climático en la dinámica poblacional de la especie.

Materiales y métodos

En junio de 2017 se recolectaron un total de 17 nidos de *A. mississippiensis* en el Tom Yawkey Wildlife Center. Todos los nidos fueron transportados en su material natural al Laboratorio de Ecología del río Savannah. En el laboratorio, cada nido fue subdividido aleatoriamente en cinco tratamientos térmicos de incubación: FPT (temperatura productora de hembras; 30 °C), MPT (temperatura productora de machos; 34 °C), IPTC (temperatura intermedia constante; 31,2 °C) e IPTF2 (temperatura fluctuante de alta amplitud; 31,2 ± 2,8 °C), manteniéndose bajo dichas condiciones hasta la eclosión.

Las crías fueron sacrificadas tres meses después de la eclosión y se recolectaron muestras de genitalia externa. Las muestras se fijaron en solución de Bouin durante siete días y posteriormente se conservaron en etanol al 70 % hasta su procesamiento histológico. El procesamiento tisular se realizó mediante inclusión en parafina, seguida de cortes seriados de 7 µm obtenidos con micrótomo. Los cortes fueron teñidos mediante hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Para el análisis histológico, la genitalia externa se dividió en las tres regiones macroscópicas descriptas por Moore y Kelly (2015): base, eje y glande. Asimismo, para la identificación y descripción de las estructuras tisulares se tomaron como referencia las caracterizaciones histológicas del cliterofalo deneonatos *C. latirostris* realizada por Tavalieri et al. (2018) y de juveniles de *A. mississippiensis* (Moore et al.,2012) . Tanto en machos como en hembras, la organización histológica general está compuesta por un epitelio externo, un surco ventral revestido por epitelio estratificado y regiones internas de tejido conectivo y vascularizado (Tavalieri et al., 2018). En el eje, el surco se encuentra rodeado por el *corpus spongiosum*, compuesto por tejido vascularizado y haces de músculo liso, mientras que parte del volumen interno está ocupado por una región central rica en fibras colágenas correspondiente al cuerpo fibroso (*corpus fibrosum/cavernosum*). Además, se observan haces nerviosos distribuidos alrededor de esta región (Tavalieri et al., 2018). En el glande, el *corpus spongiosum* presenta una organización menos muscular y se expande alrededor de la cavidad del glande, mientras que el cuerpo fibroso permanece como una región rica en colágeno que rodea dicha cavidad (Tavalieri et al., 2018).

Los preparados histológicos fueron examinados mediante microscopía óptica y fotografiados utilizando una cámara digital color Lumenera INFINITY (1–5 megapíxeles). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Fiji, a partir del cual se midieron las siguientes variables morfométricas y sus relaciones: altura del surco, altura total, relación altura total/altura del surco, área total del eje, área del cuerpo fibroso, relación área total del eje/área del cuerpo fibroso, número de nervios alrededor del cuerpo fibroso, altura total y altura del surco en el glande, y relación altura total del surco/altura total del glande.

Debido a las dificultades para cuantificar el área total del cuerpo esponjoso en el glande, se realizó una evaluación cualitativa basada en niveles de desarrollo observados histológicamente:

- **Nivel 0:** regiones espongiformes inflables muy pequeñas alrededor de una porción del glande.
- **Nivel 1:** regiones espongiformes inflables alrededor de todo el glande.
- **Nivel 2:** regiones espongiformes inflables tanto alrededor del glande como del surco.
- **Nivel 3:** grandes regiones espongiformes inflables tanto alrededor del glande como del surco.

Los datos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R. Previamente, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Para aquellas variables que cumplieron dichos supuestos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), se realizó una prueba post hoc de Tukey para identificar las diferencias entre grupos.

Resultados

Las crías incubadas bajo el tratamiento MPT fueron 100 % machos, mientras que los tratamientos FPT, IPTCe IPTF2 produjeron exclusivamente crías hembras.Se observaron diferencias cuantitativas y cualitativas entre los grupos, tanto en la zona del eje como del glande de la genitalia externa. Las crías incubadas bajo el tratamiento MPT (0,245 ± 0,016) presentaron una mayor proporción de cuerpo fibroso en el eje genital en comparación con las crías FPT (0,173 ± 0,012; $p < 0,001$; Figura 1).

