

118  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ANALISIS HISTOLOGICO PARA LA IDENTIFICACION DEL SEXO  
DE LAS GONADAS DE CRIAS DE LAS TORTUGAS MARINAS  
*Dermochelys coriacea* Y *Lepidochelys olivacea*".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A  
P R E S E N T A:

MARIA CRISTINA ORDOÑEZ ESPINOSA



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MIRIAM BENABIB NISENBAUM  
CODIRECTOR:  
DR. HORACIO MERCHANT LARIGES



México, D. F.

1998

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

266166



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACION AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS HISTOLÓGICO PARA LA IDENTIFICACIÓN  
DEL SEXO DE LAS GÓNADAS DE CRÍAS DE LAS  
TORTUGAS MARINAS *Dermochelys coriacea* Y  
*Lepidochelys olivacea*”.**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :  
MARÍA CRISTINA ORDOÑEZ ESPINOSA**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. MIRIAM BENABIB NISENBAUM  
CODIRECTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**

**México, D.F.**

**1998.**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**"Análisis histológico para la identificación del sexo de las gónadas de crías de las tortugas marinas *Dermochelys coriacea* y *Lepidochelys olivacea*"**

realizado por **María Cristina Ordoñez Espinosa**

con número de cuenta **8852713-4**, pasante de la carrera de **biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Dra. Miriam Benabib Nisenbaum**

Propietario **Dr. Horacio Merchant Laríos**

Propietario **Biol. Adriana Laura Sarti Martínez**

Suplente **Dra. María del Carmen Uribe Aranzabal**

Suplente **Biol. Raquel Briseño Dueñas**

*Miriam Benabib*  
*Horacio Merchant Laríos*  
*Adriana L. Sarti*  
*María del Carmen Uribe*  
*Raquel Briseño*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología  
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ  
*Edna M. Suarez D.*



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se llevó al cabo gracias al permiso número 412. (1) 06045 otorgado por el Instituto Nacional de Ecología.

## DEDICATORIA

---

Este trabajo esta dedicado a:

**Mi padre; Sr. Germán Espinosa S. (ŷ):**

Con profundo cariño, respeto y admiración,  
quien me enseñó a luchar con valentía,  
tenacidad, honestidad y respeto por la vida.  
Con quien compartí momentos importantes de mi vida,  
y por su cariño de padre y amigo. Aunque ausente,  
siempre estará muy presente en mi mente y corazón.

**Mi madre y tía;**

**Sras. Carmen Monroy Vda. de E. y**

**Ana María Espinosa M:**

Con cariño y respeto por todo  
su apoyo para continuar adelante  
con mi vida y mi profesión.

**Mi hermano;**

**Germán Ordoñez E:**

Pilar de apoyo en mi vida  
profesional y su amistad.

**Mis tías y tío;**

**Lupe, Chelo, Lola y Juan:**

Por su apoyo incondicional  
durante toda mi carrera  
y por su cariño brindado.

**Mi primo y sobrinas;**

**Mikey, Ale, Cris, Fer y Gali:**

Con mucho cariño y amor.  
Por lo feliz que me hacen  
al recordar la época de la niñez.

**Mis primos y cuñada:**

Por compartir conmigo muchos  
momentos agradables y desagradables.

**Bióloga Laura Sarti y Mónica Bustamante:**

Las personas que dejaron huella en mi vida académica  
por el gran interés que han tenido por el trabajo  
con tortugas marinas y por compartirlo conmigo,  
pero sobre todo por el gran apoyo que sólo las  
personas especiales como ellas saben compartir.

**A MI PADRE**

**Sr. R. Germán Espinosa S. (Ŷ)**

21 de junio de 1988

**A** la persona que me enseñó el valor de la vida  
**Mi** consejero y amigo que jamás olvidare  
**Imponente, estricto pero cariñoso.**

**Por** sus enseñanzas amor y comprensión  
**Ausente** su cuerpo, pero presente en mi corazón  
**Dedico** este trabajo con mucho respeto  
**Recordándolo** siempre y esperando  
**El** este orgulloso de este trabajo.

Los verdaderos amigos  
no son los que te dan  
de comer un pez algún día.  
Sino los que te enseñan  
a pescar para toda la vida.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis padres y mi familia en generar; por su cariño, ayuda y entusiasmo.

Al jurado dictaminador, Doctora Miriam Benabib, Doctor Horacio Merchant, Bióloga Laura Sarti, Doctora María del Carmen Uribe y Bióloga Raquel Briseño; por sus valiosos comentarios y sus sugerencias sobre la tesis.

A la Biól. Laura Sarti; por permitirme trabajar en el Campamento Tortuguero "El Farito" y en el Laboratorio de Tortugas Marinas. Así como por su apoyo incondicional y estímulo durante el trabajo de campo y gabinete y por su amistad brindada.

A la Dra. Miriam Benabib y familia; por la confianza que me han tenido y por todo su apoyo incondicional.

A la Biól. Leticia Gámez; por su ayuda incondicional durante el trabajo de campo y gabinete.

A los biólogos Norma, y Alejandro, al Sr. José, al Dr. Horacio Merchant y al resto del personal del Laboratorio de Biología del desarrollo del Instituto de Biomedicas de la UNAM; por sus enseñanzas para el trabajo sobre la técnica histológica de alta resolución.

Al personal del Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, en especial a la Dr. María del Carmen Uribe; por su apoyo brindado en la realización de la técnica histológica tradicional.

Al Biól. José Alejandro Marmolejo; Por la toma de fotos de las gónadas aclaradas.

A todo el personal del Laboratorio de Tortugas Marinas; por su amistad, apoyo brindado y por todos los momentos agradables que compartimos durante la elaboración de este trabajo. Muy especialmente a Laura, Ninel y Carlos por sus enseñanzas.

A la Dra. Silvia Ruiz y Biól. María de Lourdes Barbosa por su asesoría en el trabajo estadístico.

A la comunidad de Caleta de Campos, muy especialmente a la familia Cárdenas y Medellín; por su amistad.

A Cris, Lety, Laura y Pancho por todo su apoyo y ayuda durante el trabajo de campo.



En el presente trabajo se evaluaron en forma comparativa 3 técnicas utilizadas comúnmente para la identificación del sexo de crías de tortugas marinas. Las especies estudiadas fueron *Dermochelys coriacea* (laúd) y *Lepidochelys olivacea* (golfina). Se colectaron 44 crías recién emergidas de tortuga laúd y 20 de tortuga golfina en el campamento tortuguero "El Farito", Michoacán, durante la temporada de anidación 1992-1993. Se extrajeron las gónadas y se procesaron mediante dos técnicas histológicas para la identificación del sexo: de alta resolución en epón y tradicional en parafina. La tercera técnica empleada fue *in toto*, por aclaramiento en glicerina. Los resultados mostraron tres tipos de gónadas en fase de diferenciación para la tortuga laúd: ovario, testículo y ovotestis. En la tortuga golfina no se encontraron gónadas de tipo ovotestis. Se observó que en las crías de las tortugas marinas estudiadas, la estructura de la gónada no tiene totalmente definidas las características que identifican a cada sexo, y existe un gradiente de diferenciación por especie. Por ello, se propone emplear los calificativos de ovario y de testículo inmaduro, en lugar de ovario y testículo. No se encontró una equivalencia significativa entre las técnicas histológicas y la de aclaramiento en los resultados de la identificación del sexo. Se propone que la mejor manera para realizar la identificación del sexo en crías de tortugas marinas es mediante cortes histológicos, ya sea de tejidos incluidos en epón o parafina. En caso de emplear la técnica de aclaramiento es importante analizar las muestras con cortes histológicos para obtener resultados reales. Siendo la temperatura de incubación un factor importante para el éxito de la eclosión y la determinación sexual en crías de tortugas marinas, se sugiere dar un seguimiento a los registros de ésta en playas de anidación donde se realizan programas de protección y conservación, con el fin de ampliar nuestros conocimientos sobre los factores que regulan la relación entre la proporción de sexos y la temperatura.

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.</b>	
1) Generalidades	1
2) Determinación del sexo en reptiles	1
3) Investigación de tortugas marinas y determinación del sexo	2
4) Aspectos de manejo en los programas de conservación	3
5) Técnicas para la identificación del sexo en crías de tortugas marinas	4
<b>OBJETIVOS</b>	
1) Objetivo general	8
2) Objetivos particulares	8
<b>ÁREA DE ESTUDIO</b>	9
<b>MÉTODOS.</b>	
1) Trabajo de campo	10
2) Trabajo de laboratorio	13
<b>RESULTADOS</b>	16
<b>DISCUSIÓN</b>	31
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	39
<b>LITERATURA CITADA</b>	40
<b>ANEXOS.</b>	
1) Ubicación taxonómica de las tortugas marinas	46
2) Técnica de procesamiento de tejido para inclusión en epón	47
3) Técnica de procesamiento de tejido para inclusión en parafina	49
4) Técnica de tinción hematoxilina-eosina	50

# INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

## 1) Generalidades.

Los peces, mamíferos y aves presentan cromosomas sexuales distinguibles morfológicamente; a nivel citológico, uno de los dos sexos tiene dos cromosomas sexuales denominados X (tipo XX) y el otro tiene un cromosoma X y un cromosoma Y (tipo XY), o bien puede tener sólo un cromosoma X (tipo X0). En la mayoría de los organismos con este tipo de determinación sexual, el individuo heterogamético es el masculino y el homogamético es el femenino. Sin embargo, hay excepciones en las que el sexo femenino es heterogamético (tipo ZW) y el masculino homogamético (tipo ZZ), como en las aves (Bull, 1983). En algunos peces, anfibios, reptiles e invertebrados, los cromosomas sexuales están poco diferenciados.

Bacci (1965) y Mittwoch (1967) mencionan que el ambiente en que se desarrollan algunas especies de peces, anfibios y reptiles asume gran importancia en la diferenciación del sexo.

## 2) Determinación del sexo en reptiles.

Bull (1980) describe dos mecanismos básicos para la determinación del sexo en los reptiles:

**Determinación genotípica del sexo:** el sexo del individuo se define desde la formación del cigoto y depende de la existencia de cromosomas sexuales.

**Determinación ambiental del sexo:** el sexo se diferencia durante el desarrollo embrionario bajo la influencia de factores ambientales, como por ejemplo la temperatura y humedad (Charnov y Bull, 1977); de esta manera algunas variantes de las condiciones ambientales producirán machos y otras hembras.

En algunos reptiles como lagartijas, serpientes y tortugas de los géneros *Sturotypus* y *Siebenrockiella* se han descubierto cromosomas sexuales (Vorontsov, 1973; Gorman, 1973; King, 1977; Sites *et al.*, 1979; Carr y Bickham, 1981); Éstos son raros o están ausentes en cocodrilos, muchas especies de serpientes y lagartijas y en la mayoría de las tortugas.

Se ha comprobado que la temperatura de incubación de los huevos influye en la determinación del sexo de diversas especies de reptiles, incluyendo lagartijas (Bull,

1980), tortugas (Yntema, 1976, 1979, 1981; Bull y Vogt, 1979; Yntema y Mrosovsky, 1980, 1982; Bull *et al.*, 1982a, 1982b; Morreale *et al.*, 1982; Vogt y Bull, 1982; Bull, 1983; McCoy *et al.*, 1983; Benabib, 1984; Vogt y Flores, 1986; Silva, 1986; Aguilar, 1987; Millán, 1988; Merchant y Villalpando, 1990) y cocodrilos (Ferguson y Joanen, 1982). En algunos estudios de laboratorio se ha demostrado que en 17 géneros de tortugas (*Chrysemys*, *Emydoidea*, *Emys*, *Graptemys*, *Pseudemys*, *Terrapene*, *Kinosternon*, *Sternotherus*, *Chelydra*, *Macrolemys*, *Gopherus*, *Dermatemys*, *Chelonia*, *Caretta*, *Lepidochelys*, *Eretmochelys* y *Dermochelys*), es posible controlar la proporción de sexos manipulando la temperatura durante el período de incubación de los huevos (Vogt y Bull, 1982; Bull, 1983; Vogt y Flores, 1986).

### 3) Investigación de tortugas marinas y determinación del sexo.

Las tortugas marinas se agrupan en dos familias y siete especies, aunque algunos autores consideran ocho especies y divisiones de subespecies basándose en características morfológicas (Márquez, 1990; Bowen *et al.*, 1993; Anexo 1).

Se ha demostrado que tres especies de tortugas marinas (*Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata*) carecen de cromosomas sexuales (Bickham, 1979), y mediante estudios de laboratorio, se ha comprobado que la temperatura es un factor importante en la determinación sexual de *C. caretta* (Yntema y Mrosovsky, 1980; Owens, 1976; Owens *et al.*, 1978), *C. mydas* (Limpus y Walter, 1980; Miller y Limpus, 1981), *E. imbricata* (Dalrymple *et al.*, 1985), *Lepidochelys kempii* (Aguilar, 1987), *Lepidochelys olivacea* (McCoy *et al.*, 1983; Silva, 1986; Millán, 1988; Merchant y Villalpando, 1990) y *Dermochelys coriacea* (Dutton *et al.*, 1985; Rimblot *et al.*, 1985). Además, algunos autores mencionan la influencia de características ecológicas y biológicas que afectan la temperatura de incubación, y por lo tanto, la determinación del sexo, como son la profundidad del nido y el número de huevos, la temperatura umbral de cada especie (a la cual se obtiene una proporción de sexos de 1:1), el tiempo de exposición a cierta temperatura, la elección del sitio de anidación, la fecha de oviposición y la tasa de desarrollo embrionario (Benabib, 1984; Vogt y Flores, 1986).

En las tortugas marinas, temperaturas bajas de incubación (entre 22 y 27°C) producen machos, mientras que temperaturas más altas (mayores de 30°C) producen

hembras. El valor de la temperatura umbral varía con la especie o la población de que se trate, encontrándose más frecuentemente entre los 27 y los 31°C (Bull, 1980).

