



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESCRIPCION HISTOLOGICA PARA LA
DETERMINACION SEXUAL DE LAS GONADAS
DE CRIAS RECIEN ECLOSIONADAS DE LA
TORTUGA MARINA Dermochelys coriaceu

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LETICIA GAMEZ GUADARRAMA



DIRECTOR DE TESIS: MIRIAM BENABIB NISENBAUM

COORDIRECTOR: MARIA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL

MEXICO, D. F.

1996.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Descripción Histológica para la determinación sexual de las gónadas de crías recién eclosionadas de la tortuga marina Dermodochelys coriacea."

realizado por Leticia Gámez Guadarrama

con número de cuenta 8423684-5, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Miriam Benabib Nisenbaum

Miriam Benabib

Propietario

Dra. María del Carmen Uribe Aranzabal

Ma del Carmen Uribe

Propietario

Biol. Adriana Laura Sarti Martínez

Adriana Sarti
Marisela Villagrán

Suplente

Dra. Marisela Villagrán Santa Cruz

FACULTAD DE CIENCIAS

Suplente

Biol. Ana Rebeca Barragán Rocha

Agirre

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION
DE BIOLOGIA

I DEDICATORIA

Esta Tesis esta dedicada a mis Padres, por todo el apoyo que siempre me proporcionaron y por el infinito amor que les tengo.

A mis hermanos Armando, Antonio, Angel, Alfredo y Alberto por que son un punto de apoyo muy importante y por que siempre me motivaron para seguir adelante.

A Verónica por su comprensión y cariño.

A mis sobrinos Ariadna, Andrea, Andres, Cristian, Bryan, Astrid, Abraham y Hugo por toda la felicidad proporcionada.

A mis amigos Aleida, Carlos y Nancy por compartir los malos y buenos momentos.

A la memoria de mis abuelos Agua y José pues formaron parte importante de mi vida y a mi hermano Andres aunque ausente se encuentra muy presente en mi.

A todos mis amigos con los que compartí momentos agradables y desagradables.

Al Campamento Tortuguero "El Farito" y a su personal pasado, presente y futuro.

TORTUGA

Ahí viene la noche
lo más probable es que duermas
ahí viene la noche
lo más seguro es que mueras.
Hoy llueven martillos
lo más probable es que peguen
hoy bajó la marea
se fue llevando tus restos.

Ay

tortuga vete mar adentro
y déjanos olvídanos

ay

tortuga vete mar adentro
y déjanos en este infierno.

Ahí viene la noche
lo más probable es que mueras
hoy la arena es testigo
de tu peor enemigo.

Y no sabes

como duele

y no te imaginas

como lastimas.

Ay

tortuga vete mar adentro
y déjanos olvídanos

ay

tortuga vete mar adentro
y déjanos en este infierno.

Ay...

A Los Caifanes

II AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a las siguientes personas por su ayuda y asesoramiento: Dra. Miriam Benabib N., Dra. M^a Carmen Uribe A., Dra Marisela Villagran., Biól. Laura Sarti M. Biól. Ana R. Barragan R; quienes revisaron el manuscrito con gran dedicación de su tiempo y conocimientos, cuya revisión mejoró en gran medida la calidad del trabajo.

Un muy especial agradecimiento a Laura Sarti por todo el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo y por permitirme conocer a la gran persona que lleva dentro.

A Cristina Ordoñez Espinosa por formar parte importante en la realización de este trabajo y por ser una gran persona.

Al personal del laboratorio de Biología de la reproducción animal, Yuriri B., Gloria P y Teresa L., por su ayuda brindada en la realización de la técnica histológica.

A José Alejandro Marmolejo V., por su ayuda en la toma de fotos de las gónadas aclaradas.

Así mismo agradezco al Dr Merchant las aportaciones hechas al presente trabajo.

También quiero agradecer a Libertar Cuellar, Patricia Huerta, Miguel Herrera y Francisco Vargas, por su paciencia y apoyo.

Un especial agradecimiento al personal del laboratorio de Tortugas Marinas por su motivación, amistad y por soportar todas las diabluras hechas a todos.

El presente trabajo se llevó al cabo gracias al permiso número 412.(1) 06045 otorgado por el Instituto Nacional de Ecología, bajo la dirección de la Dra Miriam Benabib N., Investigador asociado C del Centro de Ecología y la Dra Ma. del Carmen Uribe A. Profesor asociado C del Lab Biología de la Reproducción Animal.

III INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE.....	III
RESUMEN.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción de la tortuga marina <i>Dermochelys coriacea</i> (laúd).....	1
1.2 Distribución geográfica y zonas de anidación.....	2
1.3 Conducta reproductiva.....	2
1.4 Medidas de protección y/o conservación.....	3
1.5 Determinación sexual en tortugas marinas.....	4
2. OBJETIVOS.....	13
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	13
4. MÉTODOS.....	16
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Técnica histológica.....	21
5.2 Técnica de aclaramiento con glicerina.....	28
5.3 Temperatura y proporción sexual.....	30
5.4 Comparación de las técnicas.....	32
6. DISCUSIÓN.....	36
6.1 Técnica histológica.....	36
6.2 Técnica de aclaramiento con glicerina y observaciones macroscópicas.....	40
6.3 Temperatura y proporción sexual.....	42
6.4 Comparación de las técnicas.....	43

7. CONCLUSIONES.....	45
8. LITERATURA CITADA.....	47
ANEXO I.....	51
ANEXO II.....	53

IV RESUMEN

Se realizó un análisis de los diferentes métodos empleados para la identificación del sexo de las gónadas de crías de tortugas marinas, con el fin de evaluar cuál es la técnica más apropiada para el sexado de crías recién eclosionadas de la tortuga marina *Dermochelys coriacea* (laúd). Se compararon dos técnicas: histología y aclaramiento por glicerina, en ambas gónadas de 49 individuos de la tortuga laúd. En algunas gónadas aclaradas se observaron estructuras tubulares internas que se interpretaron como vasos sanguíneos que se supone delimitan los túbulos seminíferos inmaduros. Estas observaciones fueron comparadas con las observaciones de los cortes de las gónadas procesadas por medio de la técnica histológica con parafina, en las que pudimos observar que estas estructuras eran vasos sanguíneos localizados en la parte central de la médula en las gónadas femeninas y en la periferia de la médula en gónadas masculinas, pero no se encontró correlación entre el sexo identificado con histología y el sexo identificado con las estructuras observadas en las gónadas aclaradas. Aunque la técnica de aclaramiento con glicerina es más sencilla, rápida y barata, no se recomienda para el sexado de las gónadas de las crías de la tortuga laúd. Se consideró que la técnica histológica es la más apropiada para la identificación del sexo de las gónadas de crías de la tortuga laúd, ya que mostró las características distintivas de cada sexo. Las gónadas femeninas mostraron un epitelio germinal conspicuo de tipo cilíndrico pseudoestratificado con la presencia de células germinales, y una evidente túnica albugínea que separa la médula del epitelio. Las gónadas masculinas presentaron un epitelio simple y la médula fue muy voluminosa. Los ovotestis presentaron características de ambos sexos, es decir, un epitelio germinal conspicuo, con células germinales y evidente túnica albugínea, así como una médula voluminosa con un mayor grado de desarrollo de los cordones seminíferos inmaduros. De los ovotestis obtenidos, uno mostró un grado de desarrollo muy avanzado hacia testículo, ya que se observó la formación de cordones con espermatogonias, así como el desarrollo de células germinales y una evidente túnica albugínea. Se sugiere usar los términos de pseudo-ovario, pseudo-testículo y ovotestis, al referirse a las gónadas de las crías recién eclosionadas de *D. coriacea*, ya que en esta etapa, el sexo gonadal está muy poco diferenciado. Se observó un claro sesgo hacia hembras (1♂:32♀) en la proporción de sexos de las crías que se produjeron en el vivero, como se esperaría dado que la temperatura promedio de incubación del segundo tercio del desarrollo embrionario fue de 30.02°C, incluida dentro del intervalo de temperaturas reportadas para la producción de hembras. En las crías nacidas en cajas de poliuretano, se observó un claro sesgo hacia machos (12♂:2♀), y la temperatura promedio de incubación del segundo tercio de desarrollo embrionario fue de 26.19°C, incluida dentro del intervalo de temperaturas reportadas para la producción de machos. Los resultados del sexado histológico son coherentes con las proporciones sexuales esperadas, dadas las temperaturas de incubación observadas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción de la tortuga marina *Dermochelys coriacea* (Lacépède).

Es uno de los reptiles más grandes, de alrededor de 140-180 cm de largo del caparazón. Los adultos se distinguen fácilmente de todas las demás especies de tortugas marinas por su gran cuerpo hidrodinámico en forma de lira, sus aletas largas y su caparazón cubierto por una piel o cuero suave completamente liso sin escamas; la piel de la cabeza, el cuello y las aletas también carecen de escamas. El caparazón está formado por numerosas placas óseas poligonales debajo de una gruesa capa de grasa y cartílago. A lo largo del caparazón presenta siete quillas, mientras que el plastrón sólo tiene cinco quillas. Su coloración dorsal va de negra a negro-azulado con numerosas manchas blancas dispersas en todo el cuerpo y algunas manchas rosas en el cuello y la cabeza. Las aletas anteriores son muy largas, algunas veces excediendo la mitad del largo del caparazón; tienen forma de remo, y carecen de uñas (Pritchard, 1971, 1980; Márquez, 1990; Eckert, 1991).

Las mandíbulas son muy débiles y poseen placas adaptadas para cortar alimento suave. Su maxilar superior presenta dos proyecciones como cúspides bien definidas y una cúspide central en el maxilar inferior (Pritchard, 1980).

Las crías presentan poca diferencia con los adultos. Las aletas delanteras son extremadamente largas. La piel de las aletas, cuello y caparazón está recubierta por escamas

poligonales pequeñas y suaves que desaparecen en algunas semanas (Márquez, 1990).

1.2 Distribución geográfica y zonas de anidación.

Su distribución geográfica abarca desde zonas tropicales hasta zonas templadas y frías cercanas a la península del Labrador en el Atlántico norte, y el Mar de Bering en el Pacífico norte. En el Atlántico sur se encuentran hasta Mar del Plata, en Argentina, y al sur de Africa, y en el suroeste del Océano Pacífico en Tasmania y Nueva Zelanda (Márquez, 1990). En México, sus zonas de anidación se distribuyen a todo lo largo del litoral en el Océano Pacífico, desde Chiapas en la zona sur, hasta Baja California Sur en la zona norte; su temporada de anidación abarca desde octubre hasta febrero o marzo (Márquez et al., 1990). En el Golfo de México se distribuyen frente a las costas de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo; en estas zonas su temporada de anidación abarca de marzo a julio (Mrosovsky y Pritchard, 1971).

1.3 Conducta reproductiva.

Las hembras y los machos de todas las especies de tortugas marinas, tienden a agregarse cerca de la costa para aparearse antes de la temporada de anidación de las hembras (Van Eijck y Eckert, 1994). Se han reportado pocas observaciones de apareamiento de la tortuga laúd, pero es probable que ocurra al inicio de la temporada de anidación (Pritchard, 1971). Después del apareamiento, las hembras grávidas llegan a la playa a poner sus huevos, generalmente durante la noche. La tortuga laúd

excava su nido a una profundidad de 80 cm aproximadamente. La mayoría de los huevos de esta especie son fértiles (con un promedio de 65 huevos por nidada) y junto con estos huevos, las tortugas depositan otras estructuras más pequeñas que los huevos, formadas por albúmina cubierta por cáscara. El periodo de incubación dura aproximadamente 55 a 75 días, dependiendo de las condiciones ambientales.

