

00343



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TESTÍCULO
Y EPIDÍDIMO DE *Kinosternon*
leucostomum (CHELONIA:
KINOSTERNIDAE) EN UN CICLO ANUAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA ANIMAL)

1587531

P R E S E N T A
SALVADOR ADRIÁN MORALES VERDEJA

DIRECTORES DE TESIS: DRS. RICHARD C. VOGT Y MA. CRISTINA
MARQUEZ OROZCO
MÉXICO D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

Se han hecho numerosas investigaciones para determinar el ciclo sexual de los machos, en reptiles. Sin embargo, el conocimiento actual que se tiene en quelonios es pobre, considerando que sólo se conocen los ciclos reproductores de nueve especies, pertenecientes a cuatro familias.

Las especies estudiadas son de zonas templadas, y no se han descrito los ciclos reproductores de aquellas con distribución tropical, por ello se planteó como objetivo determinar las fases del ciclo espermatogénico de *Kinosternon leucostomum* y la duración de cada una en un ciclo anual.

De una población silvestre fueron capturadas mensualmente tres tortugas macho, las cuales fueron sacrificadas y disecados los testículos y los epidídimos.

La estructura histológica de los testículos de *K. leucostomum* cambia gradualmente en un ciclo anual, lo cual permitió definir un cuadro de clasificación histológica en siete estadios.

La recrudescencia testicular se inició en el otoño, en sincronía con el descenso de la temperatura media mensual y de la precipitación pluvial. En la época seca estas tortugas pueden estivar. Se sugiere que el inicio de la espermatogénesis se presente antes de la época seca, como una estrategia reproductora que permita llegar a los organismos al periodo estival con el proceso espermatogénico avanzado.

El máximo nivel de espermiogénesis se produjo entre el final del verano y principio del otoño. La regresión testicular se identificó al final del otoño y la quiescencia, que no fue completa, se realizó entre el final del otoño y principio del invierno.

El patrón reproductor se definió como cíclico para los individuos y potencialmente continuo para la población, debido a que el inicio y el final de la espermatogénesis se traslapan.

El patrón reproductor de *K. leucostomum* fue de tipo postnupcial. El proceso espermatogénico de esta especie es el de mayor duración con respecto al de otras especies de quelonios estudiados.

La madurez sexual en esta población, se alcanzó cuando la longitud del caparazón fue de 126 mm.

A MIS PADRES

Pedro y Sara Raquel, de quienes siempre he tenido apoyo total

A MIS HERMANOS

Carlos y Edgar con el afecto y cariño de siempre

A MI ESPOSA E HIJAS

*Dulce, Fabiola y Karla quienes han sido la
motivación para seguir adelante, y poner fin a
este trabajo*

A MIS MAESTROS Y AMIGOS

*De quienes siempre encontré apoyo y
mucho que aprender*

CONTENIDO

- INTRODUCCION	1
- ESTUDIOS SOBRE LA REPRODUCCION REALIZADOS EN QUELONIOS.	2
- CLASIFICACION DE LOS TIPOS DE ESPERMATOGENESIS EN REPTILES	
- EN CONDICIONES NATURALES	4
- CARACTERISTICAS DEL TESTICULO DE QUELONIOS:	
- MORFOLOGICAS.	6
- HISTOLOGICAS.	6
- EL CICLO ESPEMATOGENICO.	8
- CELULAS DE SERTOLI Y LIPIDOS TUBULARES.	10
- LAS CELULAS DE LEYDIG Y LAS CARACTERISTICAS SEXUALES.	12
- CICLO HORMONAL.	13
- ESTUDIOS EN <i>Kinosternon leucostomum</i>	14
- OBJETIVOS.	16
- HIPOTESIS.	16
- AREA DE ESTUDIO.	17
- MATERIAL Y METODOS.	19
- RESULTADOS.	
- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL TESTICULO	24
- PESO DEL TESTICULO	24
- VOLUMEN DEL TESTICULO	26
- INDICE SOMATICO GONADAL	26
- TUBULOS SEMINIFEROS	27
- NUMERO DE CAPAS POR TIPO CELULAR EN EL EPITELIO GERMINAL	29
- CARACTERISTICAS DE LOS TESTICULOS DE ACUERDO CON LA CLASIFICACION ESPERMATOGENICA DURANTE UN CICLO ANUAL	31
- CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS DE LEYDIG Y DEL TEJIDO INTERSTICIAL	38
- OTROS ELEMENTOS DEL INTERSTICIO	42
- CARACTERISTICAS DEL EPIDIDIMO DURANTE UN CICLO ANUAL	42
- RESIDUOS CELULARES EN TESTICULO Y EPIDIDIMO	48
- RELACION ENTRE LA TALLA DE LOS INDIVIDUOS Y LA MADUREZ SEXUAL	48
- DISCUSION.	49
- CONCLUSIONES.	61
- LITERATURA CITADA.	63

INTRODUCCIÓN

Se sabe que el conocimiento de los ciclos y patrones reproductores de las especies es básico, cuando se estudia la evolución, la ecología o se intentan establecer estrategias de conservación y manejo de cualquier especie de quelonio (Gibbons, 1994; Moll, 1979). Sin embargo, la teoría ecológica y evolutiva han centrado su atención en las hembras, para la construcción de la teoría de historias de vida, este hecho ha dado como resultado que la parte complementaria en el proceso reproductor, que son los machos, haya sido relegada en su investigación (Frazer et al., 1993). Por lo anterior, los ciclos reproductores en las tortugas macho, se han estructurado de manera lenta y gradual, principalmente en los últimos 30 años.

Los primeros trabajos que se publicaron sobre reproducción fueron descripciones de una parte del ciclo, y se enfocaron al testículo o al epidídimo (Christiansen y Moll, 1973; Flores-Villela y Zug, 1995; Furieri, 1959; Lofts y Boswell, 1961a; Moll y Legler, 1971). Durante este siglo, se han caracterizado en todo el mundo los ciclos reproductores de los machos de nueve especies de tortugas, pertenecientes a las familias Emydidae, Chelydridae, Trionychidae y Kinosternidae. Estos estudios se realizaron principalmente en especies que se distribuyen en zonas templadas (Moll, 1979). Es a partir de estos estudios, y de los generados en otros grupos de reptiles, principalmente en escamados, que se ha delineado la teoría reproductora actual, e hipotetizado los ciclos de las especies que se distribuyen en las áreas tropicales, que es en donde se concentra el mayor número de especies de este orden de reptiles (Iverson, 1992). Para evaluar la actividad reproductora en reptiles, Licht (1984) considera que al menos dos aspectos del

sistema urogenital de los machos deben tomarse en cuenta: la condición espermatogénica y la actividad endocrina. Con esta base se iniciaron, los estudios de los ciclos reproductores en tortugas, que incluyen aspectos histológicos y fisiológicos, pero desde la década de 1970, hasta la fecha se han concluido en cuatro especies.

Frazer y colaboradores (1993) están de acuerdo en que los estudios de los ciclos reproductores en las tortugas macho, han sido descuidados, *pues cuando alguna información se incluye*, se asume que datos como la edad o talla a la madurez sexual y la tasa de crecimiento son características constantes para una población dada. Es por ello que deben incrementarse los esfuerzos para caracterizar los aspectos básicos en la biología de la reproducción en quelonios, tratando de entender cómo pueden variar temporalmente las características dentro de las poblaciones y las causas de la variación entre poblaciones y especies. Para lograr lo anterior, deben implementarse, estudios de largo plazo, aunque ello implica grandes inversiones de tiempo, dinero y personal, con los que generalmente no se cuenta, pero si al menos se hacen contribuciones *sólidas* en el conocimiento de poblaciones locales, el rezago podrá superarse, ya que son importantes, por revelar el papel real de los machos en la dinámica de las poblaciones naturales.

Estudios sobre la reproducción realizados en quelonios

Numerosas investigaciones se han dirigido a determinar el ciclo reproductor de los reptiles machos, y la influencia que ejercen sobre éste factores ambientales como la temperatura, el fotoperiodo y la humedad. Se ha destacado que los reptiles que viven en zonas con grandes fluctuaciones anuales de temperatura o entre el día y la noche, tienen un ciclo espermatogénico corto, seguido por un periodo de quiescencia de duración

variable. En el Ecuador, en donde la temperatura varía poco durante el año, y del día a la noche, se observa una actividad espermatogénica continua (Angelini y Picariello, 1975; Fitch, 1982). La espermatogénesis también presenta modificaciones, en la duración del proceso espermatogénico así como el tiempo de inicio del mismo, de acuerdo a la especie, esto se relaciona aparentemente con el clima del hábitat que ocupan y con la historia evolutiva del grupo al que pertenecen (Fitch, 1982; Licht, 1984; Moll, 1979; Moll y Legler, 1971).

Los estudios sobre reproducción en el orden de los quelonios son escasos, y la información existente proviene de especies que se distribuyen principalmente en zonas templadas, como: *Chelodina oblonga* y *Chelodina steindachneri* (Kuchling, 1988), *Chelydra serpentina* (Mahmoud y Cyrus, 1992), *Chrysemys dorbingni* (Silva et al., 1984), *Chrysemys picta* (Licht et al., 1985), *Kinosternon flavescens* (Christiansen y Dunham, 1972), *Sternotherus odoratus* (McPherson y Marion, 1981), *Testudo h. hermanni* (Kuchling et al., 1981), *Trachemys scripta* (Moll y Legler, 1971). La mayoría presentan un ciclo espermatogénico similar, caracterizado por el inicio de la espermatogénesis en primavera, con una actividad máxima al final del verano y término en el invierno, cuando se produce la espermiación. La época de apareamiento, en la mayoría de las especies es en la primavera, aunque puede presentarse en el otoño. Todas estas especies de quelonios que en su mayoría son de regiones templadas tienen una actividad espermatogénica de tipo postnupcial, lo que podría ser una estrategia, en donde la actividad anual es corta (Moll, 1979).

Clasificación de los tipos de espermatogénesis en reptiles, en condiciones naturales

Se han realizado numerosos estudios para clasificar la espermatogénesis de reptiles en poblaciones naturales. Los principales resultados son los siguientes:

Volsoe (1944), clasificó la espermatogénesis de los reptiles de la región neártica en:

a) Prenupcial - La espermatogénesis se inicia antes o durante la época de apareamiento, y el esperma utilizado en la fecundación se forma el mismo año.

b) Postnupcial - En este caso la espermatogénesis se inicia después del primer período de apareamiento. Los espermatozoides se almacenan en el epidídimo y por lo general son eyaculados, en la primavera o el otoño del año siguiente.

Por su parte Angelini y Picariello (1975), a través de una extensa revisión bibliográfica, establecieron una clasificación de la espermatogénesis que se presenta en poblaciones estudiadas en condiciones naturales, tomando en cuenta parámetros como la temperatura, el fotoperiodo y la humedad que influyen en la inducción de la quiescencia y la época en que ésta se presenta. De acuerdo con los autores, la caracterización de la espermatogénesis en dos grupos, es tan general, que oculta las diferencias que se presentan aún en las especies de un mismo grupo, además no revela en sí el mecanismo de la espermatogénesis ni la influencia que tiene el clima, por lo cual proponen una clasificación que identifica seis tipos de espermatogénesis (para mayores detalles puede consultarse la fuente original):

1) Termorrigostática - Presenta una estasis en los períodos más calientes y más fríos del año. Es típica de reptiles de regiones templadas, excepto en Chelonia y

Colubridae. En reptiles de áreas frías o de alta montaña, existe una variante llamada termorrígostática del segundo tipo, que consiste en una estasis en el periodo más frío, debido principalmente al efecto de altitud.

2) Rigostática - Caracterizada por la existencia de una estasis en el período más frío del año, es típica de Chelonia y Colubridae de regiones templadas.

3) Psicorrígostática - Tiene un largo período de estasis o hemiestasis que abarca el verano, el otoño y el invierno. Es típica de algunos reptiles del desierto.

4) Termocontinua - Se realiza durante todo el año, en reptiles ecuatoriales.

5) Termoxeranfotérica - Puede haber un breve período de estasis en la estación más seca del año. Es típica de algunos reptiles tropicales.

6) Termoxerostática - Se caracteriza por la existencia de una estasis prolongada, denominada xerostasis, por presentarse en la época más seca del año. Es típica de algunos reptiles tropicales.

Al relacionar la temperatura con el proceso espermatogénico, se observó que independientemente de la temperatura media anual, los reptiles de regiones con una pequeña variación en la temperatura media mensual, tienen una espermatogénesis continua o potencialmente continua. Cuando es alta la variación en la temperatura media mensual, la espermatogénesis es cíclica y de duración variable. Cuando los cambios térmicos son extremos, los periodos de actividad espermatogénica son cortos.

Características del testículo de quelonios

Morfológicas

Las gónadas son estructuras pares, dorsocaudales, que están unidas a la pared del cuerpo mediante un mesenterio, denominado mesorquio. Los testículos, en general se encuentran unidos al extremo posterior del riñón, en posición simétrica. Son elípticos, de consistencia suave y de color amarillo cremoso (Fox, 1977). Su tamaño fluctúa durante el año y autores como Jameson, (1988), Licht (1984), y Moll (1979), han tomado estos cambios como un índice de la actividad espermatogénica, un mayor tamaño lo relacionan con una espermatogénesis avanzada.

La comunicación de los testículos con el exterior es por medio de los conductos mesonéfricos o de Wolff, de los que derivan los del epidídimo, los deferentes y los eyaculadores, que desembocan en la uretra. El epidídimo está constituido por un sólo conducto circunvolucionado que forma un cuerpo compacto, alargado y unido a lo largo del riñón. Los túbulos del epidídimo cambian de volumen según la cantidad de espermatozoides que contienen, lo cual es una consecuencia del ciclo espermatogénico, y de la actividad reproductora del individuo (Fox, 1977).

Histológicas

El testículo está rodeado por una capa gruesa de tejido conectivo denso, llamada túnica albugínea. Hacia el interior, se localizan los túbulos seminíferos delimitados por fibroblastos y células mioideas. Entre los túbulos se encuentra el estroma que contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y células intersticiales o de Leydig, estas últimas tienen una función endocrina (Lofts, 1969; Márquez-Orozco, 1996; Merchant-Larios, 1991; Romano y Pedernera, 1991).

Las células de Leydig se caracterizan por tener mayor cantidad de citoplasma que las restantes del intersticio, con retículo endoplásmico liso muy desarrollado, mitocondrias grandes, redondeadas, con crestas tubulares, y abundantes inclusiones lipídicas. El núcleo es grande, esférico, con heterocromatina que se observa adherida a la membrana nuclear y con uno o dos nucleólos bien desarrollados (Fox, 1977; Lofts, 1969; Reyes-Fuentes et al., 1991; Romano y Pedernera, 1991).

En las especies de tortugas estudiadas, se han observado cambios morfológicos como es el aumento del citoplasma y del retículo endoplásmico, y aparentemente un incremento numérico de las células de Leydig, que se ha relacionado con modificaciones de la actividad esteroidogénica producidos durante el ciclo espermático (Licht, 1984; Fox, 1977). Licht (1984) considera que la variación en el número de células de Leydig puede ser un artificio, debido a que el aumento de volumen de los túbulos seminíferos, dificulta su observación.

Las células germinales maduran concéntricamente en los túbulos seminíferos, esto es, las células más cercanas a la pared son las menos diferenciadas y hacia el centro se localizan las maduras (Clermont, 1972; Heller y Clermont, 1964). En los túbulos seminíferos se pueden observar las espermatogonias que están en contacto con la lámina basal, entre las cuales se encuentran la base y el núcleo de las células de Sertoli, este último está caracterizado por ser de contorno irregular y muy voluminoso (Lofts, 1972).

De acuerdo a la etapa del ciclo espermatogénico, se observan espermátocitos primarios, que son el resultado de la última mitosis de las espermatogonias B y caracterizan la profase I de la meiosis y presentan etapas bien definidas como leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. Los espermátocitos en leptoteno carecen de contacto

con la membrana basal, poseen un núcleo con cromosomas filamentosos; los de cigoteno tienen un núcleo con cromosomas apareados y filamentosos con la configuración típica de ramillete; los de paquiteno tienen un núcleo que aumenta progresivamente en volumen y los cromosomas se observan acortados y engrosados y un nucleólo esférico se hace visible; en diploteno el núcleo obtiene su máximo volumen y los cromosomas se observan filamentosos por la separación de los cromosomas homólogos y se hacen aparentes los quiasmas (Clermont, 1972; Heller y Clermont, 1964; Marquez-Orozco, 1996; Setchell, 1982).

Los espermátocitos secundarios, tienen finas granulaciones cromatínicas fuertemente teñidas y grandes masas globulares cromofílicas, su núcleo es semejante en la apariencia cromatínica al de las espermátidas jóvenes, aunque de mayor tamaño (ibid.).

Las espermátidas tienen características propias del grado de madurez obtenido, durante el proceso de espermiogénesis, mismo que no ha sido descrito en ninguna especie de reptil. Los espermatozoides se localizan hacia la luz de los túbulos (ibid.).