La diferenciación sexual no es determinada por la temperatura de la nidada durante todo el período de incubación, sino durante el llamado período crítico o período sensible. Mediante experimentos realizados con la tortuga *C. caretta*, se ha esclarecido que el período sensible a la temperatura se encuentra entre los estadios 12 y 22 del desarrollo embrionario (Yntema y Mrosovsky, 1982). En otras investigaciones, se encontró que el período crítico corresponde al segundo tercio del período de incubación, tanto en tortugas de agua dulce (*Chelydra serpentina*, *Chrysemys picta* y *Graptemys ouachitensis*; Yntema, 1979; Bull y Vogt, 1981), como en tortugas marinas (*C. caretta*, *C. mydas* y *L. olivacea*; Yntema y Mrosovsky, 1982; Morreale *et al.*, 1983; Merchant *et al.*, 1989).

#### 4) Aspectos de manejo en los programas de conservación.

Una de las actividades realizadas en las playas de anidación donde se protegen a las tortugas marinas y sus nidadas es el trasplante de huevos. Práctica recomendada cuando los nidos son construidos en sitios de alto riesgo (expuestos a factores ambientales adversos, alta depredación o al saqueo humano). Sin embargo, este manejo puede originar que los huevos de las tortugas marinas se desarrollen frecuentemente bajo condiciones diferentes de aquéllas que experimentarían de manera *in situ* (Mrosovsky e Yntema, 1980). Por ello es importante continuar las investigaciones sobre la influencia de la temperatura de incubación en la proporción de sexos de las tortugas marinas. De interés particular, es el buscar e identificar metodologías más eficientes y precisas para las especies bajo nuestra protección.

En el Playón de Mexiquillo, Michoacán, se realiza un programa de protección y conservación desde 1980. Esta zona es muy importante para la anidación de la tortuga laúd *Dermochelys coriacea* y de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*, además de haber anidaciones esporádicas de la tortuga prieta *Chelonia agassizi*. Debido al alto porcentaje de saqueo de nidos existente en la zona, se transplantan los huevos de las tres especies de tortugas marinas, ya sea a un vivero, o a cajas de poliuretano. Las cajas muestran fluctuaciones diarias de temperaturas más marcadas que los viveros al

colocarse en cámaras de incubación (López *et al.*, 1992; Sarti *et al.*, 1993). Aunque los nidos del vivero son contruidos de manera similar a los nidos naturales, la temperatura puede variar por condiciones ambientales, como lluvias y/o mareas extraordinariamente altas, que pueden originar un decremento en la temperatura y en épocas de calor sin lluvia originará un aumento en la temperatura. Al transferir las nidadas a un ambiente diferente al natural (cajas de poliuretano), la temperatura puede variar, afectando la proporción natural de sexos de las crías y el periodo de incubación (Dutton *et al.*, 1985).

### 5) Técnicas para la identificación del sexo en crías de tortugas marinas.

Las tortugas marinas sexualmente maduras presentan un dimorfismo que permite diferenciar fácilmente un macho de una hembra; los machos son más pequeños y tienen una cola más larga, mientras que las hembras tienen un caparazón más alto, aparentemente como una adaptación para albergar los huevos antes de la anidación (Going *et al.*, 1978). Otra diferencia importante en la familia *Cheloniidae* es la presencia de uñas, los machos tienen las uñas de las aletas anteriores más largas, con las cuales pueden sujetar a la hembra durante la cópula. Sin embargo, una limitante en los estudios sobre la determinación del sexo en tortugas marinas, ha sido la dificultad para identificar el sexo en la etapa de crías (Merchant *et al.*, 1989).

A la fecha, se han realizado estudios fenotípicos y de las características morfológicas de las gónadas aplicados a este propósito, pero han tenido poco éxito (Whitmore *et al.*, 1985). También se han realizado trabajos sobre los niveles hormonales en gónadas de crías de *C. mydas* y *L. olivacea*; en éstos, se ha encontrado que la secreción de testosterona y estradiol es lenta y que por lo tanto, no existe una diferencia entre las gónadas femeninas y masculinas (Salame *et al.*, 1988, 1995). Así, para identificar el sexo de las crías es necesario sacrificarlas y disectarlas para la realización de estudios anatómicos e histológicos de las gónadas.

La técnica más ampliamente utilizada para la identificación del sexo en crías ha sido la preparación de cortes histológicos de las gónadas, descrita por Yntema y Mrosovsky (1980). Ellos mencionan que en las gónadas de las crías de *C. caretta*, que se transforman en ovario, se encuentra un epitelio germinal conspicuo formando la superficie exterior, y se extiende dentro de la médula asociándose con los canales superficiales.

Este epitelio está separado de la médula por una túnica albugínea, la cual se tiñe profusamente con la técnica del ácido peryódico de Schiff (PAS); en la médula se observa algunas veces pequeños cordones primarios. En las gónadas que se desarrollan como testículos, el epitelio germinal es más delgado, con una túnica albugínea pequeña; los cordones primarios forman túbulos seminíferos con diámetros que son de dos a cuatro veces más grandes que los cordones primarios de las hembras; estos cordones están rodeados por un estroma que se tiñe con el ácido peryódico (PAS). Otros autores describen otras características a nivel histológico como:

a) Miller y Limpus (1981) observaron en *C. mydas* gónadas femeninas con una médula densa sin túbulos, un epitelio columnar con células germinales visibles. Las masculinas presentan una médula con cordones en contacto con el epitelio. Además describen dos tipos de intersexos; en uno de ellos existe una médula densa sin cordones y el córtex degenerado, mientras que el segundo presenta una médula tubular; los túbulos no están en contacto con el epitelio y el córtex está parcialmente desarrollado.

b) Rimblot *et al.* (1985) realizaron un estudio histológico en *D. coriacea*, observando dos tipos de gónadas: las gónadas femeninas, presentaban un epitelio pseudoestratificado con células germinales que podían situarse en grupos no muy numerosos y que no estaban en profase meiótica. También se observaron pocos cordones epiteliales que podían formar lagunas y los conductos Müllermanos estaban completos. En las gónadas masculinas, la médula era voluminosa y densa, compuesta por cordones epiteliales y en algunos casos con túbulos que encerraban células germinales; el epitelio era delgado con algunas células germinales visibles y los conductos Müllermanos eran delgados y de diámetro irregular.

c) Dutton *et al.* (1985) describieron tres tipos de gónadas en *D. coriacea*: las gónadas femeninas y masculinas presentaron características similares a las reportadas por Yntema y Mrosovsky (1980), mientras que en la tercera, llamada gónada indeterminada, se observó el epitelio germinal formado por una delgada capa de células cuboidales que no se extendían en el contorno de toda la gónada y con algunas células germinales, la túnica albugínea presente en algunos lugares y presencia de cordones medulares en algunas gónadas.

Una variante de la técnica histológica, es la inclusión del tejido en epón para

microscopía electrónica (Millán, 1988). En este caso, las características principales para la identificación del sexo fueron el epitelio germinal y la apariencia general de la médula. En el ovario, el epitelio era grueso y la médula presentaba poca fragmentación, mientras que en el testículo el epitelio era más delgado y la médula presentaba gran cantidad de cordones medulares.

En estudios recientes sobre el desarrollo de las gónadas de *L. olivacea*, empleando técnicas citoquímicas y de microscopía electrónica (Merchant *et al.*, 1989), se encontró que las células germinales primordiales (CGP) tenían un camino migratorio similar al de los mamíferos. La gónada indiferenciada se formaba por la proliferación de las células del mesotelio y del mesénquima en las crestas genitales, y ambos tipos celulares formaban los cordones epiteliales medulares. También se observó que los conductos Mülllerianos persistían en los machos después de la eclosión, por lo que se concluyó que en las crías de la tortuga golfina la diferenciación de la gónada era aún incipiente en el momento de la eclosión, de manera que existe la posibilidad de una reversión sexual posterior.

Algunos autores, antes de aplicar la técnica histológica realizaron observaciones de las gónadas durante la disección en diferentes especies, informando lo siguiente:

a) Yntema y Mrosovsky (1980), describieron que en *C. caretta*, las gónadas femeninas presentaban una superficie marcada con pliegues; en los testículos la superficie era lisa y los cordones primarios presentaban una disposición irregular.

b) Rimblot *et al.* (1985), mencionan que en *D. coriacea* las gónadas femeninas eran delgadas y lisas, de 12-13 mm de largo y 0.6-0.75 mm de ancho; las masculinas presentaban la superficie irregular con estrías transversales y eran relativamente más gruesas, de 10-12 mm de largo y de 1.2-1.4 mm de ancho.

c) Whitmore *et al.* (1985), reportaron que las gónadas femeninas de *C. mydas* eran de color amarillento, delgadas y con la superficie lisa, mientras que las masculinas eran de color blanco, con un extremo de la gónada grueso y el otro terminado en punta.

Otra forma de identificar el sexo de las crías de tortugas marinas, fue descrita por Van der Heiden *et al.* (1983, 1985). El método consiste en la observación de las gónadas al microscopio estereoscópico, previamente transparentadas con una solución de glicerina. Esta técnica, empleada en gónadas de crías de *L. olivacea* y juveniles de *C. mydas* mostró que los ovarios en desarrollo, presentan numerosos pliegues en los bordes



de la gónada (epitelio germinal), el área central era menos opaca que los bordes y no se observaron detalles conspicuos en la estructura interna. En los testículos, la estructura interna presentaba un patrón granular característico, el cual se informa, es producto de numerosos túbulos seminíferos, y el contorno de la gónada mostró una superficie relativamente lisa.

La técnica de aclaramiento, ha sido empleada por otros autores, como Benabib (1984) que realizó un trabajo con crías de *D. coriacea*, reportando tres tipos de gónadas: las femeninas totalmente transparentes, las masculinas con estructuras tubulares de color rojo o café (túbulos seminíferos) y los intersexos con algunas zonas totalmente transparentes y otras con estructuras tubulares compactas, o con túbulos distribuidos laxamente.

Silva (1986), trabajando con *L. olivacea*, y Aguilar (1987) con *L. kempfi*, describieron que las gónadas femeninas presentaban una superficie estriada y los testículos eran totalmente lisos.

La técnica de aclaramiento con glicerina es mucho más barata y menos laboriosa que las de histología (tanto la de inclusión del tejido en parafina como la de alta resolución en epón), pero existen dudas sobre la exactitud del sexado por medio de esta técnica, debido a que las gónadas de crías de las tortugas marinas en la mayoría de las especies aún no están totalmente diferenciadas, y por los diferentes criterios que existen para la determinar el sexo con la técnica de aclaramiento. Dado que el esfuerzo invertido y los costos de la técnica de glicerina son mínimos en comparación con las técnicas histológicas, en este trabajo se ha considerado conveniente realizar un análisis comparativo de la eficiencia y analogía de ambas técnicas y conocer la validez de éstas.

### OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la equivalencia de 3 técnicas de procesamiento (histológica de alta resolución en epón, tradicional en parafina e *in toto* por aclaramiento con glicerina) para la identificación del sexo de las crías recién eclosionadas de la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) y la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*).

### OBJETIVOS PARTICULARES.

A) Describir las características de las gónadas de la tortuga marina *Dermochelys coriacea*, utilizando la técnica histológica de alta resolución, con inclusión en epón.

B) Describir las características de las gónadas de la tortuga marina *Dermochelys coriacea*, reveladas por el aclaramiento con glicerina.

C) Comparar los resultados obtenidos en la identificación del sexo de crías de tortuga laúd y golfina, utilizando las técnicas histológicas (epón y parafina respectivamente) y el aclaramiento con glicerina, para evaluar la eficiencia de cada técnica en las especies estudiadas.

## ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo de campo fue desarrollado en la porción sur del Playón de Mexiquillo, perteneciente al municipio de Aquila, Michoacán. Se encuentra en la parte central de la costa michoacana, a 80 Km de la Ciudad Lázaro Cárdenas. Esta playa tiene una longitud de 18 Km aproximadamente, comprendida entre la saliente rocosa denominada "La Punta" y la desembocadura del río "La Manzanilla", localizados entre la Sierra Madre del Sur y el Océano Pacífico, entre los meridianos  $102^{\circ}48'31''$ ,  $102^{\circ}58'25''$  longitud Oeste y los paralelos  $18^{\circ}05'34''$ ,  $18^{\circ}10'25''$  latitud Norte. La zona de trabajo abarcó aproximadamente 6.6 Km de la longitud de la playa, desde el extremo Sureste de la playa, ("La Punta"), hasta el estero de "La Majahua" hacia el Noroeste. El campamento y vivero están ubicados en la localidad conocida como "El Farito" (Fig. 1).

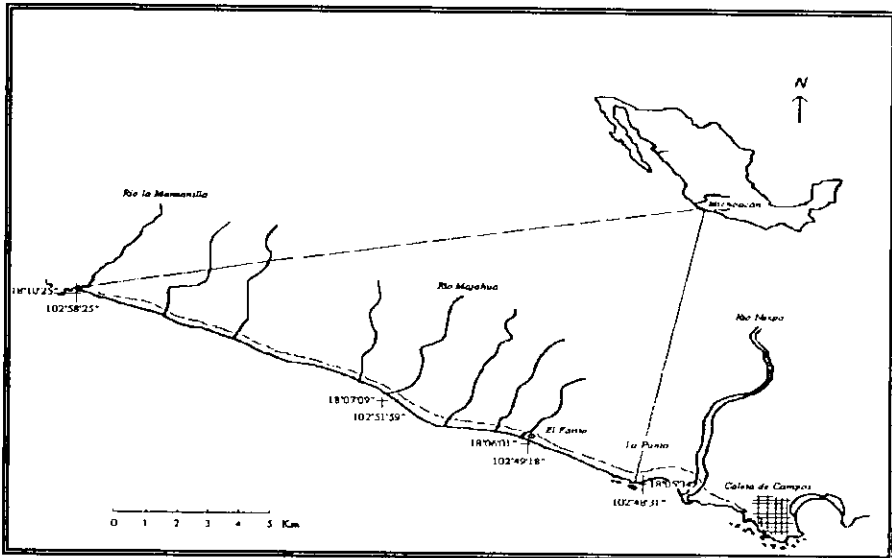


Fig. 1 Ubicación del área de estudio.

