



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DESCRIPCIÓN DEL CARIOTIPO DE LA TORTUGA
DULCEACUÍCOLA *Kinosternon herrerai*
(TESTUDINES: KINOSTERNIDAE)”

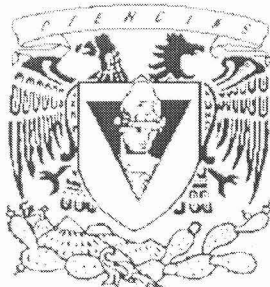
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

NIVIA ROCIO ANTONIO RUBIO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
CO-DIRECTORA DE TESIS: BIÓL. JUANA MARGARITA GARZA CASTRO

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR

m343026



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Descripción del cariotipo de la tortuga dulceacuícola *Kinosternon*
herrerai (Testudines: Kinosternidae).”

realizado por Nivia Rocio Antonio Rubio

con número de cuenta 09717399-3, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

Propietario

Dra. María Elena Calderón Segura

Co-Directora de Tesis

Propietario

Biól. Juana Margarita Garza Castro

Propietario

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Suplente

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Suplente

M. en C. Marco Antonio González Jiménez

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA.

A mis abuelos Vicente Antonio y Maura Cruz por su confianza y apoyo incondicional y sobre todo por quererme tanto.

A mis padres Angelina Rubio y Raúl Antonio por ser como son conmigo, por el gran cariño que me demuestran a cada momento y por la libertad que me han brindado siempre.

A mis hermanos Raúl y Héctor por ayudarme en todo momento para salir adelante.

A mi pequeña hermana Diana por darme todo su cariño.

A mis tíos Javier, Elvia, Lilia, Lupe, Isidro y Jesús.

A mis primos Javier, Víctor, Carlos, Erandi, Pamela, Yolotzín, Janet, Gabriela, José y Ana.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. María Elena Calderón Segura y a la Bióloga Juana Margarita Garza Castro por su confianza y por el apoyo que me brindaron en todo momento.

Al Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, y a los Laboratorios de Vertebrados y Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM por las facilidades prestadas en la realización del trabajo de laboratorio y campo.

Al Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Probetel) por el apoyo económico otorgado.

A Mónica Salmerón y Francisco Soberón por ejemplares proporcionados para la realización de este estudio.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, a la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza y al M. en C. Marco Antonio González Jiménez por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros de carrera: Alex G., Alex V., Alex P., Carlos B., Eddy M., Edith M., Emmanuel R., Erika A., Gaby J., Israel C., Joel G., Julio Cesar L., Lety O., Lulu S., Nohemí E., Paty F., Roxana N., Sofía G. y Vero G. por los gratos momentos compartidos.


A mis compañeros de laboratorio: Emmanuel R., Carolina G., Martha D., Rodrigo L., Selene A., Antonio S., Conny M., Alex F., Cesar G., Ivonn S. y Lilia C. por hacer un ambiente de trabajo muy agradable.

Con gran cariño a Bety H. y Miguel A. por su apoyo, por los inolvidables momentos que hemos vivido, por aceptarme como soy y sobre todo por brindarme su amistad.

RESUMEN

En el presente trabajo se describió el cariotipo de la tortuga dulceacuícola *Kinosternon herrerai* (Testudines: Kinosternidae), especie endémica que se localiza en los estados de Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla. Para el análisis citogenético se realizaron cultivos de sangre periférica obtenida de la vena caudal de tortugas adultas machos y hembras colectadas en el estado de Puebla. El procedimiento se basó en la técnica empleada para el cultivo de linfocitos humanos. Las condiciones adecuadas para el cultivo de linfocitos de esta especie son: 2ml de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con 4 % de fitohemaglutinina, más 50 μ l de sangre heparinizada de la arteria coccigea, con un tiempo de cultivo de 114 horas a una temperatura constante de 29 °C, aplicación de 2 horas de incubación con colchicina y 30 minutos de tratamiento hipotónico (KCl) a 37 °C.

De acuerdo al tamaño de los cromosomas y la posición del centrómero se clasificó el cariotipo de *Kinosternon herrerai* en 28 pares de cromosomas ($2n= 56$), los cuales se organizaron de la siguiente manera: Grupo A con 18 pares de macrocromosomas metacéntricos y 2 pares de submetacéntricos; Grupo B en el que no se encontraron pares de macrocromosomas telocéntricos o subtelocéntricos y Grupo C con 8 pares de microcromosomas. No se encontraron cromosomas sexuales heteromórficos. La fórmula cromosómica obtenida para *Kinosternon herrerai* mediante el análisis morfológico de los cromosomas es $F. C. = 20(A):0(B):8(C)$. El número fundamental de la especie es de 72; este parámetro es definido como el número total de brazos en el complemento haploide.

Al comparar el cariotipo de *Kinosternon herrerai* con otras especies del mismo género, así como con los géneros *Staurotypus* y *Claudius* pertenecientes a la Familia Kinosternidae, se podría inferir que hay relaciones filogenéticas entre los organismos. 

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Determinación sexual en vertebrados.	3
1.2. Mecanismos de determinación sexual en reptiles.	4
1.2.1. Determinación sexual genotípica (DTG).	6
1.2.2. Determinación sexual ambiental (Temperatura /DST).	8
1.3. Diferenciación sexual.	10
1.3.1. Gónada bipotencial.	10
1.3.2. Diferenciación gonadal.	11
1.4. Estudios citogenéticos en tortugas.	13
1.4.1. Obtención del cariotipo en tortugas.	15
1.5. Ciclo celular y mitosis.	22
1.5.1. Interfase.	23
1.5.2. Mitosis.	25
1.5.3. Regulación molecular del ciclo celular.	28
2. ANTECEDENTES.	31
2.1. Orden Testudines.	31
2.2. Familia Kinosternidae.	32
2.3. Especie de estudio, <i>Kinosternon herrerae</i> .	34
3. JUSTIFICACIÓN.	37
3.1. Implicaciones para la especie de estudio.	37
3.2. Implicaciones para la conservación.	37
3.3. Empleo de técnicas para la obtención del cariotipo en reptiles.	38
3.4. Aplicación en estudios taxonómicos.	38
4. HIPÓTESIS.	39
5. OBJETIVOS.	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	40
6.1. Obtención de sangre periférica de la vena coccigea de la tortuga.	40
6.2. Cultivo de linfocitos.	40
6.3. Cosecha de linfocitos.	41
6.4. Fijación y preparación de laminillas.	41
6.5. Tinción.	42
6.6. Análisis microscópico de los cromosomas.	42
7. RESULTADOS.	44
7.1. Estandarización de la técnica de cultivo.	44
7.2. Composición del cariotipo de <i>Kinosternon herrerae</i> .	45
8. DISCUSIÓN.	48
9. CONCLUSIONES.	52
10. REFERENCIAS.	53
ANEXOS.	58

1. INTRODUCCIÓN.

Un fenómeno tan común en la naturaleza que sigue interesando a científicos de diferentes áreas, es la presencia de gonocorismo (sexos separados; hembra y macho) en la mayoría de las especies, principalmente del reino animal. La sexualidad entre los vertebrados se ve expresada de diversas formas y a diferentes niveles, se pueden observar peculiaridades a nivel anatómico, fisiológico o conductual (Crews 1994). La presencia de ovarios o de testículos es una de las diferencias principales entre hembras y machos en especies gonocóricas.