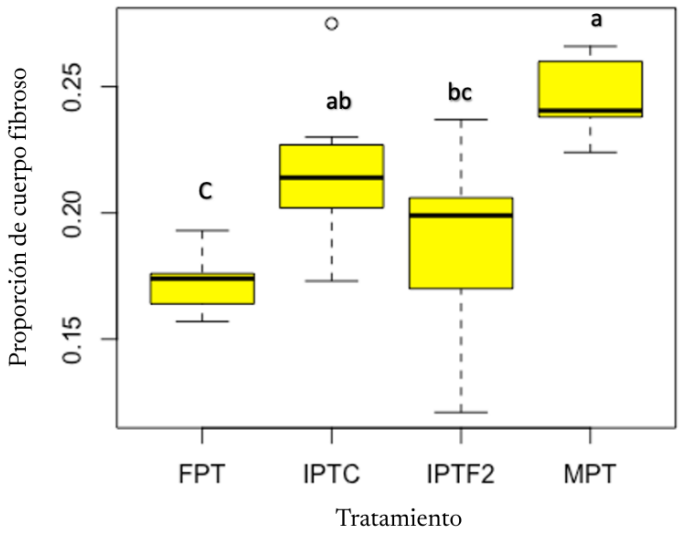


Figura 1. Diagrama de cajas de la proporción de cuerpos fibrosos para las temperaturas productoras de hembras (FPT), temperaturas productoras de machos (MPT), temperatura intermedia constante productora (IPTC) y temperatura intermedia productora con alta fluctuación (IPTF2). En el gráfico, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (valor p < 0,001).

En contraste, las crías FPT exhibieron una mayor proporción de surco (0,661 ± 0,047) respecto a las crías MPT (0,479 ± 0,040; Figura 2). Los tratamientos fluctuantes mostraron características intermedias o parcialmente masculinizadas. En particular, las crías IPTF2 presentaron valores intermedios en la proporción de cuerpo fibroso y del surco, además de una menor densidad de nervios en comparación con el resto de los grupos (p < 0,001).

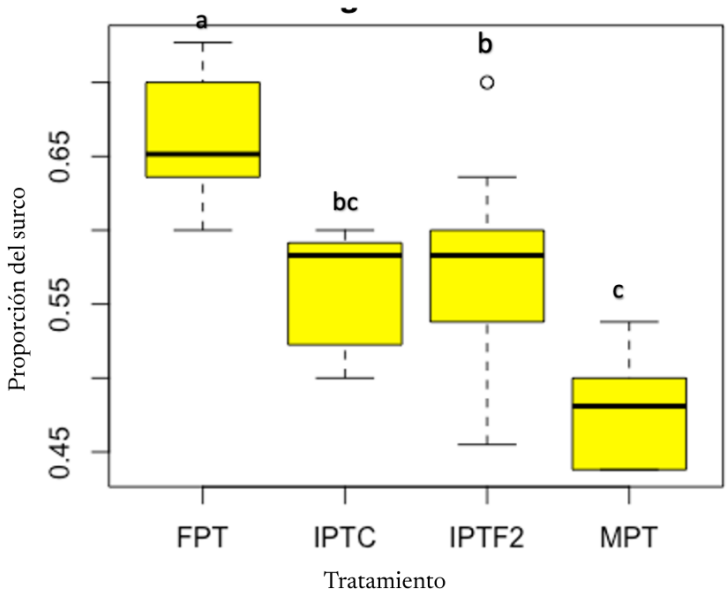


Figura 2. Diagrama de cajas de la proporción del surco para las temperaturas productoras de hembras (FPT), temperaturas productoras de machos (MPT), temperatura intermedia constante productora (IPTC) y temperatura intermedia productora con alta fluctuación (IPTF2). En el gráfico, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (valor p < 0,001).

La organización muscular a ambos lados del surco también difirió entre tratamientos. Se observaron diferencias cualitativas tanto en la presencia como en la disposición de las fibras musculares (Figura 3). En FPT no se detectaron fibras musculares alrededor del surco, mientras que en IPTC se observaron fibras con disposición longitudinal. En MPT, las fibras musculares presentaron una organización radial bien definida. Algunos individuos del tratamiento IPTF2 exhibieron una disposición muscular similar a la observada en MPT.