El clima de la región, según la carta de climas de Colima 13Q-VI Zacatula, 13Q-VIII editada por el Instituto de Geografía de la Universidad Nacional Autónoma de México, es del tipo Awo (W) ig, según la clasificación de Köppen modificada por Garcia (1973), que es un clima cálido-subhúmedo con abundantes lluvias en verano. Su temperatura media anual oscila entre los 27 y 27.5°C; el mes más caluroso del año es junio, y la precipitación anual es de 884.4 mm, principalmente durante el verano (Benabib 1983).

### 1) Trabajo de campo.

De octubre de 1992 a febrero de 1993, se realizaron recorridos nocturnos en la playa durante la anidación de las tortugas *D. coriacea* y *L. olivacea*. Los huevos se recolectaron durante el desove, colocando una bolsa de plástico debajo de la cloaca, dentro de la cavidad del nido. Si la hembra ya había comenzado a poner los huevos en el nido, éstos se tomaban con la mano para colocarlos en la bolsa. Una vez colectada la nidada se trasladaba al campamento para su siembra, ya sea en cajas de poliuretano con arena o en un vivero en la playa.

Para la incubación en cajas de poliuretano, se colocó una capa de arena húmeda (tomada de la playa, a una profundidad de 80 cm aproximadamente) en una caja con pequeños orificios en la base. Sobre ésta se colocaron los huevos, formando una pirámide, evitando que éstos estuvieran en contacto con las paredes de la caja. Finalmente, los huevos se cubrieron totalmente con más arena húmeda, compactándola suavemente. Las nidadas sembradas en cajas se protegieron de los cambios ambientales del exterior colocándolas en un cuarto (cámara de incubación) construido de palapa. En cada caja se colocó una etiqueta indicando el número de huevos, número de caja, especie, fecha de siembra y sembrador.

Para la construcción del vivero se delimitó un área de 50 x 15 m paralela al mar, aproximadamente a una distancia de 4 m de la berma de la playa. Se limpió de piedras, troncos, raíces y vegetación, se cercó con malla ciclónica y la parte inferior de la malla fue recubierta con tela de mosquitero. Los nidos se ordenaron a lo ancho del vivero separados por un metro de distancia del más próximo y de la hilera adjunta, alternadamente. Cada uno fue señalado con estacas que llevaban un número consecutivo, número de huevos, especie, fecha de siembra y sembrador.

Se procuró que las dimensiones de los nidos del vivero fueran similares a las de los nidos naturales. Los huevos de *D. coriacea* se colocaron a una profundidad de 80 cm y los de *L. olivacea* a 45 cm de profundidad.

La temperatura de la arena, se registró diariamente desde el mes de octubre de 1992 hasta el mes de abril de 1993, con el fin de conocer la temperatura de incubación de los nidos. Para ello se colocaron dos termopares a una profundidad de 80 cm, en dos zonas de la playa: el sensor 1 cerca del mar correspondiendo a la zona de nidos naturales, y el sensor 2 lejos del mar en la zona del vivero. En las cajas de poliuretano, se colocó un sensor en la

arena que cubría los huevos. Estas temperaturas se registraron tres veces al día: 0600, 1400 y 2200 h (horas en que se registran las temperaturas máximas y mínimas del día).

Después de aproximadamente dos meses de incubación (entre diciembre y marzo), y antes de la eclosión de las crías, los nidos del vivero se protegieron con una trampa de tela de alambre de 45 cm de diámetro y 35 cm de altura, para evitar la depredación de las crías por otros animales y para saber cuántas crías emergieron de cada nido. Sobre las trampas se colocaron cartones para darle sombra a las crías que emergieran durante el día.

Las muestras de crías utilizadas en el trabajo de laboratorio, se obtuvieron de tres sitios de incubación diferentes:

- A) zona cercana al mar, en la zona más próxima a la cresta donde anidan las tortugas *D. Coriacea* y *L. olivacea*, considerada zona de nidos naturales.
- B) zona alejada del mar, aproximadamente a 10 m de la cresta, considerada como la zona de vivero.
- C) nidadas sembradas en cajas de poliuretano y mantenidas en un cuarto de incubación.

El muestreo se realizó al emerger las crías a la superficie, a partir del 31 de diciembre de 1992 y hasta el 31 de marzo de 1993. Se tomaron al azar un total de 44 crías de tortuga laúd, provenientes de 18 nidos, 16 crías se obtuvieron del sitio "A" (de 8 nidos diferentes), 10 del "B" (de 4 nidos diferentes) y 18 de los "C" (de 6 cajas diferentes). En el cuadro 1 se muestran los números de nidos muestreados, las fechas de siembra y emergencia de las crías a la superficie del nido.

Las crías de laúd fueron sacrificadas por decapitación y enseguida se realizó la disección de las mismas para la extracción de las gónadas junto con el riñón (Fig. 2). Una gónada de cada cría se colocó en fijador Karnovsky (Karnovsky, 1965) para posteriormente ser incluida en epón y la otra se fijó en formol al 10% en buffer fosfatos 1M para ser aclarada con glicerina. En cada frasco se anotó la fecha de siembra, fecha de emergencia, número de nido y técnica de incubación. Las gónadas fijadas en Karnovsky permanecieron en refrigeración hasta el momento de procesar los tejidos.

De la tortuga golfina se colectaron 20 crías del nido A-237, que fue sembrado el 5 de enero de 1993 y las crías emergieron el 20 de febrero de 1993, las cuales se sacrificaron

inyectándoles 0.1 ml de pentobarbital sódico (Anestesia) en la médula espinal entre las vértebras de la región cervical y se fijaron en formol al 10% en buffer fosfatos 1M.

**Cuadro 1. NIDOS MUESTREADOS DE TORTUGA LAÚD**

Número de nido	Fecha de siembra	Fecha de emergencia	Número de crías
C-38	22/oct./92	31/dic./92	1
B-33	8/nov./92	5/ene./93	1
A-10	10/nov./92	7/ene./93	1
A-11	11/nov./92	10/ene./93	1
A-16	17/nov./92	13/ene./93	2
C-64	14/nov./92	9/feb./93	3
A-34	13/dic./92	12/feb./93	2
C-68	24/nov./92	14/feb./93	3
B-66	20/dic./92	15/feb./93	3
C-71	25/nov./92	18/feb./93	3
B-67	20/dic./92	18/feb./93	3
A-46	29/dic./92	23/feb./93	3
A-47	29/dic./92	26/feb./93	3
C-77	6/dic./92	27/feb./93	3
B-71	30/dic./92	27/feb./93	3
A-49	3/ene./93	3/mar./93	2
A-63	25/ene./93	23/mar./93	2
C-104	10/ene./93	31/mar./93	5
TOTAL			44

Número de nido: A= cerca del mar, zona de nidos naturales.

B= lejos del mar, zona de vivero.

C= nidadas en cajas de poliuretano.

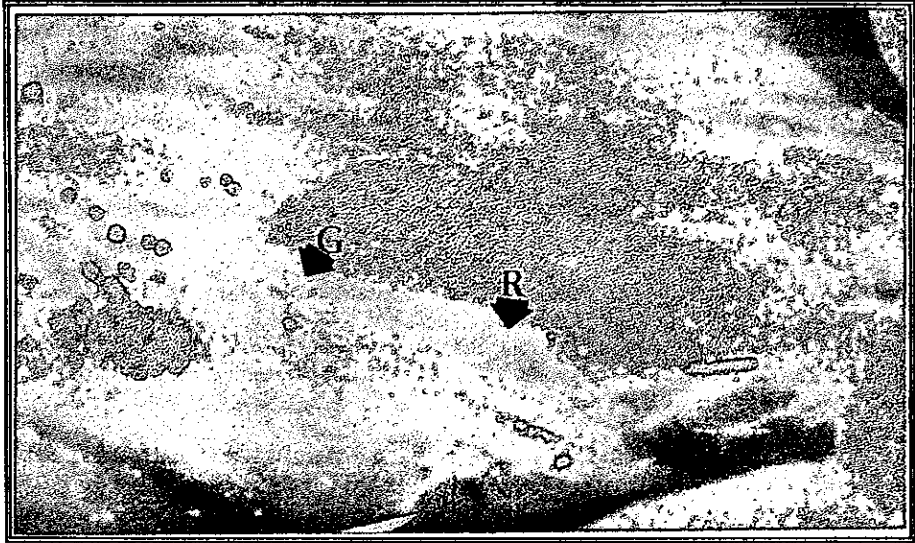


Fig. 2. Disección de cría de tortuga laúd. Gónada (G) y Riñón (R).

## 2) Trabajo de laboratorio.

Las muestras colectadas fueron trasladadas al laboratorio para ser procesadas. De las 84 gónadas de laúd extraídas en el campo, 44 (una gónada de cada tortuga, fijadas en Kamovsky) fueron procesadas para histología de alta resolución en epón (Anexo 2), en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. De cada gónada incluida en epón, se obtuvieron cortes histológicos transversales semifinos de la parte anterior y media de la gónada, con un grosor de 1 a 2  $\mu\text{m}$ . Los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% y se colocaron entre el portaobjetos y cubreobjetos con unas gotas de bálsamo de Canadá para su posterior observación.

Las 44 gónadas restantes se separaron del riñón y se aclararon con la técnica de Van der Heiden *et al.* (1983 y 1985), en el Instituto de Ecología de la U.N.A.M. Cada gónada se colocó en un frasco pequeño (20 ml) de boca ancha, con 5 ml de una solución de glicerina al 5% en formol al 4% con buffer fosfato 1M. Los frascos se colocaron en una estufa calibrada a una temperatura de 55  $^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ), por un periodo de 24 h o hasta que todo el formol y el agua se hubieran evaporado, quedando la gónada embebida en glicerina. Posteriormente se observaron al microscopio.

Las 20 crías de tortuga golfina, se llevaron al Laboratorio de Tortugas Marinas de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., donde se realizó la extracción de las gónadas. Una de las gónadas con un pequeño pedazo de riñón, se sometió al procesamiento histológico por inclusión en parafina (Anexo 3), en el Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M. Se obtuvieron cortes transversales seriados con un grosor de 6 a 7  $\mu\text{m}$ . De cada serie se escogieron 3 preparaciones al azar que se tiñeron con hematoxilina-eosina (Anexo 4). A estos cortes se les colocó un cubreobjetos con bálsamo de Canadá para conservar y observar las preparaciones. Las otras 20 gónadas se separaron del riñón y se aclararon por la técnica descrita por Van der Heiden *et al.* (1983 y 1985).

Las observaciones para el sexado con las técnicas histológicas, incluidas en epón y parafina, se hicieron en microscopio de transmisión de luz y las gónadas aclaradas se observaron al microscopio estereoscópico. De esta manera, se describieron las características principales de las gónadas tanto a nivel microscópico como macroscópico identificando el sexo de cada gónada de las crías de tortugas laúd y golfina.

Entre la variedad de criterios empleados para determinar el sexo en las gónadas trabajadas con histología, se eligieron los propuestos por Millán, (1988). Se consideró como ovario, si la gónada presenta un epitelio germinal grueso y la médula poca fragmentación, mientras que el testículo es más delgado y la médula presenta gran cantidad de cordones medulares. Las gónadas indeterminadas o intersexos presentan características tanto de ovario como de testículos.

Para sexar las gónadas aclaradas se emplearon 3 criterios:

- 1) Van der Heiden *et al.* (1983):** que considera que las gónadas de golfina que dan origen a ovarios tienen pliegues en los bordes laterales o superficie de la gónada, el área central es menos opaca que la periferia de la gónada y no se observan estructuras internas. En los testículos, las estructuras internas presentan un patrón granular debido a la presencia de los cordones medulares o túbulos seminíferos y su superficie externa es relativamente lisa.
- 2) Benabib (1984):** Los ovarios son totalmente transparentes, los testículos presentan estructuras tubulares en su interior y los intersexos presentan tanto características de ovario como de testículo.



**3) Briseño, (com. per.):** El epitelio germinal de los ovarios muestra una estructura plegada o con estriás, mientras que en los testículos el contorno de la gónada formada por el epitelio germinal es menos estriada e incluso liso.

Para determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos con cada una de las técnicas de identificación del sexo, se realizó un análisis estadístico de asociación (acuerdo de casos especiales de asociación Bishop *et al.*, 1980). Para ello se hicieron seis comparaciones:

- 1.- Entre sexos identificados con histología y sexos identificados con el criterio de Benabib (1984).
- 2.- Entre sexos identificados con histología y sexos identificados con criterio de Briseño (com. per).
- 3.- Entre sexos identificados con histología y sexos identificados con el criterio de Van der Heiden *et al.* (1983).
- 4.- Entre sexos identificados con el criterio de Benabib (1984) y sexos identificados con el criterio de Briseño (com. per).
- 5.- Entre sexos identificados con el criterio de Benabib (1984) y sexos identificados con el criterio de Van der Heiden *et al.* (1983)
- 6.- Entre sexos identificados con el criterio de Briseño (com. per) y sexos identificados con el criterio de Van der Heiden *et al.* (1983).

En cada una de las comparaciones se realizaron tablas de contingencia. Se calculó el valor de K, los intervalos de confianza de K y el valor de Z; posteriormente con el valor de Z se obtuvo el valor de P de tablas esperado, con un  $\alpha = 0.05$ .

Con los registros de la temperatura de la arena de los nidos, tanto del vivero como de las cajas de incubación, se obtuvieron las temperaturas media, máxima y mínima a las que estuvieron sometidos los nidos durante el desarrollo embrionario y se estimó la proporción de sexos resultante en cada zona de incubación. Para analizar esta relación, se emplearon los resultados obtenidos con la técnica histológica.

## RESULTADOS

En las observaciones de los cortes histológicos, para las gónadas de tortuga laúd, se distinguieron tres tipos de gónadas: ovario, testículo y ovotestis. Para las gónadas de golfina sólo ovario y testículo. A continuación se describen las características histológicas:

**Ovario.**- La capa externa de la gónada (epitelio germinal o corteza) presentó un marcado engrosamiento. Las células germinales se encontraban en el epitelio superficial o no existían. Los cordones medulares presentaban una fragmentación evidente y los vasos sanguíneos se observaban frecuentemente en la región central de la gónada (Fig. 3).