A pesar de que la morfogénesis de las gónadas de los distintos grupos de vertebrados es muy similar, se ha observado que los mecanismos que actúan para la determinación y el consecuente desarrollo de un sexo varían de manera considerable. El resto de los caracteres que diferencian a machos y hembras son considerados como secundarios y en general son el resultado de la influencia hormonal a la que se exponen las gónadas a partir de su diferenciación. El desarrollo del sexo de un individuo depende fundamentalmente de su genotipo, el cual es un equilibrio entre las dotaciones recibidas de los progenitores en la fecundación. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la definición de un sexo u otro no actúan de la misma forma en las diferentes especies de vertebrados (Puertas 1999). La presencia de cierto fenotipo sexual en los adultos es el resultado de una serie de eventos secuenciales que se llevan a cabo principalmente durante la embriogénesis. Estos eventos se pueden dividir en tres fases:

1. La determinación sexual cromosómica, esta fase se establece al momento de la fertilización y depende de la dotación de cromosomas proveniente de cada uno de los progenitores. Es la fase inicial durante la cual se decide la dirección masculina o femenina que va a tomar la gónada embrionaria indiferenciada, mediante la cascada de expresión de genes específicos.
2. La diferenciación gonadal, en esta fase se llevan a cabo los procesos involucrados en la diferenciación de la gónada, ya sea en un ovario o en un testículo, dependiendo del sexo genético del individuo.

3. El desarrollo fenotípico, es la etapa en la cual se manifiestan los caracteres sexuales secundarios y se establece definitivamente el sexo del organismo.

La expresión de los genes determinantes del sexo masculino inducirán a que se diferencien las células productoras de andrógenos, transformando la gónada indiferenciada en testículo. En ausencia de dichos factores se activará la transformación de células secretoras de estrógenos, dando lugar a un ovario (Parker *et al.* 1999). A pesar de que no se conocen claramente los procesos, se sabe que el evento crítico de determinación del sexo depende de la expresión sinérgica o en cascada de los genes presentes en los cromosomas sexuales y/o autosómicos en la gónada indiferenciada para que se desarrolle hacia testículo u ovario dependiendo de su carga genética (Parker *et al.* 1999). Una vez estimulados los primordios gonadales, se da inicio a la morfogénesis de las gónadas. Durante la diferenciación de los órganos reproductores ocurre una interacción entre células germinales (de origen extragonadal) y células somáticas mesodérmicas. En general, el desarrollo gonadal es un proceso en el que se ven involucradas varias etapas, las cuales se pueden resumir en:

1. Formación de las crestas genitales a partir del epitelio celómico y de la proliferación de células mesenquimáticas en ambos lados del mesenterio dorsal.
2. Migración de las células germinales primordiales extraembrionarias hacia las crestas genitales.
3. Desarrollo de cordones sexuales en la región medular de la gónada indiferenciada bipotencial y vascularización de la misma.
4. Proliferación de un epitelio organizado, que se inicia con el depósito de una lámina basal delgada y de fibras de colágena.
5. Desarrollo hacia testículo u ovario mediante la diferenciación de las células propias de cada uno de los órganos reproductores.

Para que se lleven a cabo los eventos antes mencionados es necesaria la activación de genes específicos que ejercen el control de la diferenciación sexual. 🐸

1.1 Determinación Sexual en Vertebrados.

Dentro de los grupos de vertebrados encontramos diversos mecanismos que determinan el sexo que han de adquirir los individuos a partir de la diferenciación de sus gónadas. El genotipo es el principal responsable de controlar el fenotipo sexual de cada uno de los individuos de una misma especie. A este mecanismo se le conoce como determinación sexual genotípica (DSG). Existen especies de animales en las cuales, tanto el genotipo como el ambiente en el cual se desarrollan los embriones, en conjunto, juegan un papel importante en la diferenciación sexual. A la forma anterior se le conoce como determinación sexual influenciada por el ambiente (DSA), en este último caso, la temperatura (DST) es el factor ambiental más estudiado (Bull 1980).

Los genes localizados en los cromosomas sexuales ejercen el control final sobre el sexo que se expresará en la mayoría de los vertebrados, sin embargo, otros animales carecen de estos cromosomas sexuales. Estas especies cuentan con activadores no genéticos, tales como la temperatura, que guían la diferenciación sexual; en este caso el sexo de un individuo viene condicionado por el entorno en el cual se desarrollan los embriones (Crews 1994). En los mamíferos el sexo está determinado genéticamente por la presencia del gen SRY, ubicado en el cromosoma Y, el cual codifica para el factor determinante de testículos (FDT). En este caso se presentan cromosomas sexuales heteromórficos, donde el macho es el sexo heterogamético (sistema X/Y). En aves el sexo se determina genéticamente, sin embargo, en este caso el sexo heterogamético es la hembra (sistema Z/W). Aunque no se conoce con detalle el mecanismo de determinación sexual en aves, se sugiere que en el cromosoma W se encuentra un gen determinante para ovario o que posiblemente una dosis doble de genes ligados al cromosoma Z pueden disparar el desarrollo hacia testículos (Morrish y Sinclair 2002). En anfibios se presenta determinación sexual genotípica, con sistemas cromosómicos tanto X/Y como Z/W, y posiblemente la temperatura no influye en el desarrollo sexual. Contrario a los grupos anteriores, en los reptiles podemos observar que se presentan tanto mecanismos de DSG como DSA y sus variantes. 🐸

1.2 Mecanismos de Determinación Sexual en Reptiles.

Dentro de la Clase Reptilia (reptiles), se ha observado tanto determinación sexual genotípica como ambiental, las cuales varían en cada uno de los diversos Ordenes y Familias (Bull 1980, Bull *et al.* 1985, Janzen y Paukstis 1991 a, b, Wibbels *et al.* 1994). Considerables estudios en reptiles han demostrado que la temperatura en la que se desarrollan los embriones, es uno de los factores ambientales que influye en la diferenciación sexual (Ciofi y Swingland 1997); esto se ha visto en todos los cocodrilos, muchas tortugas y algunas lagartijas (Tabla I).

El Orden Squamata, que incluye a las serpientes, muestra sistemas cromosómicos homomórficos (sin cromosomas sexuales) y heteromórficos (con cromosomas sexuales). La presencia de cromosomas sexuales hace suponer que la determinación sexual está bajo control genético (Ciofi y Swingland 1997). Por otro lado, no se ha encontrado sesgo hacia alguno de los sexos cuando se incuban huevos a distintas temperaturas, por lo que, en el caso de las serpientes se considera que el principal mecanismo es la determinación sexual genotípica (DSG). En este orden también se incluyen las lagartijas, en las cuales se ha observado determinación sexual influenciada por la temperatura y genotípica, en donde se han evidenciado cromosomas heteromórficos (con hembras o machos heterogaméticos) y homomórficos (Zug *et al.* 2001).

En el grupo de las Tortugas (Orden Testudines) se nota que la mayoría de las especies muestran determinación sexual influenciada por la temperatura de incubación de los embriones (DST) y solo un pequeño porcentaje de las especies exhiben DSG. Aquellas que tienen el mecanismo de DSG se encuentran en las familias Emydidae, Chelidae (Bull *et al.* 1985), Trionychidae (Vogt y Bull 1982) y Bataguridae (Zug *et al.* 2001) y en la subfamilia Staurotypinae (Vogt y Flores-Villela 1992).