En relación con el desarrollo del cuerpo esponjoso, las crías MPT presentaron con mayor frecuencia los niveles más altos de desarrollo (niveles 2 y 3; Figura 4), mientras que las crías FPT se concentraron principalmente en el nivel 1 y no mostraron muestras en los niveles superiores. Los tratamientos intermedios exhibieron patrones intermedios; sin embargo, IPTF2 tendió a asemejarse más a FPT que a MPT.

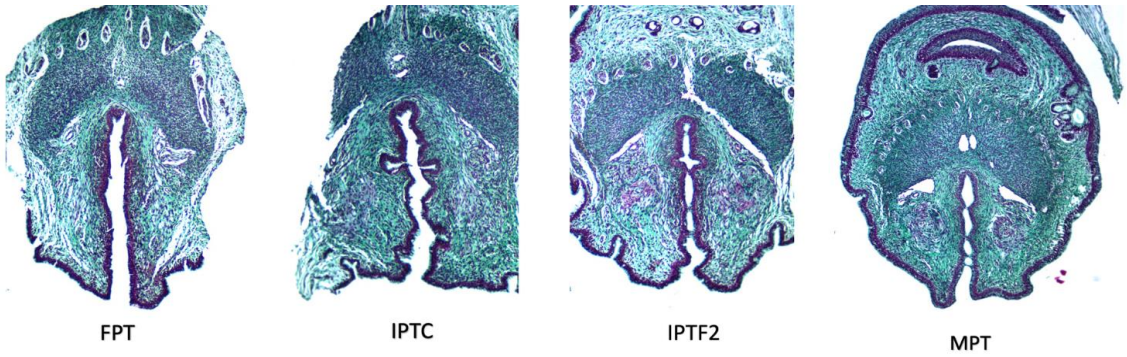


Figura 3. Base del cliterofalo de los tratamientos FPT, IPTC, IPTF2 y MPT. Cortes histológicos teñidos con tricrómico de Masson. En FPT no se observan células musculares. En IPTC se observan células musculares con disposición longitudinal alrededor del surco. En MPT, las células musculares son visibles y presentan una organización radial. En algunas muestras de IPTF2 se observan células musculares con una orientación similar a la de MPT.

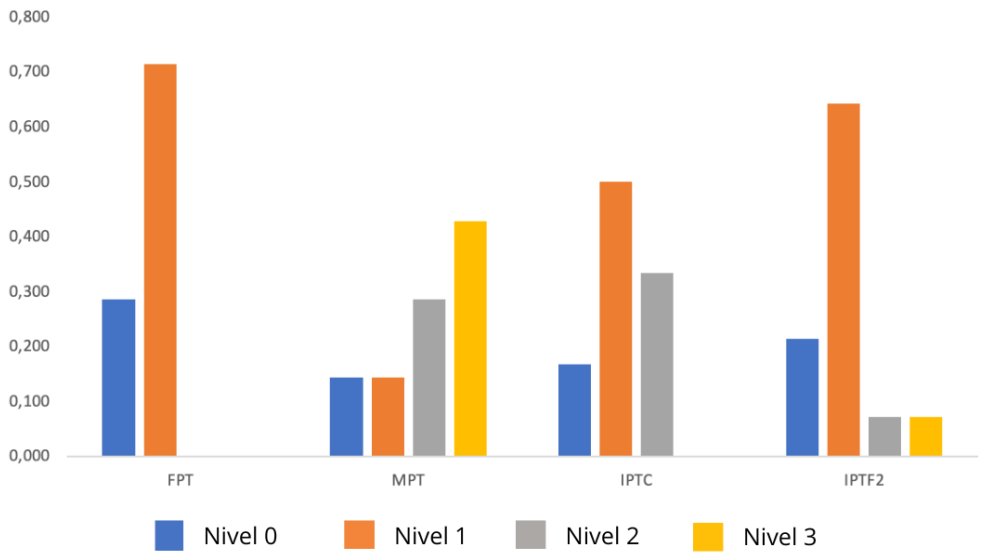


Figura 4. Desarrollo del cuerpo esponjoso en el glande del cliterofalo según tratamiento térmico

Discusión

Los resultados de este trabajo evidencian que el entorno térmico experimentado durante el desarrollo embrionario contribuye significativamente a la variación fenotípica de la genitalia externa en crías de *A. mississippiensis*. En particular, se observaron diferencias en la organización tisular de las hembras incubadas bajo temperaturas fluctuantes respecto de aquellas desarrolladas a temperaturas constantes. Asimismo, los tratamientos fluctuantes presentaron una mayor variabilidad intra-grupo en comparación con los tratamientos constantes, lo que sugiere que la amplitud térmica durante la incubación podría incrementar la heterogeneidad del desarrollo morfológico. En especial, el tratamiento con mayor amplitud térmica (IPTF2) fue el que exhibió los patrones más variables entre las estructuras analizadas.