El ciclo espermatogénico

La definición de las fases del ciclo espermatogénico varía de acuerdo a los investigadores que la estudian y se basa en exámenes histológicos detallados del testículo, del epidídimo, de las dimensiones y distribución del epitelio germinal en los túbulos seminíferos, el diámetro tubular y la morfometría del tejido intersticial formado por el estroma y las células de Leydig. Las fases más generales del ciclo espermatogénico de acuerdo con Licht (1984) son:

a) Recrudescencia o regenerativa - Se observa un incremento del volumen testicular, del diámetro de los túbulos seminíferos y del número de células de Leydig que se evidencian con facilidad, por tener abundante citoplasma y un núcleo esférico y voluminoso. Las células epiteliales del epidídimo son altas y forman un estrato cilíndrico ciliado o ligeramente pseudoestratificado.

b) Progresiva - Continúa el incremento del volumen testicular y del diámetro de los túbulos seminíferos, la densidad de las células intersticiales o de Leydig es alta. Las células epiteliales del epidídimo aumentan su altura.

c) Culminativa - En ésta fase, alcanzan su valor máximo el volumen testicular, al igual que el diámetro de los túbulos seminíferos y el grosor de las células epiteliales del epidídimo. Las células de Leydig en apariencia reducen su número.

d) Regresiva - Se caracteriza por un decremento del diámetro, volumen, número y espesor de las estructuras testiculares. Las células de Leydig reducen su citoplasma y se hace difícil su observación. El grosor de las células epiteliales del epidídimo permanece sin cambios al inicio de la fase, y disminuye hacia el final de ésta.

e) Quiescencia - Se presenta el valor mínimo del volumen testicular, del diámetro de los túbulos seminíferos y el de la altura de las células epiteliales del epidídimo, mientras que las células intersticiales no se pueden evidenciar. Las células de Sertoli presentan un gran volumen, debido a la alta concentración de lípidos que poseen.

Las tortugas de zonas templadas presentan un ciclo espermatogénico de tipo postnupcial, que tiene períodos breves de aumento en la talla testicular y actividad espermatogénica, y largos períodos de quiescencia espermatogénica inducidos por condiciones climáticas adversas (Moll, 1979). En las especies estudiadas, la mayor

diferencia entre los ciclos espermatogénicos se encuentra en el momento en que se realiza y la duración de la recrudescencia testicular, debido a que las características climáticas de las regiones templadas varían principalmente en la duración del invierno (Moll, 1979).

Células de Sertoli y lípidos tubulares

La actividad esteroideogénica de las células de Sertoli tiene relación con los ciclos de los lípidos dentro de los túbulos seminíferos (Fox, 1977). Estudios histoquímicos en tortugas revelan que los lípidos ricos en colesterol se acumulan en los túbulos, particularmente en las células de Sertoli al final del ciclo espermatogénico, y comienzan a desaparecer coincidiendo con la renovación de la espermatogénesis, al iniciar el siguiente ciclo (Lofts y Boswell, 1961b; Lofts y Tsui, 1977; Moll, 1973; Moll y Legler, 1971).

Las células de Sertoli poseen características citológicas típicas, asociadas con la secreción de esteroides. Las propiedades esteroideogénicas pueden mostrar marcados cambios estacionales relacionados con el consumo de lípidos ricos en colesterol durante la fase regenerativa y la progresiva. Así, las células de Sertoli pueden representar una importante fuente de andrógenos endógenos dentro de los túbulos testiculares y desempeñar un papel en la iniciación de la actividad gametogénica del epitelio germinal (Lofts, 1972, 1977). Se ha propuesto que es improbable que los esteroides tubulares contribuyan significativamente al nivel de andrógenos del plasma, debido a que los picos de secreción tienden a estar fuera de fase. También la capacidad secretora de los túbulos parece ser menor que la de las células de Leydig (Tsui, 1976).

En el testículo de los mamíferos, la célula de Sertoli es el principal blanco de acción de la hormona folículo estimulante (FSH). Esta hormona se une a receptores específicos que se localizan en la membrana plasmática, principalmente en la parte basal de las células (Reyes-Fuentes et al., 1991). En la célula de Sertoli la FSH regula diversos procesos celulares como son: a) el flujo de iones, b) el metabolismo de los nucleótidos, c) la síntesis de RNA, d) la síntesis y la secreción de los esteroides y las proteínas, e) la división y la movilidad celular (Reyes-Fuentes et al., 1991). Las células de Sertoli son el principal elemento secretor del epitelio seminífero, se han identificado aproximadamente 60 factores moleculares secretados por estas células aunque se desconoce la función de la mayoría.

Una de las secreciones de las células de Sertoli es la inhibina la cual tiene como órgano blanco el hipotálamo anterior, el cual a su vez secreta la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH) que participa en el control de la secreción de gonadotropinas (hormona luteinizante= LH, FSH) por la hipófisis anterior (Jameson, 1988; Reyes-Fuentes et al., 1991). No obstante que la LH es la principal hormona que regula la función de la célula de Leydig, se ha sugerido que la FSH también ejerce un efecto estimulante sobre la función de esta célula. Sin embargo, no se han observado receptores a la FSH en la célula de Leydig y se sabe que la influencia no es por contaminación, por lo tanto los efectos de la FSH sobre la célula de Leydig deben estar mediados por la célula de Sertoli a través de uno o varios factores difusibles (Reyes-Fuentes et al., 1991).

Las células de Leydig y las características sexuales

Aunque hay alguna controversia respecto a la fuente exacta de andrógenos periféricos en reptiles, las características generales de las células de Leydig, la relación entre sus ciclos y la de los tejidos andrógeno-dependientes y la demostración directa de su habilidad para secretar andrógenos en respuesta a las gonadotropinas, implican al tejido intersticial como la fuente primaria de andrógenos plasmáticos (Callard et al., 1976; Tsui, 1976).

Los ciclos en las estructuras sexuales accesorias y en la conducta, pueden revelar la existencia de ciclos en la actividad endocrina testicular, pero no pueden ser usados como indicadores de los niveles de andrógenos periféricos. Se han realizado algunos intentos para evaluar la esteroidogénesis gonadal, involucrando directamente las características histológicas de las células de Leydig. Algunos estudios han utilizado mediciones del número, volumen o tamaño de células individuales, tamaño nuclear, apariencia citológica o características histoquímicas, tales como la presencia de lípidos o actividad enzimática. Desgraciadamente no ha habido una unificación de los criterios usados para juzgar la actividad de las células intersticiales, ni una adecuada demostración, de cómo cada una de estas características citológicas se relaciona con la secreción de esteroides y varios artefactos potenciales se reconocen (Licht, 1984).

Por ejemplo, la apariencia del intersticio probablemente esté afectado por el estado de los túbulos seminíferos, cuando éstos se agrandan durante la espermatogénesis tienden a comprimir las células de Leydig (Licht, 1984). En tortugas, el intersticio es conspicuo sólo cuando los túbulos seminíferos involucionan, y representan la mayor masa del tejido (Lofts, 1977; Moll, 1979). Por otra parte, las células de Leydig

virtualmente no son observables durante el máximo de la espermatogénesis, cuando los túbulos están expandidos, pero aparentemente tienen la misma respuesta al estímulo gonadotrópico, que durante otras fases del ciclo (Callard et al., 1976).

En tortugas con espermatogénesis postnupcial, los ciclos en las células de Leydig y las estructuras sexuales accesorias son esencialmente inversas al ciclo espermatogénico y al peso de los testículos. La secreción de andrógenos en general está en un nivel mínimo cuando los testículos son más grandes (Licht, 1984), y alcanza su máximo cuando los túbulos seminíferos involucionan, y los testículos son más pequeños. Las células de Leydig y las estructuras sexuales accesorias pueden modificarse por el incremento de andrógenos, al final del otoño después que se completa la espermatogénesis, y en la primavera durante el apareamiento. Los niveles de andrógenos podrían reducirse durante el invierno (Licht, 1984).

Ciclo hormonal

Los testículos presentan una doble función, la endocrina (secreción de esteroides) y la producción de gametos en el ciclo reproductor anual. Como se ha mencionado, la relación entre esta actividad endocrina y el ciclo espermatogénico puede variar significativamente en reptiles, especialmente en asociación con los tipos de espermatogénesis prenupcial y postnupcial (Licht, 1984).

La evaluación de la actividad esteroidogénica por medio de técnicas histológicas y gravimétricas permite deducir la condición de estructuras sexuales andrógeno-dependientes, en especial del epidídimo y segmento sexual del riñón de los reptiles escamosos (Fox, 1977; Lofts, 1969). Como sitios potencialmente importantes de esteroidogénesis en los testículos de los reptiles se han identificado a las células de

Sertoli, dentro de los túbulos seminíferos, y a las células intersticiales o de Leydig. Su estudio ha revelado, que estos tejidos pueden tener un desarrollo anual inverso (Moll, 1979).

Estudios en *Kinosternon leucostomum*

Kinosternon leucostomum, es una especie de tortuga neotropical de amplia distribución, que se localiza desde el sur de Veracruz en México, hasta el oeste de Ecuador (Iverson, 1992), no obstante existen pocos trabajos para esta especie. Entre las aportaciones recientes, están las descripciones de la morfología hechas por Casas-Andreu (1967) y Ramírez Bautista (1977). En cuanto a su distribución destacan los estudios de Casas-Andreu (1967), Iverson (1992) y Smith y Smith (1980). Flores-Villela (1980 sintetizó los hallazgos de esta especie, y mencionó que al ser consumida localmente, tiene importancia económica regional.

Con respecto a su biología, se han publicado notas sobre sus hábitos alimentarios y de asoleo y sus sitios de localización (Alvarez del Toro 1973; Ramírez-Bautista 1977 y Villa-Ramírez 1973). Las observaciones de reproducción en cautiverio fueron realizadas por Duxplaix-Hall y Biegler (1972,1973) y Tryon (1978). Sobre la demografía, determinación del sexo y hábitos alimentarios se pueden citar a Vogt (1981), Vogt y Flores-Villela (1986) y Vogt y Guzmán-Guzmán (1988), respectivamente.

Morales-Verdeja y Vogt (1997a, 1997b), definieron las características de los movimientos de la especie en el sur de Veracruz, y los relacionaron con algunos aspectos de su historia natural como la anidación, la estivación, el parasitismo y las interacciones sociales. Moll y Legler (1971) estudiaron en cortes histológicos su ciclo

testicular en una población del Istmo de Panamá, que fue colectada durante siete meses discontinuos, de un año.

OBJETIVO: Describir la estructura morfológica e histológica del testículo y el epidídimo de *Kinosternon leucostomum*, y relacionarla con un ciclo anual.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1- Demostrar que los métodos histológicos aportan datos más confiables que la morfología gonadal, para la caracterización del ciclo espermatogénico de esta especie.
- 2- Comparar el ciclo espermatogénico de ésta especie, que tiene una distribución más cercana al ecuador, con el descrito por otros autores en poblaciones de zonas templadas.
- 3- Identificar los cambios cíclicos que se producen en el tejido intersticial durante un ciclo anual y compararlos con los de otros quelonios.
- 4- Establecer si la espermatogénesis de esta especie es continua o cíclica.
- 5-Relacionar los factores climáticos con las características de la espermatogénesis en la especie.
- 6- Determinar el ciclo reproductor de los machos.
- 7-Integrar los resultados de este trabajo, al estudio previo de su historia natural.

HIPOTESIS:

Kinosternon leucostomum presentará un ciclo espermatogénico continuo o casi continuo, diferente al de las especies de zonas templadas.

testicular en una población del Istmo de Panamá, que fue colectada durante siete meses discontinuos, de un año.

AREA DE ESTUDIO

De febrero de 1992 a enero de 1993 fue hecho un muestreo de una población de tortugas, que habita un arroyo en la localidad de "El Jicacal". Este lugar se ubica a 200 m de la playa, en el Golfo de México, a 6 km en dirección sur de la Estación de Biología Tropical de "Los Tuxtlas" UNAM, en el sur del estado de Veracruz, localizada entre las latitudes $18^{\circ}34'$ - $18^{\circ}36'$ N y las longitudes $94^{\circ}04'$ - $95^{\circ}09'$, perteneciente al municipio de San Andrés Tuxtla (figura 1).

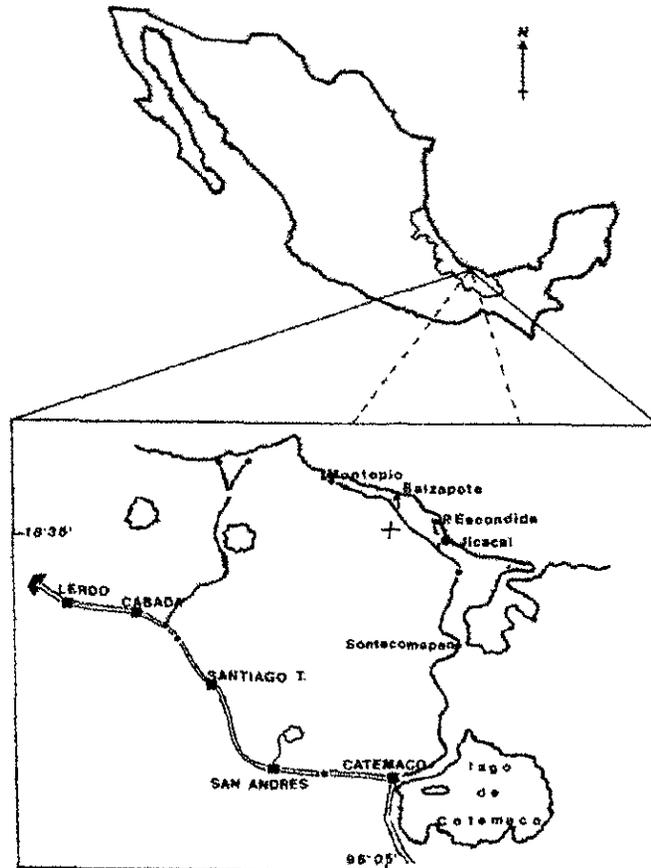


Figura 1. Localización de la Playa de "El Jicacal", Veracruz, dónde se realizó el estudio.

El arroyo se encuentra bordeado por pantanos, y pastizales dedicados a la ganadería, es de carácter estacional, por lo que tiene variaciones significativas en el nivel del agua. Durante las lluvias presenta desbordamientos, y en la época seca puede tener una profundidad máxima de 10 cm.

El clima de la región es cálido húmedo, con lluvias abundantes todo el año, poca oscilación anual de temperatura y marcha de temperatura tipo Ganges [Af(m)wⁿ(i')g] (García, 1970). Presenta una precipitación de 4 000 mm y una temperatura media anual, de 27 °C (figura 2).

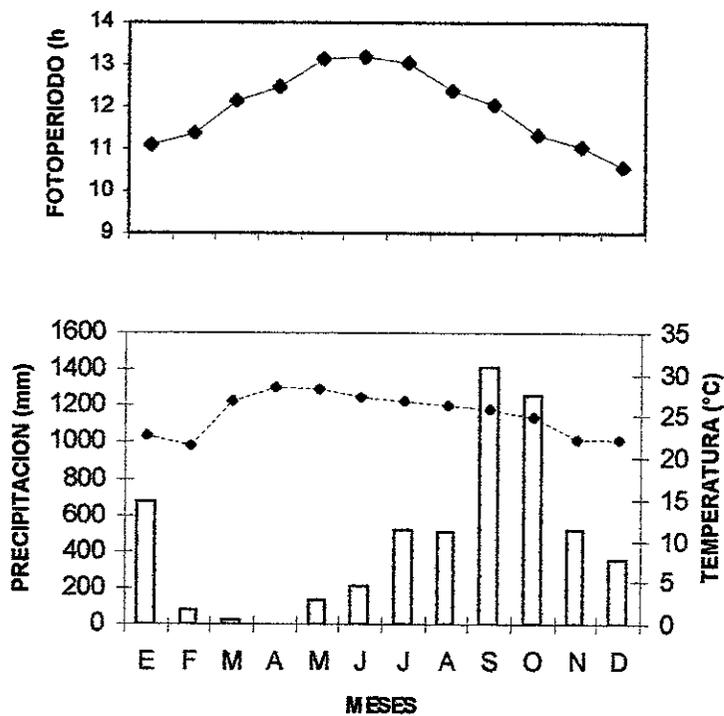


Figura 2. Climograma y fotoperiodo de Playa Escondida, Veracruz (tomado del Registro Meteorológico Nacional y el Anuario Astronómico Nacional; las barras representan la precipitación).

MATERIAL Y MÉTODOS

De febrero de 1992 a enero de 1993 fueron colectados mensualmente, de 2 a 4 tortugas macho de la especie *Kinosternon leucostomum*, éstas se capturaron por medio de trampas tipo Nasa. Las colectas tuvieron una periodicidad de 24 a 26 días, para que las diferencias observadas, fueran equivalentes entre una muestra y otra.

Se tomaron los siguientes datos de los individuos: fecha de colecta, longitud recta máxima del caparazón medida con un calibrador vernier, con una precisión de 0.05 mm y peso total del ejemplar obtenida con una balanza granataria con precisión de 1.0 g. A cada individuo se le asignó un número de colecta y se les depositó en la colección UNAMLT de la Estación de Biología de "Los Tuxtlas" UNAM. Las tortugas fueron sacrificadas en las siguientes cuatro horas posteriores a su captura, con pentobarbital sódico inyectado en el cerebro. Se sabe que el efecto de estrés postcaptura, afecta los niveles de hormonas gonadotrópicas circulantes (Licht et al., 1985), y se ignora en cuanto tiempo se puedan alterar las características histológicas del testículo.