**Testículo.**- El epitelio germinal estaba formado por una sola capa de células, por lo que es más delgada que la del ovario. También presentó cordones medulares que se encontraban en continuidad con el epitelio externo de la gónada, dentro de estos cordones se pudo observar pocas células germinales, pero la mayoría de éstas estaban en el epitelio superficial; los vasos sanguíneos se observaron de mayor calibre y se encontraron principalmente en la periferia (Fig. 4).

**Ovotestis.**- La gónada presentaba tanto características de ovario como de testículo. Presentó un epitelio germinal engrosado y una gran cantidad de cordones medulares con células germinales. Por el tipo de epitelio, se podría decir que estas gónadas tenían más características de ovario que de testículo. Los vasos sanguíneos se pudieron observar tanto en la periferia como en la parte central de la gónada (Fig. 5).

En el cuadro 2 se presentan los sexos obtenidos mediante las técnicas histológicas, incluidas en epón y parafina de *D. coriacea* y *L. olivacea* respectivamente.

**Cuadro 2. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO POR LA TÉCNICA DE HISTOLOGÍA.**

Especie	Machos	Hembras	Intersexos	Perdidas	Total
<i>D. coriacea</i>	11	19	4	10	44
<i>L. olivacea</i>	16	4	0	0	20



Fig. 3. Ovario inmaduro de *D. coriacea* recién emergida. Riñón (R), epitelio germinal (EG), cordones medulares (CM), células germinales (CG), vasos sanguíneos (V). Técnica: histología de alta resolución, 400X.

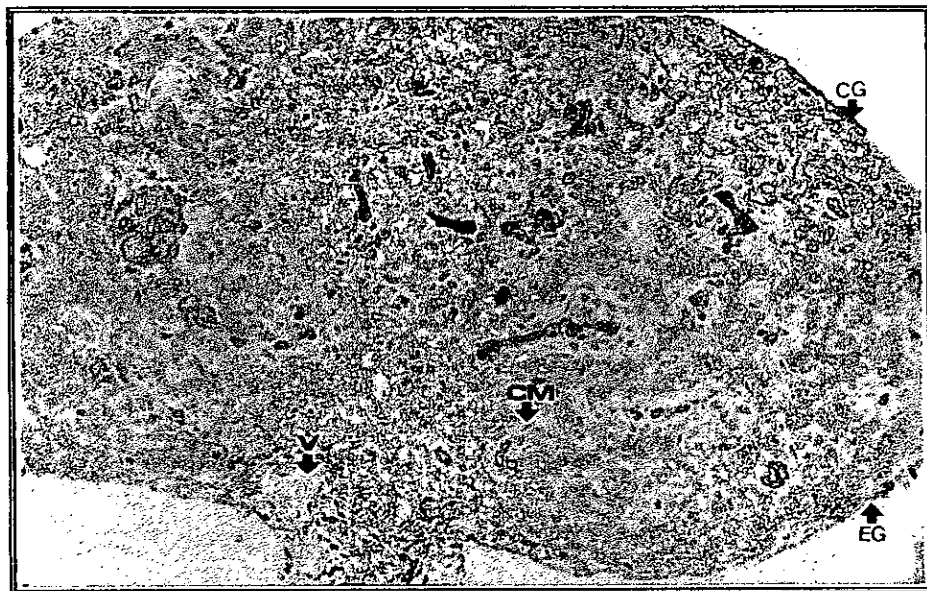
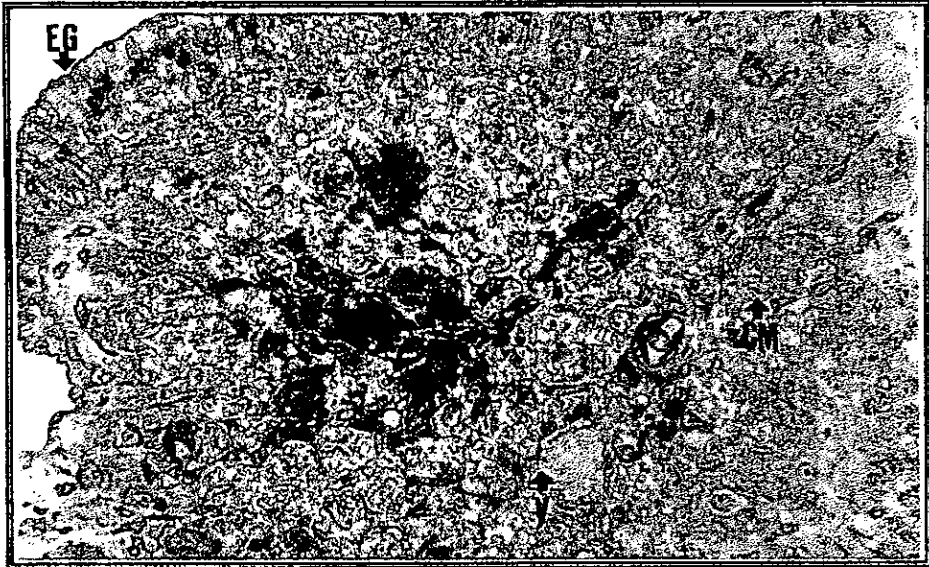


Fig. 4. Testículo inmaduro de *D. coriacea* recién emergida. Epitelio germinal (EG), células germinales (CG), cordones medulares (CM), vasos sanguíneos (V). Técnica: histología de alta resolución, 400X.



**Fig. 5.** Ovotestis de *D. coriacea* recién emergida. Epitelio germinal (EG), cordones medulares (CM), vasos sanguíneos (V). Técnica: histología de alta resolución, 400X.

En las gónadas aclaradas con glicerina, observadas al microscopio estereoscópico, empleando los criterios de Benabib (1984), se distinguieron los siguientes tipos de gónadas:

**Ovario.**- La parte interna de la gónada es totalmente transparente y sin estructuras aparentes. (Fig. 6).

**Testículo.**- Presentan estructuras tubulares en su interior claramente coloreados (rojo o café) aparentemente relacionados con los cordones medulares y la vascularización de la gónada (en el presente trabajo no se lograron identificar gónadas con estas características en *D. coriacea* por esto se presenta una gónada de *L. olivacea* (Fig. 7).

**Ovotestis.**- En este caso se podía observar que la gónada tenía tanto características de ovario como de testículo: internamente presentaba tubulos, que se agrupan en manchones en diversas áreas de la gónada (Fig. 8).

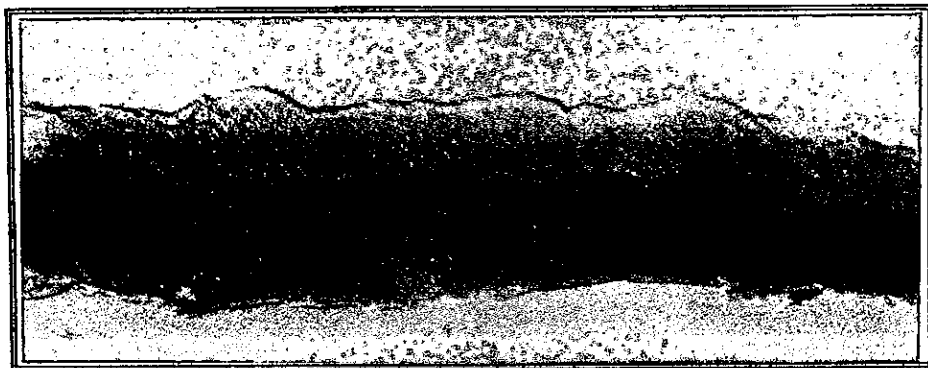


Fig. 6. Ovario de *D. coriacea* recién emergida. Técnica: aclaramiento con glicerina.

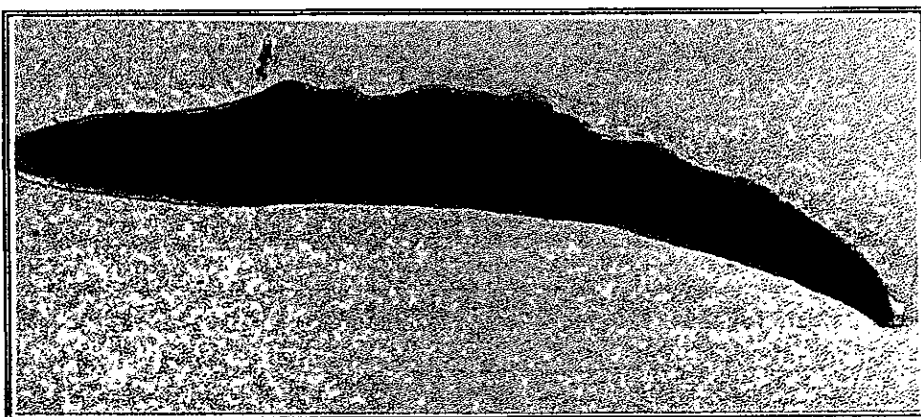


Fig. 7. Testículo de *L. olivacea* recién emergida. Técnica: aclaramiento con glicerina.



Fig. 8. Ovotestis de *D. coriacea* recién emergida. Técnica: aclaramiento con glicerina.

El patrón de características que identifican a machos y a hembras propuesto por Van der Heiden *et al.* (1983, 1985) no fue consistente en las gónadas estudiadas en este trabajo, por lo que no en todas las gónadas se pudo determinar el sexo con su criterio y fueron denominadas como gónadas ambiguas (Cuadro 3). Esto se debió a que algunas gónadas presentaban los bordes laterales aserrados sólo en una parte de la gónada y se observaron algunos cordones medulares en el interior; en otras ocasiones se podían observar granulaciones muy tenues en la parte interna de la gónada, la parte media era menos opaca y la superficie aserrada. Por ello se evaluó cada característica por separado, observando de manera independiente las estructuras internas y las características externas de la gónada (Cuadro 4).

**Cuadro 3. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE LAS GÓNADAS TRATADAS CON LA TÉCNICA DE ACLARAMIENTO APLICANDO LA DESCRIPCIÓN DE VAN DER HEIDEN *et al.* (1983, 1985)**

Especie	Machos	Hembras	Ambiguas	Perdidas	Total
<i>D. coriacea</i>	0	13	13	18	44
<i>L. olivacea</i>	2	2	16	0	20

**Cuadro 4. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO POR LA TÉCNICA DE ACLARAMIENTO CON GLICERINA, CONSIDERANDO LAS CARACTERÍSTICAS EXTERNAS E INTERNAS INDEPENDIENTEMENTE.**

ESPECIE	SEXO	CARACTERÍSTICAS INTERNAS	CARACTERÍSTICAS EXTERNAS
<i>D. coriacea</i>	Machos	0	10
	Hembras	25	14
	Intersexos	1	2
	Perdidas	18	18
	Total	44	44
<i>L. olivacea</i>	Machos	2	18
	Hembras	18	2
	Intersexos	0	0
	Total	20	20

Las características específicas que se emplearon para sexar a las crías fueron las siguientes:

- 1) Se consideró macho si presentó estructuras tubulares en su interior y hembra si la gónada era transparente, sin importar los bordes de la gónada (este criterio es el empleado por Benabib, 1984).
- 2) Si la gónada presentaba los bordes con numerosos pliegues y el área central menos opaca que los bordes se identificó como hembra y si el contorno era liso se identificó como macho (criterio empleado por Briseño, com. pers.).

En ambos casos se identificó a la gónada como intersexo cuando presentaba una combinación de características de macho y de hembra.

De las 44 gónadas de tortuga laúd designadas para aclararse con glicerina, 18 (41%) se perdieron al ser procesadas, principalmente durante la disección, al momento de separar la gónada del riñón. En ocasiones, no fue posible distinguir la gónada a simple vista y en el campo no se contó con microscopio, o bien algunas gónadas se encontraban muy adheridas al riñón y al momento de separarlas se rompían haciendo más difícil su observación después del aclaramiento. Por estas razones sólo se logró identificar el sexo de 26 gónadas (59%).

En los cuadros 5 y 6 se muestran los resultados comparativos del sexado de las gónadas de crías de *D. coriacea* y *L. olivacea* respectivamente con las técnicas de histología y aclaramiento con glicerina, utilizando los distintos criterios mencionados.

**Cuadro 5. RESULTADOS COMPARATIVOS DEL SEXADO EN CRIAS DE TORTUGA LAÚD, CONSIDERANDO DIFERENTES CRITERIOS.**

Número de gónada	Número de nido	HISTOLOGIA Inclusión en Epon	AGLARAMIENTO CON GLICERINA		
			Criterio de Van der Heiden <i>et al.</i> (1985)	Criterio de Benabib (1984)	Criterio de Braseño (com. per.)
G-1	A-49	♀	---	---	---
G-2	A-49	♂	---	---	---
G-3	A-63	♀	---	---	---
G-4	A-63	---	---	---	---
G-5	C-104	♀	---	---	---
G-6	C-104	---	♀	♀	♀
G-7	C-104	---	♀	♀	♀
*G-8	C-104	♀	♀	♀	♀
*G-9	C-104	♀	ambigua	♀	♀/♂
*G-10	C-64	♂	ambigua	♀	♂
G-11	B-71	♀	---	---	---
G-12	B-71	---	---	---	---
G-13	B-71	---	---	---	---
G-14	C-77	---	---	---	---
*G-15	C-77	♀	♀	♀	♀
G-16	C-77	---	♀	♀	♀
*G-17	A-47	♀	♀	♀	♀
*G-18	A-47	♀/♂	ambigua	♀	♂
*G-19	A-47	♀/♂	ambigua	♀	♂
G-20	A-46	♀	---	---	---
G-21	A-46	♀	---	---	---
*G-22	A-46	♀	ambigua	♀/♂	♀
*G-23	B-67	♀/♂	ambigua	♀	♂
*G-24	B-67	♀/♂	♀	♀	♀

(♀/♂) Intersexo

(\*) Gónadas en las que se identificó el sexo con los cuatro criterios.