1.4 Medidas de protección y/o conservación.

Las tortugas marinas están consideradas como amenazadas o en peligro de extinción. Sus nidos son generalmente saqueados en las playas de anidación por sus depredadores naturales o introducidos, o por el mismo hombre. Es por esto que se han implementado medidas de protección y conservación en su favor, como la vigilancia de las playas de anidación y el transplante de las nidadas a zonas protegidas, donde los huevos son incubados. En el campamento tortuguero el "Farito" (Michoacán), también se llevan al cabo prácticas de incubación artificial que consisten en la incubación de los huevos en cajas de poliuretano, almacenadas en un pequeño cobertizo (cámara de incubación) hecho con palapa y cerca de la playa. Esta última técnica, cambia la temperatura de incubación de los huevos, modificando el periodo de incubación (Dutton et al, 1985). Yntema y Mrosovsky (1982), sugirieron que la temperatura de incubación afecta la diferenciación sexual en las tortugas marinas durante el segundo tercio del desarrollo embrionario, produciéndose machos a bajas temperaturas (promedio de 27°C) y hembras a altas temperaturas (promedio de 30°C). El periodo de

incubación de los huevos en cajas de poliuretano es más prolongado que en los nidos dejados *in situ*. En la tortuga laúd, el periodo de incubación en cajas de poliuretano dura aproximadamente 79 días, con una temperatura promedio en la arena de las cajas, de 25.97-28.38°C, menor a la temperatura promedio registrada en la arena de la playa del campamento tortuguero el "Farito". Debido a que esta temperatura está por debajo de la temperatura umbral promedio de varias poblaciones estudiadas (Benabib, 1984; Dutton *et al.*, 1985 y Rimblot *et al.*, 1985), la incubación artificial podría causar una inclinación de la proporción sexual hacia machos (Dutton *et al.*, 1985). En el playón de Mexiquillo, donde se llevó al cabo este estudio, el periodo promedio de incubación en condiciones naturales es de 59-65 días, dependiendo de las condiciones ambientales de cada temporada (Benabib, 1983).

1.5 Determinación sexual en tortugas marinas.

En algunos grupos de reptiles, el sexo se determina después de la fecundación del óvulo por efecto de su ambiente térmico inmediato; por lo tanto, algunos ambientes están asociados con la producción de machos y otros con la producción de hembras. Este mecanismo de determinación sexual es el llamado "determinación ambiental" o "epigenético" (Merchant *et al.*, 1989), porque la primera distinción ontogenética entre los sexos es ambiental (Bull, 1983). Tal es el caso de algunos quelonios, en los que la diferenciación sexual depende de la temperatura durante el periodo de incubación de los huevos.

Se sabe que diferentes especies de tortugas marinas

presentan determinación sexual dependiente de la temperatura: *Caretta caretta* (Mrosovsky y Yntema, 1980; Yntema y Mrosovsky, 1980; Mrosovsky, 1982), *Chelonia mydas* (Miller y Limpus, 1981; Morreale et al., 1982), *Lepidochelys olivacea* (Mohanty-Hejmadi y Diamond, 1983; McCoy et al., 1983; Silva, 1986), *D. coriacea* (Benabib, 1984; Dutton et al., 1985; Rimblot et al., 1985), *Eretmochelys imbricata* (Dalrymple et al., 1985) y *Lepidochelys kempfi* (Wibbels et al., 1989; Aguilar, 1987). Aunque algunos estudios han sido realizados en condiciones naturales, o en el laboratorio con temperaturas fluctuantes, la mayoría se confinan a trabajos de laboratorio con temperatura de incubación constante. Los resultados obtenidos con las distintas especies de tortugas hasta ahora estudiadas son similares: temperaturas bajas (22 a 27°C) producen machos; temperaturas altas (30°C o más) producen hembras (Bull, 1980). Se pueden obtener ambos sexos en una proporción de 1:1 en un pequeño intervalo de temperatura intermedia (entre los 27 y 30°C); esta temperatura ha sido definida como temperatura umbral (Mrosovsky y Pieau, 1991). Benabib (1984) propone que la temperatura umbral para la población de la tortuga laúd en Mexiquillo, se encuentra por debajo de los 29.8°C. Rimblot et al. (1985) encontraron que en la tortuga laúd de Surinam y la Guyana Francesa la temperatura umbral se encuentra entre los 28.75 y 29.75°C, mientras que Dutton et al. (1985) la encontraron entre los 28 y 30.5°C, para poblaciones en Surinam.

En tetrápodos, el efecto de la temperatura en la diferenciación del sexo gonadal puede ser explicado en términos de una gónada primordial bisexual en la que se identifican dos

áreas: el córtex y la médula, potencialmente ginogénicas y androgénicas, respectivamente. Estas dos áreas son identificadas por diferencias en topografía, morfología y propiedades histogenéticas. Cuando un área domina sobre la otra, resulta en la definición temporal o permanente del sexo. La definición es permanente si uno de los inductores es completamente inhibido. En los casos de intersexualidad, persisten tanto el córtex como la médula (Merchant et al., 1989).

Benabib (1984) realizó estudios sobre la determinación del sexo de la tortuga laúd en Michoacán, encontrando que la distancia del nido al mar y la fecha de la oviposición tienen un efecto en las proporciones sexuales, dándose una proporción elevada de intersexos. Dutton et al. (1985) y Mrosovsky (1982) realizaron estudios con huevos incubados en cajas de poliuretano, encontrando que existe un efecto de masculinización en las crías incubadas por medio de esta técnica artificial. Debido a que los huevos de tortugas marinas son incubados con frecuencia en condiciones artificiales en programas de investigación y protección, y a temperaturas diferentes de aquellas que experimentarían en los nidos *in situ*, es importante investigar cuál es la proporción de sexos que se produce en dichas condiciones artificiales.

En general, las tortugas sexualmente maduras presentan dimorfismo sexual, con diferencias en el tamaño y la forma del caparazón de hembras y machos. Los machos, en general, son más pequeños que las hembras y tienen una cola muy larga. El gran cuerpo de las hembras es aparentemente una adaptación para contener gran cantidad de huevos (Going et al., 1978). En la

tortuga laúd parece no haber un dimorfismo sexual muy marcado, aunque los machos son fácilmente reconocibles por tener una cola más larga que las hembras; el contorno de los machos está ligeramente deprimido, el plastron cóncavo, la cadera estrecha y el osteodermo terminal de cada quilla ventral forma una fuerte protuberancia que probablemente ayuda en la conservación de la posición sobre la hembra durante la cópula (Pritchard, 1971).

En especímenes juveniles y crías de tortugas marinas, las características sexuales secundarias aún no están desarrolladas. En los neonatos no hay características morfológicas externas que permitan distinguir a las hembras de los machos (Vogt y Flores-Villela, 1986), por lo que para conocer el sexo es necesario realizar estudios anatómicos e histológicos de las gónadas. Existen dos técnicas básicas para el sexado de crías que dependen del procesamiento de las gónadas:

a) La técnica histológica que consiste en la obtención de cortes histológicos de las gónadas y su observación al microscopio. La aplicación de distintas técnicas de tinción permite interpretar las estructuras por medio del análisis de su reacción específica a los diferentes colorantes. Por ejemplo, con la combinación de colorantes básicos y ácidos como la Hematoxilina-Eosina, las estructuras basófilas como el núcleo toman color azul intenso o púrpura y las estructuras acidófilas como diversas sustancias citoplásmicas e intercelulares se tiñen de color rosa. En la reacción de Schiff, el ácido peryódico produce aldehídos insolubles al oxidar ciertos polisacáridos, que al reaccionar con el reactivo de Schiff, dan un color rosa intenso.

b) El aclaramiento total de la gónada mediante glicerina (Van Der Heiden et al., 1985). Esta técnica resulta más sencilla y barata que la histológica, pero existen dudas sobre la exactitud del sexado así obtenido (Mrosofsky y Benabib, 1990).

En estudios realizados por medio de la técnica histológica en crías de *C. caretta*, Yntema y Mrosofsky (1980), observaron un epitelio germinal conspicuo formando la superficie exterior del ovario, el cual formaba pequeñas extensiones dentro de la médula. El epitelio estaba separado de la gónada por una evidente túnica albugínea que se teñía profusamente con la técnica de PAS, y en la médula persistían algunas veces pequeños cordones primarios. En los testículos, el epitelio germinal era más delgado y pudo detectarse bajo éste una delgada túnica albugínea; los cordones primarios formaban túbulos seminíferos inmaduros con el diámetro de dos a cuatro veces mayor que los cordones primarios de las hembras, y estos cordones estaban rodeados por un estroma de fibras. Macroscópicamente, las gónadas femeninas presentaban una superficie marcada con pliegues. En los testículos, la superficie era lisa y los cordones primarios presentaban una disposición sinuosa e irregular. Otros estudios histológicos de las gónadas de crías de *C. caretta* (Yntema y Mrosofsky, 1980; Mrosofsky y Benabib, 1990), *C. mydas* (Miller y Limpus, 1981; Morreale et al., 1982; Mrosofsky, 1982; Whitmore et al., 1985), *L. olivacea* (Mohanty-Hejmadi y Diamond, 1983 y 1986; McCoy et al., 1983; Merchant et al., 1989; Merchant y Villalpando, 1990; Pérez-Gómez y Montellano., 1990), *D. coriacea* (Rimblot et al., 1985; Dutton et al., 1985; Mrosofsky y Benabib, 1990) y *L. kempfi*

(Aguilar, 1987; Wibbels et al., 1989)), encontraron características similares que diferenciaban las gónadas femeninas de las masculinas.

Utilizando la técnica histológica, Miller y Limpus (1981) describieron las gónadas femeninas de *C. mydas* con una médula densa, sin túbulos y el córtex con epitelio columnar y células germinales visibles. Las gónadas masculinas presentaban una médula con cordones en contacto con el epitelio. Las gónadas clasificadas como intersexos fueron de 2 tipos: unas que tenían una médula densa, sin cordones y con córtex degenerado, y otras con médula tubular, aunque los túbulos no estaban en contacto con el epitelio y el córtex estaba parcialmente desarrollado.

En trabajos histológicos realizados con crías de *D. coriacea*, Rimblot et al. (1985) describieron a las gónadas femeninas con una superficie epitelial pseudoestratificada que contenía células germinales, algunas veces formando grupos, pero no muy numerosos, y con cordones epiteliales no muy abundantes, algunos contribuyendo a formar lagunas. En las gónadas masculinas, la superficie estaba cubierta por una delgada capa de células epiteliales, con algunas células germinales visibles donde el epitelio germinal había entrado en regresión, con una médula voluminosa y muy densa, compuesta por muchos cordones epiteliales y algunos cordones que encerraban células germinales. Macroscópicamente, describieron a las gónadas femeninas como delgadas y lisas, de 12-13 mm de largo y 0.6-0.75 mm de ancho, mientras que a las gónadas masculinas como relativamente grandes (gruesas) de 10-12 mm de largo y de 1.2-1.4 mm de ancho, y de superficie irregular con estrías

transversales.

Dutton et al. (1985) realizaron estudios con crías de *D. coriacea* y describieron tres tipos de gónadas: 1) las gónadas femeninas, con un epitelio germinal compuesto por varias capas de células cuboidales extendidas alrededor de toda la gónada y claramente separado de la médula por una túnica albugínea teñida profusamente por la técnica de tinción PAS, y la presencia de células germinales claramente visibles en el epitelio; 2) las gónadas masculinas, con un epitelio delgado y sin túnica albugínea que lo separe de forma evidente de la médula, con cordones seminíferos inmaduros distribuidos homogéneamente en la médula, y 3) las gónadas indeterminadas. Esta categoría incluyó a especímenes que presentaron un epitelio germinal formado por una delgada capa de células cuboidales que no se extendían alrededor de toda la gónada, y con algunas células germinales, con la túnica albugínea evidente en algunos lugares y la médula de algunas de estas gónadas con obvios cordones seminíferos inmaduros.