Se disecaron los testículos y el epidídimo de cada individuo. Se midió el diámetro mayor y menor de los testículos, con un calibrador vernier, con una precisión de 0.05 mm y se pesaron en fresco en una balanza analítica, con una precisión de 0.001 g, se dividieron en dos partes iguales a través del eje mayor, y se fijaron la mitad de cada uno en Bouin y la otra en formol neutro al 10%; o en Bouin y Zenker respectivamente, después de eliminar la túnica albugínea para permitir una mejor fijación.

Los órganos fueron fijados en frío la primera hora y las nueve horas subsecuentes a temperatura ambiente. Se les pasó a alcohol al 70%, haciendo cambios cada 24 h en el periodo previo a su traslado a la Ciudad de México, en donde se procedió a

deshidratarlos en alcoholes graduales hasta llegar al absoluto. Se aclararon en tolueno e incluyeron en parafina de punto de fusión 56-58 °C, en una estufa a temperatura constante. Se sometieron a un vacío de 20 libras durante 1 h. Los bloques con el tejido fueron cortados a cinco micrómetros de grosor y montados en laminillas.

De la colección UNAMLT, fueron estudiados histológicamente 50 individuos fijados, de *K. leucostomum* de una colecta realizada en julio de 1990, en la localidad de Lerdo de Tejada, Veracruz, a partir de los cuales se estimó la varianza en el ciclo espermatogénico, y se determinó el tamaño mínimo de colecta. Debido a que en esta muestra se observaron tres estadios espermatogénicos, se concluyó que el número mínimo de ejemplares por coleccionar fuera de tres mensuales.

Métodos de Tinción:

Se realizaron preparaciones fijas de cada órgano y ejemplar. Los cortes de testículo se tiñeron con hematoxilina de Harris - eosina para hacer observaciones generales, así como la tricrómica de Mallory, para identificar las características y número de las células de Leydig. Los cortes de epidídimo se tiñeron con hematoxilina de Harris - eosina. La madurez sexual fue determinada por la presencia de alguna de las fases del proceso espermatogénico en el testículo y/o la presencia de espermatozoides en el epidídimo.

Morfometría:

Con las medidas de diámetro máximo y mínimo del testículo se calculó su volumen, aplicando la fórmula $V = (4/3 \pi a^2 b) / 100$, donde $a = 1/2$ diámetro mínimo, y $b = 1/2$ diámetro máximo (Jones, 1970). Con los datos de peso y volumen del testículo se hizo una prueba de t pareada para analizar la igualdad de tamaño entre los órganos en un

mismo individuo. Se calculó el índice somático gonadal con la fórmula $ISG=(Pt/PT)1000$, donde Pt= peso testículo, y PT= peso total del ejemplar. Se midió el diámetro de 30 túbulos seminíferos y de 20 a 30 conductos y conductillos del epidídimo por individuo, con un ocular micrométrico.

Se analizó la abundancia de cada tipo celular, en 40 cortes de túbulos por individuo, realizados a diferentes niveles del testículo. Se modificó la metodología de análisis descrita por Estrada-Flores y colaboradores (1990), y consistió en considerar el corte transversal de un túbulo y dos ejes perpendiculares imaginarios que lo intersectaran, a lo largo de los cuales se contó el número de capas de cada tipo celular, y el promedio de los cuatro contéos, se consideró como una observación.

Se cuantificó el número de células de Leydig en una área fija, mediante una rejilla ocular, en una zona definida como el intersticio de 3 túbulos seminíferos adyacentes, con la finalidad de tener áreas equivalentes (Kuchling, 1982), y se midió el diámetro de los núcleos de 40 células por cada individuo.

Se analizó el porcentaje de espermatozoides, en el área total de un corte longitudinal del epidídimo, mediante la captura de la imagen y el cálculo de áreas del mismo corte, utilizando el equipo del Laboratorio de Digitalización de Imágenes del Instituto de Física; que tiene integrado los programas PHOTOMETRICS IMAGE 2000, ver. 2.0 y PHOTOSHOP - ADOBE PHOTOSHOP. Se desarrolló esta técnica de análisis, debido a que el promedio y desviación estándar de los diámetros de los conductos no fueron suficientes para caracterizar las variaciones que presentan durante el año. Los resultados fueron graficados individualmente, y se relacionaron con los de madurez espermatogénica y talla del ejemplar.

Utilizando los programas STATGRAPHICS, STATISTICA ver. 6.0 y el apoyo estadístico de EXCEL versión 8.0, se realizó el ANDEVA, basado en el modelo estadístico $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, en donde los errores también llamados residuos (e_{ij}), son independientes, y se distribuyen normalmente con media aritmética igual a cero y varianza constante. Con la prueba de análisis de residuos (Chatterjee, 1977; Curts, 1984; Draper, 1981; Montgomery, 1991; Walpole y Myers, 1992), y la de Bartlett para igualdad de varianza, también llamada homocedasticidad (Montgomery, 1991; Walpole y Myers, 1992), se comprobó que no se violaban los supuestos de este modelo, y se validaron los resultados. Para identificar grupos homogéneos, se aplicaron comparaciones múltiples por el método de Scheffé, con una probabilidad de confianza del 95% (ibid.), a las siguientes variables: peso y volumen del testículo, índice somático gonadal, diámetro de los túbulos seminíferos y conductos del epidídimo. El ANDEVA de estas variables se correlacionó con el tiempo y el grado de madurez espermatogénica, del testículo derecho y del izquierdo, para conservar la independencia de los datos.

Se graficó el valor máximo, el mínimo y la media aritmética y en algunos casos la desviación estándar de cada ejemplar, debido a que al considerarlos juntos, como un promedio mensual, se ocultaba las variaciones intra e interindividuales.

El estadio del ciclo espermatogénico de cada individuo colectado, y el de los 50 ejemplares de la colección UNAMLT, se determinó usando como referencia el análisis del ciclo espermatogénico de McPherson y Marion (1981) utilizado para la tortuga *Sternotherus odoratus* (cuadro 1). De los individuos de la colección, se seleccionaron 10 pares de ejemplares con la misma longitud del carapacho, entre los cuales se comparó el

peso y el estadio de madurez espermatogénico, para probar una posible influencia del peso sobre el estado reproductor.

Estadio	Características de los túbulos seminíferos y su contenido	Células de Leydig
1	Diámetro tubular reducido; espermatogonias, escasos o abundantes espermatozoides	hipotróficas
2	Espermatocitos I y abundantes espermatogonias	hipertróficas
3	Abundantes espermatocitos II y espermátidas que no han iniciado la espermiogénesis	hipertróficas
4	Espermátidas diferenciadas y espermatozoides escasos	hipertróficas
5	Espermátidas y espermatozoides abundantes	hipotróficas
6	Espermatozoides abundantes, máximo nivel de espermiogénesis	hipotróficas
7	Espermatozoides abundantes, espermatocitos I y II y espermátidas escasas	hipotróficas
8	Espermatozoides, espermátidas y espermatocitos escasos o espermátidas y espermatocitos ausentes o abundantes espermatozoides en el lumen	hipotróficas

Cuadro 1 . Clasificación del estadio espermatogénico, basado en los tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos (McPherson y Marion, 1981).

De los ejemplares colectados, la muestra de marzo presentó alteración del tejido interno por haberse congelado los ejemplares, sin embargo, se pudieron obtener con las reservas del caso, los valores morfométricos del testículo y la caracterización del estado espermatogénico.

En las figuras del testículo de los estadios espermatogénicos, se usan las siguientes abreviaturas: **Eg** = espermatogonias; **E1** = espermatocitos 1; **Ed** = espermátidas; **Ez** = espermatozoides; **Ly** = células de Leydig; **S** = células de Sertoli.

RESULTADOS

Características morfológicas del testículo

El color de los testículos de los quelonios sacrificados al ser capturados, fue amarillo cremoso, y algunas veces más oscuro. En los ejemplares de *K. leucostomum* colectados y en los de la colección UNAMLT, la forma de los testículos fue elíptica, y su tamaño, peso y volumen varió durante el año, como se observa en la figura 3.

Los testículos en un mismo ejemplar, tuvieron diferente peso y volumen, por lo que se realizó una prueba de t pareada, que comprobó que existen diferencias estadísticamente significativas con $t_{0.975(26)} = 3.171$, $p < 0.05$, en peso, y $t_{0.975(32)} = 23.53$, $p < 0.05$, en volumen. El testículo derecho tuvo una razón de peso, derecho/izquierdo de 1.07 veces mayor en peso que el izquierdo, y de 1.12 veces en cuanto a la razón de volumen, derecho/izquierdo.

Peso del testículo

En la figura 3 se observa que hubo variación en el peso de los testículos de las tortugas colectadas, por mes y entre meses. Sin embargo, existen dos fases de aumento, la primera entre julio y agosto, en donde el peso fue mayor a 0.50 g y la segunda entre noviembre y diciembre, con un peso mayor a 0.70 g. Durante los meses de enero y marzo bajó en todos los individuos y fue menor a 0.23 g.

Se utilizó el modelo ANCOVA empleando como covariable la longitud del carapacho para determinar diferencias entre los meses de colecta, para validar la prueba se aplicó el análisis de residuos (Montgomery, 1991; Walpole y Myers, 1992), que definió una distribución al azar y permitió asumir normalidad, homocedasticidad,

linealidad e independencia. La prueba de Bartlett se aplicó para comprobar la homocedasticidad de la muestra, que fue de 1.505, $p < 0.05$. Por el ANCOVA, se encontraron diferencias significativas entre las muestras del testículo derecho $F_{11,35} = 2.1035$, $p < 0.06$ y el izquierdo con $F_{11,35} = 2.2010$, $p < 0.05$.

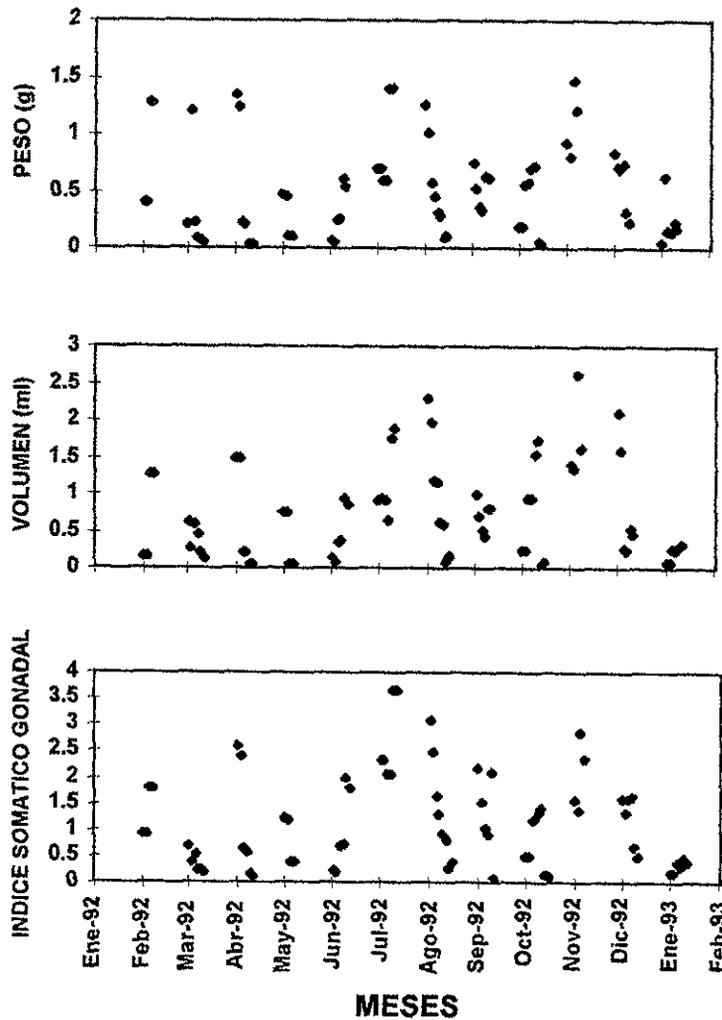


Figura 3. Comparación del peso, volumen e ISG de los testículos de *K. leucostomum* colectados en "El Jicacal", Veracruz (cada punto representa el valor de cada uno de los órganos de cada individuo sexualmente maduro).

Por la prueba de comparación múltiple de Scheffé se identificaron dos grupos que se traslapan ampliamente. La gran variación intragrupo (cuadro 2), no confiere una robustez adecuada al análisis de peso.

MÉTODO:	SCHEFFÉ	P<0.05
Nivel	Promedio	Grupo Homogéneo
Junio	0.13083	*
Abril	0.23555	*
Agosto	0.27925	*+
Septiembre	0.29500	*+
Enero	0.38162	*+
Julio	0.51850	*+
Diciembre	0.53700	*+
Marzo	0.64812	*+
Noviembre	0.65333	*+
Mayo	0.84000	*+
Octubre	0.90000	*+
Febrero	1.04666	*

Cuadro 2. Comparación múltiple de Scheffé para el peso de los testículos de *K. leucostomum* (los símbolos * y + representan a cada grupo formado).

Volumen del testículo

El análisis de los datos obtenidos, reveló un comportamiento análogo al del peso. En la figura 3 se observa que el valor del volumen es heterogéneo en cada mes, excepto en enero. Se encontró una tendencia de aumento, observándose valores mayores a 1.3 ml de julio a agosto y de noviembre a diciembre, y una disminución, con valores menores a 0.60 ml en enero y marzo.

El análisis de residuos mostró la ausencia de homocedasticidad y normalidad en el volumen. Debido a que se violan al menos dos supuestos del modelo ANDEVA, se consideró que los resultados obtenidos carecen de validez estadística, y no se aplicó.

Índice somático gonadal (ISG)

El análisis de residuos del ISG, y la prueba de Bartlett (1.360, $p < 0.10$), validaron la aplicación del ANDEVA, que dio como resultado la existencia de diferencias

significativas entre los meses de colecta con $F_{11,35} = 2.2995$, $p < 0.06$ para el testículo derecho y de $F_{11,35} = 2.4745$, $p < 0.03$ para el testículo izquierdo.

MÉTODO:	SCHEFFÉ	P<0.05
Nivel	Promedio	Grupos Homogéneos
Junio	0.37416	*
Abril	0.47411	*
Agosto	0.77050	*+
Enero	0.80437	*+
Septiembre	0.93633	*+°
Julio	1.09150	*+°
Marzo	1.22512	*+°
Mayo	1.34750	*+°
Diciembre	1.62966	*+°
Noviembre	1.70633	*+°
Febrero	1.95733	*+°
Octubre	2.68566	+~

Cuadro 3. Comparación múltiple de Scheffé para el índice somático gonadal de *K. leucostomum* (los símbolos *, +, -, ° representan a cada grupo formado).

El análisis de comparación múltiple permitió identificar cuatro grupos superpuestos, por lo cual algunas muestras tenían representantes de los cuatro grupos formados, esto indica que la prueba no es robusta cuando hay gran variación intragrupal.

Túbulos seminíferos

El diámetro de los túbulos seminíferos (DTS), fue graficado por individuo y se observó heterogeneidad en las muestras. En la figura 4 se observa una tendencia a incrementar el diámetro de junio a julio, en que alcanzó el valor más alto, que fue de 199.5 μm , en julio. En este último mes los valores de la media del DTS fueron más homogéneos. En agosto algunos se conservaron altos, mientras que otros bajaron y en septiembre fueron de 140 μm , que fueron menores a los obtenidos en julio. En octubre la muestra tuvo valores promedio menores a 111 μm (figura 4).

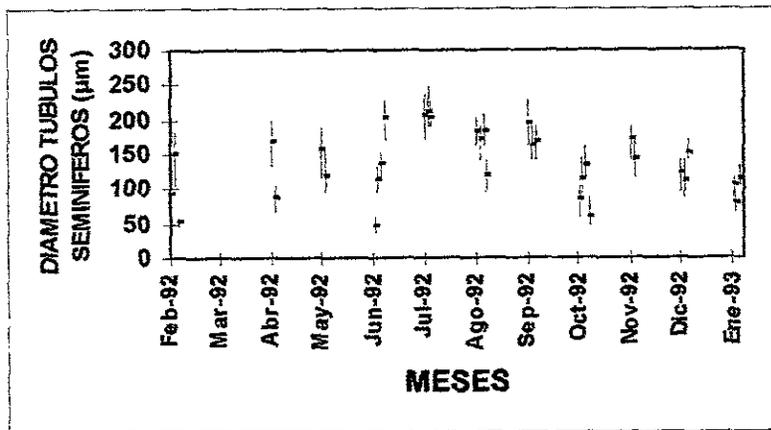


Figura 4. Distribución de la variación del diámetro de los túbulos seminíferos de *K. leucostomum* de cada ejemplar colectado durante un año (cada punto representa la media y el valor máximo y mínimo).

De noviembre a enero el DTS tuvo un segundo aumento con un intervalo de 90 µm a 150 µm. Por el ANDEVA, se encontró una diferencia significativa entre las muestras mensuales ($F_{10,319} = 20.639, p < 0.01$). Por el análisis de comparación múltiple, se identificaron tres grupos, sin embargo, no coincidió con la secuencia mensual ni con la madurez espermatogénica (cuadro 4).

MÉTODO:	SCHEFFÉ	P<0.05
Nivel	Promedio	Grupos Homogéneos
Febrero	09.800	*
Noviembre	09.866	*
Abril	11.600	*+
Enero	11.733	*+
Agosto	11.733	*+
Octubre	12.233	*+
Marzo	13.366	+°
Junio	13.466	+°
Mayo	15.766	°
Julio	15.800	°
Septiembre	15.966	°

Cuadro 4. Prueba de comparación múltiple para el diámetro de los túbulos seminíferos (los símbolos *, +, ° representan cada grupo formado).