En este contexto, la variabilidad térmica durante la incubación podría tener implicancias relevantes sobre la persistencia futura de las poblaciones. Esto resulta particularmente importante debido a que la organización histológica del cliterofalo estaría estrechamente relacionada con su funcionalidad durante la cópula (Moore et al., 2021). En machos, el *corpus spongiosum* y los tejidos vascularizados participan en la inflación del glande, mientras que el cuerpo fibroso rico en colágeno actuaría como soporte estructural, regulando la expansión y rigidez del órgano durante la intromisión. Asimismo, la disposición de las fibras musculares, colágenas y nerviosas influiría sobre la forma final del glande inflado y sobre la interacción mecánica con la cloaca femenina durante la transferencia de semen. En consecuencia, alteraciones en la organización de estos tejidos inducidas por la temperatura de incubación podrían afectar el desempeño reproductivo de los individuos.

Sin embargo, la temperatura no sería el único factor involucrado en la determinación sexual y en el desarrollo de las estructuras reproductivas. Actualmente continúa investigándose cómo otros factores interactúan con las vías de señalización asociadas a la diferenciación sexual. Algunos autores proponen que este proceso también estaría influenciado por la inversión hormonal materna, particularmente por los niveles de estrógenos depositados en la yema (Elf, 2003; Simoncini et al., 2019). En *C.latirostris*, tratamientos con estrógenos exógenos produjeron hembras fenotípicas con diferencias histológicas y en la expresión de receptores hormonales respecto de hembras desarrolladas a 31 °C (Tavaleri et al., 2018). También estudios realizados a una temperatura de incubación constante de 32°C (temperatura en la que se producen crías de ambos sexos en *C. latirostris*) mostraron que concentraciones altas y bajas de estradiol (E_2) en la yema de huevo se asociaron con mayores porcentajes de hembras que nidos que presentaron concentraciones intermedias en la yema (Valli, 2026). Además, en cocodrilianos como *A. mississippiensis* y *C. latirostris* se observó que los nidos difieren en las concentraciones de E_2 depositadas en la yema, a diferencia de lo reportado para otras hormonas maternas, y estas concentraciones disminuyen durante estadios del desarrollo que coinciden con los primeros rasgos de diferenciación gonadal (Conley et al., 1997, Valli, 2026).

En este sentido, los estrógenos maternos podrían modular la respuesta térmica embrionaria y generar variación en la expresión de genes implicados en la diferenciación sexual que responden tanto a la temperatura como a señales hormonales (Bowden y Paitz, 2021). Estudios realizados en otros reptiles con determinación sexual dependiente de la temperatura demostraron que variaciones térmicas durante la incubación modifican la expresión de genes involucrados en el desarrollo gonadal y, en consecuencia, alteran el proceso de determinación sexual. En particular, Breitenbach et al. 2020 observaron que exposiciones breves a olas de calor durante etapas tempranas del desarrollo alteran la respuesta térmica posterior de los embriones, modificando la expresión de genes asociados a la diferenciación gonadal y retrasando el compromiso hacia un destino sexual definido. Estos resultados sugieren que la historia

térmica experimentada por el embrión puede influir sobre las vías moleculares que regulan la diferenciación sexual.

En conjunto, estos hallazgos resaltan la importancia del ambiente térmico como modulador del desarrollo de las estructuras sexuales de la descendencia y ponen de manifiesto la necesidad de profundizar el estudio de los efectos de las fluctuaciones térmicas sobre la biología reproductiva de la especie. Asimismo, resulta fundamental comprender cómo factores ambientales y hormonales interactúan entre sí, ya sea potenciando o modulando diferentes vías de señalización durante el desarrollo embrionario. Esto adquiere especial relevancia en el contexto actual de cambio climático, donde se prevé un incremento tanto de las temperaturas medias como de la variabilidad térmica ambiental.