Whitmore et al. (1985) sexaron crías de *C. mydas*, de acuerdo con las características morfológicas de las gónadas, y compararon sus observaciones con las características histológicas ya descritas por otros autores. Clasificaron como gónadas femeninas aquellas que presentaban un color amarillento, eran delgadas y con una superficie lisa; las gónadas masculinas fueron de color blanco con un extremo de la gónada grueso y el otro extremo terminando en punta.

En cuanto a los estudios de aclaramiento con glicerina realizados en crías de tortugas marinas, se encuentran los de

Van Der Heiden et al. (1985) con *L. olivacea* y *C. mydas* (juvenil), Benabib (1984) con *D. coriacea*, Silva (1986) con *L. olivacea* y Aguilar (1987) con *L. kempfi*, los cuales consistieron en la observación de las gónadas previamente transparentadas al microscopio estereoscópico, en las que se observaron las características de la superficie de la gónada y la presencia o ausencia de estructuras internas para clasificarlas como uno u otro sexo. Van Der Heiden et al. (1985) consideraron que las gónadas femeninas eran aquellas que presentaban una superficie con pliegues en los bordes laterales que envuelven el epitelio germinal. La parte media de la gónada, donde estaba conectada al riñón por medio del mesovario (hileo), era menos opaca que las partes laterales. Por fuera no se reconoció ningún detalle de las estructuras internas. Por el contrario, las gónadas clasificadas como masculinas mostraron, sobre todo, gránulos correspondientes a los numerosos cordones seminíferos y la superficie de la gónada era relativamente lisa.

Benabib (1984), usó la técnica de aclaramiento con glicerina en crías de *D. coriacea* y distinguió los sexos usando las siguientes características: las gónadas femeninas se observaron totalmente transparentes y sin coloración; en las gónadas masculinas, se observaron claramente estructuras tubulares que interpretó como túbulos seminíferos coloreados en rojo o café. Posteriormente reinterpretó estas estructuras como los vasos sanguíneos que aparecen en las gónadas masculinas antes de la aparición de los túbulos seminíferos (Benabib, M., com. pers.). Otro tipo de gónadas, clasificadas como intersexos, fueron aquellas en las que se observaron tanto zonas totalmente

transparentadas, como zonas con estructuras tubulares compactas y/o zonas con estructuras tubulares distribuídas muy laxamente.

Mrosovsky y Benabib (1990), usaron las técnicas de aclaramiento gonadal e histología en crías de *C. caretta* y *D. coriacea*, tomando en cuenta las características descritas por cada uno de ellos. Encontraron diferencias al sexar a las crías con ambas técnicas, y especularon que los métodos de fijación y disección afectaron la técnica de aclaramiento con glicerina. Aparentemente, la disección del tejido antes de la fijación producía una total transparentación de la gónada mientras que la fijación de la cría completa antes de la disección preservaba el color rojizo de las estructuras internas de la gónada masculina. Por ello consideraron la necesidad de realizar estudios adicionales que exploraran la influencia de los métodos de fijación y disección. De acuerdo con los resultados obtenidos, sugirieron que es preferible el uso de la técnica histológica.

Debido a la gran diversidad de criterios que diferentes autores han tomado en cuenta para sexar las gónadas de crías de tortugas marinas, se consideró importante comparar ambas técnicas: histología y aclaramiento por glicerina, en gónadas de un mismo individuo de la tortuga laúd. Debido a que existen dudas acerca de la exactitud del sexado por medio del aclaramiento por glicerina, es de interés saber si esta técnica es recomendable para sexar gónadas de crías de la tortuga laúd.

2. OBJETIVOS

1.- Describir la estructura histológica de las gónadas de crías recién eclosionadas de la tortuga laúd *Dermochelys coriacea*.

2.- Identificar el sexo de crías de la tortuga laúd por medio de la técnica histológica y por aclaramiento con glicerina.

3.- Comparar ambas técnicas de sexado.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo de campo se llevó al cabo en el playón de Mexiquillo, el cual pertenece al municipio de Aguila. El poblado más cercano es Caleta de Campos, que pertenece al municipio de Lázaro Cárdenas, Michoacán.

El playón de Mexiquillo se encuentra a 80 km de la Ciudad de Lázaro Cárdenas. Tiene una longitud de 18 km comprendidos entre las salientes rocosas denominadas "La Punta" y "La Manzanilla", y está localizado entre la Sierra Madre del Sur y el Océano Pacífico, entre los paralelos $102^{\circ}48'31''$, $102^{\circ}58'25''$ longitud oeste y los $18^{\circ}05'34''$, $18^{\circ}10'25''$ latitud norte. El área de trabajo comprendió aproximadamente 6.6 km, desde la zona suroeste denominada "La Punta", hasta el estero de "La Majahua" hacia el noroeste (fig. 1).

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

La zona sur de la costa del estado de Michoacán presenta numerosas corrientes fluviales superficiales, las cuales desembocan en el Océano Pacífico. El principal río es el Balsas que delimita a los estados de Michoacán y Guerrero. Existen además una serie de ríos de temporal siendo los más importantes: Chuta, Mexcalhuacán, Nexpa, Tupitina y la Manzanilla. La fisonomía de la playa cambia constantemente a través de la temporada de anidación por efecto de las mareas.

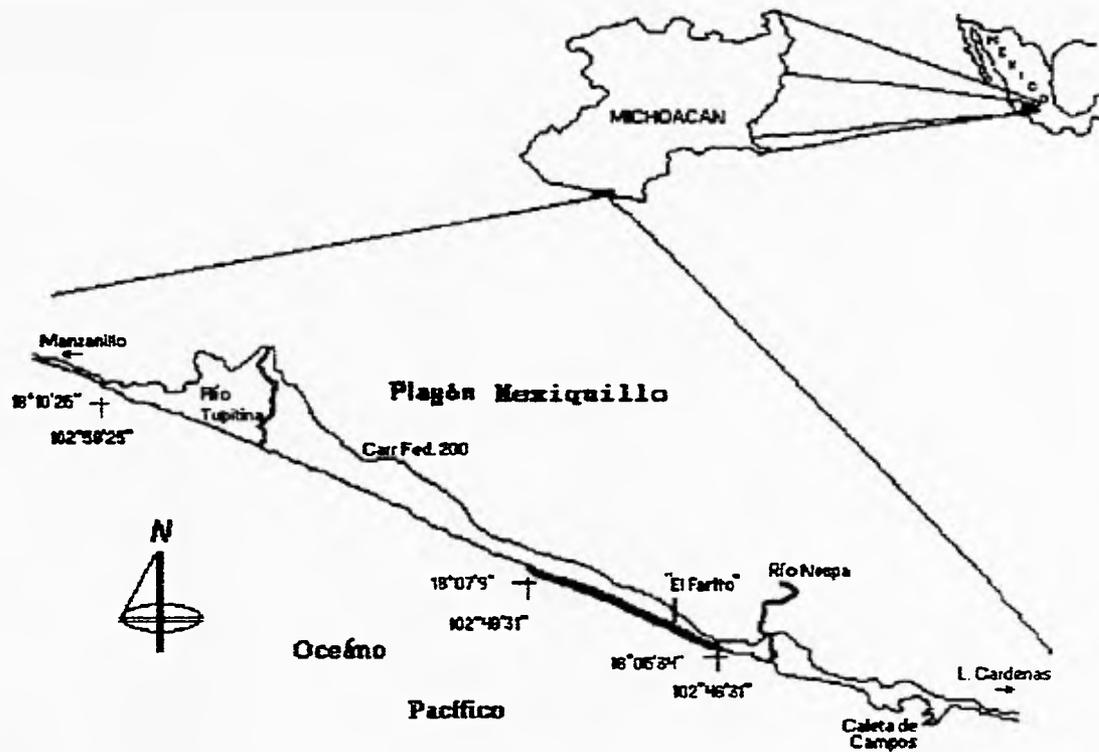


Fig 1. Área de estudio

4. MÉTODOS

Durante el periodo de anidación de la tortuga laúd (octubre a febrero) de la temporada 1992-1993, se realizaron recorridos nocturnos a lo largo de la playa para localizar a las hembras anidando. Los huevos fueron colectados en bolsas de plástico y trasladados al campamento para su siembra, ya sea en un corral o vivero, a una profundidad de 80 cm, o en cajas de poliuretano. En las cajas de poliuretano se colocaba una capa de arena, y encima, los huevos acomodados a manera de pirámide, evitando que estuvieran en contacto con las paredes de la caja, y después se cubrían de arena húmeda compactada suavemente. Las cajas fueron colocadas en un cobertizo (cámara de incubación) con techo de palma para protegerlas de los cambios ambientales.

Una vez nacidas, se tomaron 55 crías al azar, de 21 nidos, 13 del vivero (36 crías) y 8 de las cajas (19 crías). Las crías fueron sacrificadas inyectándoles 0.1 ml de pentobarbital sódico (Anestesal) en la médula espinal, entre las vertebrae de la región cervical. Posteriormente fueron fijadas con formol al 10% en amortiguador fosfato 1 M y trasladadas al Laboratorio de Tortugas Marinas de la Facultad de Ciencias. Ahí se midió con un vernier el largo y el ancho de las gónadas de sólo 26 crías, ya que al estar realizando las disecciones se empezaron a observar diferencias en el tamaño y la forma de las gónadas, por lo que se decidió medir las últimas muestras, para conocer el tamaño promedio de las gónadas así como la forma de estas. Se extrajeron las dos gónadas de cada cría y cada una fue sujeta

a uno de los siguientes procedimientos:

A) Una gónada fué procesada por medio de la técnica histológica con inclusión en parafina y cortada con microtomo en secciones de 6-7 μm de grosor aproximadamente, aplicándoles dos tinciones: hematoxilina-eosina y PAS+ (ver anexo 1).

B) La otra gónada fué aclarada con glicerina según la técnica descrita por Van Der Heiden et al. (1985), con una solución de glicerina al 5%, en formol al 4% con amortiguador fosfato 1 M (ver anexo 2).

Las observaciones para el sexado de las gónadas aclaradas con glicerina se hicieron con un microscopio estereoscópico, mientras que las observaciones con la técnica histológica se hicieron con un microscopio de transmisión de luz.

Las características histológicas tomadas en cuenta para el sexado de las gónadas fueron las mencionadas por Yntema y Mrosovsky (1980), Dutton et al. (1985), Rimblot et al. (1985) y Merchant et al. (1989). Las características tomadas en cuenta en la técnica de aclaramiento fueron las descritas por Benabib (1984), Van Der Heiden et al. (1985) y Rimblot et al. (1985).

En los cortes histológicos se midieron los diámetros mayor y menor (ancho y alto respectivamente) de las gónadas ya sexadas usando un ocular con reglilla, para valorar si existían diferencias significativas en el tamaño de las gónadas femeninas con respecto a las masculinas. Se compararon las técnicas, histológica y de aclaramiento, para ver si coincidía el sexo identificado por cada técnica. Todas las pruebas estadísticas se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$.

La técnica histológica por inclusión en parafina se llevó

al cabo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal y en el Laboratorio de Tortugas Marinas de la Facultad de Ciencias, y el aclaramiento por glicerina se realizó en el Centro de Ecología de la UNAM.