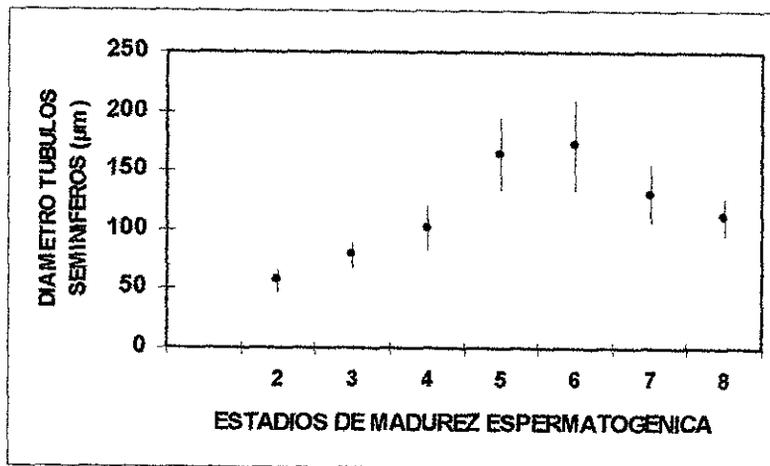


Figura 5. Variación de los túbulos seminíferos de *K. leucostomum* en relación al grado de madurez espermatogénica (cada punto representa el diámetro promedio y desviación estándar).

El DTS promedio mínimo de $48.45 \pm 6.32 \mu\text{m}$ correspondió al estadio sexualmente inmaduro. En la figura 5 se observa que iniciado el proceso espermatogénico, los túbulos aumentaron gradualmente de diámetro hasta alcanzar el valor máximo de $130.63 \pm 24.5 \mu\text{m}$ en el estadio 6; en el 8 y disminuye a $111.29 \pm 15.9 \mu\text{m}$. El valor alto del ANDEVA del DTS por el estado de madurez espermatogénica, reveló la existencia de una relación directa entre estas variables ($F_{6,412} = 135.11, p < 0.05$).

Número de capas por tipo celular en el epitelio germinal

Las capas de cada tipo celular se distribuyó en forma concéntrica en los túbulos seminíferos y el número de capas está representado de manera gráfica en la figura 6, en la cual se observa, que las espermatogonias fueron más abundantes en febrero, y de abril a julio disminuyeron, pero su población tendió a ser estable. De agosto a diciembre,

fueron menos numerosas y en enero presentaron un ligero incremento de 1.02 a 1.15 capas de células.

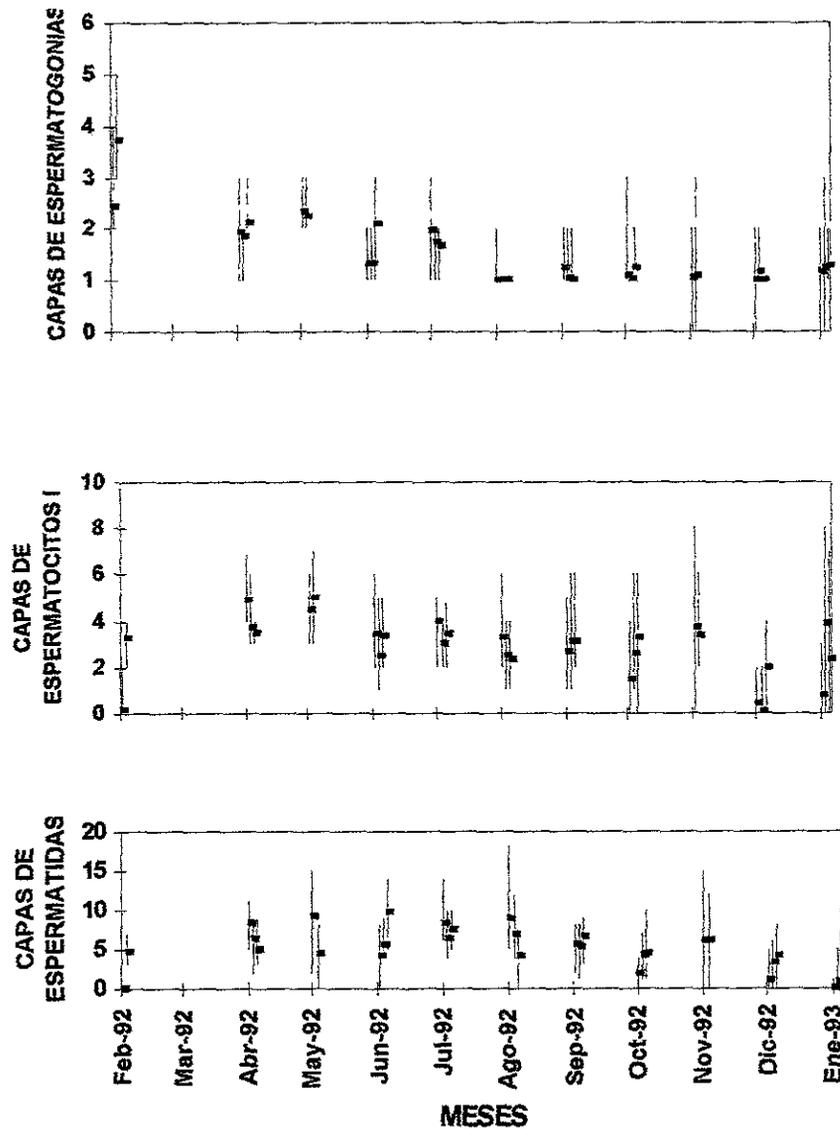


Figura 6. Comparación de las variaciones de los tipos celulares del epitelio germinal en *K. leucostomum*, en un año (cada punto corresponde a la media y valor máximo y mínimo por ejemplar).

Los espermatoцитos primarios fueron más abundantes de abril a mayo con un promedio de 3.7 a 5.0 capas por individuo, disminuyendo de manera gradual de junio a octubre, alcanzando valores mínimos en diciembre con un promedio de capas menor a

uno, e incrementó ligeramente en enero en donde hubo un promedio superior a 2.3 capas.

El número de espermátidas aumentó de julio a agosto con un promedio mayor a 6.5 capas, aunque valores superiores a 5 capas se pudieron observar de abril a noviembre. En diciembre el epitelio se redujo a menos de cuatro capas, y los valores mínimos se encontraron en enero y febrero con dos o menos capas.

En la figura 6 se hace una comparación de la secuencia en que cambió la abundancia de los tres tipos de células germinales que se cuantificaron, ya que en febrero hubo más espermatogonias, en abril y mayo espermatocitos primarios y de abril a noviembre espermátidas. El mismo fenómeno se repitió con respecto a los valores mínimos, ya que entre agosto y noviembre disminuyó la población de espermatogonias, en diciembre la de los espermatocitos primarios y en enero y febrero la de espermátidas.

Características de los testículos de acuerdo con la clasificación espermatogénica durante un ciclo anual

Con la clasificación de McPherson y Marion (1981), ningún ejemplar se identificó en el estadio 1 (figura 7), caracterizado por tener túbulos seminíferos con diámetro reducido, epitelio germinal en regresión total, con espermatogonias y células de Sertoli.

En octubre, se observó un individuo en el estadio 2 (figura 7), que presentó el menor desarrollo espermatogénico. Los túbulos tuvieron un diámetro promedio de $57.00 \pm 9.13 \mu\text{m}$. El epitelio germinal estaba constituido por espermatogonias claras y oscuras dispersas entre el abundante citoplasma de las células de Sertoli, desde la base hasta una región cercana a la luz, que era reducida. En algunas áreas, formaban dos o tres capas.

edo1												
edo2								*				
edo3												*
edo4	*	*	*	*	*		*		*			*
edo5	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
edo6						*	*	*	*	*		
edo7											*	
edo8											*	*
	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E

Figura 7. Distribución de los estadios espermatogénicos observados en los ejemplares de *K. leucostomum* en el curso de un año (cada punto representa el estado de madurez espermatogénica de al menos un ejemplar).

Los núcleos de las espermatogonias se encontraban intercalados entre las células de Sertoli que eran grandes, de contorno irregular y con un nucléolo muy grande, típicos de éstas células. Los espermatoцитos primarios, en diferentes etapas de la profase, fueron más numerosos que las espermatogonias y los predominantes fueron los de la fase leptoteno, seguidos por los que estaban en cigoteno, paquiteno, y algunos en diploteno (figura 8, la flecha muestra un espermatoцитo primario como el estado más avanzado).

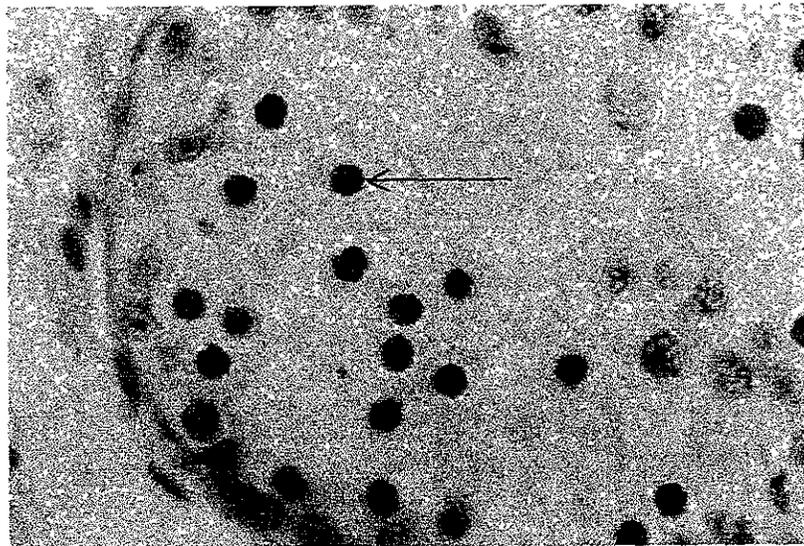


Figura 8. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 2, colectado en octubre. Las flechas señalan espermatoцитos I como el estadio celular más desarrollado (fase de proliferación; hematoxilina-eosina; 845X).

En enero se colectó un ejemplar que se encontraba en el estadio 3 (figura 7). Sus túbulos tuvieron un diámetro promedio mayor a los $78.71 \pm 11.44 \mu\text{m}$, en el epitelio había

espermatogonias claras y oscuras con núcleo esférico muy distinto a los de las células de Sertoli, que fueron irregulares, voluminosos, con un nucléolo prominente. El citoplasma de las células de Sertoli (S) era fibrilar, acidófilo y muy abundante. Hacia la región adluminal se observaron entre tres y cuatro capas de espermátocitos primarios en leptoteno.

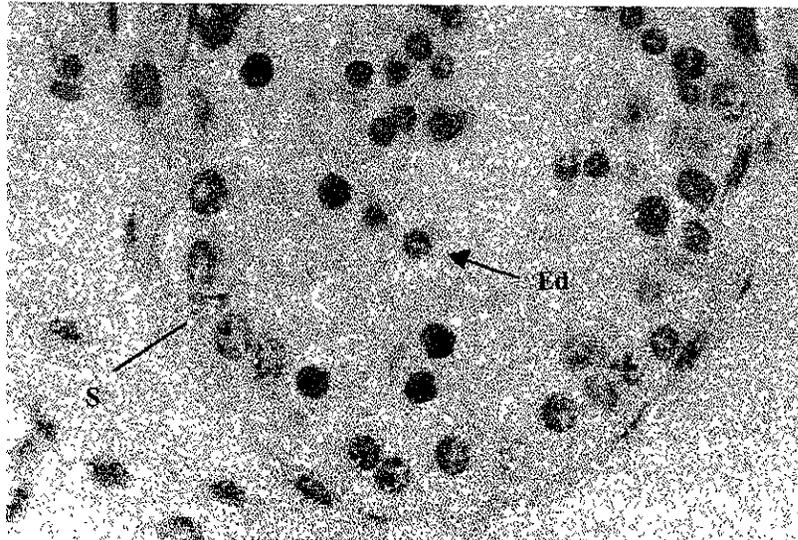


Figura 9. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 3, colectado en enero. La flecha señala espermátidas recién formadas como el máximo estadio de desarrollo (fase de proliferación; hematoxilina – eosina; 845X).

En algunos túbulos se observaron espermátocitos secundarios y espermátidas que formaron de dos a tres capas. Las espermátidas recién formadas, fueron esféricas, con la cromatina en grumos, sin haber iniciado la espermiogénesis (figura 9 Ed, indicadas por flecha). Este tipo de células representa el máximo grado de diferenciación que se alcanza en los túbulos seminíferos y en algunos casos se pudieron observar con aspecto de cordones al no presentar una luz definida, debido a que el citoplasma de las células de Sertoli era tan abundante que ocupaba la mayor parte de los túbulos o de los cordones.

El estadio 4 fue el segundo en cuanto a frecuencia, ya que se identificó de enero a junio, agosto y octubre (figura 7). Los túbulos alcanzaron un diámetro promedio de $101.48 \pm 18.48 \mu\text{m}$, el epitelio aumentó de espesor al encontrarse espermatogonias, espermatocitos primarios en varias etapas de la profase I, espermatocitos secundarios, espermátidas recién formadas en diversos grados de diferenciación (figura 10, señaladas con flecha). En algunos túbulos hubo espermatozoides.

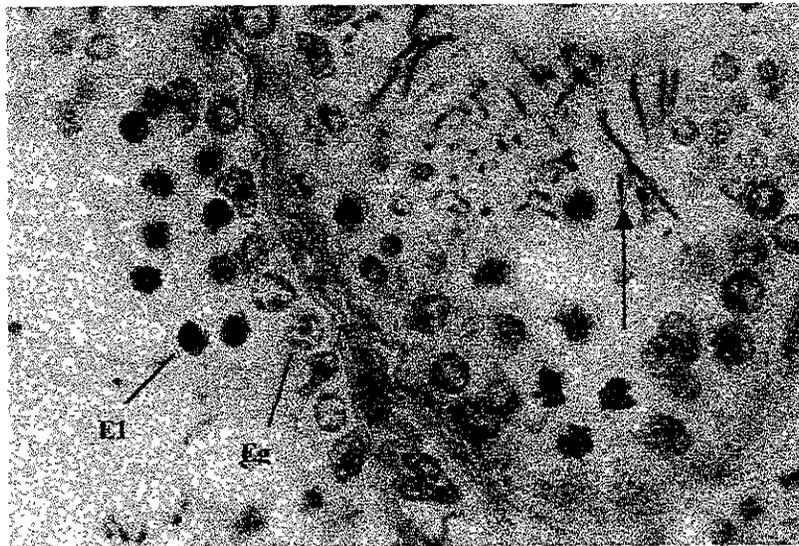


Figura 10.. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 4, colectado en febrero. La flecha indica espermátidas en espermiogénesis (fase de proliferación; hematoxilina – eosina; 845X).

El estadio 5 fue más frecuente, ya que se observó de febrero a octubre (figura 7). El diámetro promedio de los túbulos fue de $163.59 \pm 30.30 \mu\text{m}$. El epitelio estaba constituido por espermatogonias oscuras y algunas claras, escasos espermatocitos primarios, espermátidas recién formadas, abundantes espermátidas en espermiogénesis avanzada y una menor cantidad los espermatozoides (figura 11, espermátidas señaladas con flecha).

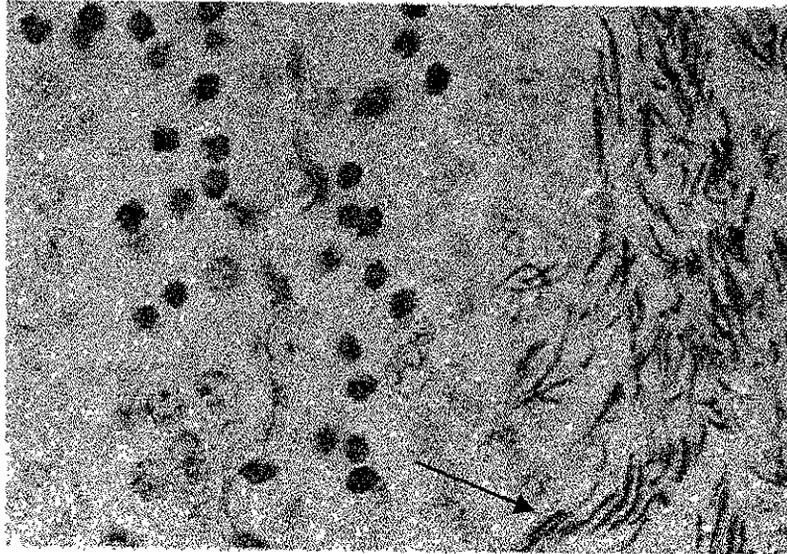


Figura 11. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 5, colectado en junio. La flecha indica espermatidas abundantes y espermatozoides (fase de progresión; hematoxilina – eosina; 845X).