(—) Gónadas perdidas durante la disección o procesamiento.

Continúa....



Cuadro 5. Continuación.

Número de gónada	Número de nido	HISTOLOGÍA Inclusión en Epon	ACLARAMIENTO CON GLICERINA		
			Criterio de Van der Heiden et al. (1985)	Criterio de Benabib (1984)	Criterio de Briseño (con Pet.)
*G-25	B-67	♀	♀	♀	♀
*G-26	C-71	♂	ambigua	♀	♂
*G-27	C-71	♂	ambigua	♀	♀/♂
*G-28	C-71	♂	ambigua	♀	♂
G-29	B-66	♀	----	----	----
G-30	B-66	♀	----	----	----
*G-31	B-66	♂	ambigua	♀	♂
G-32	C-68	----	♀	♀	♀
*G-33	C-68	♂	ambigua	♀	♂
*G-34	C-68	♂	ambigua	♀	♂
G-35	A-34	----	♀	♀	♀
*G-36	A-34	♀	♀	♀	♀
*G-37	C-64	♂	♀	♀	♀
*G-38	C-64	♂	♀	♀	♀
G-39	A-16	♀	----	----	----
G-40	A-16	♀	----	----	----
G-41	A-11	----	----	----	----
G-42	A-10	♀	----	----	----
G-43	B-33	♀	----	----	----
*G-44	C-38	♂	ambigua	♀	♂

(♀/♂) Intersexo

(\*) Gónadas en las que se identificó el sexo con los cuatro criterios.

(—) Gónadas perdidas durante la disección o procesamiento.

**Cuadro 6. RESULTADOS COMPARATIVOS DEL SEXADO EN CRÍAS DE TORTUGA GOLFINA CONSIDERANDO DIFERENTES CRITERIOS.**

Número de gónada	HISTOLOGÍA Inclusión en parafina	AQLARAMIENTO CON GLICERINA		
		Criterio de Van der Heiden <i>et al.</i> (1985)	Criterio de Benabib (1984)	Criterio de Briseño (com. por.)
G-1	♂	ambigua	♀	♂
G-2	♂	ambigua	♀	♂
G-3	♂	ambigua	♀	♂
G-4	♂	ambigua	♀	♂
G-5	♂	ambigua	♀	♂
G-6	♂	ambigua	♀	♂
G-7	♀	♂	♂	♂
G-8	♂	♀	♀	♀
G-9	♀	ambigua	♀	♂
G-10	♂	ambigua	♀	♂
G-11	♂	ambigua	♀	♂
G-12	♂	ambigua	♀	♂
G-13	♂	ambigua	♀	♂
G-14	♂	ambigua	♀	♂
G-15	♂	ambigua	♀	♂
G-16	♂	ambigua	♀	♂
G-17	♂	ambigua	♀	♂
G-18	♀	♀	♀	♀
G-19	♀	♂	♂	♂
G-20	♂	ambigua	♀	♂

Para determinar la equivalencia de los resultados obtenidos con los distintos criterios para la identificación del sexo, sólo se trabajó con las 21 gónadas de tortuga laúd que se lograron sexar con los cuatro criterios, y con las 20 gónadas colectadas de golfina.

En los cuadros 7 (a, b, c, d, e, f) y 8 (a, b, c, d, e, f) están representadas las tablas de contingencia utilizadas para la prueba de acuerdo de casos especiales de asociación, que

relacionan los diferentes criterios usados para la identificación del sexo en cada especie; en la diagonal de cada cuadro se presenta el número de gónadas que tienen el mismo sexo con diferentes criterios y fuera de la diagonal se observan los que no son del mismo sexo. Los valores calculados de K, intervalos de confianza de K,  $\sigma^2$ , Z y P se muestran en el cuadro 9

Cuadros 7 (a, b, c, d, e, f). TABLAS DE CONTINGENCIA COMPARANDO LOS CUATRO CRITERIOS UTILIZADOS EN GÓNADAS DE CRÍAS DE TORTUGA LAÚD.

HISTOLOGIA	Benabib (1984)			Total
	♀	♂	♀/♂	
♀	6	0	1	7
♂	10	0	0	10
♀/♂	4	0	0	4
Total	20	0	1	21

a

HISTOLOGIA	Briseño (com. per.)			Total
	♀	♂	♀/♂	
♀	6	0	1	7
♂	2	7	1	10
♀/♂	1	3	0	4
Total	9	10	2	21

b

HISTOLOGIA	Van der Heiden et al. (1985)				Total
	♀	♂	♀/♂	Amb	
♀	6	0	0	2	7
♂	2	0	0	8	10
♀/♂	1	0	0	3	4
Amb	0	0	0	0	0
Total	8	0	0	13	21

c

Benabib (1984)	Briseño (com. per.)			Total
	♀	♂	♀/♂	
♀	6	10	2	20
♂	0	0	0	0
♀/♂	1	0	0	1
Total	9	10	2	21

d

Benabib (1984)	Van der Heiden et al. (1985)				Total
	♀	♂	♀/♂	Amb	
♀	6	0	0	12	20
♂	0	0	0	0	0
♀/♂	0	0	0	1	1
Amb	0	0	0	0	0
Total	8	0	0	13	21

e

Briseño (com. per.)	Van der Heiden et al. (1985)				Total
	♀	♂	♀/♂	Amb	
♀	6	0	0	1	9
♂	0	0	0	10	10
♀/♂	0	0	0	2	2
Amb	0	0	0	0	0
Total	8	0	0	13	21

f

En las tablas de contingencia de los cuadros 7 (a, c, d, e, y f) logramos observar que menos del 38.1 % de las gónadas trabajadas coinciden en la identificación del sexo con diferentes criterios; mientras que en el cuadro 7 b comparando la técnica histológica con la técnica de aclaramiento utilizando el criterio de Briseño (com. per.) se obtuvo que el 61.9 % de las gónadas, sí tienen resultados similares.

También se puede ver que al comparar la técnica de aclaramiento utilizando el criterio de Van der Heiden *et al.* (1985) con otros criterios el 61.9 % de los resultados son ambiguos, ya que con este criterio fue más difícil la identificación del sexo en las gónadas trabajadas.

**Cuadros 8 (a, b, c, d, e, f). TABLAS DE CONTINGENCIA COMPARANDO LOS CUATRO CRITERIOS UTILIZADOS EN GÓNADAS DE CRÍAS DE TORTUGA GOLFINA**

HISTOLOGÍA	Benabib (1984)		Total
	♀	♂	
♀	2	2	4
♂	16	0	16
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>20</b>

a

HISTOLOGÍA	Briseño (com. Per.)		Total
	♀	♂	
♀	3	1	4
♂	15	1	16
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>20</b>

b

HISTOLOGÍA	Van der Heiden <i>et al.</i> (1985)			Total
	♀	♂	Amb	
♀	2	1	1	4
♂	1	0	15	16
Amb	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>20</b>

c

Benabib (1984)	Briseño (com. Per.)		Total
	♀	♂	
♀	2	16	18
♂	0	2	2
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>20</b>

d

Benabib (1984)	Van der Heiden <i>et al.</i> (1985)			Total
	♀	♂	Amb	
♀	2	0	16	18
♂	0	2	0	2
Amb	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>20</b>

e

Briseño (Com. Per.)	Van der Heiden <i>et al.</i> (1985)			Total
	♀	♂	Amb	
♀	2	0	0	2
♂	0	2	16	18
Amb	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>20</b>

f

En los cuadros 8 (a, c, d, e y f) de las tablas de contingencia de la tortuga golfina, los valores de similitud entre los diferentes criterios fue menor del 20 % y en el cuadro 8 b la similitud de los resultados es del 80 %, comparando el criterio de Briseño (com. per.) con la técnica histológica.

El uso del criterio de Van der Heiden *et al.* (1985) resultó en un 80 % de gónadas con sexado ambiguo, por lo que difícilmente pueden compararse estos resultados con los de la identificación del sexo usando otros criterios.

Cuadro 9. RESULTADOS DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE CONTRASTE.

Especie	Comparación	Valor de K	Valor de $\chi^2$	Valor de Z	Valor de P	Intervalo de confianza K
<i>D. coriacea</i>	a) Histología vs. Benabib	-0.06	0.13	-0.17	0.3932	(-0.77,0.65)
	b) Histología vs. Briseño	0.38	0.02	2.45	0.0198	(0.08,0.68)
	c) Histología vs. Van der H.	0.13	0.04	0.67	0.3187	(-0.25,0.50)
	d) Benabib vs. Briseño	-0.05	0.14	-0.14	0.3951	(-0.80,0.69)
	e) Benabib vs. Van der H.	0.03	0.15	0.07	0.3980	(-0.73,0.79)
	f) Briseño vs. Van der H.	0.26	0.03	1.56	0.1182	(-1.23,1.75)
<i>L. olivacea</i>	a) Histología vs. Benabib	-0.22	0.29	-0.40	0.3683	(-1.27,0.84)
	b) Histología vs. Briseño	0.23	0.09	0.78	0.2943	(-0.35,0.81)
	c) Histología vs. Van der H.	-0.06	0.14	-0.15	0.3945	(-0.79,0.67)
	d) Benabib vs. Briseño	0.02	0.18	0.06	0.3982	(-0.81,0.86)
	e) Benabib vs. Van der H.	0.11	0.12	0.32	0.3790	(-0.56,0.78)
	f) Briseño vs. Van der H.	0.11	0.12	0.32	0.3790	(-0.56,0.78)

Los resultados del análisis estadístico en las comparaciones a, c, d, e y f en la tortuga *D. coriacea* indican que los criterios comparados no son equivalentes, ya que los valores de P obtenidos son mayores que el esperado ( $P < 0.05$  con un  $\alpha = 0.05$ ). Esto significa que los resultados están en la región de rechazo de la hipótesis nula, mientras que en la comparación entre los sexos identificados con la técnica de histología y los del criterio de Briseño (b) los valores de P están dentro de la región de aceptación con un valor de  $P = 0.0198 < 0.05$ . También podemos observar que en las comparaciones a, c, d, e y f no existe concordancia en los intervalos de confianza (K), ya que en la prueba de acuerdo de casos especiales de asociación como regla general no se espera obtener entre esos intervalos el cero (0), mientras que en la comparación b sí existe concordancia entre las técnicas y criterio empleado, ya que los intervalos de confianza son  $> 0$ . Por lo tanto se deduce que los resultados del contraste de criterios y técnicas elegidos, fueron discrepantes en la mayoría de las comparaciones con excepción de la comparación entre la técnica histológica y la técnica de aclaramiento con el criterio de Briseño.

Sin embargo en la prueba estadística de contraste para la tortuga *L. olivacea* no existió equivalencia en las comparaciones, ya que los valores de P obtenidos fueron mayores que el esperado ( $P < 0.05$ ), estando los resultados en la región de rechazo. Además entre los intervalos de confianza de K existe el cero (0) en todos los casos, por lo que las comparaciones con los diferentes criterios en esta especie son discrepantes. Esto es debido a que en las tablas de contingencia para la tortuga golfina se trabajó con una variable menos (ovotestis) lo que nos permite hacer más representativa la prueba estadística ya que en esta prueba las tablas de contingencia de 2X2 nos permiten eliminar el índice de error.

En 34 crías de tortuga laúd se identificó el sexo por la técnica histológica. Estos resultados se relacionaron con la zona de incubación de los nidos y su temperatura promedio durante todo el periodo de incubación, para ver si la proporción de sexos resultante era consistente con la proporción de sexos que podría esperarse de acuerdo con la temperatura de incubación (cuadro 10).

**Cuadro 10. PROPORCIÓN DE SEXOS DE LAS CRÍAS DE TORTUGA LAÚD INCUBADAS CON DIFERENTES TÉCNICAS.**

Técnica de Incubación	Temperatura Promedio	SEXOS			Total de Crías
		♂	♀	♀/♂	
A (cerca del mar)	30.0 ± 0.9 °C	7.69%	76.92%	15.39%	13
B (lejos del mar)	30.2 ± 0.5 °C	12.50%	62.50%	25.00%	8
C (caja)	26.0 ± 0.7 °C	69.23%	30.77%	00.00%	13
Número Total de crías		11	19	4	34

En el cuadro 11 se muestran las temperaturas a las que estuvieron sometidos los nidos de tortuga laúd durante el desarrollo embrionario, desde la fecha de siembra del nido hasta la fecha de emergencia de las crías a la superficie del nido.

Las temperaturas a las que estuvo sometido el nido de tortuga golfina A-237, durante su desarrollo fueron: promedio 29.9°C, máxima 30.3°C y mínima 29.0°C.

Las temperaturas a las que estuvieron sometidos los nidos A-10, B-33 y C-64 durante el desarrollo embrionario en cada una de las técnicas de incubación, muestran que los huevos colocados en cajas de poliuretano estuvieron aproximadamente 4 °C más fríos durante el

segundo tercio del periodo de incubación, período en el que se ha demostrado ocurre la diferenciación sexual (Yntema y Mrosovsky, 1982; Morreale *et al.*, 1983; Merchant *et al.*, 1989; Fig. 9). Las crías de la caja C-64 fueron machos mientras que en los nidos A-10 y B-33 las crías fueron determinadas como hembras. En el nido A-237 de tortuga golfina, las temperaturas durante el segundo tercio del período de incubación fueron menores de 30 °C lo que nos dio como resultado la obtención de más machos (Fig. 10).