Con el fin de conocer la relación entre la temperatura de incubación y la proporción sexual de las crías muestreadas con las dos técnicas de incubación empleadas (cajas de poliuretano y vivero), se tomaron datos de la temperatura de incubación de los huevos, utilizando termopares y un teletermómetro. Se realizó un muestreo de 48 horas para señalar las horas de mayor fluctuación, determinando que las horas para registrar la temperatura serían las 0600, 1400 y 2200 horas, ya que son las horas durante las que se registran las temperaturas máximas y mínimas del día. Las temperaturas fueron tomadas a una profundidad de 80 cm en el vivero, así como de la arena de las cajas. Por último, se analizaron las temperaturas registradas durante la incubación de los huevos. Se obtuvieron las temperaturas promedio del periodo de incubación así como del segundo tercio del desarrollo embrionario de los huevos de cada nido muestreado del vivero y de las cajas.

5. RESULTADOS

Durante el procesamiento con la técnica histológica (durante la disección de las gónadas y al momento de cortar con el microtomo), se perdieron 4 gónadas de las crías nacidas en cajas y una del vivero, sexándose un total de 51 gónadas (Cuadro 1). Por medio de la técnica de aclaramiento con glicerina se sexó un total de 53 gónadas, perdiéndose 2 gónadas de crías del vivero durante la disección (Cuadro 2).

Cuadro 1. RESULTADOS DEL SEXADO (TÉCNICA HISTOLÓGICA).

Técnica de siembra	# de nidos	Gónadas femeninas	Gónadas masculinas	Ovotestis	Total
vivero	13	32	1	2	35
cajas	7	2	12	2	16
Total	20	34	13	4	51

Cuadro 2. RESULTADOS DEL SEXADO (ACLARAMIENTO CON GLICERINA).

Técnica de siembra	# de nidos	Gónadas femeninas	Gónadas masculinas	Ovotestis	Total
vivero	13	20	10	5	35
cajas	8	16	2	0	18
Total	21	36	12	5	53

Las observaciones macroscópicas de las gónadas durante la disección mostraron básicamente 4 grupos con diferentes características: 1) gónadas largas, delgadas y de superficie lisa; 2) gónadas largas, anchas y de superficie estriada; 3) gónadas cortas, anchas y de superficie estriada, y 4) gónadas con la combinación de las características mencionadas, por ejemplo, gónadas con un lado estriado y el otro lado liso, anchas y cortas; gónadas con un extremo estriado y el otro extremo liso o con zonas estriadas y zonas lisas. La longitud promedio de las gónadas fue de $12.56 \text{ mm} \pm 1.6$ ($n=26$) y el ancho promedio de $1.5 \text{ mm} \pm 0.2$ ($n=26$), (Fig. 2).



Fig 2. Gónadas de crías recién eclosionadas, mostrando las diferencias básicas encontradas al momento de la disección. A) Gónada delgada de superficie lisa B) Gónada gruesa y de superficie estriada. Mesonefros (Ms). Gónada (G)

5.1 Técnica histológica

En las gónadas clasificadas como femeninas, la superficie externa mostró un epitelio germinal conspicuo de aproximadamente $31.2\mu\text{m}$ de altura en promedio, de tipo cilíndrico pseudoestratificado (Fig. 3, 4 y 5), que en algunas gónadas se extendía ligeramente hacia adentro de la médula (Fig. 5). Las células epiteliales se apoyaban en la membrana basal, pero no todas llegaban hasta la superficie libre. Las células que alcanzaban la superficie eran de tipo cilíndrico y entre ellas se encontraban células de forma irregular, más bajas y anchas; el núcleo se encontraba en la parte más ancha de ambos tipos celulares. La superficie epitelial contenía células germinales de forma esférica o elíptica con un diámetro promedio de $21.5\mu\text{m}$ (diámetro mayor) (Fig. 3, 4 y 5), con sus núcleos de $8.04\mu\text{m}$ de diámetro promedio, también esféricos o elípticos y con granulaciones. En ocasiones se observaron nucléolos. El epitelio estaba separado de la médula por una evidente túnica albugínea compuesta por fibras de colágena ricas en mucopolisacáridos PAS+ (Fig. 5). En 23 gónadas se observaron cordones sexuales primarios, también llamados cordones medulares en fragmentación (Merchant *com. pers.*; Fig. 3 y 5).

Las gónadas clasificadas como masculinas presentaron un epitelio germinal formado por una delgada capa de células (Fig. 6). Algunas veces las células germinales fueron evidentes, y en algunas gónadas se observó una túnica albugínea muy delgada bajo el epitelio. La médula era voluminosa y muy densa, y los cordones seminíferos inmaduros, mencionados por varios autores en sus descripciones histológicas, no se observaron en ningún

caso (fig. 6).

Las gónadas menos diferenciadas, presentaron características de ambos sexos en diferentes combinaciones: unas gónadas con un epitelio germinal conspicuo, con células germinales y evidente túnica albugínea, así como una médula voluminosa con un mayor grado de desarrollo de los cordones seminíferos inmaduros (Fig. 7); otras gónadas presentaron en algunas regiones un epitelio pseudoestratificado y en otras un epitelio simple. De los ovotestis obtenidos, uno mostró un grado de desarrollo muy avanzado hacia testículo, ya que se observó la formación de cordones con espermatogonias, así como el desarrollo del epitelio con células germinales y evidente túnica albugínea (Fig. 8 y 9).

Debido a que en las crías recién eclosionadas de *D. coriacea* las gónadas están menos diferenciadas en comparación con otras tortugas, se sugiere referirse a las gónadas aparentemente femeninas u ovarios como **pseudo-ovarios**, a las gónadas masculinas o testículos como **pseudo-testículos** y a los intersexos o indeterminadas como **ovotestis**.



Fig. 3

Fig. 4

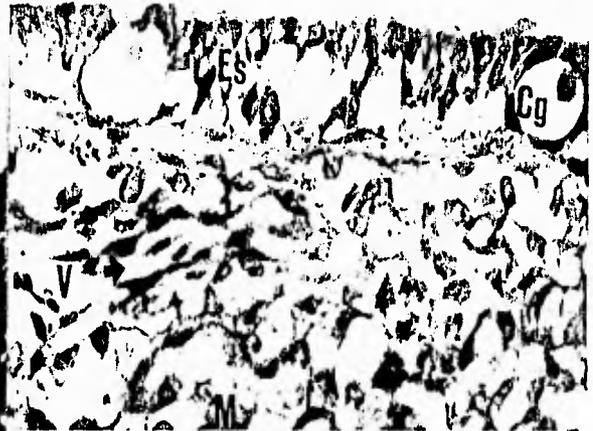


Fig 3. Corte transversal de una gónada clasificada como femenina. Gónada (G). Epitelio pseudoestratificado (Es). Células germinales (Cg). Túnica albugínea (Ta). Médula (M). Vasos sanguíneos (V). Hileo (H). Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina. 200 X.

Fig 4. Acercamiento del epitelio donde se observa que las células cilíndricas alcanzan la superficie libre y entre ellas, células pequeñas y anchas. Epitelio pseudoestratificado (Es). Células germinales (Cg). Médula (M). Vaso sanguíneo (V). Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina. 500 X.



Fig 5. La gónada femenina muestra la túnica albugínea (Ta) resaltada por el reactivo de Schiff, así como la formación de cordones sexuales primarios (Cs). Epitelio pseudoestratificado (Es). Médula (M). Extensiones del epitelio (Ep). Células germinales (Cg). Vasos sanguíneos (V). Hileo (H). Mesonefros (Ms). Técnica de tinción PAS. 200 X.

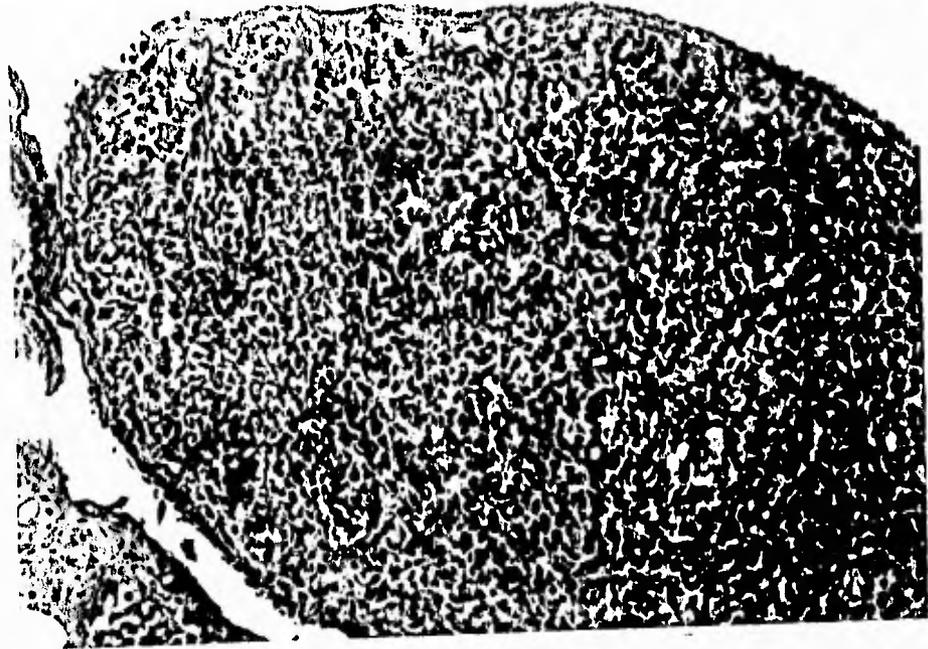


Fig 6. Corte transversal de una gónada clasificada como masculina, donde se muestra el desarrollo de la médula (M) y la delgada capa de células que forman el epitelio (E). Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina. 200 X.



Fig 7. Típicas ovotestis que muestran el desarrollo de un epitelio (E) con células germinales (Cg) y el desarrollo de cordones sexuales (futuros túbulos seminíferos; Cs), médula (M). Técnicas de tinción: A. Hematoxilina-Eosina; B. PAS. 200 X.

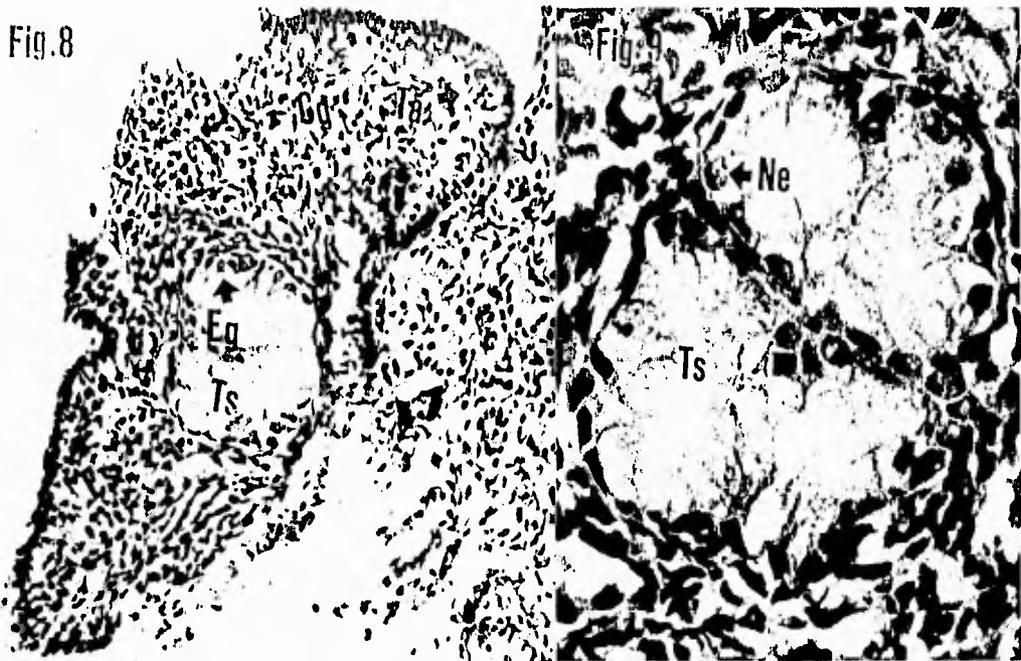


Fig 8. Ovotestis que muestra el desarrollo tanto del epitelio como de los túbulos seminíferos (Ts) con espermatogonias (Eg), células germinales (Cg), y túnica albugínea (Ta). Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina. 200 X

Fig 9. Acercamiento de los túbulos seminíferos (Ts) en donde se aprecian los núcleos de los espermatogonios (Ne). Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina. 500 X.