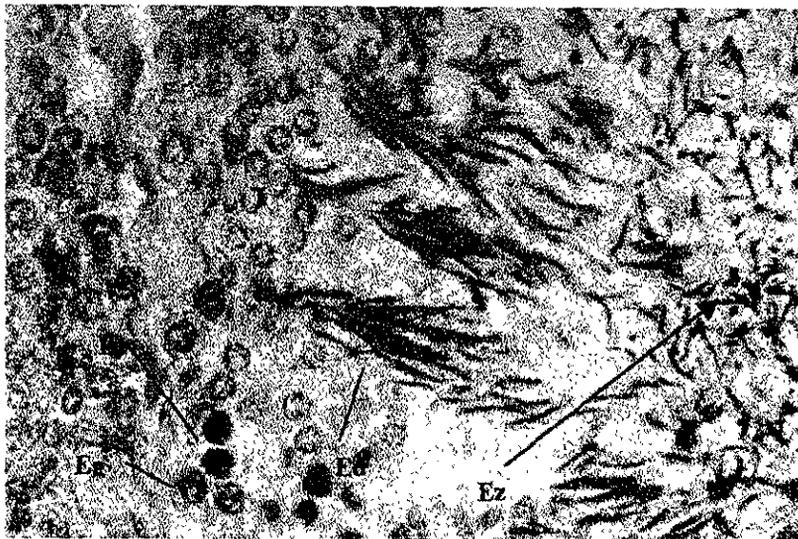


Figura 12.. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 6, colectado en agosto. La flecha señala abundantes espermatozoides en el lumen (máximo desarrollo espermatogénico; hematoxilina – eosina; 845X).

El estadio 6 se observó de julio a noviembre (figura 7). Los túbulos alcanzaron el mayor diámetro promedio observado, que fue de $171.73 \pm 37.58 \mu\text{m}$, este estadio se caracterizó por presentar un epitelio grueso constituido principalmente por escasas espermatogonias claras, cercanas a la lámina basal y de cuatro a cinco capas de

espermatoцитos primarios; abundantes espermátidas a manera de racimos, con el vértice dirigido a la región basal en varios grados de diferenciación, distribuidas en el citoplasma de las células de Sertoli. Hacia la luz del túbulo, sin una organización determinada y ocupándola por completo, había abundantes espermatozoides (figura 12, espermatozoides señalados con flecha).

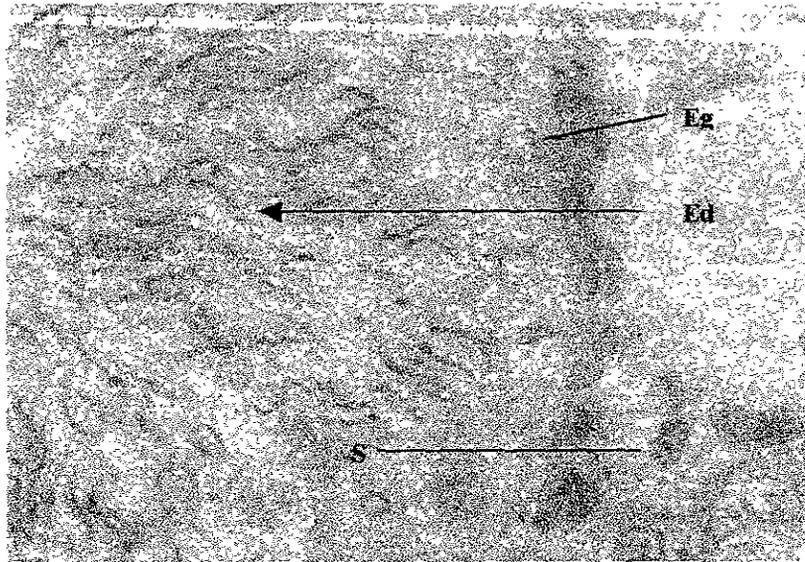


Figura 13. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 7, colectado en noviembre. El epitelio disminuye en diversidad y el elemento principal son espermátidas señaladas con flecha (regresión; hematoxilina – eosina; 845X).

En diciembre se observó el estadio 7 (figura 7), caracterizado por marcar el inicio de la regresión testicular. Los túbulos disminuyeron su diámetro promedio a $130.60 \pm 24.48 \mu\text{m}$. El epitelio disminuyó de espesor y en diversidad celular, las espermatogonias fueron escasas y se localizaron en la periferia de los túbulos (figura 13, marcado con flecha), alternando con los núcleos de las células de Sertoli que incluyeron abundantes espermátidas en espermiogénesis y espermatozoides maduros, éstos ocuparon la amplia luz de los túbulos.

En diciembre y enero se observaron individuos en la última fase del ciclo espermatogénico (figura 7), que corresponde al estadio 8, en el que el diámetro

promedio de los túbulos fue de $111.30 \pm 15.91 \mu\text{m}$, su contorno era irregular al cortarlos transversalmente. El epitelio se redujo a una capa de espermatogonias dispersas entre la base de las células de Sertoli, en las que se encontraron sus núcleos irregulares (figura 14, la amplitud del epitelio está señalado con la flecha de doble punta). Los espermatocitos primarios en leptoteno (E1) fueron escasos al igual que algunas espermatíidas en fases avanzadas de la espermiogénesis, restringidas a una parte del túbulo. La luz de los túbulos fue muy amplia, con algunos espermatozoides (Ez).

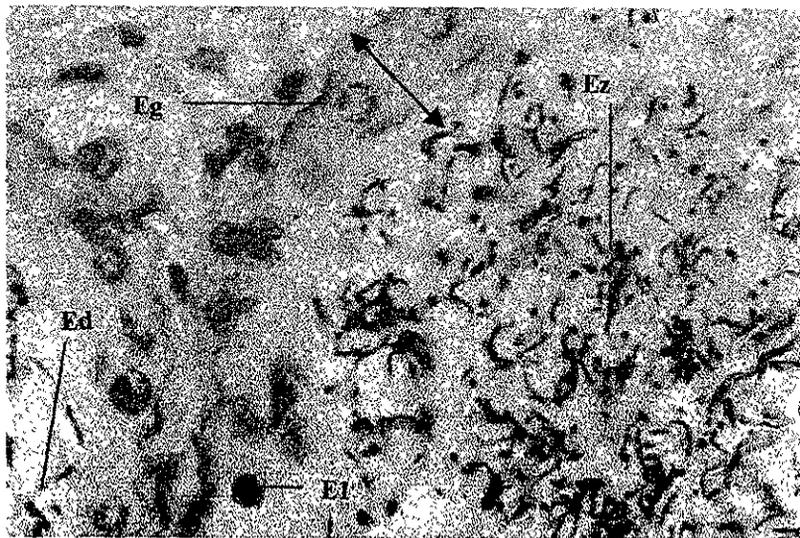


Figura 14. Corte de un túbulo seminífero de *K. leucostomum* en estadio 8, colectado en diciembre. La amplitud del epitelio se reduce a la capa de espermatogonias señaladas con la flecha (fase de quiescencia; hematoxilina – eosina; 845X).

Tres ejemplares que se colectaron, en enero, febrero y junio, tuvieron cordones testiculares con un diámetro promedio de $48.95 \pm 6.32 \mu\text{m}$. El epitelio germinal estaba constituido por espermatogonias claras (figura 15, marcadas con flecha) y células indiferenciadas, estos fueron individuos sexualmente inmaduros que estuvieron fuera de la clasificación de McPherson y Marion (1981).

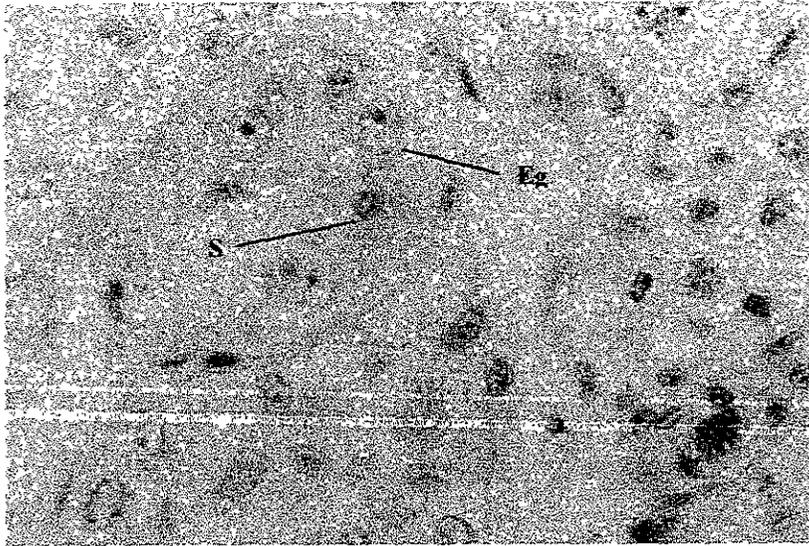


Figura 15. Corte de testículo de un ejemplar sexualmente inmaduro de *K. leucostomum*, colectado en febrero. La flecha señala a espermatogonias que son las únicas células de la línea espermatogénica (hematoxilina – eosina; 845X)

Características de las células de Leydig y del tejido intersticial

Los elementos más conspicuos del tejido intersticial, fueron las células de Leydig, de los cuales se analizaron las variaciones en la abundancia relativa y la morfometría del núcleo durante un ciclo anual (figuras 16 a 20).

Entre febrero y junio, los ejemplares presentaron la máxima densidad de células de Leydig, con un promedio de 106 ± 22 a 46 ± 22 células por campo; en febrero se observó la máxima densidad por mes, con 106 ± 22 células por campo, a partir de abril disminuyó a 85 ± 22 , hasta que en julio se encontró el promedio mas bajo, que fue de 28 ± 22 células por campo. De agosto a enero aumentó ligeramente la población y se mantuvo sin variaciones muy grandes entre 32 ± 22 y 47 ± 22 células por campo (figura 16). El análisis de residuos reveló heterocedasticidad y ausencia de normalidad en esta variable, por lo que el ANDEVA careció de consistencia.

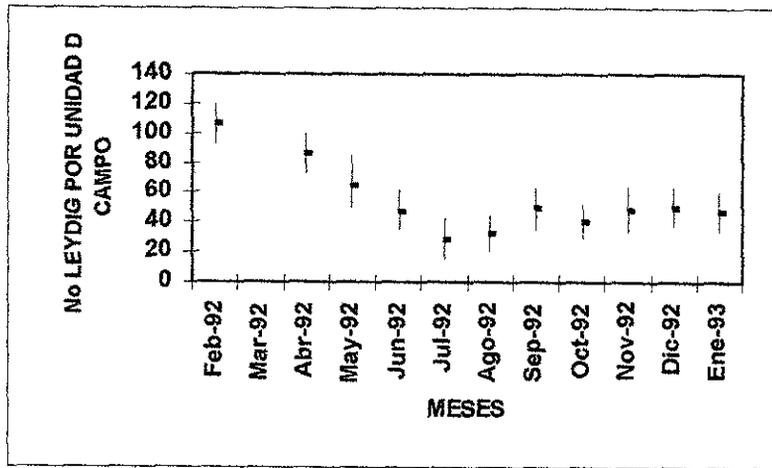


Figura 16. Densidad de las células de Leydig por muestra mensual, en el testículo de *K. leucostomum* en un año (cada punto representa la media y desviación estándar).

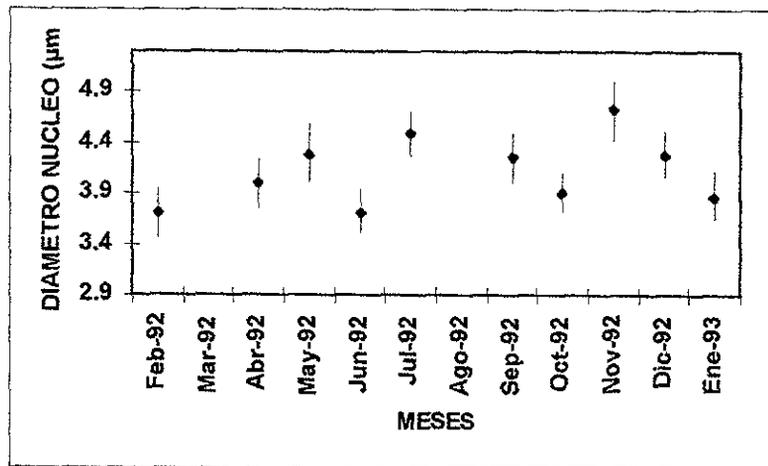


Figura 17. Diámetro del núcleo de las células de Leydig de *K. leucostomum* por muestra mensual en un ciclo anual (cada punto representa la media con la desviación estándar).

El diámetro del núcleo presentó cambios durante un ciclo anual. El mínimo se registró en febrero, con un valor promedio de $3.70 \pm 0.08 \mu\text{m}$. A partir de este mes, hubo un aumento gradual, en noviembre alcanzó el valor máximo que fue de $4.70 \pm 0.09 \mu\text{m}$, y se redujo en los meses siguientes entre 4.20 ± 0.07 y $3.8 \pm 0.07 \mu\text{m}$ (figura 17). Por medio del ANDEVA se mostró que existen diferencias significativas en el diámetro del núcleo de los ejemplares colectados durante el ciclo anual ($F_{9,890} = 17.163$, $p < 0.05$).

Se observó que hay mayor relación entre el estadio de madurez espermatogénica y el diámetro del núcleo, que con la densidad de las células de Leydig (cuadro 5). En el estadio 2, los núcleos tuvieron un diámetro promedio de $3.52 \pm 0.10 \mu\text{m}$, mismo que aumentó conforme avanzaron los estadios, alcanzando el valor máximo en los estadios 5, 6 y 7, con promedio de $4.30 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (figura 18). En el estadio 8 se observó una ligera disminución del diámetro a $4.12 \pm 0.10 \mu\text{m}$.

ESTADIO ESPERMATOGENICO	CELULAS POR CAMPO		DIAMETRO NUCLEO	
	PROM	ERROR EST.	PROM	ERROR EST.
2	36.80	1.655	3.52	0.10
3	52.00	2.983	3.60	0.10
4	61.17	4.104	3.78	0.06
5	61.66	5.514	4.30	0.04
6	41.95	2.177	4.29	0.05
7	52.30	2.749	4.30	0.11
8	42.10	3.513	4.12	0.10

Cuadro 5. Densidad y diámetro del núcleo de las células de Leydig en *K. leucostomum*, por estadio de madurez espermatogénica (los valores mostrados son media aritmética y error estándar).

Por el ANDEVA, se probó que existía una relación significativa entre el diámetro del núcleo de las células de Leydig y los estadios espermatogénicos ($F_{7,892} = 22.860$, $p < 0.05$). Por la prueba de Scheffé se caracterizaron tres grupos homogéneos, el primero integrado por los estadios 2, y 3, y el segundo por 5, 6 y 7 (figura 19, células con un máximo desarrollo nuclear y citoplásmico). Los datos fueron similares en los estadios 4 y 8, los cuales integraron el tercer grupo (figura 20, células con mínimo desarrollo nuclear, citoplasma vacuolado y gran cantidad de fibras intercelulares).

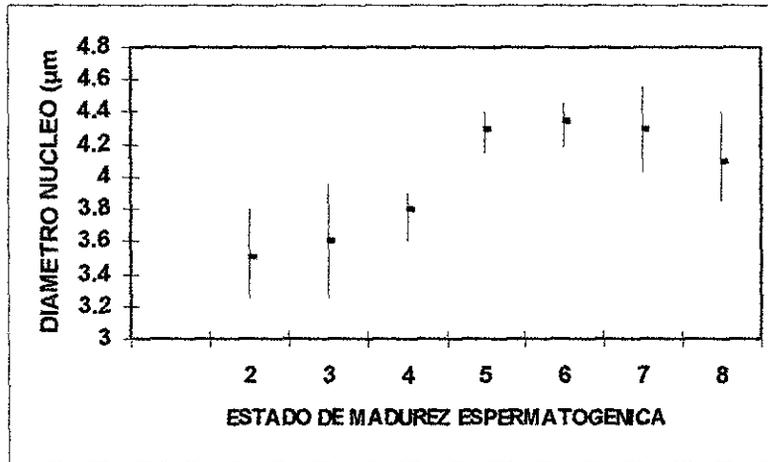


Figura 18. Variación del tamaño nuclear de las células de Leydig de *K. leucostomum*, por estado de madurez espermatogénico (cada punto representa la media y desviación estándar).

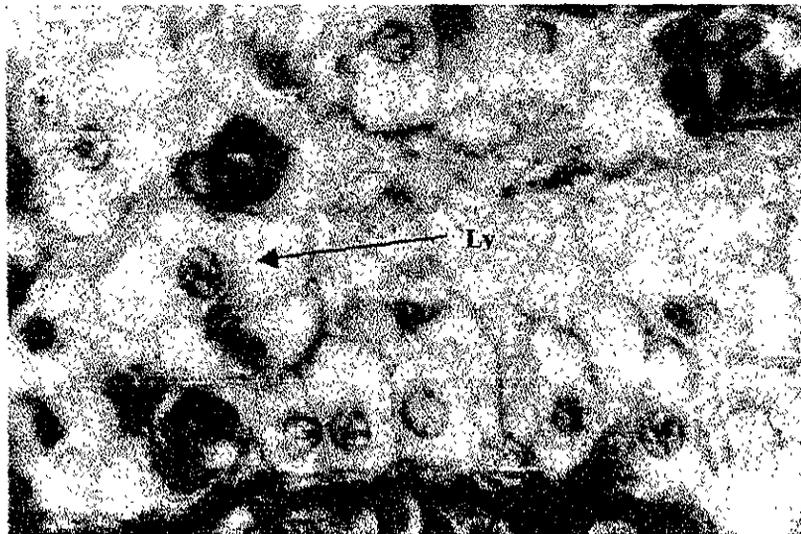


Figura 19. Aspecto de las células de Leydig [flecha] en *K. leucostomum* en el estadio 6 (colectado en julio). Se observan células [flecha] con un núcleo grande y esférico, con la cromatina en grumos y se aprecia un nucléolo grande; el citoplasma es muy amplio; las células son muy abundantes y ocupan casi todo el intersticio, hay muy pocas fibras presentes (Mallory; 850X).