El tuatara *Sphenodon punctatus* (Orden Rhynchocephalia) manifiesta cromosomas sexuales homomórficos y DST, en donde los machos se desarrollan a temperaturas cálidas. La otra especie de tuatara, *S. guntheri*, al parecer también muestra DST, sin embargo, Cree *et al.* (1995) no aseguran que la temperatura influya en la diferenciación del sexo de los adultos.

En cocodrilos, caimanes y gaviales (Orden Crocodylia) se sabe que no portan cromosomas sexuales heteromórficos y al parecer la temperatura influye en la determinación del sexo de la progenie. La presencia de DST se ha comprobado en aproximadamente 11 de las 22 especies que existen en el mundo (Ciofi y Swingland 1997) por lo que la presencia de este mecanismo en el resto de las especies es muy probable.

Tabla I. Mecanismos de determinación sexual genotípica y ambiental (temperatura) en Ordenes y Familias de reptiles (Zug *et al.* 2001).

Orden Reptilia.	Determinación Sexual Genotípica.			Determinación Sexual dependiente de la Temperatura.
	Machos heterogaméticos.	Hembras heterogaméticas.	Homogaméticos.	
Testudines	Chelidae, Bataguridae, Staurotipinae.	Bataguridae.	Chelidae.	Pelomedusidae, Podocnemididae, Bataguridae, Carettochelydae, Cheloniidae, Chelydridae, Dermatemydidae, Dermochelyidae, Emydidae, Kinosternidae, Testudinidae, Trionychidae.
Crocodylia	No presente.	No presente.	No presente.	Alligatoridae, Crocodylidae, Gavialidae.
Rhynchocephalia	No presente.	No presente.	No presente.	Sphenodontidae.
Squamata (serpientes)	No presente.	Boidae, Colubridae, Elapidae, Viperidae.	Colubridae, Elapidae.	No presente.
Squamata (lagartijas)	Iguania, Teiidae, Gekkonidae, Scincidae.	Gekkonidae, Lacertidae, Amphisbaenia, Varanidae.	Iguania, Teiidae, Gekkonidae, Lacertidae, Scincidae.	Iguania, Gekkonidae, Lacertidae.

En lagartijas y tortugas se halla gran variabilidad en cuanto a la presencia de los mecanismos de determinación sexual. En ambos grupos se han descrito tanto mecanismos de DSG como de DST. A nivel de Familia presentan distintos mecanismos de determinación sexual, como en el caso de la Familia Emydidae (Ciofi y Swingland 1997). En la tabla I se incluyen las Familias de reptiles para las cuales ya se reconoce la presencia de algún mecanismo de determinación sexual. 🐢

1.2.1 Determinación Sexual Genotípica.

El mecanismo de determinación sexual genotípico, se denomina así debido a que la diferenciación de los sexos está estrechamente ligada a genes específicos que disparan y controlan el desarrollo del sexo del individuo. En este caso el sexo de los individuos está determinado en el momento de la fecundación, dependiendo de la dotación cromosómica proporcionada por cada uno de los progenitores (Puertas 1999).

Cuando se presenta el mecanismo de determinación sexual genotípico, por lo general están presentes cromosomas sexuales, los cuales se utilizan como indicadores de la actividad genética relacionada con el sexo (Bull 1980). Debido a la presencia característica de cromosomas sexuales en este mecanismo, también se ha denominado como determinación sexual cromosómica (Pieau *et al.* 1999). De acuerdo al tipo de cromosoma sexual existen básicamente tres sistemas cromosómicos de determinación del sexo (Ciofi y Swingland 1997):

1. Sistema XX/XY, en este caso las hembras poseen un par de cromosomas sexuales homomórficos (XX) y los machos un par de cromosomas heteromórficos (XY). Una variante de este sistema es el caso XO en donde se observa un solo cromosoma sexual (el denominado X), que generalmente se presenta en los machos y las hembras portan un par de este cromosoma (XX). Otras variantes implican la presencia de varios cromosomas X ó Y por lo que se observan cromosomas sexuales múltiples como por ejemplo el XXX/XXY.
2. En el sistema ZZ/ZW, las hembras son las que portan un par de cromosomas sexuales heteromórficos (ZW) y los machos un par homomórfico (ZZ). En este sistema también se han observado variantes de cromosomas múltiples como ZZZ/ZZW.
3. Sin cromosomas sexuales diferenciados, en este caso no se han identificado cromosomas heteromórficos en ninguno de los sexos (Wibbels *et al.* 1994), por lo que no se conocen los cromosomas que contienen los genes relacionados con la determinación sexual de los individuos.

Las letras X, Y, Z y W utilizadas en cada caso son notaciones con las que se indica la presencia de cromosomas sexuales y no hacen referencia a su forma o tamaño.

Los cromosomas sexuales pueden contener un solo locus determinante del sexo o varios loci estrechamente ligados para ese fin, además de otros loci autosómicos (Puertas 1999).

En el sistema cromosómico, en el cual no se observan cromosomas sexuales heteromórficos, los individuos presentan un cariotipo en el que cada uno de los cromosomas tiene su homólogo morfológicamente idéntico, tanto en hembras como en machos (Wibbels *et al.* 1994). Esta forma de determinación del sexo se observó en la tortuga *Apalone (Trionix) spiniferus* cuando se incubaron sus huevos a 5 diferentes temperaturas y se analizaron los radios sexuales de nidos naturales (Vogt y Bull 1982). Los resultados indicaron que tanto en el laboratorio como en el campo se tenían radios sexuales 1:1, lo que significa que no hay una inclinación a favor de la diferenciación hacia hembras o machos al variar las temperaturas de incubación. Estos datos difieren de los que se presentan en trabajos de especies con determinación sexual que es influida por el ambiente (DSA), en donde los radios sexuales se ven sesgados hacia hembras o machos dependiendo de la temperatura de incubación de los embriones. En la tortuga *A. spiniferus* no se encontraron cromosomas sexuales, por lo que se sugiere que el control genético de la determinación sexual de esta especie puede haberse originado recientemente (Vogt y Bull 1982).

En mamíferos, la determinación sexual implica una cascada de señales de genes, proteínas, hormonas, factores de transcripción, así como otras moléculas celulares que están estrechamente relacionadas al sexo. Aunque no se conoce la función exacta de muchos de estos componentes se sabe que juegan un papel importante en el desarrollo del sexo. Además, se ha observado que no solo los genes presentes en los cromosomas sexuales participan en este proceso sino también los autosómicos. 🐾

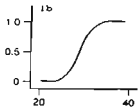
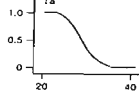
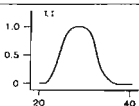
1.2.2 Determinación Sexual Ambiental (Temperatura /DST).