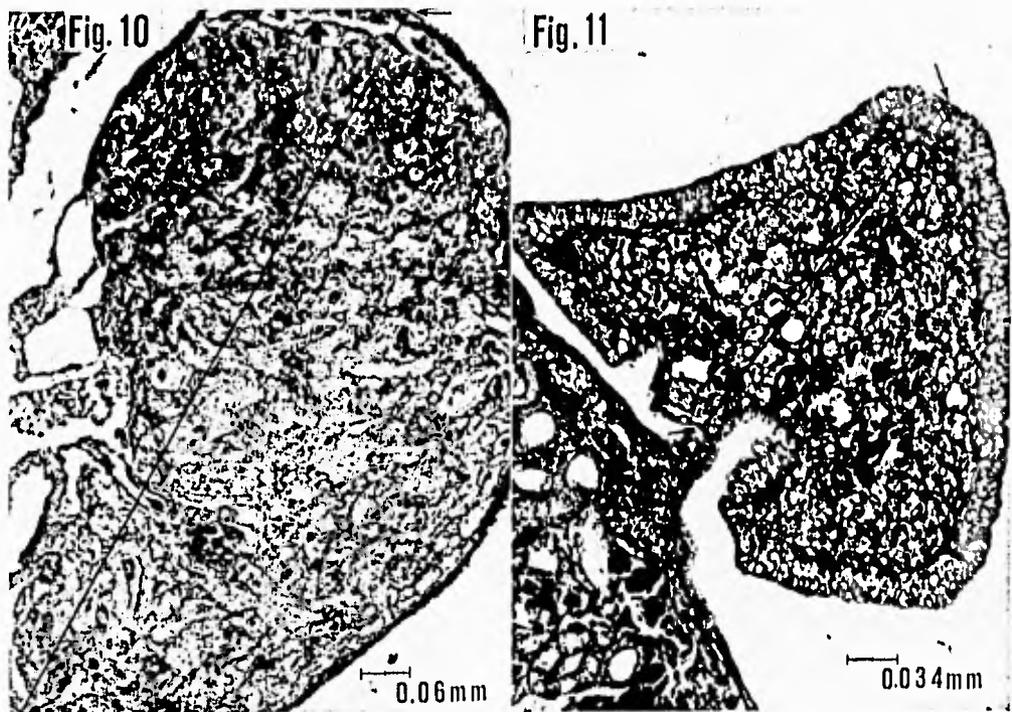


Fig 10. La gónada masculina muestra la vascularización periférica (V), y un tamaño mayor que el de la gónada femenina. PAS. 200 X.

Fig 11. La gónada femenina muestra vascularización central (V) y el tamaño de la gónada es menor con relación a la masculina. PAS. 200 X.

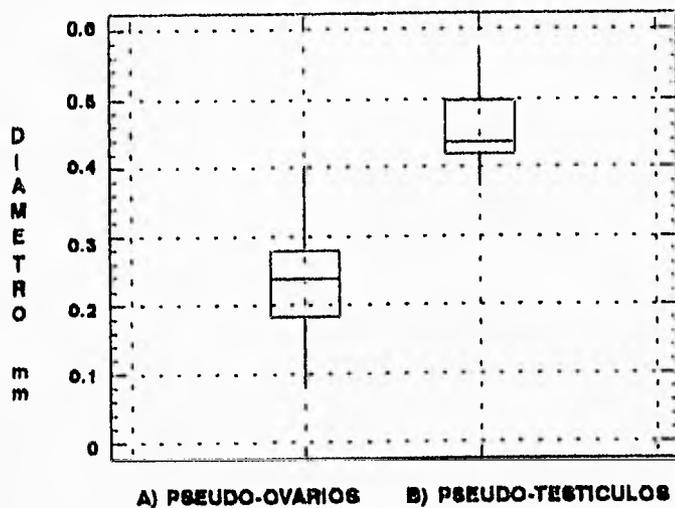
Durante las observaciones microscópicas se apreció que la vascularización de las gónadas fue también una característica que mostró diferencias entre las gónadas observadas: el calibre y número de los vasos sanguíneos fue variable, así como su distribución; fueron más numerosos, y de mayor calibre en la periferia en las gónadas masculinas, y en la región central en las gónadas femeninas (Fig. 10 y 11).

Los cortes histológicos de los pseudo-testículos y los pseudo-ovarios presentaron diferencias en el tamaño de la gónada. Para comprobar si existían diferencias significativas entre los tamaños de las gónadas, se realizó una prueba de *t* con las medidas obtenidas de los cortes histológicos (cuadro 3). Se encontró que las gónadas masculinas eran significativamente más anchas $t=-3.59$, $p<0.01$ y más altas $t=-6.48$, $p<0.01$ (diámetro mayor y menor respectivamente) que las gónadas femeninas (Fig. 10, 11 y 12).

Cuadro 3. **DIÁMETROS DE LOS PSEUDO-TESTICULOS Y
LOS PSEUDO-OVARIOS.**

	Altura promedio mm.	Desviación Estandar.	Ancho promedio mm.	Desviación Estandar.	n
Pseudo-testículo	0.436	0.062	0.889	0.307	7
Pseudo-ovario	0.239	0.081	0.624	0.176	18

ALTURA PROMEDIO DE LOS PSEUDO-OVARIOS Y LOS PSEUDO-TESTICULOS



ANCHO PROMEDIO DE LOS PSEUDO-OVARIOS Y LOS PSEUDO-TESTICULOS

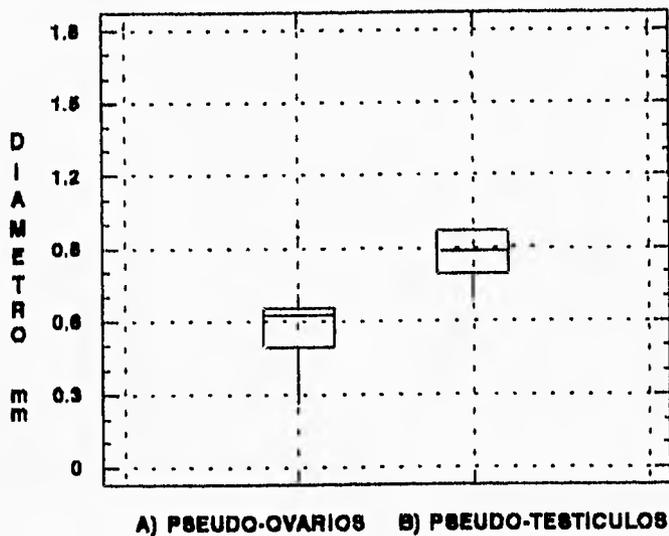


Fig 12. El diagrama de caja muestra los diámetros mayor y menor (ancho y alto respectivamente) de las gónadas y dónde se encuentra el mayor número de datos (la línea horizontal que divide la caja es la mediana de los datos). Podemos observar que los diámetros de los pseudo-testículos (B) son mayores que los pseudo-ovarios (A).

5.2 Técnica de aclaramiento con glicerina

Para identificar el sexo de las gónadas, las características tomadas en cuenta por medio de la técnica de aclaramiento con glicerina, fueron: 1) gónadas femeninas con una total transparentación de la gónada sin estructuras internas evidentes (Fig. 13), 2) gónadas masculinas, con estructuras tubulares internas (Fig. 14), interpretadas como los túbulos seminíferos por Van Der Heiden *et al.* (1985) y por Benabib (1984), de acuerdo con las observaciones de las gónadas aclaradas y los cortes histológicos. Estas estructuras fueron reinterpretadas como los vasos sanguíneos que aparecen en las gónadas masculinas previamente a la aparición de los túbulos seminíferos (Benabib, M., *com. pers.*), y 3) ovotestis, con la combinación de ambas características, presentando tanto zonas totalmente transparentes, como zonas con estructuras tubulares compactas y zonas con estructuras tubulares distribuídas muy laxamente (Fig. 15).



Fig 13. Gónada totalmente transparentada clasificada como femenina. Técnica de sexado: Aclaramiento con glicerina.



Fig 14. Gónada con estructuras internas clasificada como masculina. Técnica de sexado Aclaramiento con glicerina.

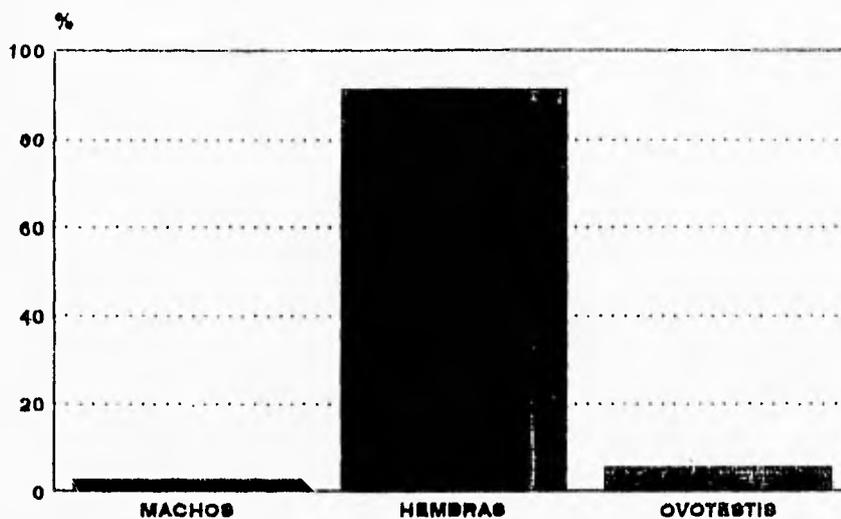


Fig 15. Gónada con zonas transparentes y zonas vascularizadas, clasificada como ovotestis. Técnica de sexado: Aclaramiento con glicerina.