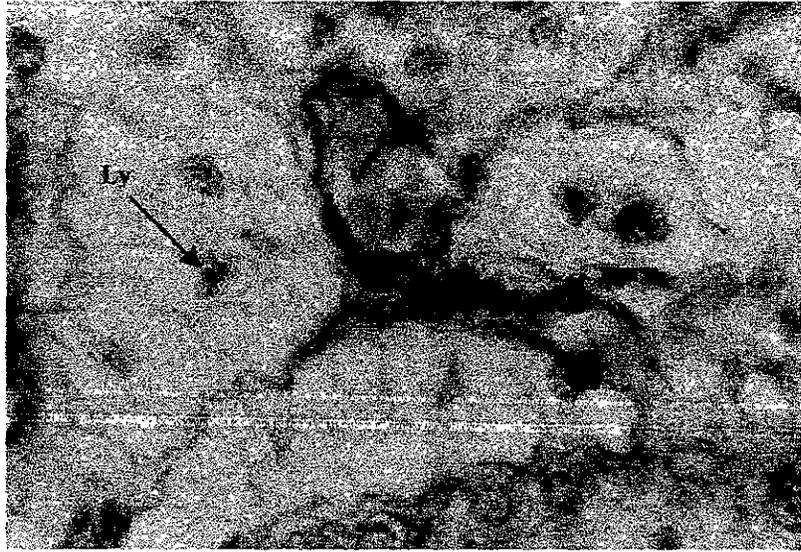


Figura 20. Aspecto de las células de Leydig [flecha] en *K. leucostomum* en el estadio 8 (colectado en diciembre). Se observa que las células tienen un núcleo de forma irregular, el nucléolo es poco visible; el citoplasma está muy reducido y vacuolado; las células son escasas agrupándose en nidos celulares principalmente en áreas cercanas a los vasos sanguíneos el intersticio es amplio y cubierto por una gran cantidad de fibras (Mallory; 850X).

Otros elementos del intersticio

Otros constituyentes del estroma testicular fueron los fibroblastos y los haces de fibras de colágeno de la matriz extracelular, las cuales se evaluaron en el intersticio testicular mediante una escala ordinal, tomando en cuenta su abundancia, definida por la afinidad tintórea y los cambios que experimentaron las células y los haces de fibras durante el año. De octubre a enero los ejemplares presentaron un intersticio con tejido conectivo denso irregular (figura 20), mientras que de febrero a septiembre aumentó su laxitud, y en dos de tres individuos llegó al mínimo en el mes de septiembre (figura 19). Sin embargo, en abril y junio en dos individuos el tejido conectivo fue denso.

Características del epidídimo durante un ciclo anual

El epidídimo estuvo formado por una serie de conductos ampliamente contorneados, los cuales estuvieron cubiertos por una cápsula de tejido conjuntivo denso regular con un espesor de 10 a 50 μm . Con base en el diámetro y estructura histológica

se identifican tres tipos de túbulos: a) los conductos eferentes, b) los conductillos epididimarios y c) los conductos epididimarios.

a) - Los conductos eferentes según Fox (1977) se comunican con el testículo y los describió, como conductos de luz amplia, con un epitelio plano monoestratificado, no se lograron identificar en los ejemplares estudiados.

b) - Conductillos epididimarios. Fueron los túbulos de menor diámetro que se pudieron localizar en el cuerpo del epidídimo. El diámetro promedio varió durante el año entre 21.60 ± 3.53 y 45.10 ± 7.05 μm . De enero a junio, presentaron un diámetro promedio de 21.60 ± 3.53 a 32.80 ± 4.58 μm , mientras que de julio a diciembre fue mayor a 30.00 μm , con valores máximos de 38.98 ± 4.71 μm en agosto y septiembre (figura 21).

Su epitelio fue cúbico tenía estereocilios largos, con una altura promedio de 5.50 ± 0.83 a 11.70 ± 1.23 μm . En los individuos inmaduros y en los que presumiblemente presentaron su primer ciclo de maduración espermatogénica, la altura del epitelio fue de 5.20 ± 0.42 μm .

Las características del epitelio no presentaron cambios aparentes en el tamaño ni en la estructura, en el curso de un año. En estos túbulos se observaron espermatozoides durante todo el año, aunque de octubre a enero aumentó el número de túbulos que los contenían. En un ejemplar se observó esta condición desde agosto.

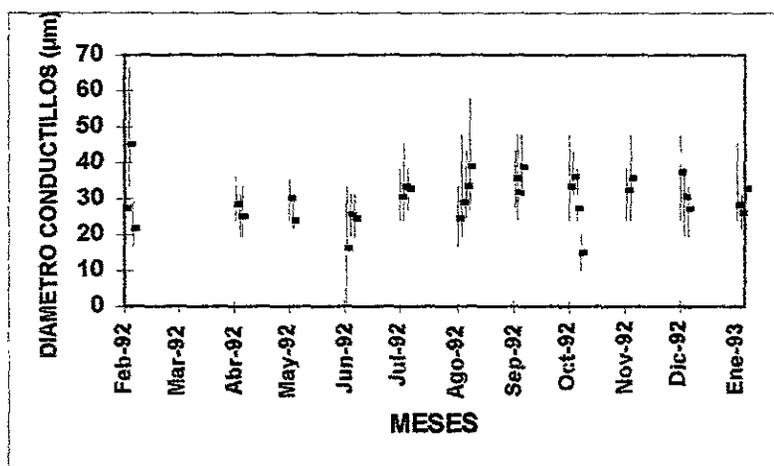


Figura 21. Variación del diámetro de los conductillos epididimarios *K. leucostomum* colectados durante un año (los puntos representan media y desviación estándar por ejemplar).

c) - Conductos epididimarios. Se analizaron con dos métodos, el clásico que fue la medición del diámetro de los conductos que proporcionó los siguientes resultados: Fueron los túbulos con el diámetro mayor que varió durante el año entre 97.4 ± 39.5 y $812.4 \pm 202.7 \mu\text{m}$, aunque en algunos individuos alcanzó un diámetro máximo de $1185.0 \mu\text{m}$.

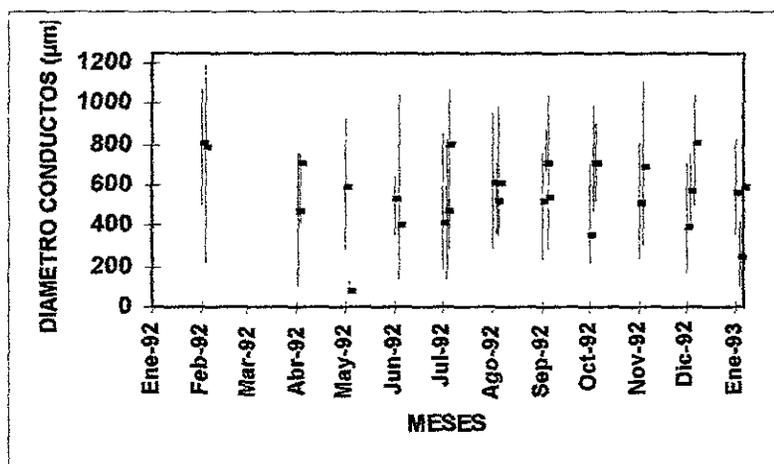


Figura 22. Variación del diámetro de los conductos epididimarios de *K. leucostomum* colectados en un año (los puntos representan media y desviación estándar por ejemplar).

Durante la mayor parte del año los conductos epididimarios presentaron diámetro amplio, que fue de los 240.0 a 880.0 μm . En la figura 22 se observa que de febrero a julio el diámetro promedio tuvo una tendencia a disminuir, y de agosto a noviembre a incrementar. En mayo, octubre y enero hubo individuos con el menor diámetro tubular. Los conductos epididimarios tuvieron un epitelio cilíndrico, con estereocilios cortos, cuya altura varió entre 7.0 y 40.0 μm . La altura del epitelio y la posición de los núcleos dentro de las células se modificó en el transcurso del año, por esto se estableció el siguiente cuadro de clasificación:

Estadio	Tipo de epitelio	Dimensión (μm)
1	cúbico	8.05 \pm 1.15
2	columnar, núcleo basal	21.70 \pm 3.31
3	columnar, núcleo central	19.90 \pm 3.63
4	pseudoestratificado	23.45 \pm 5.51
5	pseudoestratificado más alto	40.00 \pm 5.50

Cuadro 6. Clasificación del epitelio de los conductos epididimarios de *Kinosternon leucostomum*.

Con el método implementado, se calculó la proporción con base en el porcentaje de espermatozoides contenidos en los túbulos de un corte histológico, con respecto al área total del epidídimo de un mismo corte. Como se puede apreciar en la figura 23, la cantidad de espermatozoides presentes en los conductos epididimarios fue variable, sin embargo, los valores mensuales mayores se encontraron de julio a diciembre, que varió entre 47.48 % y 60.87%.

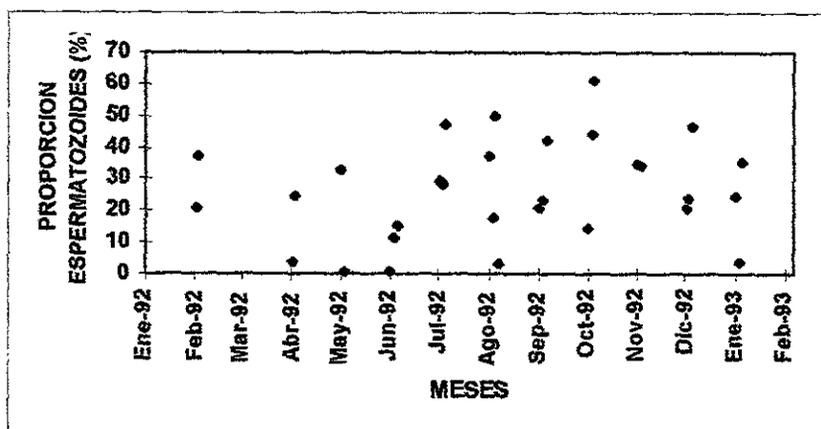


Figura 23. Proporción de espermatozoides observados en el epidídimo de *K. leucostomum*, en el curso de un año, cada punto representa el valor porcentual de un ejemplar.

Tomando en cuenta los ejemplares con el máximo contenido de espermatozoides por mes, se observó que en octubre los túbulos con espermatozoides representaron el 61.00% del área total del epidídimo, seguidos por julio, agosto y diciembre. De enero a junio, la proporción se mantuvo menor a 35%, con excepción de un organismo colectado en febrero que tuvo un valor de 37.07%, y en junio el máximo fue de 15.05%. Entre los ejemplares en los que se observaron cantidades menores de espermatozoides estuvieron los que aparecen en la gráfica 23, que tuvieron las siguientes características: el de abril presentó su primer ciclo de actividad espermatogénica, los de mayo, junio y agosto fueron individuos de talla baja, y el de enero fue un macho de gran tamaño, pero con pocos espermatozoides almacenados.

En la figura 24, se observa que los conductos del epidídimo estaban completamente llenos de espermatozoides durante el otoño, y que presentaron un epitelio cúbico. En este período hubo espermiación. En la figura 25, se observa el estado

de los conductos que mostraron hipertrofia del epitelio, y baja cantidad de espermatozoides a mediados del verano, cuando se produce el apareamiento.

Con esta metodología se logró identificar de manera clara la época en que los ejemplares presentaron mayor o menor cantidad de espermatozoides almacenados.

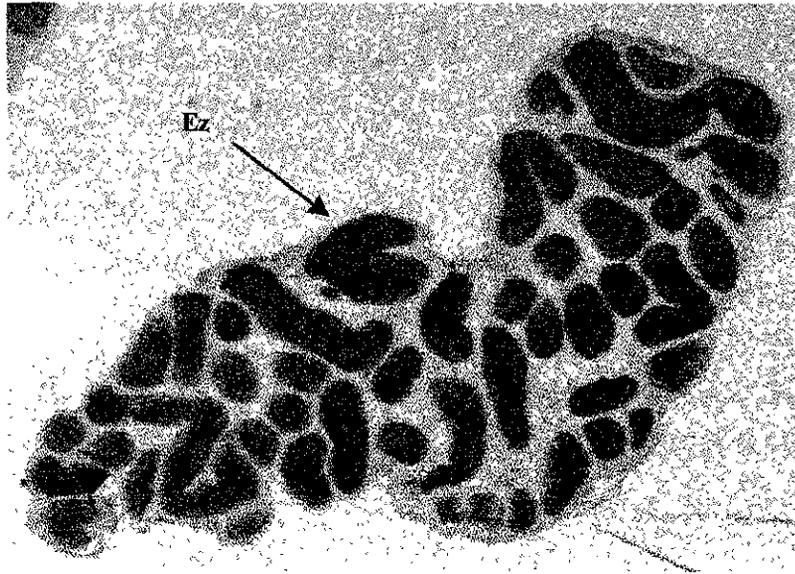


Figura 24. Corte de epidídimo de *K. leucostomum* capturado en octubre, en el que se observa el máximo contenido de espermatozoides almacenados [flecha](hematoxilina – eosina; 125X).

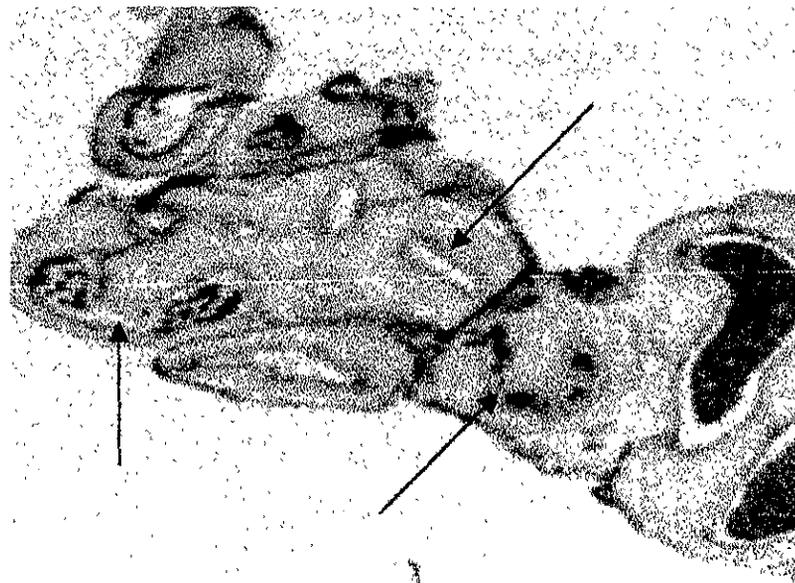


Figura 25. Detalle de un corte de epidídimo de *K. leucostomum* colectado en julio, se observa la reducción en los espermatozoides almacenados [flecha] y la hipertrofia del epitelio en los conductos que se vaciaron [e] (hematoxilina eosina; 500X).

Residuos celulares en testículo y epidídimo

En los túbulos seminíferos se observaron detritos celulares en cantidad variable, con una clara definición estacional. De abril a septiembre todos los individuos presentaron restos celulares, disminuyó su abundancia en octubre y noviembre, y desaparecieron en los meses de diciembre, enero y febrero.

Por otra parte, se observó que en los conductos del epidídimo, de abril a septiembre la cantidad de detritos celulares fue variable, pero en general fueron escasos, mientras que en febrero y de octubre a enero no se presentaron en todos los individuos.

Relación entre la talla y la madurez sexual de los individuos

Los machos estudiados tuvieron una longitud del carapacho (LC) que varió entre 98.5 y 166.7 mm, en los que se observó que los individuos con LC de 98.5, 120.7 y 125.7 mm no presentaron actividad espermatogénica, ni espermatozoides en el epidídimo.

De los machos con una LC de 125.1, 127.4 y 127.8 mm, se observó, que a pesar de tener talla baja, presentaron espermatogénesis activa. En el que tuvo 127.4 mm de LC, los conductos y conductillos del epidídimo tuvieron espermatozoides, mientras que en los otros dos hubo espermatogénesis, pero un análisis detallado del epidídimo completo reveló ausencia de espermatozoides, y poco desarrollo de los conductos y conductillos epididimarios, en los cuales el epitelio fue cúbico, el diámetro reducido a $15.0 \pm 4.0 \mu\text{m}$ y la luz estuvo ausente.

DISCUSIÓN

Se analizaron diferentes características y medidas del testículo y del epidídimo, para encontrar aquellas que ayudaran a describir de manera clara el desarrollo de la espermatogénesis en *K. leucostomum*, así como la relación de este proceso con el ciclo reproductor. Se discuten los resultados de las diferentes variables que fueron consideradas de manera aislada por algunos autores, como indicadores del ciclo espermatogénico, como el volumen, el peso, el diámetro máximo del testículo y el índice somático gonadal, calculado a partir del peso o de la longitud de las gónadas (Legler, 1960; Moll y Legler, 1971; Kuchling, 1988 y Mahmoud y Cyrus, 1992 entre otros). No hay consenso respecto a cuál de estas medidas es un mejor indicador del ciclo espermatogénico, y el que cada autor registre la medida de su elección, dificulta el establecer comparaciones entre los ciclos de las poblaciones y entre las especies. Es importante mencionar que los estudios se han hecho principalmente, en especies de zonas templadas, en donde aparentemente los ciclos espermatogénicos individuales están sincronizados en la población, esto es, para un mes dado todos los organismos presentan el mismo estadio espermatogénico y un desarrollo de las gónadas similar.