**Cuadro 11. TEMPERATURAS PROMEDIO, MÁXIMAS Y MÍNIMAS DE LOS NIDOS DURANTE EL PERÍODO DE INCUBACION DE LAS CRÍAS DE TORTUGA LAÚD.**

Número de nido	Temperaturas promedio	Temperaturas máximas	Temperaturas mínimas	Proporción de sexos		
				♀	♂	♀♂
C-38	26.0°C	31.3°C	22.7°C	--	2.9%	--
B-33	30.6°C	31.9°C	29.0°C	2.9%	--	--
A-10	30.4°C	31.7°C	29.0°C	2.9%	--	--
A-16	30.3°C	31.7°C	29.0°C	6.0%	--	--
C-64	25.8°C	30.0°C	21.6°C	--	8.8%	--
A-34	29.8°C	30.5°C	29.0°C	2.9%	--	--
C-68	25.7°C	30.0°C	21.6°C	--	6.0%	--
B-66	30.0°C	30.9°C	29.0°C	6.0%	2.9%	--
C-71	25.7°C	30.0°C	21.6°C	--	8.8%	--
B-67	30.0°C	30.9°C	29.0°C	2.9%	--	6.0%
A-46	29.9°C	30.3°C	29.0°C	8.8%	--	--
A-47	29.9°C	30.9°C	29.0°C	2.9%	--	6.0%
C-77	26.2°C	30.0°C	21.6°C	2.9%	--	--
B-71	30.1°C	30.9°C	29.0°C	2.9%	--	--
A-49	29.8°C	30.2°C	29.0°C	2.9%	2.9%	--
A-63	29.9°C	30.3°C	29.3°C	2.9%	--	--
C-104	27.0°C	33.6°C	21.6°C	8.8%	--	--
<b>Total</b>				<b>55.7%</b>	<b>32.3%</b>	<b>12.0%</b>

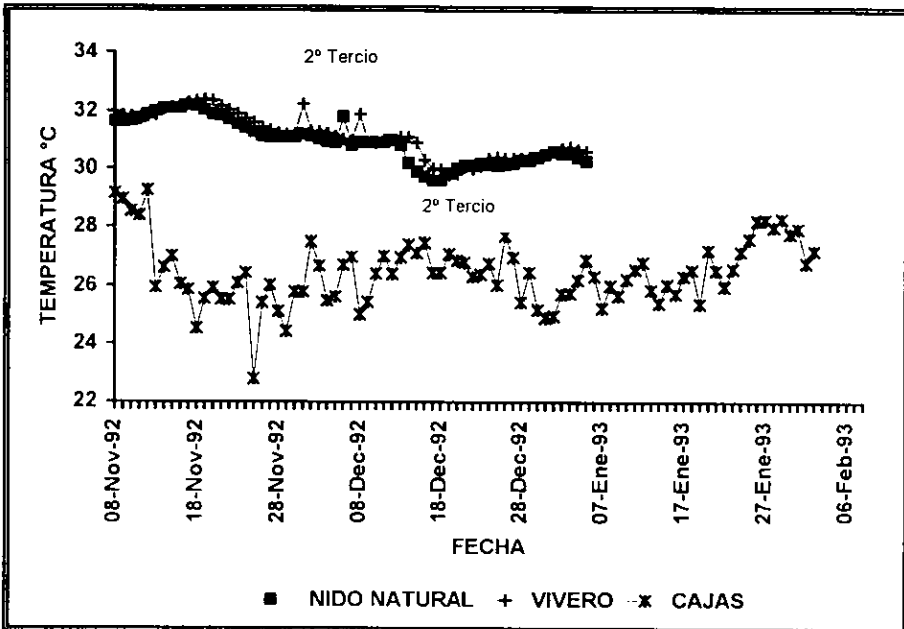


Fig. 9 Registros diarios de temperaturas de tres nidos de tortuga laúd, tratados con tres técnicas de incubación.

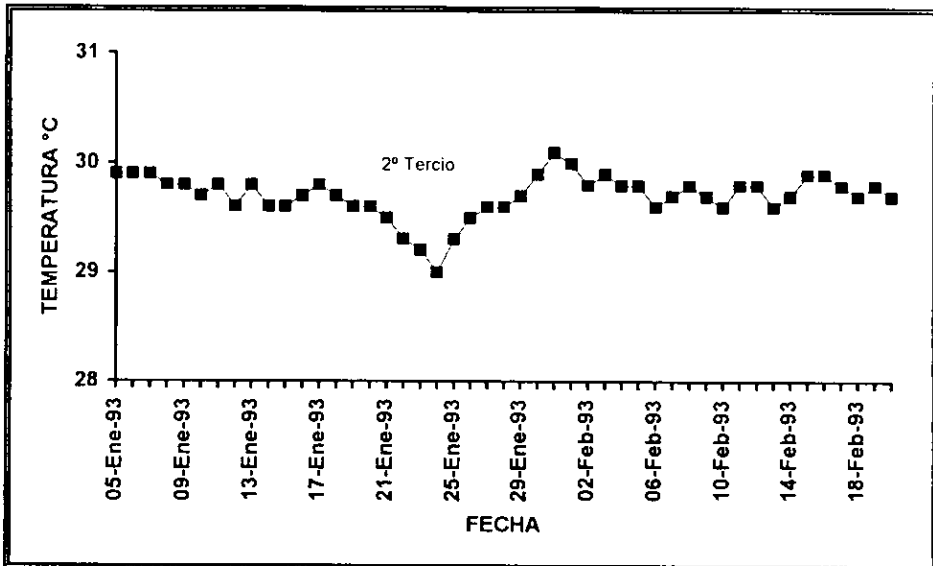


Fig. 10. Registros diarios de temperaturas en nido de tortuga golfinia.



Las gónadas de las tortugas laúd y golfinia recién emergidas, mostraron características histológicas en una fase de diferenciación incompleta. Esta observación coincide con trabajos realizados por Merchant *et al.*, (1989), Rimblot *et al.*, (1985) y Gámez (1996) en los que se discuten las características histológicas de las gónadas de crías recién emergidas de tortuga golfinia y laúd respectivamente.

En las gónadas clasificadas como ovarios (Fig. 3), es claro el mayor desarrollo de la corteza y la fragmentación de los cordones sexuales; no hay formación de folículos y los ovocitos no han iniciado la meiosis, como ocurre en algunas especies de tortugas de agua dulce como *Emys orbicularis* (Pieau, 1974). Por otra parte, en las gónadas clasificadas como testículos (Fig. 4), todavía no se han diferenciado las células de Leydig ni los túbulos seminíferos, que mantienen características de cordones sexuales embrionarios. En los ovotestis (Fig. 5) la corteza se engrosa como en los ovarios, pero a diferencia de éstos, los cordones medulares no se fragmentan y mantienen su identidad como en los testículos. En los tres tipos de gónadas se presenta un cierto grado de vascularización presentándose de diferente forma en cada sexo: en el ovario se encuentra principalmente en la parte medular, mientras que en el testículo se observa en la periferia de la gónada y en las gónadas indiferenciadas no se observó un patrón específico de la localización de éstos.

Estas observaciones dejan aún por resolver el problema de la diferenciación sexual definitiva de las gónadas; por ello se sugiere emplear los calificativos de ovario o testículo inmaduros, ya que las gónadas de las crías estudiadas se encontraron en las primeras etapas de diferenciación histológica. La formación de folículos con ovocitos en meiosis en los ovarios y la formación de túbulos seminíferos con células de Leydig en los testículos se realiza después de la eclosión en otras tortugas; sin embargo, la edad a la que estos procesos se llevan al cabo en las tortugas marinas, no se ha establecido. Las tortugas marinas tienen un lento proceso de maduración sexual que puede tomar entre 15 y 30 años de acuerdo con la especie y con las condiciones en las que se desarrollan. Dadas las características embrionarias de las gónadas en el momento del nacimiento, potencialmente podría revertirse el sexo en una etapa posterior, ya que el aspecto histológico de las gónadas de las crías muestra cierto grado de bipotencialidad.

Algunos autores como Limpus y Walter (1980) mencionan que *C. mydas* y otras especies de tortugas marinas, tardan más de 30 años en llegar a la edad adulta. Merchant

(com. pers.), realizó un estudio sobre el desarrollo embrionario de las gónadas en 3 especies de tortugas marinas y encontró que las gónadas de *D. coriacea* son las de más lenta diferenciación, seguidas por *L. olivacea* y *C. agassizi*, que presentan mayor diferenciación en el momento de la eclosión.

Algunos de los criterios considerados en el presente trabajo para identificar el sexo en las gónadas aclaradas, coinciden con trabajos realizados por Benabib (1984) trabajando con *D. coriacea* y Silva (1986) con *L. olivacea*. En la tortuga laúd, algunas gónadas presentaron tanto características de testículo como de ovario, las cuales fueron consideradas ovotestis; esta situación no ocurre en las tortugas golfinas, ya que hay una diferenciación sexual más evidente. Esto mismo se observó en los cortes histológicos de las gónadas. Lo anterior es similar a nuestros resultados, ya que pudimos observar que en la tortuga golfina es más definido el sexo de la gónada y no se encontraron intersexos. Fue más difícil identificar el sexo en la tortuga laúd y además se observaron gónadas que presentaban características tanto de ovario como de testículo (intersexos u ovotestis).

En trabajos anteriores, se describe la presencia de túbulos seminíferos como característica principal de los testículos aclarados con glicerina (Spotila *et al.*, 1983; Benabib, 1984). Esta interpretación es prematura, ya que como se observó en los cortes histológicos, las gónadas en proceso de diferenciación presentan solamente cordones medulares primarios, los cuales probablemente podrán derivarse en túbulos seminíferos al diferenciarse totalmente la gónada como testículo (Yntema y Mrosovsky, 1980). Se plantea la hipótesis de que los túbulos que se observan en las gónadas aclaradas, son los vasos sanguíneos periféricos que son muy notorios en los cortes histológicos de las gónadas masculinas. Pero se observó en los resultados que la vascularización de las gónadas no tiene relación con los túbulos que se observan en el interior de las gónadas clasificadas como masculinas.

Las técnicas aplicadas para sacrificar a las crías presentaron una relación con la presencia de los túbulos; en las tortuga laúd que se decapitaron, se desangraron las crías y por lo tanto, también los vasos sanguíneos de la gónada, así que al identificar el sexo de esas crías por la técnica de histología se pudo observar la presencia de vascularización pero al ser aclarada la gónada, los túbulos no presentan ninguna coloración, haciendo más difícil su visualización. En estas gónadas no se identificaron machos, al aplicar el criterio de Benabib (1984), mientras que en tortuga golfina, que se sacrificaron con pentobarbital sódico y fijada

inmediatamente las crías, se identificaron 2 machos con el criterio de Benabib. Como se indicó antes, la presencia de la vascularización no estuvo relacionada con el sexo, ya que en tortuga golfina, donde los túbulos presentaron coloración, sólo el 10 % de las muestras fue posible identificarlas como machos, sin embargo a nivel histológico se clasificó el 80 % de los individuos como machos.

En el presente trabajo, se identificaron algunos problemas para el sexado en las dos especies estudiadas, al seguir los criterios propuestos en los trabajos de Van der Heiden *et al.* (1983, 1985) con *L. olivacea* y *C. Agassizi*. La combinación de los atributos internos y externos que deben presentar cada uno de los sexos, según su publicación, no se localizaron en algunas de las muestras analizadas. Al considerar las características internas y externas por separado, tampoco fue posible la identificación del sexo. Las muestras con esta dificultad se denominaron como gónadas ambiguas: el 61.9% de las gónadas de laúd y el 80% de las gónadas de golfina fueron ambiguas. Sin embargo otros autores como Silva (1986) trabajando con *L. olivacea*, y Aguilar (1987) con *L. kempfi*, al aplicar la técnica de aclaramiento de Van der Heiden *et al.* (1983, 1985), consideraron sólo las características externas de las gónadas para sexar y describieron a las gónadas que dan origen a un ovario como aquellas que presentaron una superficie estriada o con pliegues muy marcados, y los testículos una superficie lisa.

Por otro lado, Benabib (1984) también usando la misma técnica, informó que en la tortuga *Dermochelys coriacea* se distinguen tres tipos de gónadas, considerando sólo las características internas que pueden observarse debido a la transparentación del órgano. Los ovarios los describe como totalmente transparentes, los testículos con estructuras tubulares en su interior y las ovotestis con zonas transparentes y tubulares a manera de manchones, o túbulos fragmentados, no completamente formados.

En este trabajo, el proceso histológico no resultó equivalente, con la mayoría de los criterios seleccionados para la identificación del sexo con la técnica de aclaramiento, ya que los resultados fueron significativamente contrastantes (Cuadro 9). Los resultados también indican que la identificación del sexo por medio de la histología es más precisa, ya que por lo menos hay una serie de criterios claros para determinar el sexo de la gónada que se está examinando.

Cabe mencionar algunas fallas metodológicas que probablemente impidieron realizar una buena observación de las gónadas aclaradas como son: la falta de calidad del aclaramiento, derivado probablemente de una fijación inadecuada, presentándose más frecuentemente en las gónadas de tortugas laúd. Fue común que durante el procesamiento y la observación, estas gónadas se rompieran con gran facilidad. Otro factor importante en muchos casos es que las gónadas se encontraron en una fase muy indiferenciada y no fue posible identificar las características informadas en otros trabajos.

Al comparar las técnicas para ver la validez existente entre ellas, se pudo observar que sí existe una analogía significativa entre los criterios de Briseño para el sexado por aclaramiento y el sexado histológico en tortuga laúd, pero ésta no es confiable por la marcada indiferenciación de las gónadas. En las demás comparaciones no se encontró equivalencia, ya que estadísticamente, todas las comparaciones fueron rechazadas; podemos observar en los cuadros 7 a, c, d, e y f que fuera de la diagonal (zona de sexos equivalentes) se presentan más del 62% de las gónadas lo que permite rechazar las comparaciones. Sin embargo en la tortuga golfina se observó que ninguna comparación fue equivalente, esto se debe a que las gónadas presentan mayor diferenciación y no se lograron identificar gónadas como intersexos, por ello las tablas de contingencia tienen una variable menos que permite que los resultados se distribuyen homogéneamente, por ello la prueba estadística es más confiable, se puede observar que en la tabla de contingencia 8 b existe más del 80% de los datos dentro de la diagonal lo que nos permitiría suponer que existe analogía en esta comparación, pero los resultados estadísticos nos muestran que no existe tal similitud. Los resultados sobre la similitud entre técnicas coinciden con los reportados por Gámez (1996).