5.3 Temperatura y proporción sexual

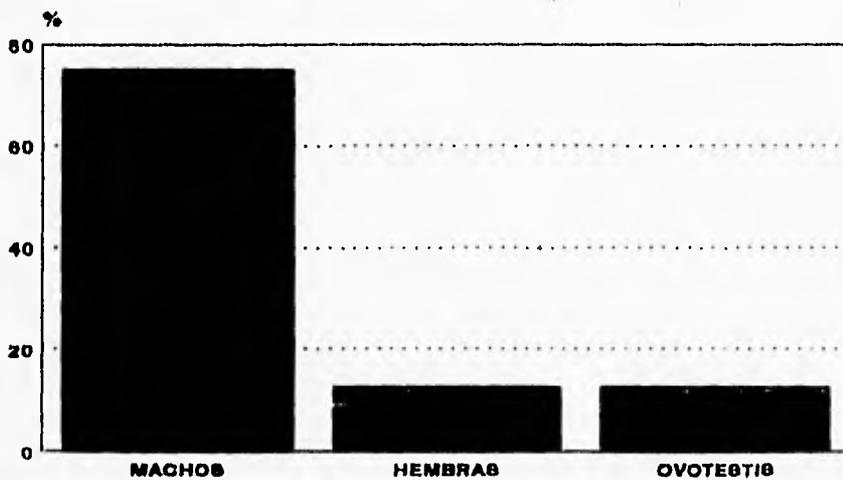
De acuerdo con los análisis de las temperaturas registradas, obtuvimos una temperatura promedio para los nidos (n=13) incubados en el vivero de $30.16^{\circ}\text{C} \pm 0.19$, con una máxima promedio de 30.54°C y una mínima promedio de 29.95°C . Durante el segundo tercio del desarrollo embrionario, el cual es el periodo crítico para la determinación del sexo, se obtuvo una temperatura promedio de $30.02^{\circ}\text{C} \pm 0.25$ con una máxima promedio de 30.4°C y una mínima promedio de 29.74°C , y la proporción sexual obtenida mediante esta técnica de incubación fue de 2.68% machos, 91.43% de hembras y 5.71% de ovotestis (1:32:2), observándose un claro sesgo hacia hembras (ver cuadro 1 y Fig. 16 A). Por otro lado, la temperatura promedio en los nidos sembrados en cajas de poliuretano (n=7), fue de $26.8^{\circ}\text{C} \pm 0.90$ con una máxima promedio de 28.38°C y una mínima promedio de 25.97°C . Durante el segundo tercio del desarrollo, la temperatura promedio fue de $26.19^{\circ}\text{C} \pm 0.78$ con una máxima promedio de 27.53°C y una mínima promedio de 25.4°C . La proporción sexual de las crías recién nacidas en cajas fue de 75% de machos, 12.5% de hembras y 12.5% de ovotestis (6:1:1), observándose un claro sesgo hacia machos (ver cuadro 1 y Fig. 16 B). Las proporciones sexuales analizadas en estos resultados fueron los obtenidos mediante la técnica histológica. Por otro lado, no se hizo un análisis de la temperatura promedio de cada nido, que se pudiera comparar con la proporción sexual obtenida, debido a que el número de crías obtenido de cada nido fue muy pequeño, por lo que no se pudieron calcular las proporciones sexuales con un nivel de confianza adecuado.

PROPORCION SEXUAL NIDOS EN VIVERO



A

PROPORCION SEXUAL NIDOS EN CAJA



B

Fig 16. Proporción sexual obtenida en las dos técnicas de incubación A) vivero. B) cajas.

5.4 Comparación de las técnicas.

Por medio de la técnica histológica, 34 gónadas se clasificaron como pseudo-ovarios (66.7%), 13 como pseudo-testículos (25.5%) y 4 como ovotestis (7.8%), mientras que por medio de la técnica de aclaramiento, 36 se clasificaron como pseudo-ovarios (67.9 %), 12 como pseudo-testículos (22.6%) y 5 como ovotestis (9.4%). (Cuadros 1, 2 y 4).

**Cuadro 4. RESULTADOS DEL SEXADO DE CRÍAS DE TORTUGA LAÚD
HISTOLOGÍA vs ACLARAMIENTO**

TÉCNICA DE SEXADO			TÉCNICA DE SEXADO		
MUESTRA	HISTOLOGIA	ACLARAMIENTO	MUESTRA	HISTOLOGIA	ACLARAMIENTO
NV-16/C-1	♀	♀	NV-100/C-1	♀	♀
C-2	♀	♀	C-2	♀	♀
C-3	♀	♀-♂			
NV-22/C-1	♀	♀-♂	NV-110/C-1	♀	♂
C-2	♀	♂	C-2	♀	♂
C-3	♀	♂	C-3	♀	♂
NV-26/C-1	♀	♀	NC-38/C-1	♀	♀
			C-2	♀	♂
			C-3	♀	♀
NV-27/C-1	♀	♂	NC-50/C-1	-	♀
C-2	♀	♀	C-2	-	♀
C-3	♀	♀	C-3	-	♀
NV-33/C-1	♀-♂	♀	NC-53/C-1	♂	♀
C-2	♀-♂	♀			
C-3	♂	♀			
NV-47/C-1	♀	♀	NC-56/C-1	♂	♀
C-2	♀	♀-♂	C-2	♂	♀
C-3	♀	♂	C-3	♂	♂
NV-50/C-1	♀	-	NC-71/C-1	♂	♀
C-2	♀	-			
C-3	♀	♀			
C-4	♀	♂			
NV-54/C-1	♀	♀	NC-77/C-1	♂	♀
C-2	-	♀	C-2	♂	♀
C-3	♀	♀	C-3	♂	♀
NV-60/C-1	♀	♀	NC-111/C-1	♀-♂	♀
C-2	♀	♀	C-2	♂	♂
NV-63/C-1	♀	♀	NC-115/C-1	♀	♀
C-2	♀	♂	C-2	♀-♂	♀
C-3	♀	♀-♂	C-3	♀	♀
NV-71/C-1	♀	♀			
C-2	♀	♀-♂			
C-3	♀	♀			

NV = # de nido del vivero. NC = # de nido de caja. C = # de cría
♀ = pseudo-ovario ♂ = pseudo-testículo ♀-♂ = ovotestis

Aunque el porcentaje de pseudo-ovarios y de pseudo-testículos obtenidos con cada técnica sea similar, esto no indica que el sexado de una técnica coincida con el de la otra. De los doce pseudo-testículos obtenidos por medio de la técnica de aclaramiento, sólo tres coincidieron con el sexado de la técnica histológica y las otras nueve gónadas resultaron ser pseudo-ovarios con una gran vascularización evidenciada en los cortes histológicos.

De un total de 49 individuos en los que pudimos comparar una gónada con la otra, en 28 (57.14%) individuos diferentes el sexo de una gónada no coincidió con el de la otra, encontrándose entre éstas a las ovotestis en las que el sexado usando diferentes técnicas no coincidió. Por otro lado 18 pseudo-ovarios (36.74%) y 3 pseudo-testículos (6.12%) sí coincidieron en el sexado (cuadros 5 y 6).

Cuadro. 5 **PORCENTAJE DE CONCORDANCIA EN EL SEXADO
UTILIZANDO LAS DOS TECNICAS**

Pseudo-ovario	Pseudo-testículo	Ovotestis	Total
36.74%	6.12%	0%	42.86%

Para tratar de sacar un patrón común entre las características internas y externas del sexado de las gónadas aclaradas, y comparar los resultados obtenidos utilizando los criterios de Van Der Heiden et al. (1985), con los criterios de Rimblot et al. (1985), observamos lo siguiente: si tomamos en cuenta el criterio de Van Der Heiden et al. (1985) en el que las

gónadas transparentes sin estructuras tubulares fueron femeninas y lo comparamos con el criterio de Rimblot et al. (1985), en el cual las gónadas femeninas fueron delgadas y lisas, tenemos que ocho gónadas presentan tanto las características mencionadas por uno como por otro autor; por otro lado si comparamos el criterio de Van Der Heiden et al. (1985), en el que las gónadas masculinas presentaron estructuras tubulares internas y las comparamos con el criterio de Rimblot et al. (1985), en el cual las gónadas masculinas fueron gruesas y estriadas, tenemos que sólo una presentó ambas características. Ahora, considerando sólo el criterio de Van Der Heiden et al. (1985), tenemos que sólo una gonada fue estriada y totalmente transparente sin estructuras tubulares (femenina), y también sólo una gónada fue lisa y presentó estructuras tubulares (masculina). De acuerdo con los criterio de Rimblot et al. (1985), ocho gónadas fueron delgadas y lisas (femenina) y solamente una fue gruesa y estriada (masculina). Las gónadas aclaradas no presentaron un patron común, ni en uno ni en otro sexo, en cuanto a sus características internas y/o externas que se pudiera relacionar con el sexado de la técnica histológica. No es posible decir que características internas y externas se podrían tomar en cuenta para sexar las gónadas por medio de la técnica de aclaramiento. En el cuadro 6, se muestran las características internas y externas observadas en las 21 gónadas aclaradas, que sí coincidieron con el sexado de la técnica histológica. Como ya se mencionó anteriormente, la principal característica tomada en cuenta para determinar el sexo de las gónadas aclaradas, fue la presencia y/o ausencia de las estructuras internas. Debido

a que las características externas presentaron formas tan variadas, no se consideraron para sexar a las gónadas.

Cuadro. 6 **CONCORDANCIA DEL SEXADO**

Características observadas en las gónadas aclaradas con glicerina de las 21 crías en las que hubo concordancia en la identificación del sexo tanto usando histología como la técnica de glicerina.

Muestra	sexo	Características externas	Características internas
NV-16/C-1	♀	delgada y lisa	transparente
NV-16/C-2	♀	delgada y lisa	transparente, conductillos tenues y finos (pocos)
NV-26/C-1	♀	delgada y lisa	transparente, conductillos finos (pocos)
NV-27/C-2	♀	delgada y lisa	transparente
NV-27/C-3	♀	delgada y lisa	transparente, conductillos tenues y finos (pocos)
NV-47/C-1	♀	delgada, poco estriada	transparente
NV-50/C-3	♀	gruesa; con un lado liso y el otro estriado	transparente
NV-54/C-1	♀	delgada y lisa	transparente, conductillos tenues y finos (pocos)
NV-54/C-3	♀	delgada y lisa	transparente
NV-60/C-1	♀	delgada, lado estriado	transparente
NV-60/C-2	♀	delgada, lado poco estriado	transparente, conductillos pocos y finos
NV-63/C-1	♀	delgada	opaca
NV-71/C-1	♀	delgada y lisa	transparente
NV-71/C-3	♀	delgada, extremo estriado	transparente
NV-100/C-1	♀	delgada, lado poco estriado	transparente, parte media donde se conectaba con el riñon fue más transparente
NV-100/C-2	♀	delgada, lado poco estriado	transparente, parte media donde se conectaba con el riñon fue más transparente
NC-38/C-2	♂	medianamente gruesa y de superficie lisa	estructuras tubulares
NC-56/C-3	♂	gruesa y lisa	estructuras tubulares
NC-111/C-2	♂	gruesa y estriada	estructuras tubulares
NC-115/C-1	♀	gruesa y estriada	transparente
NC-115/C-3	♀	medianamente delgada y casi lisa	transparente

6. DISCUSION

6.1 Técnica histológica

Los criterios empleados por diferentes autores, para la identificación del sexo de las gónadas de tortugas marinas usando histología (Yntema y Mrosovsky, 1980; Miller y Limpus, 1981; Morreale et al., 1982; Mrosovsky, 1982; Mohanty-Hejmadi y Diamond, 1983 y 1986; McCoy et al., 1983; Rimblot et al., 1985; Whitmore et al., 1985; Aguilar, 1987; Merchant et al., 1989; Wibbels et al., 1989; Merchant y Villalpando, 1990; Mrosovsky y Benabib, 1990; Pérez-Gómez et al., 1990), coincidieron en general con las características distintivas de cada sexo en las gónadas observadas en este trabajo. Sin embargo, sí encontramos diferencias con otros autores (Dutton et al., 1985) en cuanto a la descripción del tipo de epitelio. Las gónadas femeninas o pseudo-ovarios presentaron un epitelio conspicuo columnar pseudoestratificado de aproximadamente 31.2 μm de altura en promedio, y no un epitelio cúbico estratificado como describen Dutton et al. (1985). La razón por la que se creería que es un epitelio estratificado es que aparentó tener varias capas de células, debido quizás a que los cortes se encontraban inclinados y se observaban los diferentes núcleos de las células que se encontraban atrás. En nuestras observaciones, no todas las células que formaban el epitelio eran cilíndricas, sino que había entre ellas otro tipo de células más pequeñas y que no alcanzaban la superficie libre del epitelio, aparentando tener varias capas de células, de ahí el

nombre de pseudoestratificado. Las células germinales tuvieron un diámetro promedio de 21.5 μ m y tenían forma esférica o elíptica. La túnica albugínea también fue una característica evidente de las gónadas femeninas o pseudo-ovarios. El criterio para el sexado de las gónadas masculinas o pseudo-testículos fue similar al de otros autores: córtex formado por un epitelio simple. Sin embargo, el desarrollo de cordones seminíferos inmaduros, no fue evidente en las gónadas de la tortuga laúd, como se describe en otras especies, debido a que son gónadas muy indiferenciadas, siendo la tortuga laúd la de más lenta diferenciación en comparación con las tortugas golfina y verde (Merchant *com. pers.*). Por otro lado, los criterios tomados en cuenta para identificar a los intersexos u ovotestis fueron similares a los utilizados por Dutton *et al.* (1985), y Miller y Limpus (1981). Resultó muy interesante notar que en esta categoría, la formación de cordones seminíferos inmaduros fue mucho más evidente que en los pseudo-testículos; un curioso caso fue la presencia de cordones seminíferos con espermatogonias, las cuales son células masculinas que formarán espermatozoides. Esto indicó que la gónada sería un testículo, pero se le clasificó como ovotestis debido a que la gónada presentó un epitelio conspicuo y una evidente túnica albugínea que fueron consideradas características femeninas.