El color del testículo en *K. leucostomum* fue generalmente amarillo cremoso, aunque en algunos individuos fue más oscuro, es probable que esta diferencia esté asociada con el cambio que se observó en la vascularización de la túnica albugínea durante el año, pero que no fue cuantificada debido a que se eliminó para obtener una fijación óptima de las estructuras de los órganos. Al igual que en esta especie, la coloración fue descrita como amarilla cremosa en los testículos de otros quelonios como

Emydoidea blandingii, *Trachemys scripta* y *Clemmys insculpta* (Fox, 1977). Con relación al cambio de coloración del testículo, algunos autores han propuesto que puede ser utilizado como un indicador del grado de madurez espermatogénico.

La forma del testículo fue elíptica, en tanto en los individuos sexualmente inmaduros, como en los adultos, lo cual sugiere que la forma se mantiene constante durante el ciclo espermatogénico, y a lo largo de su vida. En contraste con estos resultados, algunos autores han observado que la forma del testículo puede modificarse durante el ciclo espermatogénico, como en el caso de *Terrapene o. ornata* (Legler, 1960) en que se torna casi esférico al alcanzar la máxima espermatogénesis, lo que sugiere que en los adultos de esta especie, la longitud del testículo es constante y lo que se modifica es el diámetro menor.

Por el análisis morfométrico gonadal en *K. leucostomum*, se observó que los testículos de un individuo no tuvieron el mismo tamaño, considerando el peso y el volumen, que por lo tanto mostraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, las variaciones en el tamaño no fueron constantes. La diferencia en la talla, considerada como peso e ISG entre los testículos derecho e izquierdo, se acentuó a medida que los testículos aumentaron de tamaño, siendo en algunos casos de más del doble e independientes del tamaño de los ejemplares y del grado de madurez espermatogénica. No se pudo identificar la causa de esta variabilidad, pero sería conveniente tomarla en cuenta en futuros análisis.

De todas las medidas del testículo completo, el peso fue el único con el que se logró establecer comparación con otras especies. En *K. leucostomum* tuvo dos valores máximos, de julio a agosto y de noviembre a diciembre siendo el segundo el de mayor

magnitud, con valores superiores a 0.70 g, y un valor mínimo de 0.06 g entre enero a marzo. Este patrón es semejante a lo registrado por Moll y Legler (1971) en la especie panameña *Trachemys scripta*, con relación a la época del año en que se presentan los valores máximo y mínimo y por un largo periodo, en que los testículos son grandes, siendo distinto a lo descrito en otras especies de tortugas.

El tamaño del testículo varió de diferente manera respecto al peso, el volumen y el ISG, pero se desconoce la causa, y no se encontraron referencias de que ocurra algo semejante en otras especies de tortugas, debido a que la mayoría de los investigadores extrajeron sólo uno de los testículos, consideraron el valor conjunto de estos órganos, o reportaron solo una de las dimensiones. Se observó que el análisis estadístico por ANDEVA sólo fue válido para el peso testicular y el ISG, debido a la ausencia de normalidad y homocedasticidad en el volumen. Por los resultados obtenidos, se propone que en investigaciones futuras se debe ser cuidadoso en la elección del tipo de análisis que se aplica a los datos, ya que es común asumir que los supuestos de los modelos estadísticos empleados se cumplen y no lo comprueban.

En las curvas descritas por las tres variables, se observó que los valores máximo y mínimo no coincidieron en los mismos meses, como podría esperarse por estar estas variables relacionadas, sólo el peso y el ISG siguieron una trayectoria análoga. Resultados semejantes fueron obtenidos por Mahmoud y Cyrus (1992), en su estudio de la especie *Chelydra serpentina*, en la que se observó que el ISG tuvo un comportamiento similar al mostrado por el peso del testículo, aunque en este trabajo no se tomó en cuenta las otras medidas.

Estos resultados apoyan la idea de que para el análisis reproductor, el peso del testículo es una variable más confiable que el volumen, no obstante, habría que determinar la causa de sus diferencias, para hacer un análisis más sólido.

El diámetro de los túbulos seminíferos (DTS), al igual que el peso e ISG, presentaron sus valores mayores en julio y agosto, sin embargo, la mayor parte de las curvas siguieron una trayectoria diferente, ya que los valores altos de peso y volumen observados en noviembre, no se presentaron en la misma época en la que se observó la del DTS. Por otra parte, los cambios en el peso, el volumen y el ISG fueron abruptos, y los del DTS graduales.

Por el análisis de comparación múltiple de Scheffé, aplicado a las cuatro variables tratadas, no se lograron definir grupos, debido a que la prueba estadística supone la existencia de una homogeneidad intragrupo, que en este caso, no existió debido a que la madurez espermatogénica fue distinta en los ejemplares colectados cada muestra. Con el mismo tipo de análisis, se demostró una clara correlación entre el DTS y el estadio de madurez espermatogénica, que no se identifica al analizar los datos por colecta. El DTS aumentó por el engrosamiento del epitelio a la activación de la división mitótica de las espermatogonias y la meiótica de los espermatoцитos.

Al considerar el DTS del último y del primer estadio espermatogénico, se observó que en el estadio 8 ($111.30 \pm 15.90 \mu\text{m}$) fue el doble del 2 ($57.00 \pm 9.12 \mu\text{m}$), lo que podría deberse a una regresión incompleta de los túbulos en el estadio 8, que es el último del ciclo espermatogénico y el que 2 correspondiera al inicio del ciclo, posterior a la quiescencia. Esto difirió con lo que ocurre en otras especies como *Testudo h. hermanni* (Kuchling, 1982), *Chelydra serpentina* (Mahmoud y Cyrus, 1992) y *Sternotherus*

odoratus (Mendoza y Licht, 1986), en las cuales, durante la regresión espermatogénica el DTS se reduce al mínimo presente al inicio y al final del ciclo. Por la restricción mundial que existe para la colecta de quelonios, el tamaño de muestra fue insuficiente para discriminar si el estadio 1 existe o si el 2 es el primero del ciclo, la regresión de los túbulos fue incompleta como lo propuso Moll (1979) con respecto a las especies que viven en zonas tropicales, con poca variación de la temperatura. Otra posibilidad sería que el estadio 1 fuera muy corto y sólo se pudiera encontrar haciendo muestreos a intervalos menores de un mes. Flores-Villela y Zug (1995) al estudiar el ciclo reproductor de *Claudius angustatus* en una región cercana al de este estudio en el estado de Veracruz, identificaron, por un sistema de clasificación distinto al empleado en *K. leucostomum*, el mínimo desarrollo espermatogénico, en una etapa equivalente al estadio 2.

El análisis de la abundancia de los tipos celulares, resultó más informativo que la morfometría testicular, ya que se lograron caracterizar cuatro etapas de la espermatogénesis por lo que sugiere que el inicio de la **recrudescencia** testicular se produjo en diciembre, con la multiplicación de las espermatogonias, que al aumentar en número alcanzaron una población máxima en febrero. En abril y mayo, con la presencia de mayor cantidad de espermátocitos primarios, continuó la recrudescencia, que se prolongó hasta la época de sequía que ocurrió de abril a junio, El hallazgo de espermátidas durante todo el año sugirió que la **espermiogénesis** es continua, con un máximo en julio y agosto, en tanto que la menor abundancia de los espermátocitos primarios y espermátidas en diciembre y enero podría deberse a que la **regresión** y **quiescencia** testicular sean muy breves.

Por no encontrarse trabajos en los que se analizara la abundancia de los tipos celulares del proceso espermatogénico, en quelonios, en ciclos anuales, fue imposible establecer si existe un comportamiento similar en otras especies. La frecuencia de los tipos celulares se ha utilizado por algunos investigadores en la descripción histológica del ciclo espermatogénico en forma parcial, ya que sólo citan el número de capas de un tipo de células germinales y en meses determinados, sin abarcar el ciclo anual. Entre los trabajos de este tipo se pueden citar los realizados en especies como *Terrapene o. ornata* (Legler, 1960), *Trachemys scripta* (Moll y Legler, 1971) y *Chelydra serpentina* (Mahmoud y Cyrus, 1992). Los estudios completos sobre la abundancia de los tipos celulares espermáticos, fueron los realizados en lagartijas de las especies *Tarentola mauritanica* (Angelini et al., 1983) y *Sceloporus mucronatus* (Estrada-Flores et al., 1990; Méndez de la Cruz et al., 1994). La escasez de información sobre la variación de los tipos celulares espermatogénicos, durante el año, en reptiles, podría deberse a que es una técnica de análisis reciente, y poco difundida, sin embargo, es un auxiliar útil en la definición de las fases mas generales del ciclo espermatogénico que puede complementar la clasificación propuesta por Licht (1984).

Con base en el estudio del ciclo del epitelio seminífero de McPherson y Marion (1981), se identificaron en *K. leucostomum*, siete estadios. Tomando en cuenta la relación con el DTS, se observó que se inició el ciclo espermatogénico en octubre, en el que se encontró la recrudescencia testicular típica de los estadios 2 y 3, que se prolongó hasta enero. De febrero a noviembre la espermiogénesis fue activa, lo que caracterizó a los estadios 4, 5 y 6, y alcanzó el máximo entre julio y noviembre en el estadio 6. En diciembre se presentó la regresión típica del estadio 7, y de diciembre a enero una breve

quiescencia, del estadio 8. Resultados semejantes fueron encontrados por Moll y Legler (1971) en Panamá, para *K. leucostomum*, en un estudio realizado durante siete meses, en 12 ejemplares, en los que reconocen “...una espermatogénesis casi continua y un breve periodo de quiescencia que incluye el mes de enero.”

Por los resultados histológicos del estudio del testículo se demostró la presencia de cambios espermatogénicos cíclicos en los individuos de esta especie y que, el proceso no es sincrónico en todos los individuos de la población, lo cual se hizo más evidente en el mes de octubre, en el que se registraron cuatro de los siete estadios de la clasificación. De la misma manera Flores-Villela y Zug (1995) registraron más de un estadio espermatogénico en la muestra de un mismo mes, en *Claudius angustatus*. Lo antes expuesto, permite suponer, que la espermatogénesis en la población sea potencialmente continua, ya que mientras algunos individuos terminaron el ciclo, otros lo iniciaron. Este comportamiento espermatogénico podría ser una estrategia reproductora acoplada al ciclo sexual continuo de las hembras de esta especie (Morales –Verdeja y Vogt, 1997b).

La espermatogénesis de *K. leucostomum* difiere de la caracterizada en especies de zonas templadas, por el análisis de Moll (1979), en las cuales se inicia en la primavera, y no como sucede en *K. leucostomum* en otoño e invierno, que presentó el pico espermatogénico al final del otoño y no del verano, como ocurre en las demás especies, y la época de apareamiento en la mayoría de éstas se realiza en primavera, mientras que en *K. leucostomum* se realizó principalmente en el verano.

En la mayoría de las especies descritas por otros autores, el ciclo espermatogénico es breve, a excepción de *Chelodina steindachneri* (Kuchling, 1988) que presenta la espermatocitogénesis y espermiogénesis más larga que dura nueve

meses. En *Claudius angustatus* (Flores-Villela y Zug, 1995), se propuso un ciclo espermatogénico largo, sin embargo, en este estudio no se describió la mayoría de las fases del ciclo espermatogénico y sólo se analizaron 7 meses del año, mientras que en *K. leucostomum* los dos procesos se realizaron en 11 meses.

Por lo tanto, se sugiere que en investigaciones futuras del ciclo espermatogénico de quelonios, incluyan los datos del peso y volumen de los testículos, ISG, DTS, evaluación histológica de la condición espermatogénica y evaluación de las características histológicas del epidídimo durante un ciclo anual e información climática de la región, para evitar la introducción de sesgos en la interpretación de los resultados, obtenidos en especies en las que se presume que el ciclo espermatogénico no es sincrónico en los individuos de la población, ya que la interpretación es más complicada. Con estos datos se lograrían estudios más sólidos de los ciclos, lo que facilitarían la comparación inter e intraespecífica

El inicio de la espermatogénesis, en algunos casos pudo ser en octubre cuando la temperatura y el fotoperiodo mostraron un descenso gradual, lo mismo que la precipitación pluvial, que llegó al máximo en septiembre. En los individuos que en enero se encontraron en la última fase del ciclo espermatogénico, se debió iniciar en febrero, cuando el fotoperiodo incrementa y la precipitación empieza a disminuir. Licht (1984) consideró que en la mayoría de los reptiles el aumento de la temperatura puede ser un requisito para la recrudescencia, lo que explicaría el inicio del ciclo al principio del año, pero no el que se presentara al final del año, cuando los factores climáticos, fueron adversos.

Morales-Verdeja y Vogt (1997a) encontraron que en esta región *K. leucostomum* pueden estar en la época seca del año, que varía de acuerdo con el nivel de agua alcanzado por ríos, lagunas y arroyos lo que podría relacionarse con la observación de restos celulares diferentes a los cuerpos residuales en los túbulos seminíferos, principalmente en la época seca, y de abril a septiembre en los epidídimos. Este tipo de restos celulares también fueron identificados en las especies de tortugas *Chelydra s. serpentina* (White y Murphy, 1973); *Chrysemys picta* (Ernst, 1971); *Trachemys scripta* (Moll y Legler, 1971) y *Testudo h. hermanni* (Kuchling, 1982), y en las lagartijas *Podarcis sicula campestris* (Angelini et al., 1979) y en *Tarentola mauritanica* (Angelini et al., 1983). Los autores citados coincidieron en que las temperaturas extremas, inducen la involución de varias generaciones de espermatoцитos y espermátidas, mientras que las espermatogonias sólo dejan de dividirse. Una posible consecuencia de este fenómeno en la época estival, sería el que la población se encuentre en progresión testicular durante un periodo de cinco meses, que culmina, al aumentar la precipitación. De acuerdo con Angelini y Picariello (1975), el “reposo” espermatogénico provocado por la época seca, ubica a *K. leucostomum* con una espermatogénesis de tipo termoxeranfotérica con un “hiato secundario”, en el que se interrumpe la transformación de las espermatogonias en espermatoцитos primarios, que se presenta en la época seca del año.

En el tejido intersticial se observó, que la cantidad de células de Leydig varió durante el año en relación inversa a la evolución del ciclo espermatogénico, puesto que la proporción fue menor cuando el pico espermiogénico llegó a su máximo, durante la recrudescencia testicular. Lofts (1977) y Moll (1979) encontraron que en tortugas de zonas templadas las células de Leydig fueron más abundantes en la quiescencia, y en *K.*

leucostomum se observó al inicio de la recrudescencia, como sucede en *Testudo h. hermanni* (Kuchling, 1982). En un estudio parcial con *K. leucostomum* y *Rhinoclemys funerea* en Panamá, Moll (1979) supuso que debido a la quiescencia germinal corta, las células de Leydig podrían ser más abundantes en otra época del ciclo, y diferir con las especies de zonas templadas.

Por otra parte, se observó que el diámetro máximo del núcleo y de las células de Leydig se obtuvo al mismo tiempo que se alcanzó la madurez espermatogénica, característica de los estadios 5, 6 y 7 en el que se inicia la regresión. La cantidad de citoplasma y del diámetro nuclear mayor podría señalar, una intensa actividad secretora de éstas células, que disminuyó en la recrudescencia típica de los estadios 2 a 4 y en la quiescencia representada por el estadio 8, en donde fueron mínimos. Este patrón es inverso al registrado por McPherson y Marion (1981) en *Sternotherus odoratus*, en el cual, la hipertrofia se presenta durante los estadios 2 a 4, del mismo sistema de clasificación. Lo anterior es un concepto generalizado en la mayoría de los quelonios (Licht, 1984; Lofts, 1977; Moll, 1979).

Como la abundancia de las células intersticiales fue mayor cuando el diámetro del núcleo fue mínimo se consideró que la medición del número de éstas células no es un parámetro adecuado para evaluar su actividad en *K. leucostomum*, ya que involucra los sesgos citados por Licht (1984), quien consideró el que las poblaciones celulares no cambien de tamaño, y las diferencias se deban al aumento de diámetro de los túbulos seminíferos, y de las mismas células.

En el epidídimo se observaron espermatozoides durante todo el año, pero la mayor cantidad se presenta durante el pico espermatogénico, época en la que el epitelio

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

de los conductos fue cúbico, de lo que se dedujo que el máximo de espermiación se presentó de julio a octubre. El contenido de espermatozoides fue bajo, de noviembre a junio y el epitelio de los túbulos fue más grueso de abril a octubre, por estos datos se dedujo que en esta última época del año, copulan la mayor parte de las tortugas. De acuerdo con estos resultados, Morales-Verdeja (1991) al analizar la proporción de machos y hembras capturados mensualmente, identificó que el mayor sesgo hacia los machos estuvo entre junio y julio, lo que interpretó como un mayor movimiento de los machos en busca de las hembras para aparearse. Morales-Verdeja y Vogt (1997a) con base en la presencia de hembras grávidas y nidos encontrados en el campo, plantearon que la época de anidación es principalmente de mediados de agosto a mediados de marzo, lo que concordó con las características del ciclo espermatogénico. El que en *K. leucostomum* se acumulen espermatozoides en el verano, y se utilicen al año siguiente desde la primavera, permite clasificarla en un patrón reproductor postnupcial.