El principal factor ambiental que se ha considerado como inductor de la diferenciación sexual es la temperatura (DST; Crews 1994), aunque también se ha sugerido que la humedad puede influir en la diferenciación sexual en tortugas como *Chrysemys picta*, pero ha sido poco estudiado (Gutzke y Paukstis 1983). En una especie con DST, la proporción de sexos de las crías que eclosionan de huevos incubados a diferentes temperaturas muestran un sesgo, es decir, que la cantidad de machos y hembras no es 1:1 como ocurre con DSG (Janzen y Paukstis 1991a). En el caso de la DST se tiene una temperatura umbral o zona de transición en la cual la proporción de hembras y machos es 1:1 y puede variar de una especie a otra. La determinación del sexo dependiente de la temperatura se identificó hace más de 40 años, cuando Charnier (1966) encontró que la temperatura a la que eran incubados los huevos del lagarto arco iris (*Agama agama*) gobernaba su proporción sexual (Bull 1980). Se han distinguido tres patrones generales de la determinación sexual dependiente de la temperatura denominados:

1. Patrón tipo A: en este caso se producen hembras a temperaturas bajas de incubación en los embriones (menores a 31°C en *Alligator mississippiensis*) y machos a temperaturas altas (mayores a 33°C en *A. mississippiensis*). En el intervalo de 31 a 33°C se desarrollan tanto hembras como machos (Deeming y Ferguson 1988).
2. El tipo B es el proceso inverso, en *Trachemys scripta* las hembras se desarrollan a temperaturas altas (mayores a 30°C) y los machos a bajas (menores a 27°C, Ewert y Nelson 1991), en este caso las temperaturas de incubación son muy diferentes para *A. mississippiensis* y varía según las especies.
3. En el tipo C, conocido en la tortuga *Chelydra serpentina*, las hembras se desarrollan a temperaturas altas (mayores a 30°C) y bajas (menores a 20°C) y los machos en temperaturas intermedias (entre 23 y 26°C); en este caso se tienen dos zonas de transición (de 21 a 23°C y de 26 a 29°C) en las cuales se desarrollan tanto hembras como machos (Wilhoft *et al.* 1988).

El tipo A se ha reportado para lagartijas, caimanes y cocodrilos; el tipo B principalmente en tortugas y el C en cocodrilos (3 especies), tortugas (3 especies) y una lagartija (Bull 1980, Head *et al.* 1987, Janzen y Paukstis 1991 a y b). Ewert *et al.* (1994) reportan dos patrones de DST en tortugas, el Ia y el II (Tipos B y C; Bull 1980). El patrón Ia se encuentra en las familias Carettochelyidae, Cheloniidae, Dermochelyidae, Emydidae y Testudinidae, y en la subfamilia Batagurinae. Tiene una sola zona de transición de la temperatura debajo de la cual la incubación es un 100 % machos y sobre de esta se produce un 100% de hembras. El patrón II se conoce en Pelomedusidae, Kinosternidae, Chelydridae y Bataguridae. Tiene dos zonas de transición, con desarrollo de machos predominantes en las temperaturas intermedias y hembras en ambos extremos.

Tabla II. Patrones de determinación sexual dependiente de temperatura (DST, Head *et al.* 1987).

Bull 1980.	Ewert y Nelson, 1991.	Zona de transición.	Temperatura de formación de hembras	Temperatura de formación de machos.	Familias o subfamilias en las que se presenta.	Gráficas de proporción de machos*
A	Ib	1	Bajas	Altas	No registrada en tortugas.	
B	Ia	1	Altas	Bajas	Carettochelyidae, Emydidae Cheloniidae, Dermochelyidae, Testudinidae y Batagurinae.	
C	II	2	Altas y bajas	Intermedias	Pelomedusidae, kinosternidae, Chelydridae y Bataguridae	

La subfamilia Kinosterninae presenta mecanismos de determinación sexual influenciados por la temperatura de incubación de los embriones en las especies *Kinosternon flavescens*, *Sternotherus (Kinosternon*) odoratus* (Vogt *et al.* 1982), *K. leucostomum* (Vogt y Flores-Villela 1992), *K. scorpioides cruentatum*, *S. (K*) carinatus* y *S. (K*) minor* (Ewert y Nelson 1991). Estas especies no presentan cromosomas sexuales que son característicos de la DSG. *Actualmente las especies de *Sternotherus* se consideran dentro del género *Kinosternon* según la revisión más reciente de la familia Kinosternidae (Iverson 1997). 🐢

1.3 Diferenciación Sexual.

Independientemente del mecanismo de determinación sexual que se presente en una especie, es claro que el componente genético es el factor principal que actúa en la diferenciación sexual. Tanto en la DSG como en la DST la regulación de la expresión génica juega un papel importante en la diferenciación, solo que a distintos niveles del desarrollo embrionario. Lo anterior se debe a que, una vez activada la cascada de señales que regulan la diferenciación sexual, se sigue el patrón establecido en el componente genético. En el caso de la DSG, la cascada de expresión se inicia con la activación de genes que controlan la producción de proteínas, hormonas y enzimas necesarias; en el caso de la DST el ambiente externo (temperatura) es el activador de la cascada de expresión que conducirá a la expresión de uno u otro sexo (Korpelainen 1990).

1.3.1 Gónada Bipotencial.

El desarrollo de las gónadas, de las glándulas adrenales y del riñón están íntimamente relacionados. La temperatura de incubación influye en la diferenciación sexual únicamente durante un tiempo a lo largo del desarrollo embrionario, a este lapso se le conoce como periodo termo-sensible (PTS ó TSP por sus siglas en inglés). La duración del PTS es variable para las diversas especies y puede abarcar del 18 al 30 % del desarrollo embrionario (Pieau *et al.* 1999). La diferenciación sexual de las gónadas ocurre al final de este periodo termo-sensible. Pieau *et al.* 1999 describieron la diferenciación gonadal basados en estudios realizados en la tortuga *Emys orbicularis* y en el cocodrilo *Alligator mississippiensis*, los cuales presentan una morfología gonadal similar (Figura 1). La proliferación del epitelio celómico en la superficie ventromedia de los riñones mesonéfricos ubicados a cada lado del mesenterio dorsal da origen a los primordios gonadales o crestas genitales. Las células germinales primordiales (CGP) migran al primordio gonadal a través del mesenterio dorsal y se establecen dentro de las crestas genitales. A partir del arribo de las CGP en etapas iniciales comienza la proliferación de células mesenquimáticas y del epitelio celómico que contribuyen a la formación de los

cordones sexuales en la región medular de las crestas genitales, constituyéndose así la gónada indiferenciada o bipotencial.

Posteriormente se inicia la acumulación de una delgada lámina basal y de fibras de colágena que participan en la organización de un epitelio organizado.

1.3.2 Diferenciación Gonadal.

En tortugas, las células germinales primordiales migran desde la cresta germinal posterior hacia la gónada a través del mesenterio dorsal. El epitelio externo de la cápsula de Bowman de los corpúsculos de Malpighi, el epitelio celómico que rodea a los riñones mesonéfricos y el epitelio germinal son los sitios en los cuales las células epiteliales proliferan y por acumulación en el mesénquima constituyen una médula en la parte interna de las gónadas. Dichas células se organizan creando cordones denominados cordones medulares o sexuales. Esta estructura gonadal se puede apreciar en ambos sexos hasta antes del periodo termosensible y es considerada una gónada indiferenciada. En la figura 1 se pueden observar los cambios morfológicos que se llevan a cabo desde la creación del primordio gonadal hasta el establecimiento de las gónadas en el momento de la eclosión de las crías.

En las gónadas que responden a temperaturas masculinizantes se comienzan a diferenciar los linajes celulares (células de Sertoli) característicos de testículos, observándose un desarrollo de cordones seminíferos en la médula. En general, la morfología del testículo consiste de cordones seminíferos, rodeados de tejido intersticial muy vascularizado, con una cápsula de tejido conjuntivo constituida principalmente por fibras de colágena. Al final del desarrollo se diferencian las células de Leydig en el tejido intersticial.