El hecho de haber obtenido intersexos u ovotestis es muy interesante y deja mucho que pensar sobre la diferenciación sexual, ya que hay mínimas evidencias de que el efecto de la temperatura de incubación sea permanente (Bull, 1980), y existe la posibilidad de una reversión sexual post-eclosión (Merchant

et al., 1989). En estudios realizados actualmente con crías de la tortuga laúd, muertas en cautiverio entre las 2 y 13 semanas de edad, mostraron que aún persisten intersexos u ovotestis a esta edad (Gámez, datos no publicados). Sin embargo, no se sabe si efectivamente los intersexos u ovotestis desaparecen como tales, y a qué edad sucede esto, por lo que quedan las siguientes preguntas: ¿en qué momento se diferencian estas gónadas?, ¿las gónadas que se están diferenciando hacia uno y otro sexo presentarán reversión sexual post-eclosión por influencia de su ambiente inmediato?. Resulta difícil realizar un estudio con individuos de más de 13 semanas de edad, por las dificultades para mantener en cautiverio a las crías de esta especie y por ser difíciles de observar en el mar. Aún así, sería interesante realizar un estudio con crías mayores de 13 semanas, para ver en qué momento las características distintivas de cada sexo se mantienen de una forma más definitiva.

Otra característica muy evidente, fue el alto grado de vascularización presente en algunas gónadas, observándose en general una vascularización central en los pseudo-ovarios y una vascularización periférica en los pseudo-testículos. Esto no quiere decir que todos los pseudo-testículos tenían sólo vascularización periférica, ya que sí había vasos sanguíneos en la parte medular, pero en las gónadas que presentaron vasos grandes o de mayor calibre, éstos se encontraban en la zona periférica. Como no todas las gónadas tenían muchos vasos sanguíneos de gran calibre, se consideró que esta vascularización fue la que se observó en las gónadas aclaradas y que fueron interpretadas como las estructuras tubulares

internas características de los pseudo-testículos. Para comprobar esto, se compararon las gónadas sexadas de un mismo individuo, confirmando que las estructuras internas observadas en las gónadas aclaradas son vasos sanguíneos. Otro dato interesante observado en los cortes histológicos es que existen diferencias significativas en el diámetro de las gónadas, siendo más grandes los pseudo-testículos que los pseudo-ovarios; tal vez por esta característica las gónadas más gruesas podrían ser los pseudo-testículos. Sin embargo, estas observaciones microscópicas, son difíciles de interpretar en una observación macroscópica o a simple vista y con una muestra tan pequeña.

Las dos técnicas de tinción empleadas en los cortes histológicos de las gónadas resaltaron las características que nos permitieron diferenciar entre uno y otro sexo. Por ejemplo, la técnica de PAS resaltó la túnica albugínea que está compuesta por fibras de colágena ricas en mucopolisacáridos, la cual se tiñó profusamente por el reactivo de Schiff; por otro lado con la técnica de Hematoxilina-Eosina se pudieron apreciar las características generales del tejido como el tipo de células que forman el epitelio, así como los demás componentes celulares de las gónadas. Es importante señalar la importancia de la aplicación de las distintas técnicas de tinción ya que permiten interpretar las estructuras que componen células y tejidos.

De acuerdo con el análisis histológico, en el vivero se produjeron más crías hembras (proporción sexual = 1:32:2), y en cajas se produjeron más crías machos (proporción sexual = 6:1:1). Se identificó un número similar de intersexos con ambas técnicas de sembrado. Las proporciones sexuales obtenidas, son

coherentes con lo que se esperaría obtener por las temperaturas de incubación registradas.

6.2 Técnica de aclaramiento con glicerina y observaciones macroscópicas

Existe una gran discrepancia en los criterios tomados en cuenta por distintos autores para diferenciar un sexo del otro, utilizando el aclaramiento con glicerina y las observaciones macroscópicas, tanto en diferentes especies como en una misma especie (cuadro 7).

Cuadro. 7 ACLARAMIENTO CON GLICERINA Y OBSERVACIONES
MACROSCOPICAS

Autor/año/especie	Gónadas Femeninas	Gónadas Masculinas	intersexos
Yntema y Mrosovsky 1980 C.c.	superficie marcada con pliegues.	superficie lisa y con cordones primarios internos.	
Van Der Heiden <u>et al.</u> 1983-1985 L.o y C.m.	superficie con pliegues y mesovario más claro (hileo).	superficie lisa y con numerosos túbulos seminíferos internos.	
Benabib, 1984 D.c.	totalmente transparentes.	estructuras tubulares internas coloreadas en café y rojo.	zonas totalmente transparentes y zonas con estructuras tubulares
Rimblot <u>et al.</u> 1985 D.c.	delgadas y de superficie lisa de 12-13 mm de largo y 0.6-0.75 mm de ancho.	gruesas, superficie irregular con estrias transversales, de 10-12 mm de largo y 1.2-1.4 mm de ancho.	
Whitmore <u>et al.</u> 1985. C.m.	amarillas, delgadas y de superficie lisa.	blancas con un extremo grueso y el otro terminado en punta.	
Briseño. <i>com.pers.</i> D.c.	superficie estriada.	superficie lisa.	

Al estudiar la especie *C. mydas*, Whitmore et al. (1985) consideraron a las gónadas femeninas delgadas y de superficie

lisa, y las masculinas con un extremo grueso y el otro terminado en punta, mientras que para Van Der Heiden et al. (1985) las gónadas femeninas fueron aquellas de superficie estriada y las masculinas de superficie lisa. Con la especie *D. coriacea* Rimblot et al. (1985) consideraron como gónadas femeninas aquellas delgadas y de superficie lisa, y las masculinas gruesas y de superficie estriada. Briseño *com. pers.* consideró como gónadas femeninas las de superficie estriada, y las masculinas de superficie lisa. Como podemos apreciar en ambos ejemplos, son diferentes criterios en gónadas de una misma especie.

En total, se observaron 12 gónadas con estructuras tubulares, 36 gónadas totalmente transparentes y 5 gónadas con una mitad transparente y la otra con estructuras tubulares o con ambas características en forma de mosaico. Los resultados del sexado se compararon con los resultados usando la técnica histológica. El criterio utilizado en la técnica de aclaramiento fue la presencia o ausencia de estructuras tubulares. Las estructuras tubulares son interpretadas como túbulos seminíferos, por Van Der Heiden et al. (1985) y Benabib (1984). Sin embargo esas estructuras parecen ser vasos sanguíneos, ya que algunas veces tienen color rojo o café, y en *D. coriacea* a esta edad (recién eclosionadas) nunca se observan túbulos seminíferos en las gónadas tratadas con técnicas histológicas (Benabib, *com. pers.*). Sin embargo, en el presente trabajo se observó una gónada clasificada como ovotestis, la cual presentó claras células masculinas como son las espermatogonias, las cuales se encuentran dentro de los túbulos seminíferos, pero se

desconoce cómo se observarían tales estructuras en una gónada aclarada.

En cuanto a las observaciones macroscópicas, se trató de sexar las gónadas por medio de los criterios de los diferentes autores. Esto resultó imposible, ya que muy pocas gónadas presentaron claramente las características utilizadas por cada autor. El criterio de Rimblot et al, (1985) se consideró como el más acertado para distinguir los sexos, pero las observaciones mostraron que en muchas gónadas se encuentra una combinación de las características mencionadas para uno y otro sexo y muy pocas presentaron una diferencia marcada (ver cuadro 6).

6.3 Temperatura y proporción sexual

De acuerdo con los resultados del sexado histológico y los análisis de temperatura, se observó un claro sesgo hacia hembras en las crías producidas en el vivero. La temperatura promedio de incubación del segundo tercio del desarrollo embrionario fue de 30.02°C, incluida dentro del intervalo de temperaturas reportadas para la producción de hembras. En las crías producidas en cajas de poliuretano, se observó un claro sesgo hacia machos y la temperatura promedio de incubación del segundo tercio del desarrollo embrionario fue de 26.19°C, incluida dentro del intervalo de temperaturas reportadas para la producción de machos. Los resultados del sexado histológico son coherentes con las proporciones sexuales esperadas por las temperaturas de incubación. Sería recomendable realizar un experimento para conocer la proporción de sexos que se obtiene

mediante cada una de estas técnicas de incubación.

6.4 Comparación de las técnicas.

De los doce pseudo-testículos obtenidos por medio de la técnica de aclaramiento, sólo tres coincidieron con el sexado de la técnica histológica y las otras nueve gónadas resultaron ser pseudo-ovarios con una gran vascularización evidenciada gracias a los cortes histológicos y a las diferentes tinciones empleadas. Con la comparación de las técnicas se confirmó que las estructuras internas presentes en ciertas gónadas, son vasos sanguíneos y no cordones seminíferos como mencionaron Van Der Heiden et al. (1983, 1985) y que también Benabib (1984) consideró como tales aunque posteriormente los reinterpretó como los vasos sanguíneos que aparecen en las gónadas masculinas previo a la aparición de los túbulos seminíferos.

Analizando los resultados de las 21 gónadas que coincidieron en el sexado con ambas técnicas (cuadros 5 y 6), se pudo observar que fueron pocas las gónadas que resaltaron las características externas que describieron Rimblot et al. (1985), es decir, que las gónadas femeninas son delgadas y lisas (sólo 8), y las gónadas masculinas son gruesas y estriadas (sólo una).

Con la comparación de ambas técnicas de sexado de gónadas en un mismo individuo de la tortuga laúd, y por otro lado analizando los diferentes criterios tomados en cuenta en la identificación del sexo de las gónadas, se consideró que la técnica de aclaramiento con glicerina, aunque es más sencilla, rápida y barata, no es confiable para sexar gónadas de crías recién eclosionadas de la tortuga laúd, ya que las

características internas de las gónadas interpretadas como túbulos seminíferos no son tales. Los vasos sanguíneos periféricos que son resaltados en los cortes histológicos de las gónadas masculinas, no corresponden clara e inequívocamente con las estructuras que aparentan ser vasos sanguíneos de las gónadas aclaradas, ya que no es evidente en el tejido transparentado si estas estructuras se encuentran en la parte medular de la gónada, o en la parte periférica de la misma. Es por eso que la presencia de los vasos sanguíneos no puede usarse para identificar a los sexos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cada técnica de sexado, con los análisis de las temperaturas promedio en ambas técnicas de incubación, y la comparación de las proporciones sexuales obtenidas, y las esperadas de acuerdo con las temperaturas de incubación (ver cuadros 1, 2, 4 y Fig 15 A) se puede concluir que la mejor técnica para identificar el sexo de las gónadas de crías de tortuga laúd recién eclosionadas es por medio de la técnica histológica. Los resultados indican que la proporción de sexos es significativamente distinta de 1:1, presentándose un claro sesgo hacia hembras en crías producidas en la playa (vivero) y un claro sesgo hacia machos en crías producidas en cajas.