La madurez sexual se encontró cuando la longitud recta del caparazón alcanzó una talla promedio de 126.2 ± 1.4 mm. En dos individuos con una talla de 127.8 mm y peso de 300 g, uno estuvo en estadio 2, en el que no hubo espermatozoides en el epidídimo por lo que se supuso debió iniciar la espermatogénesis, y el otro se encontró en el estadio 6, con espermatozoides en los epidídimos por lo que debió iniciar la espermatogénesis el año anterior. Por otra parte, un ejemplar inmaduro tuvo una longitud del caparazón de 125.7 mm y pesó 268 g y un adulto de 128.8 mm con 250 g de peso. Los datos mencionados son contradictorios con lo sugerido por Congdon and Gibbons, 1990; Ford and Seigel, 1994; Gibbons et al., 1981 entre otros, quienes propusieron que el estado de nutrición de los individuos influye de manera importante

en su madurez, sin embargo, los resultados sugieren que la maduración es variable y que son muchos los factores que la dirigen, y que el peso en tortugas puede no ser un buen indicador del estado nutricional de los ejemplares debido a que pueden sufrir fácilmente deshidratación que influye directamente en el peso, alterando los resultados. Moll y Legler (1971), observaron que *K. leucostomum* en Panamá madura a una LC de 115 mm, lo que sugiere que esta especie presenta variación latitudinal, observando maduración a una talla menor conforme la población está más cercana al ecuador.

CONCLUSIONES

Las características morfométricas y gravimétricas del testículo, no fueron suficientes para determinar el ciclo reproductor de *K. leucostomum*.

El tamaño del testículo estuvo correlacionado con el tamaño del individuo.

El testículo derecho en general fue mayor que el izquierdo aunque las diferencias fueron variables entre los órganos de los mismos ejemplares.

El peso de los testículos tuvo una mayor correlación con el proceso espermatogénico que el volumen y el ISG, que fueron heterocedásticos o no siguieron un patrón lineal, por lo que su análisis estadístico debe ser cuidadoso.

El diámetro de los túbulos seminíferos tuvo una relación directa con la madurez espermatogénica, por lo tanto se consideró que esta variable es importante en el estudio del ciclo del epitelio seminífero.

El análisis del número de capas por tipo celular del epitelio seminífero, permitió definir cuatro fases del ciclo espermatogénico, sin embargo, la técnica no logra establecer con precisión el inicio y el término del proceso, y fue poco sensible para identificar los periodos de interrupción de la espermatogénesis debida a condiciones climáticas extremas.

La estructura histológica de los testículos cambió gradualmente durante el ciclo anual, y permitió caracterizar siete de los estadios, de la clasificación histológica de McPherson y Marion.

La recrudescencia testicular se inició entre el otoño e invierno, en sincronía con el descenso de la temperatura media mensual y de la precipitación pluvial. El

máximo nivel de espermiogénesis se presentó entre el final del verano y principio del otoño. La regresión testicular se identificó al final del otoño y una quiescencia parcial, al inicio del invierno.

En la época seca esta especie puede estar, lo cual tendría como consecuencia una "estasis" de la espermatogénesis en la época más cálida del año, que sugirió un ciclo espermatogénico termoxeranfotérico.

Es probable que la espermatogénesis se inicie al menos un mes antes de la época seca, como una estrategia reproductora que permita llegar a los individuos al periodo estival con un proceso espermatogénico avanzado.

El patrón espermatogénico se definió como cíclico para los individuos, y potencialmente continuo para la población, debido a que el inicio y el final de la espermatogénesis se traslaparon.

La espermatocitogénesis y espermiogénesis, tuvo una duración de 11 meses, es el proceso más largo de los quelonios estudiados.

El inicio de la espermatogénesis y la espermiación difirió del patrón de las especies de zonas templadas.

El ciclo de las células intersticiales o de Leydig, fue paralelo al proceso espermatogénico.

El patrón reproductor de *K. leucostomum* es de tipo postnupcial.

La madurez sexual de los machos en esta población, se alcanzó cuando la longitud del caparazón tuvo en promedio 126.2 ± 1.4 mm, y se encontró variación con otras poblaciones de la misma especie, localizadas en otra latitud.

LITERATURA CITADA

- Alvarez del Toro, M. 1973. Los reptiles de Chiapas. Publ. del Gob. del Estado de Chiapas, México.
- Angelini, F. and O. Picariello 1975. The course of spermatogenesis in reptilia. *Accademia di Scienze e Matematiche, serie 3a*, 9(3): 61-108.
- Angelini, F.; G. Ciarcia; O. Picariello and E. D'Alterio 1983. The annual spermatogenic cycle of *Tarentola mauritanica* L. (Reptilia, Gekkonidae): I – The spermatogenic cycle in nature. *Amphibia – Reptilia* 4: 171- 184.
- Angelini, F.; R. Brizzi and C. Barone 1979. The annual spermatogenic cycle of *Podarcis sicula campestris* de Betta (Reptilia, Lacertidae): I – The spermatogenic cycle in nature. *Monitore zool. Ital. (N.S.)* 13: 279 – 301.
- Callard, I.P.; G.V. Callard; V. Lance, and S. Eccles 1976. Seasonal changes in testicular structure and function and the effects of gonadotrophins in the freshwater turtle *Chrysemys picta*. *Gen. Comp. Endocrinol. suppl.* 3: 65-75.
- Casas-Andreu, G. 1967. Contribución al conocimiento de las tortugas dulceacuícolas de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Chatterjee, S. and B. Price 1977. Detection and correction of model violations: simple linear regresión. Chap 2 in: *Regresion analisis by example*. John Wiley and Sons: New York.
- Christiansen J.L. and A.E. Dunham 1972. Reproducion of the yellow mud turtle (*Kinosternon flavescens*) in New Mexico. *Herpetologica* 28: 130-137.
- Christiansen J.L. and E.O. Moll, 1973. Latitudinal reproductive variation within a single subspecies of painted turtle *Chrysemys picta bellii*. *Herpetologica* 29(2): 152-162).
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Phys. Rev.* 52(1): 198 - 236.
- Congdon, J.D. and J.W. Gibbons 1990. The evolution of turtle life histories. Chap 3 in: *Life history and ecology of the slider turtle*, J.W. Gibbons (ed.) Smithsonian Institution Press. Washington, D. C.
- Curts, J.B. 1984. Introducción al análisis de residuos en biología. *Biotica* 9(3): 271-278.
- Draper, N.R. 1981. The examination of residuals. Chap. 3. in: *Applied regresion analisis*. John Wiley and Sons: New York.

- Duxplaix-Hall, N. and R. Biegler 1972. Species of wild animals bred in captivity during 1970. *Int. Zoo. Yb.* 12: 311-375.
- Duxplaix-Hall, N. and R. Biegler 1973. Species of wild animals bred in captivity during 1971. *Int. Zoo. Yb.* 13: 283-346.
- Ernst, C. H. 1971. Sexual cycles and maturity of the turtle, *Chrysemys picta*. *Biol. Bull. USA*, 140(2): 191 – 200.
- Estrada-Flores, E.; M. Villagran-Santa Cruz; F.R. Mendez de la Cruz and G. Casas-Andreu 1990. Gonadal changes throughout the reproductive cycle of the viviparous lizard *Sceloporus mucronatus* (Sauria: Iguanidae). *Herpetologica* 46(1): 43-50.
- Fitch, H.S. 1982. Reproductive cycles in tropical reptiles. *Occ. Papers Mus. Nat. His. Kan.* 96: 1 -53.
- Flores-Villela, O. A. 1980. Reptiles de importancia económica en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Flores-Villela, O. A. and G. Zug 1995. Reproductive biology of the chopontil, *Claudius angustatus* (Testudines: Kinosternidae), in Southern Veracruz, México. *Chelonian Conservation and Biology* 1 (3): 181 – 186.
- Ford, N.B. and R.A. Seigel 1994. An experimental study of the trade-offs between age and size at maturity: effects of energy availability. *Functional Ecology* (1994) 8: 91-96.
- Fox, H. 1977. The urogenital system of reptiles. Chap.1 in: Gans, C. y T.S. Parsons (eds.) *Biology of the reptilia. Morphology* E. Academic Press, v. 6: 1-157 p.
- Frazer, N.B.; J.L. Green and J.W. Gibbons 1993. Temporal variation in growth rate and age at maturity of male painted turtles, *Chrysemys picta*. *Am. Midl. Nat.* 130(2): 314 – 324.
- Furieri, P. 1959. La secrezione dell'epididimo e del rene sessuale nei rettili. Studio al M.E. *Arch. It. Anat. Embr.*, 64(3): 357-379.
- García, E. 1970. Los climas del estado de Veracruz. *An. Ins. Biol. U.N.A.M., Ser. Bot.* 41(1): 3-42.
- Gibbons, J.W., 1994. Reproductive patterns of reptiles and amphibians: considerations for captive breeding and conservation. pp. 119-123. in J.B. Murphy; K. Alder and J.T. Collins (eds.) *Captive Management and Conservation of Amphibians and Reptiles. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca (New York). Contributions to Herpetology*, vol. 11.

- Gibbons, J. W.; R.D. Semlitsch; J.L. Green, and J.P. Schubauer. 1981. Variation in age and size at maturity of the slider turtle (*Pseudemys scripta*). *Am. Nat.* 117: 841-845.
- Heller, C.G. and Y. Clermont 1964. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog. Hormone Res.* (20): 545-571.
- Iverson, J.B. 1992. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Privately Printed, Richmond, Indiana.
- Jameson, E.W. 1988. Vertebrate reproduction. John Wiley & Sons: New York.
- Jones, R. E. 1970. Effect of season and gonadotropin on testicular interstitial cells of California quail. *Auk* 87: 729-737.
- Kuchling, G. 1982. Effect of temperature and photoperiod on spermatogenesis in the tortoise, *Testudo hermanni hermanni* (Gmelin). *Amphibia - Reptilia* 2: 329-341.
- Kuchling, G. 1988. Gonadal cycles of the Western Australian Long-necked Turtles *Chelodina oblonga* and *Chelodina steindachneri* (Chelonia: Chelidae). *Rec. West. Aust. Mus.* 14(2): 189-198.
- Kuchling, G.; R. Skolek-Winnisch, and E. Bamber 1981. Histochemical and biochemical investigation on the annual cycle of testis, epididymis and plasma testosterone of the tortoise *Testudo h. hermanni*, Gmelin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44:194-201.
- Legler, J.M. 1960. Natural history of the ornate box turtle, *Terrapene ornata ornata* Agassiz. *Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kans.* 11: 527-669.
- Licht, P., 1984. Reptiles Chap. 3. in: Lammung, G.E. (ed) *Marshall's physiology of reproduction.* v.1 Churchill, London.
- Licht, P., G.L.Britenbach, and J.D. Congdon 1985. Seasonal cycles in testicular activity, gonadotropin, and thyroxin in the painted turtle, *Chrysemys picta* under natural conditions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 130-139.
- Lofts, B. 1969. Seasonal cycles in reptilian testis. *Gen. Comp. Endocrinol. suppl.*2: 147-155.
- Lofts, B., 1972. The Sertoli cell. *Gen. Comp. Endocrinol. suppl.*3: 636-648.
- Lofts, B., 1977. Patterns of spermatogenesis and steroidogenesis in male reptiles. pp. 127-136 in: Calaby, J.H. y C.H. Tyndale-Boscoe (eds.) *Reproduction and evolution.* Australian Academic of Science, Canberra.
- Lofts, B. and C. Boswell 1961a. Seasonal changes in the

- distribution of the testis lipids of the caspian terrapin *Clemmys caspica*. Proc. Zool. Soc. London, 136: 581-592.
- Lofts, B. and C. Boswell 1961b. Seasonal changes in the spermatogenic condition of the seminiferous tubules of *Clemmys caspica*. Proc. Zool. Soc. London. 136: 581-592.
- Lofts, B. and H.E. Tsui 1977. Histological and histochemical changes in the gonads and epididymides of the male soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*. J. Zool. 181: 57-68.
- Mahmoud, I.Y. and R.V. Cyrus 1992. The testicular cycle of the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Comp. Biochem. Physiol. 78: 153-157.
- Marquez Orozco, M.C. 1996. Aparato reproductor masculino: Espermatogénesis. Impresión privada, México. 49 p.
- McPherson, R.Y and K.R. Marion 1981. Seasonal testicular, cycle of the stinkpot turtle (*Sternotherus odoratus*). Gen Comp. Endocrinol. 62: 459-469.
- Méndez de la Cruz, F.R.; M. Villagrán-Santa Cruz and O. Cuellar 1994. Geographic variation of spermatogenesis in the mexican viviparous lizard *Sceloporus mucronatus*. Biogeografica 70(2): 59-67.
- Mendoca, M. T. and P. Licht 1986. Photothermal effects on the testicular cycle in the musk turtle, *Sternotherus odoratus*. J. Exp. Zool. 239(1): 117 – 130.
- Merchant-Larios, H. 1991. Gametogénesis. cap. I en: Tópicos selectos, de biología de la reproducción. Roberto Domínguez-Casal (Coord.). UNAM-Miguel Angel Porrúa: México.
- Moll, E.O. 1973. Latitudinal and interspecific variation in reproduction of the painted turtle, *Chrysemys picta*. Herpetologica 29: 307-318.
- Moll, E. O., 1979. Reproductive cycles and adaptations. Chap. 16 in: Harless, M. and H. Morlock (eds.), Turtles: Perspectives and research. Wiley and Sons: New York, 305-331.
- Moll, E. O and J.M. Legler 1971. The life history of a neotropical slider turtle, *Pseudemys scripta* (Schoepff), in Panama. Bull. Los Angeles Co. Mus. Nat. Hist. 11: 1-102.
- Montgomery, D.C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Iberoamérica: México.
- Morales-Verdeja, S.A. 1991. Estudio de los movimientos e historia natural de *Kinosternon leucostomum* Duméril, Bibron y Duméril en el sur de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias,

- Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Cambridge, Cambridge Univ. Press.
- Morales-Verdeja, S.A. and R.C. Vogt 1997a. *Kinosternon leucostomum*. pp. 488-490 en: Gonzalez-Soriano E., Dirzo, R. y Vogt, R.C. (eds.) *Historia Natural de Los Tuxtlas*. México.
- Morales-Verdeja, S.A. and R.C. Vogt 1997b. Terrestrial movements in relation to aestivation and the annual reproductive cycle of *Kinosternon leucostomum*. *Copeia* 1997(1): 123-130.
- Ramírez Bautista, A. 1977. Algunos anfibios y reptiles de la región de "Los Tuxtlas", Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, México.
- Reyes-Fuentes, A.; R. Martínez-Zaguilaán; M. Luna-Muñoz y M.E. Chavarría-Olarte, 1991. La bioquímica de la función testicular: El túbulo seminífero. cap. 8 en: R. Domínguez-Casalá (ed), *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. UNAM-Porrúa: México.
- Romano, M.C. y E. Pedernera, 1991. La glándula intersticial del testículo. cap. 9 en: R. Domínguez-Casalá (ed), *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. UNAM-Porrúa: México.
- Setchell, B.P. 1982. Spermatogenesis and spermatozoa. Chap. 4 in: Austin, C.R. y R.V. Short (eds.), *Reproduction in mammals: Germ cells and fertilization*. V.1
- Silva, A.M.R.; G.S. Moraes; G.F. Wasserman 1984. Seasonal variations of testicular morphology and plasma levels of testosterone in the turtle *Chrysemys dorsibigni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A: 153 – 157.
- Smith, H.M and R.B. Smith 1980. Synopsis of the herpetofauna of México. vol. 6 Guide to Mexican Turtles. John, Johnson, North Bennington, Vermont 1044 p.
- Tryon, B.W. 1978. Some aspects of breeding and raising aquatic chelonians: part I. *Herpetological Review* (9): 15-19.
- Tsui, H.W. 1976. Stimulation of androgen production by the lizard testis: Site of action of ovine FSH and LH. *Gen. Comp. Endocrinol.* (28): 386-394.
- Villa-Ramírez., B. 1973. A snake in the diet of a kinosternid turtle. *J. Herpetol.* 7(4): 380-381.
- Vogt, R.C. 1981. Demografía de poblaciones de *Kinosternon leucostomum* Duméril y Bibron, en la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz (Informe).
- Vogt, R.C. y O.A. Flores-Villela 1986. Determinación del sexo, en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. *Ciencia* 37: 21-32.

Vogt, R.C and S. Guzmán Guzmán
1988. Food partitioning in a
neotropical freshwater turtle
community. *Copeia* 1988(1): 37-
47.

Volsoe, H. 1944. Structure and seasonal
variation of the male,
reproductive organs of *Vipera*
berus L. *Spolia Zool Mus.*
Haunensis Copenhagen 5: 62-
157.

Walpole, R.E. y R.H. Myers 1992.
Probabilidad y estadística. 3ª ed.
McGraw-Hill: México, 798 p.

White J.B. and G.G. Murphy, 1973. The
reproductive cycle and sexual
dimorphism of the common
snapping turtle *Chelydra s.*
serpentina. *Herpetologica* 29:
240 – 246.