En hembras, la migración de las células germinales hacia la corteza y la proliferación de células epiteliales son eventos característicos que dan como resultado un arreglo compacto. Al final del PTS las CGP generalmente entran en meiosis. Al momento de la eclosión, los ovocitos en crecimiento se encuentran contenidos en los folículos primordiales, los cuales parecen derivar de la proliferación del epitelio germinal. 🐢

1.4 Estudios Citogenéticos en Tortugas.

La realización de estudios de carácter citogenético nos permiten conocer la presencia o ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos, los cuales, por lo general se utilizan como indicadores de DSG. Esto es de gran importancia porque de esta manera se sabe cual es el fragmento del genoma que contiene los genes determinantes del sexo y se pueden observar las diferencias morfológicas entre dichos cromosomas (Bull 1980).

Los cromosomas pueden ser observados al microscopio cuando se obtienen a partir de cultivos celulares *in vitro*. Los más frecuentes son obtenidos a partir de linfocitos de sangre periférica u otras fuentes como biopsias de piel o de diferentes tejidos. Los cromosomas se capturan en preparaciones cuando se encuentran en profase tardía o en metafase, una vez que se ha replicado y está compuesto por dos cromátidas hermanas que se encuentran unidas por el centrómero (Hare y Singh 1979, Salamanca 1990).

En cada especie, los cromosomas se encuentran en número constante y presentan estructura y morfología definidas (Sáez y Cardoso 1978). En células somáticas hay dos series de cromosomas homólogos (número diploide; $2n$) provenientes de las líneas materna y paterna (Clarck y Wall 1996). Es por lo anterior que la expresión génica está sujeta a la modulación adecuada de la interacción de un gen con uno o varios genes distintos. En células germinales solo se encuentra una serie de cromosomas (número haploide; n), que serán aportados a la siguiente generación durante la fertilización (Sáez y Cardoso 1978, Hare y Singh 1979). El ordenamiento de todos y cada uno de los cromosomas en grupos que van de acuerdo a su tamaño y según la localización del centrómero es a lo que se le denomina cariotipo y éste se presenta en forma de un esquema denominado idiograma (Clarck y Wall 1996, Tamarin 1996). El cariotipo se establece por medio de su fórmula cromosómica, la cual consta del número total de cromosomas (número diploide, $2n$) y el complemento gonosómico o sexual (Salamanca 1990). A los cromosomas que no son los sexuales se les denomina cromosomas autosómicos (Paniagua *et al.* 2000). Con el estudio del cariotipo es posible saber cual de los dos sexos es el que presenta los cromosomas heteromórficos (Hare y Singh 1979, Tamarin 1996, Puertas 1999).

El desarrollo de diversas técnicas de tinción denominadas "de bandas" han permitido identificar con mayor precisión a cada uno de los pares de cromosomas durante la realización de un cariotipo. Estas técnicas se basan en la tinción diferencial de los cromosomas que se observa como segmentos claros y oscuros o fluorescentes y no fluorescentes dependiendo de la solución utilizada (Hare y Singh 1979, Salamanca 1990). Los cromosomas se clasifican en 4 tipos de acuerdo a su morfología en metafase. Para distinguir los brazos formados por la posición del centrómero, se designa como *p* al brazo pequeño y como *q* al brazo largo (Sáez y Cardoso 1978, Tamarin 1996). Los tipos son:

1. Metacéntricos, con los brazos de igual o mas o menos el mismo tamaño.
2. Submetacéntricos, un brazo tiene de la mitad a un tercio de la longitud del otro.
3. Acrocéntrico o subteloacéntrico, uno de los brazos solo es de la tercera a la séptima parte del tamaño del otro brazo.
4. Telocéntrico, el centrómero se localiza muy cercano al extremo del cromosoma, de tal modo que tiene un solo brazo.

Para describir el cariotipo de tortugas, Bickham y Carr (1983) sugieren organizar tres grupos de cromosomas que se describen con una fórmula cromosómica (F. C.) en la que se indica la cantidad de cromosomas en cada grupo (A:B:C) según la siguiente clasificación:

- Grupo A, se incluyen los macrocromosomas (Mc) submetacéntricos y metacéntricos.
- Grupo B, aquí se colocan los macrocromosomas subteloacéntricos y telocéntricos.
- Grupo C, este incluye a todos los microcromosomas (mc, Figura 2).

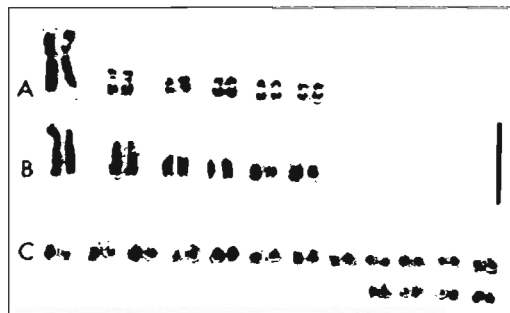


Figura 2. Cariotipo de la tortuga *Kinosternon scorpioides cruentatum* ♂ ($2n=56$, 6:6:16) con bandas G (Sites et al. 1979a).

1.4.1 Obtención del Cariotipo en Tortugas.

Las técnicas más utilizadas para la elaboración de cariotipos en tortugas, por lo general, requieren del sacrificio de los individuos con el propósito de hacer cultivos celulares. A partir de dichos cultivos se obtienen células mitóticas que proporcionan los cromosomas que son fijados durante la metafase y los cuales pueden ser analizados al microscopio gracias a diversas técnicas de tinción (Goyenechea 2001).

Entre las técnicas a las que se recurre comúnmente están las siguientes:

1. Las que se elaboran a partir de cultivos celulares de fibroblastos provenientes de músculo cardíaco (Sites *et al.* 1979a).
2. Uso de cultivos de células sanguíneas obtenidas por:
 - a) Punción cardíaca de individuos recién eclosionados.
 - b) De la vena yugular de ejemplares adultos.
 - c) Uso de órganos completos como el bazo o el riñón (Goyenechea 2001).
3. Realización de preparaciones cromosómicas por medio de acoplamiento en monocapa a partir de epitelio córneo (Killebrew 1975).
4. Elaboración de preparaciones a partir de diversos tejidos como médula ósea, testículo, bazo y epitelio intestinal, entre otros (Goyenechea 2001).

Una técnica empleada para la obtención de cariotipos que no requiere del sacrificio de los ejemplares consiste en obtener muestras sanguíneas tomadas de la cola. Sin embargo, se requiere de un tratamiento previo, durante el cual se inyecta a los individuos con fitohemaglutinina (para estimular a los leucocitos a que entren en mitosis), posteriormente se les inyecta colcemida, se mantienen por 20 minutos a 40° C para estimular la producción de leucocitos y finalmente se obtienen las muestras sanguíneas con las cuales se elaboran las preparaciones cromosómicas después de centrifugar la sangre durante 5 minutos a 1000 revoluciones por minuto en tres ocasiones consecutivas para decantar el plasma (Goyenechea 2001).

En particular, la Familia Kinosternidae se ha estudiado poco (Tabla III), actualmente se cuenta con el cariotipo de 13 de las 22 (59 %) especies reconocidas por Iverson (1997, Anexo 1).

El cariotipo de esta familia muestra un componente cromosómico constante dentro de los distintos grupos. Se observan componentes de $2n=56$ y $2n=54$, que se organizan en 28 y 27 pares de cromosomas respectivamente (Tabla III). Para cada una de las especies, la organización de los cromosomas en los diversos grupos varía dependiendo del autor de cada uno de los trabajos.