Por otro lado, ya que en individuos tan indiferenciados existe la posibilidad de que en un individuo una gónada esté más desarrollada que la otra, o que una gónada se esté diferenciando hacia macho y la otra hacia hembra (Merchant. com. pers.), se recomienda hacer un estudio sexando ambas gónadas en un mismo individuo usando histología.

7. CONCLUSIONES

1.- La técnica histológica mostró las características distintivas de las gónadas de cada sexo, pero debido a que las crías de *D. coriacea* recién eclosionadas tienen el sexo gonadal muy poco diferenciado, se sugiere utilizar los términos de pseudo-ovario, pseudo-testículo y ovotestis, en esta especie.

2.- Aunque la técnica de aclaramiento con glicerina sea más sencilla, rápida y barata, no se recomienda su uso para sexar gónadas de crías de la tortuga laúd, ya que al comparar los resultados del sexado de las gónadas con ambas técnicas (histología y aclaramiento por glicerina), se demostró que las estructuras tubulares internas presentes en las gónadas aclaradas, son vasos sanguíneos y no túbulos seminíferos inmaduros. Por lo tanto se consideró que tales características no pueden ser utilizadas para sexar gónadas de crías de tortuga laúd.

3.- Se consideró la técnica histológica como la más apropiada para sexar gónadas de crías de tortuga laúd.

4.- El sexo puede no estar definido en crías recién eclosionadas, ya que se encontraron ovotestis.

5.- Puesto que hay pocas evidencias de que el efecto de la temperatura de incubación sea permanente en *D. coriacea*, y ya que existe la posibilidad de una reversión sexual post-eclosión, se recomienda hacer un estudio más detallado de las características distintivas de cada sexo en individuos de mayor edad (de más de 13 semanas).

6.- Por medio de la técnica histológica, se observó un claro sesgo hacia pseudo-ovarios (1♂:32♀) en la proporción de sexos de las crías que se producen en el vivero. En crías que se producen en cajas, se observó un claro sesgo hacia pseudo-testículos (12♂:2♀). La proporción de ovotestis fue muy baja en ambos casos.

7.- Para corroborar estos sesgos, se recomienda hacer un estudio más detallado, ya que nuestra muestra fue muy pequeña para hacer una comprobación estadística.

8.- Ya que los huevos de tortugas marinas son incubados en condiciones diferentes de aquellas que experimentarían *in situ*, es importante investigar cuál es la proporción de sexos que se produce bajo condiciones de vivero, cajas e *in situ* en los campamentos de protección, de manera que no se altere la proporción de sexos que se produce en condiciones naturales.

8. LITERATURA CITADA

- Aguilar R.H.M. 1987. Influencia de la temperatura en la determinación del sexo y la duración del periodo de incubación de la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*). Tesis de Licenciatura (Biología). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México. 58 pp.
- Benabib N., M. 1983. Algunos aspectos de la biología de *Dermochelys coriacea* en el Pacífico Mexicano. Tesis Profesional de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. 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. 60 pp.
- 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 Programs. Menlo Park, CA. 316 pp.
- Dalrymple, G.H., J.C. Hampp and D.J. Wellins. 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.P. Whitmore and N. Mrosovsky. 1985. Masculinization of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* hatchlings from eggs incubated in styrofoam boxes. Biological Conservation 31:249-264 pp.
- Eckert K. L. 1991. The biology and population status of marine turtles in the North Pacific Ocean. Final report, NOAA/NMFS 40ABF002067. 119 pp.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM. México. 253 pp.
- Going, C.J., O.B. Going and G.R. Zug. 1978. Introduction to Herpetology. W.H. Freeman and Company. USA. 378 pp.
- Márquez M., R. 1990. Sea turtles of the world. FAO Species Catalogue. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Volume 11 FAO. Rome. 81 pp.

- Márquez, M.R., J. Vasconcelos, J.M. Sánchez, S. Sánchez, J. Díaz, C. Peñaflores, D. Ríos y A. Villanueva. 1990. Campamentos tortugueros, manual de operación. Instituto Nacional de la Pesca. México. 67 pp.
- McCoy, C.J., R.C. Vogt and E.J. Censky. 1983. Temperature controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. J. Herpetology. 17:404-406.
- Merchant-Larios, H. and I. Villalpando. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An Organ Culture Study. J of Exp Zool. 254:327-331.
- Merchant, H., I. Villalpando and B. Centeno. 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. Herpetological Monographs. 3:43-61.
- Miller, J.D. and C.J. Limpus. 1981. Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas*. L. In: Banks, C.B. and A.A. Martin. (Eds) Proc. Melbourne. Herpetol. Symp. p. 66-73.
- Mohanty-Hejmadi, P. and M.T. Diamond. 1983. Incubation temperature and sex determination in sea turtle. Amer. Zool. 23:1017.
- Mohanty-Hejmadi, P. and M.T. Diamond. 1986. Temperature dependent sex determination in the olive ridley turtle. Progress in Developmental Biology, part A. p. 159-162.
- Morreale, S.J., G.J. Ruíz, J.R. Spotila and E.A Standora. 1982. Temperature-dependent sex determination: Current practices threaten conservation of the sea turtles. Science. 216:1245-1247.
- Mrosovsky, N and P. Pritchard. 1971. Body temperature of *Dermochelys coriacea* and other sea turtles. Copeia No 4:624-631.
- Mrosovsky, N. and Yntema, C.L. 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtle: Implication for conservation practices. Biological Conservation. 18:271-280.
- Mrosovsky, N. 1982. Sex ratio bias in hatchling sea turtles from artificially incubated eggs. Biological Conservation. 23:309-314.
- Mrosovsky, N. and N. Benabib. 1990. An assessment of two methods of sexing hatchling sea turtles. Copeia 1990:589-591.

- Mrosofsky, N. and C. Pieau. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. Amphibia-Reptilia. 12:169-179.
- Pérez-Gómez, B.M. y R.H Montellano. 1990. Aspecto histológico de las gónadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* incubados a 32°C. En: Memorias del V encuentro interuniversitario de tortugas marinas en México. Morelia, Mich. p. 81-82.
- Pritchard, P. 1971. The leatherback or leathery turtle *Dermochelys coriacea*. IUCN Monograph. Morges, Switzerland No.1.39 pp.
- Pritchard, P. 1980. *Dermochelys coriacea*, leatherback turtle. Catalogue of American Amphibians and Reptiles 238.1-238.4.
- Rimblot, F., J. Fretey, N. Morosovsky, J. Lescure and C. Pieau. 1985. Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea-turtle *Dermochelys coriacea*. Amphibia-Reptilia 6:83-92.
- Silva, B., F. de A. 1986. La temperatura como factor determinante de la diferenciación sexual en *Lepidochelys olivacea*. Tiempos de Ciencias (México) 2:17-20.
- Van Der Heiden, A.M., R. Briseño-Dueñas and D. Ríos-Olmeda. 1983. Description of a labor and cost saving method for the determination of sex in hatchling sea turtles. Proceeding of the Western Atlantic Turtle Symposium. San José, Costa Rica. Julio, 1993.
- Van Der Heiden, A.M., R. Briseño-Dueñas and D. Ríos-Olmeda. 1985. A simplified method for determining sex in hatchling sea turtles. Copeia 1985:779-782.
- Van Eijck, T.J.W. y K.L. Eckert. 1994. Sea turtles in Bonaire: 1993 Survey results and conservation recommendations. Sea Turtles Club Bonaire, Amsterdam, The Netherlands. 83.
- Vogt, R.C. y O. Flores-Villela. 1986. Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. Ciencias 37:21-32.
- Yntema, C. L. and N. Morosovsky. 1980. Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. Herpetologica 36:33-36.
- Yntema, C.L. and N. Mrosofsky. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. Can. J. Zool. 60:1012-1016.

- Whitmore, C., P. Dutton and N. Mrosovsky. 1985. Sexing of hatchling sea turtles: gross appearance versus histology. J Herpetology 19:430-431.
- Wibbels, T., Y. Morris, D. Owens, G. Dienberg, J. Noell, J. Leong, R. King and R. Márquez. 1989. Predicted sex ratios from the international kemp's ridley sea turtle head start research project. p. 77-81. In: Caillouet, Jr, C.W. y A.M. Landry, Jr. (Eds.) Proceedings of the first International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology, Conservation and Management. Texas.

ANEXO I

TECNICA HISTOLOGICA

Los tejidos se sometieron al siguiente proceso histológico.

- 1.- Fijación en formol al 10% en amortiguador fosfato 1 M.
- 2.- Lavado del tejido al chorro del agua durante 1:30 h
- 3.- Deshidratación gradual en alcoholes de 50, 70, 80, 96 y 100 por ciento, alcohol/xilol y xilol durante 1:30 h en cada solución.
- 4.- Inclusión en Paraplast colocando las muestras en una solución de xilol/paraplast, posteriormente en paraplast I y paraplast II durante 15 min. en cada paso, en una estufa a una temperatura de 55°-58°C. Se colocaron los tejidos y el paraplast en un molde de papel a temperatura ambiente hasta su endurecimiento.
- 5.- Se obtuvieron cortes seriados de cada bloque, de aproximadamente 6-7 μ m de grosor.
- 6.- Se aplicaron dos técnicas de tinción: Hematoxilina-Eosina y Pas.

HEMATOXILINA-EOSINA

- 1.- Se desparafinaron los cortes en xilol durante 10 min.
- 2.- Se hidrataron de manera gradual en alcoholes del 100, 96, 70 y 50% y agua destilada durante 10 min cada uno.
- 3.- Se tiñeron con Hematoxilina durante 45 s aproximadamente.
- 4.- Se lavaron en agua corriente y en agua destilada.
- 5.- Se deshidrataron en alcoholes 50 y 70%, durante 10 min.
- 6.- Se tiñeron con Eosina 30 s. aproximadamente.

7.- Se continuó la deshidratación gradual con alcoholes de 70, 96, 100%, xilol/alcohol, durante 10 min cada uno.

8.- Se aclararon en xilol.

9.- Se montaron con Bálsamo de Canadá

PAS (Picro indigo y carmín) Tricrómica

1.- Se desparafinaron los cortes en xilol durante 10 min.

2.- Se deshidrataron de manera gradual en alcoholes del 100, 96, 70 y 50% y agua destilada durante 10 min.

3.- Se colocaron en ácido peryódico al 5% durante 8 min.

4.- Se lavaron en agua destilada.

5.- Se tiñeron con reactivo de Schiff 20 min*

6.- Tres baños con mezcla sulfurosa 5 min.**

7.- Dos baños con agua corriente 5 min (observar viraje a rosa).

8.- Se tiñeron con picro índigo y carmín 1:15 min.

9.- Se deshidrataron gradualmente en alcoholes del 70, 96, 100%, xilol/alcohol 5 a 10 min.

10.- Se aclararon en xilol.

11.- Se montaron con Bálsamo de Canadá.

* La mezcla no debe estar expuesta a la luz.

** Se prepara al momento, 180 ml. de agua destilada, 10 ml. ácido clorhídrico 1 N y 10 ml de metasulfito de sodio al 10%.

ANEXO II

TECNICA DE ACLARAMIENTO

FIJACION

1.- El tejido fué fijado en formol al 10% en amortiguador fosfato 1 M.

ACLARAMIENTO

2.- Se preparó un litro de solución de formol al 10% en amortiguador fosfato 1 M al 4% (950 ml) y glicerina (50 ml).

3.- Cada gónada se colocó en un frasco y se le agregaron 5 ml de la solución.

4.- Los frascos se colocaron en una estufa calibrada a una temperatura de 55°C aproximadamente, por un periodo aproximado de 24 h.

5.- Al evaporarse el agua y el formol de la solución, las muestras se retiraron de la estufa y se procedió a observarlas al microscopio estereoscópico.