Aguilar (1987) realizó un trabajo comparativo entre las técnicas de sexado en crías de *L. kempfi*, tomando en cuenta el criterio de las características externas de la gónada y reporta que no existe diferencia entre las técnicas de inclusión en parafina y el aclaramiento con glicerina, mientras que Mrosovsky y Benabib (1990), trabajando con *C. caretta* y *D. coriacea*, e identificando los sexos con las características internas de la gónada, reportan que no existe tal similitud entre ambas técnicas, lo cual coincide con nuestros resultados.

Por lo dicho anteriormente, no recomendamos usar la técnica de glicerina, ya que por un lado la forma de la gónada no nos dice nada sobre sus estructuras internas, y por el otro, las características internas que pueden observarse con la técnica de aclaramiento resulta

ambigua para identificar el sexo de *D. coriacea* y *L. olivacea*. Por lo tanto, recomendamos utilizar la técnica de histología, ya sea por inclusión en parafina o epón, ya que a pesar de ser laboriosas, estas técnicas nos permiten establecer con más seguridad el sexo de las gónadas. Por ello se recomienda que mientras no se defina un criterio patrón para sexar las gónadas aclaradas, no es recomendable aplicar el método con glicerina. Además es necesario evaluar en qué especies es posible emplear la técnica de glicerina, tomando en cuenta la poca diferenciación encontrada en las distintas especies de tortugas marinas.

Briseño y Abreu (en prep.) en un informe que amplía lo publicado por Van der Heiden et al. (1983,1985) recomiendan realizar un proceso secuencial en el cual se aplique la técnica de aclaramiento, y sólo en caso de alguna duda sobre el sexado, se aplicaría la técnica de histología. La Fig. 11 muestra los pasos propuestos por estos autores para la identificación del sexo en crías de tortugas marinas. El problema básico de este esquema, es que la identificación del sexo de las crías de tortugas marinas mediante la técnica de aclaramiento con glicerina aún no se ha validado. En los resultados podemos observar que existe discrepancia en los criterios usados para identificar el sexo con la técnica de aclaramiento, por lo que es recomendable establecer primero qué características hay que utilizar como indicativos de cada sexo, y con un alto nivel de confianza.

Si se sigue este esquema para el sexado de las gónadas es recomendable realizar también un estudio histológico de las gónadas para ver si el criterio que se está empleando es el correcto. Por lo menos en un inicio, debería aplicarse la técnica de histología como validación de la técnica de glicerina, y no sólo cuando existan dudas. La técnica de histología podría aplicarse a la misma gónada aclarada con glicerina, que se puede incluir en parafina o epón y realizar los cortes histológicos, o trabajar una gónada con la técnica histológica y otra con aclaramiento, pero indicando qué criterio es el que se está empleando para sexar. También sería recomendable realizar un buen diseño experimental que incluya muestras de todas las especies, incubarlas a la misma temperatura, y aplicar el proceso secuencial sugerido por Briseño y Abreu (en prep.). Lo anterior permitiría la identificación de la eficiencia de las técnicas más conocidas en relación a factores de precisión y de costo-beneficio y también se determinaría el gradiente de diferenciación que poseen las gónadas de las crías recién emergidas de cada especie de tortuga marina.

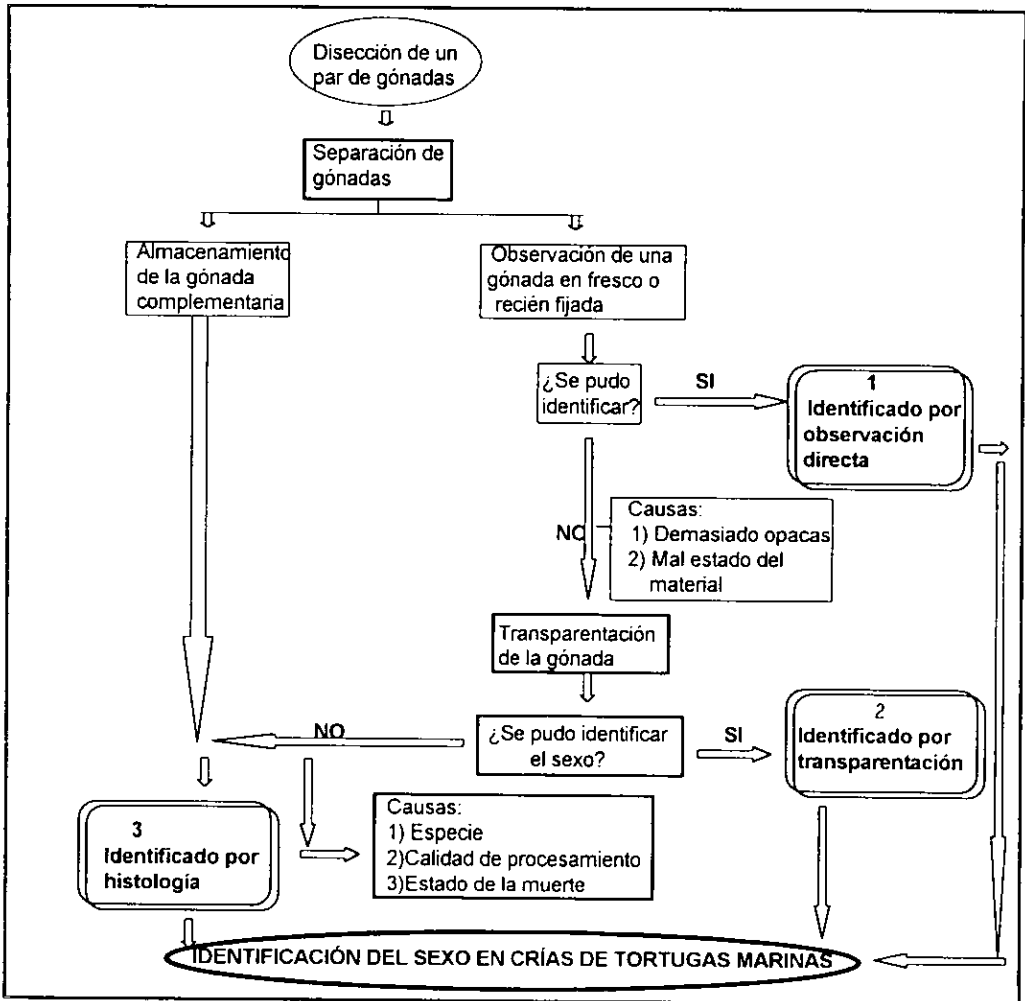


Fig. 11 Proceso secuencial para la identificación del sexo.

Como recomendación adicional, se resalta tomar en consideración algunos problemas que pueden suscitarse al realizar el proceso sugerido. Por ejemplo, al separar las gónadas del riñón puede haber pérdida o rotura del tejido de la gónada, por lo que la observación directa del órgano y la identificación del sexo puede dificultarse, principalmente en especies con menor diferenciación de las gónadas al nacer (v. gr. *D. coriacea*). Cuando no se tiene experiencia, es recomendable adquirir un entrenamiento previo tanto en la técnica de

aclareamiento como en la histología. Es recomendable trabajar la misma muestra con ambas técnicas. Lo anterior ayudará a establecer los criterios que se tomarán en cuenta al definir las características más conspicuas para la identificación de cada sexo. También es muy relevante la consideración de la presencia de intersexos.

Otro problema identificado al trabajar con la disección de la laúd en el campo, es el procedimiento para lograr una conservación adecuada. Al separar el tejido del riñón, es frecuente la ruptura de la gónada y al aclararse, el tejido se vuelve friable y dificulta su observación. Por ello, es recomendable que la gónada se fije inmediatamente después de la muerte de la tortuga para evitar la descomposición del tejido.

También se recomienda aplicar la técnica de histología y la de aclareamiento de glicerina en una misma gónada, usando la mitad del órgano para cada técnica. Como alternativa, es posible someter una misma gónada al proceso de aclareamiento y una sección de esa gónada puede utilizarse para realizar cortes histológicos. De esa manera se podría asegurar que no haya discrepancia en los resultados observados derivados de una eventual diferenciación entre las gónadas de un mismo individuo.

Los estudios sobre la influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo (v. gr. Bull, 1980; Benabib, 1984; Millán, 1988; Merchant y Villalpando, 1990) coinciden con los resultados que se muestran en el cuadro 10. En los nidos incubados en cajas se registró una temperatura promedio de  $26.0 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$  y se obtuvo mayor cantidad de machos (69.23%) de 13 crías y en las nidadas incubadas en vivero en la zona A (cerca del mar) la temperatura promedio fue de  $30.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$  obteniendo un 76.92 % de hembras de 13 crías y en la zona B (lejos del mar) donde se registró una temperatura promedio de  $30.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  se obtuvo el 62.5 % de hembras de 8 crías. Como podemos observar en estos resultados, el manejo de las nidadas que se realiza en los campamentos tortugeros permiten modificar las temperaturas de los nidos. También nos sirve para tener un seguimiento de la variación de la temperatura de incubación.

Sin embargo, de las 34 crías de laúd trabajadas, se logró observar que en los nidos de la zona A (cercanos al mar), y considerada como zona de nidos naturales, presentaron temperaturas máximas de  $31.7^{\circ}\text{C}$ , mínimas de  $29.0^{\circ}\text{C}$  y temperatura promedio de  $30.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ ; en estos nidos se obtuvo una proporción de 2.9 % de machos y 6.0 % de intersexos. En los nidos de la zona B (vivero), se registraron temperaturas promedio de  $30.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , con

un máximo de 31.9°C y mínimo de 29.0°C se obtuvo una proporción de machos e intersexos igual que en la zona A (2.9% machos y 6.0 % intersexos cuadro 11 y figuras 9 y 10)). Como se puede ver es mínima la variación de las temperaturas de la zona A y B. Esta pequeña variación probablemente se deba a la poca influencia de la humedad en los nidos de zona B, ya los nidos cercanos al mar (A) tienen un poco más de humedad (Benabib, 1984). La temperatura en las cajas fue menor debido a que al protegerlas de los cambios de temperatura exterior en la cámara de incubación se les proporcionó sombra, produciendo un decremento de la temperatura, influyendo además en el periodo de incubación de las nidadas. Por lo anterior se puede decir que con las técnicas conservacionistas realizadas en el campamento tortuguero "El Farito" se puede producir una población relativamente homogénea de sexos 1:1. El sólo empleo del vivero favorecería la producción de hembras y las cajas la producción de machos. Pero aún queda todavía por resolver cuál es la proporción de sexos en las poblaciones naturales, y si existen algunos otros factores externos que influyan en la diferenciación sexual definitiva de estos organismos después de la eclosión y que pudieran ocasionar un cambio en el sexo diagnosticado en las crías recién emergidas.



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

---

De acuerdo con los objetivos planteados para el presente trabajo, podemos concluir y recomendar lo siguiente:

1. La técnica de sexado por aclaramiento es poco confiable para *L. olivacea*, y para *D. coriacea*, por lo que definitivamente no es recomendable.
2. Las gónadas de las tortugas marinas *L. olivacea* y *D. coriacea* recién emergidas, muestran características histológicas poco diferenciadas. La etapa de maduración sexual histológica definitiva está todavía por establecerse. Por ello se recomienda que al sexar las gónadas de crías de estas dos especies, se utilice el calificativo de ovario o testículo inmaduro, en lugar de ovario y testículo solamente.
3. Entre las técnicas de procesamiento gonadal (histológica y aclaramiento por glicerina), recomendamos el uso de histología, ya sea por inclusión en plástico o parafina, ya que aunque la técnica de aclaramiento sea más fácil y económica, no permite identificar el sexo de las gónadas de manera confiable como el estudio histológico, debido a la inmadurez de las gónadas.
4. La temperatura de incubación es un factor importante en la determinación del sexo de tortugas laúd y golfina. En los programas de protección y conservación, recomendamos se utilicen diferentes técnicas de incubación, registrando las fluctuaciones de temperatura a las que se someten los nidos, para hacer una estimación de la proporción de sexos en crías reclutadas a la población natural.

## LITERATURA CITADA

---

- Aguilar, R. H. 1987. **Influencia de la temperatura en la determinación del sexo y la duración del periodo de incubación de la tortuga lora (*Lepidochelys kempí* Garman 1880).** Tesis profesional (Biología). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México, D. F. 58 pp.
- Bacci, G. 1965. **Sex determination.** Pergamon press, Oxford, NY. 306 pp.
- Benabib, N. M. 1983. **Algunos aspectos de la biología de *Dermochelys coriacea* en el Pacífico mexicano.** Teis profesional (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 83 pp.
- Benabib, N. M. 1984. **Efecto de la temperatura de incubación, la posición del nido y la fecha de anidación en la determinación del sexo de *Dermochelys coriacea*.** Tesis de Maestría (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 63 pp.
- Bickham, J. W. 1979. **Karyotypes of sex turtles and the kariological relationships of the cheloniidae.** Amer. Zool. 19: 983.
- Bishop, M. Y., S. Fienberg, E. and P. Holland, W. 1980 **Discrete multivariate analisis theory and practice.** The mit press Cambridge Massachusetts. 325 pp.
- Bowen, B. W., S. Nelson, W. and J. Avise, C. 1993. **A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assesment, and conservation relevance.** Proc. Natt. Acad. Sci. USA 90: 5571-5577.
- Bull, J. J. 1980. **Sex determination in reptiles.** Quart. Rev. Biol. 55: 3-21.
- Bull, J. J. 1983. **Evolution of sex determining mechanisms.** The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Advanced Book Program. Menlo Park, CA. 316 pp.
- Bull, J. J. and R. Vogt, C. 1979. **Temperature-dependent sex determination in turtles.** Science 206: 1186-1188.
- Bull, J. J. and R. Vogt, C. 1981. **Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles.** J. Exp. Zool. 218: 435-440.
- Bull, J. J., R. Vogt, C. and C. McCoy, J. 1982 a. **Sex determining temperatures in emydid turtles: A geographic comparison.** Evolution 36: 326-332.
- Bull, J. J., R. Vogt, C. and M. Bulmer, G. 1982 b. **Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination.** Evolution 36: 333-341.