Sites *et al.* (1979a) establecieron el cariotipo de 4 especies de *Kinosternon*, una de *Sternotherus* (actualmente es el género *Kinosternon*) y una de *Staurotypus* (todos estos son géneros de la familia Kinosternidae). En *Kinosternon* y *Sternotherus* encontraron un componente cromosómico de $2n=56$. Describen 24 macrocromosomas (Mc) y 32 microcromosomas (mc) con una fórmula cromosómica de 6:6:16. Esta distribución difiere con la reportada por Killebrew (1975) para otras especies de los mismos géneros. *Staurotypus salvinii* tiene una fórmula cromosómica de 7:5:15 con 54 cromosomas.

Killebrew en 1975 determinó el cariotipo de 10 especies de tortugas del género *Kinosternon* y una de *Staurotypus*. En su trabajo encontró que todas las *Kinosternon* tienen el mismo número cromosómico diploide ($2n=56$). Todas las especies que analizó exhibieron 26 Mc y 30 mc. En los 13 pares de macrocromosomas incluye 7 pares metacéntricos, 4 submetacéntricos y 2 telocéntricos, por lo que tienen una fórmula cromosómica de 11:2:15. La especie *Staurotypus tripocatus* tiene un total de 54 cromosomas y una fórmula cromosómica de 22:2:14.

Las especies de *Staurotypus* poseen cromosomas sexuales (Bull *et al.* 1974, Sites *et al.* 1979b), a diferencia del resto de las especies, para las cuales no describen dichos cromosomas, por lo que machos y hembras muestran cariotipos idénticos. La existencia de cromosomas sexuales en *Staurotypus* concuerda con la expresión del mecanismo de determinación sexual genotípico descrito por Ewert y Nelson (1991) y por Vogt y Flores Villela (1992). La especie *Claudius angustatus* es otra de las tortugas de la subfamilia Staurotypinae que manifiesta determinación sexual genotípica (Vogt y Flores Villela 1992), sin embargo no se han identificado cromosomas sexuales.

Tabla III. Especies y subespecies de la Familia Kinosternidae de las que se ha descrito el cariotipo. Mc macrocromosomas, mc microcromosomas, A grupo que incluye metacéntricos (M) y submetacéntricos (Sm), B grupo que incluye telocéntricos (T) y subtelocéntricos, C grupo que incluye los microcromosomas, F. C. fórmula cromosómica, ND no se cuenta con la información disponible, C. S. Cromosomas sexuales, XY cromosomas sexuales, NP no presentes, M D S mecanismo de determinación sexual, NR no reportado, DST determinación sexual influenciada por la temperatura, DSG determinación sexual genotípica.

Taxón.	2n.	Mc.	mc.	A.	B.	C.	F. C.	C. S.	M. D. S.	Fuente.
<i>Kinosternon bauri</i> .	56	24	32	12M	12T	32	6:6:16	NP	NR	Sites <i>et al.</i> 1979a.
<i>K. bauri bauri</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>k. b. palmarum</i> .	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. cruentatum cruentatum</i> .	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. flavescens</i> .	56	ND	ND	16(M-Sm)	8St	ND	ND	NP	DST	Stock 1972.
<i>K. f. flavescens</i> .	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. hirtipes</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. subrubrum</i>	56	ND	ND	16(M-Sm)	8St	ND	ND	NP	NR	Stock 1972.
<i>K. s. hippocrepis</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. s. steindachneri</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
	56	24	32	12M	12T	32	6:6:16			Sites <i>et al.</i> 1979a.
<i>K. leucostomum</i>	56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NP	DST	Gorman 1973.
<i>K. l. postinguinale</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. scorpioides</i>	56	26	30	14M	12T	30	7:6:15	NP	NR	Bickham y Baker 1976.
<i>K. s. scorpiodes</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>K. s. carajasensis</i>	56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NP	NR	Barros <i>et al.</i> 1972.
<i>K. s. abaxillare</i>	56	24	32	12M	12T	32	6:6:16	NP	NR	Sites <i>et al.</i> 1979a.
<i>K. s. cruentatum</i>	56	24	32	12M	12T	32	6:6:16	NP	DST	Sites <i>et al.</i> 1979a.
<i>K. spurrelli</i>	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	NR	Killebrew 1975.
<i>Sternotherus odoratus</i> .§	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	DST	Killebrew 1975.
<i>S. carinatus</i> .§	56	26	30	14M-8Sm	4T	30	11:2:15	NP	DST	Killebrew 1975.
<i>S. minor minor</i> . §	56	24	32	12M	12T	32	6:6:16	NP	DST	Sites <i>et al.</i> 1979a.
<i>Staurotypus triporcatus</i> *	54	26	28	16M-6Sm	4T	28	22:2:14	XY	DSG	Killebrew 1975.
<i>S. salvinii</i> *	54	24	30	14M	10T	30	7:5:15	XY	DSG	Sites <i>et al.</i> 1979a.
<i>Claudius angustatus</i>	54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NR	DSG	Moon 1974.

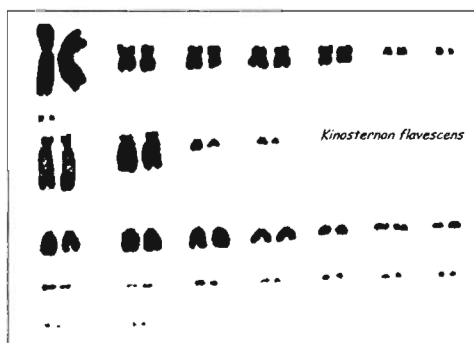
* Estas dos especies están en conflicto en cuanto a su posición taxonómica ya que algunos autores como Ernest y Barbour (1989) e Iverson (1997) las incluyen en la subfamilia Staurotypinae en la familia Kinosternidae. Otros como Bickham y Carr (1983) y Alderton (1988) las consideran en una familia diferente, la Staurotypidae. § Actualmente estas especies se conocen como *Kinosternon odoratus*, *K. carinatus* y *K. minor minor* (Iverson 1997).

Stock (1972) reportó el cariotipo de dos especies de *Kinosternon*, las cuales mostraron tener 56 cromosomas en los que reconoció 16 metacéntricos y submetacéntricos y 8 subtelocéntricos. También trabajó con dos especies de *Sternotherus*, en estos casos se describió un cariotipo similar a las especies de *Kinosternon* ($2n=56$).

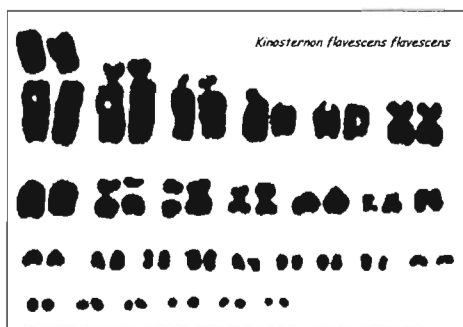
Bickham y Baker (1976) elaboraron el cariotipo de *K. scorpioides* en el cual determinan la presencia de 56 cromosomas con una fórmula cromosómica de 7:6:1. Barros et al. en 1972 describen el cariotipo de *K. scorpioides carajasensis* y reportan la presencia de un total de 56 cromosomas. Gorman (1973) y Moon (1974) detallan el cariotipo de *K. leucostomum*. En esta especie se observa un cariotipo compuesto por 56 cromosomas.