Bibliografía:

Bock, S. L., Hale, M. D., Rainwater, T. R., Wilkinson, P. M., & Parrott, B. B. (2021). Incubation temperature and maternal resource provisioning, but not contaminant exposure, shape hatchling phenotypes in a species with temperature-dependent sex determination. The Biological Bulletin, 241(1), 43–54.

Bowden, R. M., Carter, A. W., & Paitz, R. T. (2014). Constancy in an inconstant world: moving beyond constant temperatures in the study of reptilian incubation. Integrative and Comparative Biology, 54(5), 830–840. https://doi.org/10.1093/icb/icu016

Bowden, R. M., & Paitz, R. T. (2021). Is thermal responsiveness affected by maternal estrogens in species with temperature-dependent sex determination? Sexual Development, 15(1–3), 69–79.

Breitenbach, A. T., Carter, A. W., Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2020). Using naturalistic incubation temperatures to demonstrate how variation in the timing and continuity of heat wave exposure influences phenotype. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 287(1932), 20200992. https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0992

- Conley, A. J., Elf, P., Corbin, C. J., Dubowsky, S., Fivizzani, A., & Lang, J. W. (1997). Yolk steroids decline during sexual differentiation in the alligator. *General and comparative endocrinology*, *107*(2), 191-200. https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6913

Elf, P. K. (2003). Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. General and Comparative Endocrinology, 132(3), 349–355. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00098-4

Ferguson, M. W. J., & Joanen, T. (1982). Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. Nature, 296(5860), 850–853. https://doi.org/10.1038/296850a0

Kohno, S., Parrott, B. B., Yatsu, R., Miyagawa, S., Moore, B. C., Iguchi, T., & Guillette, L. J. Jr. (2014). Gonadal differentiation in reptiles exhibiting environmental sex determination. Sexual Development, 8(5), 208–226. https://doi.org/10.1159/000358892

Lang, J. W., & Andrews, H. V. (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodilians. Journal of Experimental Zoology, 270(1), 28–44. https://doi.org/10.1002/jez.1402700105

Les, H. L., Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2007). Experimental test of the effects of fluctuating incubation temperatures on hatchling phenotype. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 307A(5), 274–280. https://doi.org/10.1002/jez.378

Moore, B. C., Brennan, P. L. R., Francis, R., Penland, S., Schiavone, K., Wayne, K., Woodward, A. R., Does, M. D., Kim, D. K., & Kelly, D. A. (2021). Glans inflation morphology and female cloaca copulatory interactions of the male American alligator phallus. Biology of Reproduction, 104(2), 374–386. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa197

Moore, B. C., & Kelly, D. A. (2015). Histological investigation of the adult alligator phallic sulcus. South American Journal of Herpetology, 10(1), 32–40.

Piña, C. I., Larriera, A., & Cabrera, M. R. (2003). Effect of incubation temperature on incubation period, sex ratio, hatching success, and survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). Journal of Herpetology, 37(1), 199–202. https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037[0199:EOITOI]2.0.CO;2

Simoncini, M. S., Leiva, P. M., Piña, C. I., & Cruz, F. B. (2019). Influence of temperature variation on incubation period, hatching success, sex ratio, and phenotypes in *Caiman latirostris*. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology, 1–9.

Tavalieri, Y. E., Galoppo, G. H., Canesini, G., Truter, J. C., Ramos, J. G., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2019). The external genitalia in juvenile *Caiman latirostris* differ in hormone sex determinate-female from temperature sex determinate-female. General and Comparative Endocrinology, 273, 236–248.

Valli, F. (2026). *Influencia materna y su interacción con variables climáticas en la determinación sexual por temperatura de Caiman latirostris* [Tesis doctoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral].

Warner, D. A., & Shine, R. (2011). Interactions among thermal parameters determine offspring sex under temperature-dependent sex determination. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 278(1703), 256–265. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1040

Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por el Grupo de Especialistas de Cocodrilos de UICN-SSC mediante el Programa de apoyo de investigación para estudiante. Asimismo, se agradece a quienes formaron este equipo de trabajo y me guiaron durante el proceso Dr. Piña Carlos, Dra. Simoncini Melina y Dr. Brandon Moore. A las instituciones que permitieron mi formación y la ejecución del proyecto CICYTTP-CONICET, Stephens College y Proyecto Yacaré.