- Carr, J. L. and J. Bickham, W. 1981. **Sex chromosomes of the Asian black pond turtle, *Siebenrockiella crassicollis* (Testudines: Emydidae).** Cytogenet Cell Genet 31: 178-183.
- Charnov, E. L. and J. Bull J. 1977. **When is sex environmentally determined?** Nature 266: 828-830.
- Dalrymple, G. H., J. Hampp, C. and D. Wellins, J. 1985. **Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill sea turtle *Eretmochelys imbricata*.** J. Herpetology 19: 158-159.
- Dutton, P. H., C. Whitmorey, P. and N. Mrosovsky. 1985. **Masculinisation of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* hatchlings from eggs incubated in styrofoam boxes.** Biological Conservation 31: 249-269.
- Ferguson, M. W. and T. Joanen. 1982. **Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*.** Nature 296: 850-853.
- Gámez, G. L. 1996. **Descripción histológica para la determinación sexual de las gónadas de crías recién eclosionadas de la tortuga marina *Dermochelys coriacea*.** Teis profesional (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 53 pp.
- García, E. 1973. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen.** Instituto de Geografía. UNAM. México, D. F. 253 pp.
- Going, C. J., O. Going, B. and G. Zug, R. 1978. **Introduction to herpetology.** W. H. Freeman and Company. USA. 378 pp.
- Gorman, G. 1973. **The chromosomes of the reptilia, a cytotaxonomic interpretation.** In: A<sup>a</sup> B<sup>a</sup> Chiarelli and E. Capanna (eds.). Cytotaxonomy and vertebrate evolution. Academic Press, NY: 349-424.
- Karnovsky, M. J. 1965. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.** J. Cell. Biol. 27: 137-145.
- King, M. 1977. **The evolution of sex chromosomes in lizards.** In: J. Calaby and H. Tyndale-Briscoe (eds.). Evolution and reproduction. Australian Academy of Science, Canberra: 55-60.
- Limpus, C. J. and D. Walter, G. 1980. **The growth of immature green turtles, (*Chelonia mydas*) under natural conditions.** Herpetologica 36: 162-165.

- López, S. C., L. Sarti, M. y N. García, T. 1992. **Estudio de las poblaciones de tortugas marinas *Lepidochelys olivacea* (golfina) y *Dermochelys coriacea* (laúd), con énfasis en aspectos conductuales y reproductivos, en el Playón de Mexiquillo, Michoacán.** Biología de Campo. 1991-1992. Facultad de Ciencias, UNAM. 140 pp.
- Márquez, M. R. 1990. **Sea turtles of the world.** FAO Species Catalogue. FAO Fisheries Synopsis 125 (11). Rome, 81 pp.
- McCoy, C. J., R. Vogt, C. and E. Censky, J. 1983. **Temperature- controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*.** J. Herpetology 17: 404-406.
- Merchant, L. H. and F. Villalpando, I. 1990. **Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study.** J. Exp. Zool. 254: 327-331.
- Merchant, L. H.; F. Villalpando, I. and U. Centeno, B. 1989. **Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*.** Herpetological Monographs 3: 43-61.
- Millán, G.L. 1988. **Estudio sobre la proporción de sexos de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), cuyos huevos son incubados masivamente en el Centro Biológico de Mazunte, Oaxaca.** Tesis Profesional (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 59 pp.
- Miller, J. D. and C. Limpus, J. 1981. **Incubation period and sexual differentiation in the green turtle (*Chelonia mydas*).** L. Proc. Melbourne. Herpetol. Symp. 66-73.
- Mittwoch, U. 1967. **Sex chromosomes.** Academic Press, NY. London. 306 pp.
- Morreale, S. J., G. Ruiz, J., E. Spotila, J. and E. Standora, J. 1983. **Methodology for the study of temperature related phenomena affecting sea turtle eggs.** U.S. Fish and Wildlife Service. Albuquerque, New Mexico. Endangered Species Report II.
- Morreale, S. J., G. Ruiz, J. J. Spotila R. and E. Standora, A. 1982. **Temperature-dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles.** Science 216: 1245-1247.
- Mrosovsky, N. 1982. **Sex ratio bias in hatchling sea turtles from artificially incubated eggs.** Biological Conservation 23: 309-314.

- Mrosovsky, N. and C. Yntema, L. 1980. **Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: Implications for conservation practices.** *Biological Conservation* 18: 271-280.
- Mrosovsky, N. and M. Benabib, N. 1990. **An assessment of two methods of sexing hatchling sea turtles.** *Copeia*. 1990: 589-591.
- Owens, D. W. 1976. **Endocrine control of reproduction and growth in the green sea turtle *Chelonia mydas*.** Ph. dissertation. Univ. of Arizona, Tucson.
- Owens, D. W., J. Hendrickson, R., V. Lance and I. Callard, P. 1978. **A technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using a radioimmunoassay.** *Herpetologica* 34: 270-273.
- Pieau, C. 1974. **Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d' *Emys orbicularis* L. (Chélonien); effets des hormones sexuelles.** *Annales d' Embryologie et de Morphogenèse* 7: 365-398.
- Rimblot, F., J. Fretey, N. Mrosovsky, J. Lescure and C. Pieau. 1985. **Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea-turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761).** *Amphibia-Reptilia* 6: 83-92.
- Salame, A. V., A. Lemus, F. Vichis y H. Merchant, L.. 1988. **Aspectos bioquímicos de la diferenciación sexual de las gonadas de *Chelonia mydas* y *Lepidochelys olivacea* incubadas a temperatura controlada.** En: Memorias del V encuentro interuniversitario sobre tortugas marinas en México. U.M.S.N.H. CONACYT. Comp.
- Salame, A. V., M. Herrera J. y L. Merchant, H. 1995. **Valoración de esteroides sexuales en vitelo, suero y órganos urogenitales durante el desarrollo gonadal de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea* Eschscholtz, 1829).** En: Memoria de resúmenes XII encuentro interuniversitario y II internacional para la conservación de las tortugas marinas. Centro Mexicano de la tortuga Mazunte, Tonameca, Oaxaca, México. Comp. Centro Mexicano de la tortuga 44 pp.

- Sarti, M. L., C. López, S., N. García, T., C. Ordoñez, E., L. Gámez, G., C. Hernández, R., A. Barragán R. y F. Vargas, S. 1993. **Informe final del proyecto protección e investigación de algunos aspectos biológicos y reproductivos de las tortugas marinas en la zona sur de la costa michoacana.** Temporada de anidación 1992-1993. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Silva, S. F. 1986. **La temperatura como factor determinante de la diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea*.** *Tiempos de Ciencia*. México. 2: 17-20.
- Sites, J. W. Jr., J. Bickham, W. and M. Haiduk, W. 1979. **A derived X chromosome in the turtle genus *Staurotypus*.** *Science* 206: 1410-1412.
- Spotila, J., E. Standora, S. Morreales, Ch. Puccia and G. Ruiz. 1983. **Methodology for the study temperature related phenomena affecting sea turtles eggs.** U.S. Fish and Wildlife Service. Albuquerque, New Mexico. Endangered species report. 11. 51 pp.
- Van Der Heiden, A. M., R. Briseño, D. and D. Ríos, O. 1983. **Description of a labor and cost saving method for the determination of sex in hatchling sea turtles.** *Proceeding of the Western Atlantic Turtles Symposium*. San Jose, Costa Rica. *Comp. Western Atlantic Turtles*. pág. 8
- Van Der Heiden, A. M., R. Briseño, D. and D. Ríos, O. 1985. **A simplified method for determining sex in hatchling sea turtles.** *Copeia* 1985 3: 779-782.
- Vogt, R. C. and J. Bull, J. 1982. **Temperature controlled sex-determination in turtles: Ecological and behavioral aspects.** *Herpetologica* 38: 156-164.
- Vogt, R. C. y O. Flores, V. 1986. **Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos.** *Ciencia*. 37: 21-32.
- Vorontsov, N. N. 1973. **The evolution of the sex chromosomes.** In: A. B. Chiarelli and E. Capanna (eds.). *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, NY: 619-657.
- Whitmore, C.; P. Dutton and N. Mrosovsky. 1985. **Sexing of hatchling sea turtles: Gross appearance versus histology.** *J. Herpetology* 19: 430-431.
- Yntema, C. L. 1976. **Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*.** *J. Morphol.* 150: 453-462.

- Yntema, C. L. 1979. **Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina***. J. Morphol. 159: 17-27.
- Yntema, C. L. 1981. **Characteristics of gonads and oviducts in hatchling and young *Chelydra serpentina* resulting from three incubation temperatures**. J. Morphol. 167: 297-304.
- Yntema, C. L. and N. Mrosovsky. 1979. **Incubation temperature and sex ratio in hatchlings loggerhead turtles: A preliminary report**. Marine Turtle Newsletter 11: 9-10.
- Yntema, C. L. and N. Mrosovsky. 1980. **Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures**. Herpetologica 36: 33-36.
- Yntema, C. L. and N. Mrosovsky. 1982. **Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles**. Can. J. Zool. 60: 1012-1016

ANEXO 1 UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS TORTUGAS MARINAS

CLASE: REPTILIA

SUBCLASE: ANAPSIDA

ORDEN: TESTUDINES

SUBORDEN: CRYPTODIRA

SUPERFAMILIA: CHELONIOIDEA

FAMILIA: CHELONIIDAE

GENEROS: *Caretta*

ESPECIES: *Caretta caretta* (Caguama)

*Chelonia*

*Chelonia mydas* (Verde)

*Chelonia agassizi* (Prieta)

*Eretmochelys*

*Eretmochelys imbricata* (Carey)

*Lepidochelys*

*Lepidochelys kempfi* (Lora)

*Lepidochelys olivacea* (Golfina)

*Natator*

*Natator depressus* (kikila)

FAMILIA: DERMOCHELYIDAE

GENERO: *Dermochelys*

ESPECIE: *Dermochelys coriacea* (Laúd)



---

## **Anexo 2 Técnica de procesamiento de tejido para inclusión en epón.**

### Fijación:

Cada tejido se colocó en un frasco con fijador Karnovsky modificado (1965) 0.1 M, ph 7.3.

### Post-fijación:

Los tejidos se lavaron con buffer de cacodilato de sodio 0.1 M (4°C), 1 h.

Se colocaron en tetraóxido de osmio 1% Zelter QUST (tapados con parafilm) (4°C), 1 h.

Posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada

### Deshidratación

Tres cambios con alcohol 70 % y dejarlo 10 min (4°C).

Tres cambios con alcohol 80 % y dejarlo 10 min (4°C).

Tres cambios con alcohol 90 % y dejarlo 10 min.

Tres cambios con alcohol 95 % y dejarlo 10 min.

Tres cambios con alcohol 100 % y dejarlo 20 min.

Tres cambios con alcohol 100 % y dejarlo 20 min.

Óxido de propileno 20 min.

Óxido de propileno 20 min.

### Impregnación:

Proporción de mezclas (epon 812 - óxido de propileno).

Epón-Óxido de propileno 1:1, temperatura ambiente 1 h.

Epón-Óxido de propileno 2:1, temperatura ambiente 1 h.

Epón-Puro (812), temperatura ambiente 24 h.

Inclusión:

En moldes, según el tamaño del tejido y las necesidades se deja en una estufa con Epón 812, polimerizar a 60 °C, 24 h.

Preparación del Epón 812 (Luft, 1961).

Para 10 ml se tomaron las siguientes porciones:

-7 ml de mezcla "A": (la cual consiste en 50 ml de epon 812 más 81 ml de dodecenil succínico anhídrido - DDSA).

-3 ml de mezcla "B": (la cual consiste en 50 ml de epon 812 más 44 ml de metil nádic anhídrido - NMA).

-0.15 ml de catalizador DMP - 30 (2,4,6 - tris - dimetil aminometil fenol).

Las tres porciones se batieron durante 15 a 20 minutos, evitando la formación de burbujas.

En el laboratorio, las mezclas "A" y "B", así como el epon 812 se conservan a 4 °C. Antes de abrirse y usarse se dejaron 1 hora a temperatura ambiente.

---

### **Anexo 3 Técnica de procesamiento de tejido para inclusión en parafina.**

#### Fijación:

Los tejidos se fijaron en una solución de formol al 10% en buffer fosfato 1 M.

#### Post-fijación:

Se lavó el tejido al chorro del agua durante 2 h.

#### Deshidratación:

Alcohol 50 % 2 h.

Alcohol 70 % 2 h.

Alcohol 80 % 2 h.

Alcohol 96 % 2 h.

Alcohol 100 % 2 h.

Alcohol 100 % Xilol 2 h.

Xilol 2 h.

#### Impregnación:

Paraplas 1, 15 min.

Paraplas 2, 15 min.

(Deben mantenerse en estufa a 50°C)

#### Inclusión:

En moldes de papel o cartón agregar parafina y colocar el tejido horizontalmente hasta que la parafina endurezca a temperatura ambiente. 24 h.

#### Cortes:

Una vez incluido el tejido, se practicaron cortes con microtomo de 7 u 8 micras, los cuales se colocan en una tina de agua a 25°C con grenetina para que el tejido se estire y se adhiera al portaobjetos.

---

#### **Anexo 4 Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina.**

Desparafinar en xilol las preparaciones durante 10 min.

##### Hidratación:

Alcohol absoluto, 10 min.

Alcohol 96 %, 10 min.

Alcohol 70 %, 10 min.

Alcohol 50 %, 10 min.

Agua destilada, 10 min.

##### Tinción:

Hematoxilina de Hams, 30 a 45 seg aproximadamente.

Lavar con agua corriente (observar virage).

Agua destilada, 10 min.

Alcohol 50 %, 10 min.

Alcohol 70 %, 10 min.

Eosina, 10 seg.

##### Deshidratación:

Alcohol 70 %, 10 min.

Alcohol 96 %, 10 min.

Alcohol absoluto, 10 min.

Alcohol Xilol, 10 min.

Xilol/aclarar, 10 min.

(todos estos cambios a temperatura ambiente)

Montar con bálsamo de Canadá y dejar sobre una parrilla hasta que seque.