Las especies de los géneros *Kinosternon* y *Sternotherus* presentan un cariotipo conformado por 28 pares de cromosomas ($2n=56$), a diferencia de las dos especies del género *Staurotypus*, las cuales poseen 27 pares de cromosomas ($2n=54$). Por lo que se sugiere que *Kinosternon* y *Sternotherus* están más estrechamente relacionados entre sí, y autores como Iverson (1997) y Ernest y Borbour (1989) las ubican en un sólo género, el *Kinosternon*.

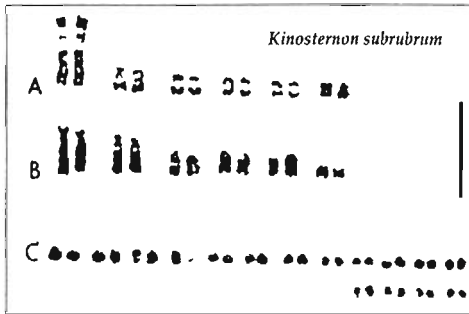
- Idiogramas correspondientes a las especies y subespecies reconocidas de tortugas de la Familia Kinosternidae.



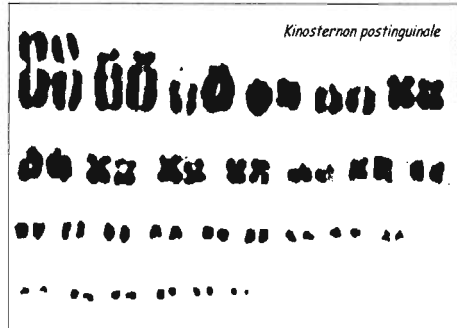
Kinosternon flavescens, $2n=56$
(Stock 1972).



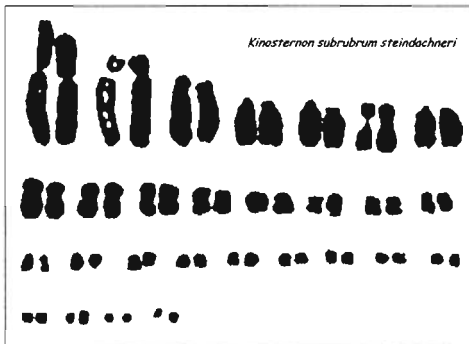
K. flavescens flavescens, $2n=56$
(Killebrew 1975).



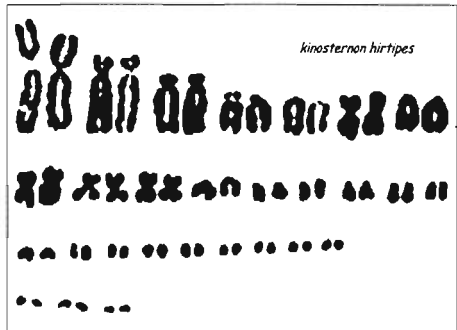
K. subrubrum steindachneri, ♂ 2n=56
(Sites et al. 1979a).



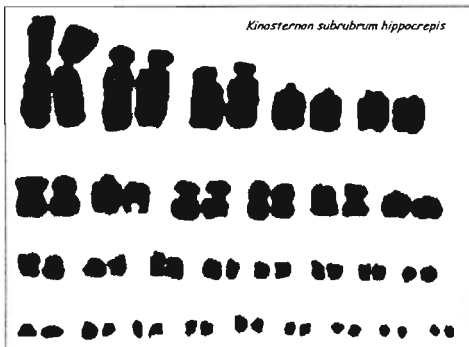
K. postinguinale, 2n=56 (Killebrew 1975).



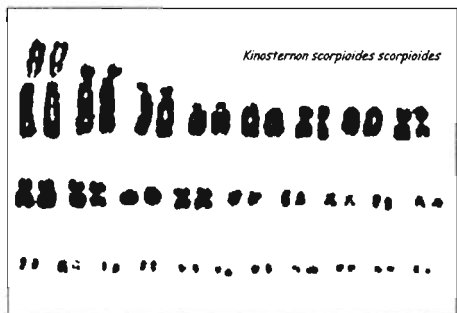
K. subrubrum. steindachneri,
2n=56 (Killebrew 1975).



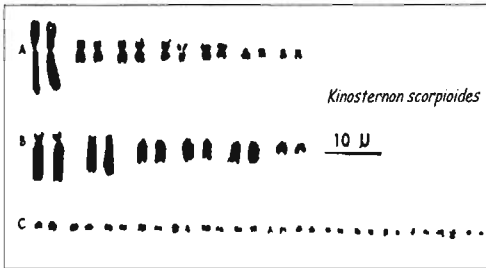
K. hirtipes, 2n=56 (Killebrew 1975).



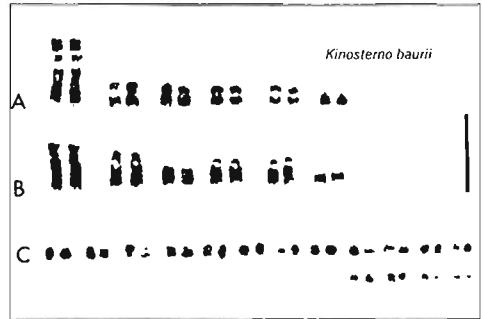
K. subrubrum. hippocrepis, 2n=56
(Killebrew 1975).



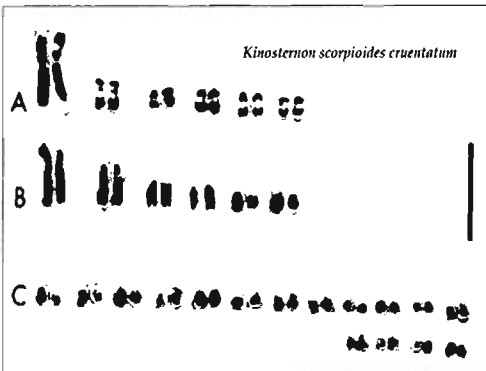
K. scorpioides scorpioides, 2n=56
(Killebrew 1975).



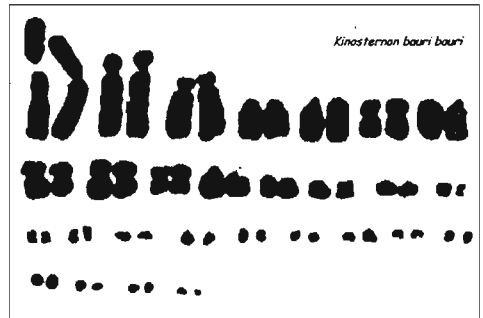
K. scorpioides, 2n=56 (Bickham y Baker 1976).



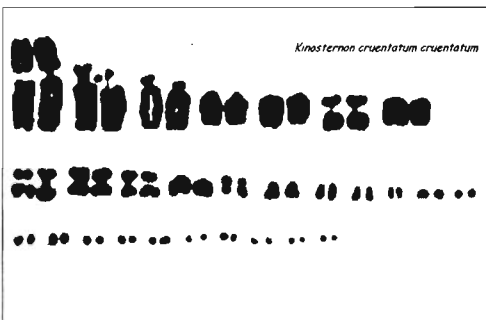
K. bauri, ♀ 2n=56 (Sites et al. 1979a).



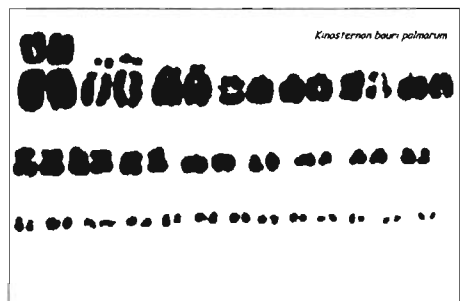
K. scorpioides. cruentatum, ♂
2n=56 (Sites et al. 1979a).



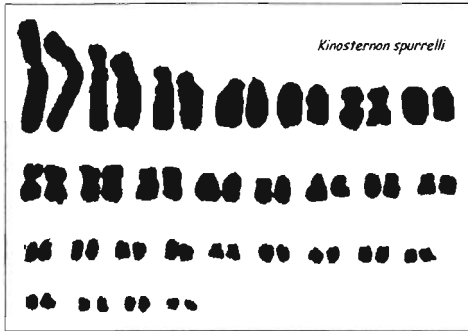
K. bauri bauri, 2n=56 (Killebrew 1975).



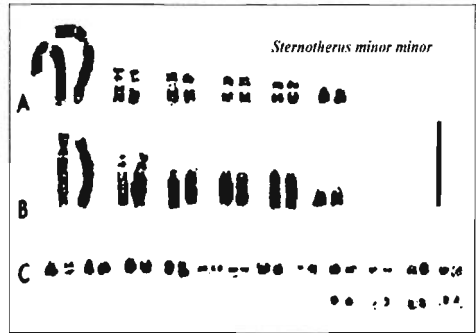
K. cruentatum cruentatum, 2n=56
(Killebrew 1975).



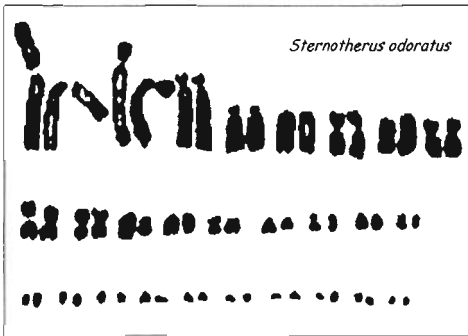
K. bauri palmarum, 2n=56 (Killebrew 1975).



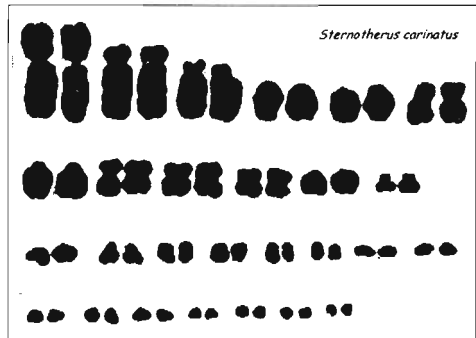
K. spurrelli, 2n=56 (Killebrew 1975).



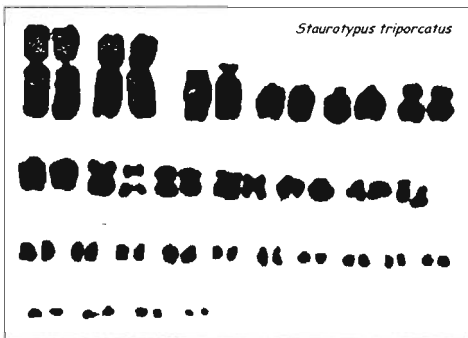
Sternotherus. (Kinosternon) minor minor, ♂ 2n=56 (Sites et al. 1979a).



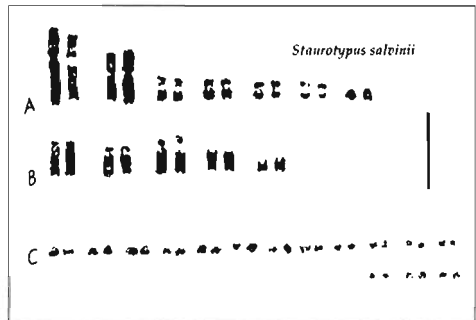
Sternotherus (Kinosternon) odoratus, 2n= 56 (Killebrew 1975).



Sternotherus. (Kinosternon) carinatus, 2n= 56 (Killebrew 1975).



Staurotypus triporcatus, 2n=54 (Killebrew 1975).



Staurotypus. salvinii, ♀ 2n=54 (Sites et al. 1979a).



1.5 Ciclo Celular y Mitosis.

La proliferación de las células es la base del desarrollo, crecimiento y reproducción de los seres vivos. En los organismos multicelulares, la división mitótica sucesiva de las células del cigoto determina desarrollo del individuo (Sáez y Cardoso 1978).

En general todas las células pasan por dos períodos, los cuales son los siguientes (Sáez y Cardoso 1978, Paniagua *et al.* 2000):

- Período de no división o intermitótico, el cual se le denomina de interfase o intercinesis .
- Período de división o mitosis, en el que se producen dos células hijas. Debido a que este evento se lleva a cabo por las células del cuerpo o soma, también se le conoce como división celular somática.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con la producción de dos células hijas (Figura 3). Aunque con algunas variantes en cuanto al tiempo en el que se llevan a cabo los eventos en los diferentes tipos celulares, el ciclo se repite en cada generación celular (Sáez y Cardoso 1978).

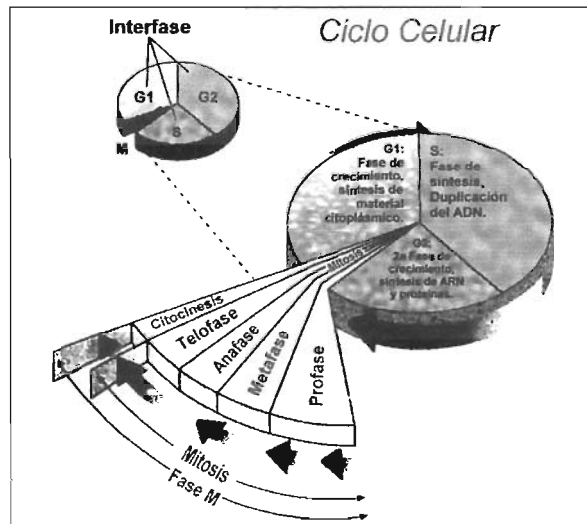


Figura 3. Etapas del ciclo celular. Períodos G1, S y G2 de la Interfase. Profase, Metafase, Anafase y Telofase de la Mitosis. Citocinesis (Snustad *et al.* 1997).

1.5.1 Interfase.

La interfase se subdivide en tres períodos G1, S y G2 (Figura 3). Durante dichos períodos la célula está en actividad metabólica preparándose para la mitosis. Los cromosomas no se distinguen claramente en el núcleo (Snustad *et al.* 1997). Cada uno de los periodos se diferencia por las siguientes características.

- El estado G1 quiere decir "GAP 1" (intervalo 1).

Es la primera fase de crecimiento; durante este período la célula aumenta de tamaño debido a la síntesis de nuevo material citoplásmico, principalmente proteínas y ARN; tienen lugar los eventos celulares como: secreción, conducción, endocitosis, etc. A partir de la citocinesis de la división anterior, la célula hija es pequeña y posee un bajo contenido de ATP resultante del gasto experimentado en el ciclo anterior, por lo que se produce la acumulación del ATP necesario y el incremento de tamaño celular. Es el período que más variación de tiempo presenta, puede durar días, meses o años. Las células que no se dividen nuevamente (como las nerviosas o del músculo esquelético) pasan toda su vida en esta fase, que en estos casos se denomina G₀ para distinguirlas de las células que se encuentran en un estado de G1 transitorio (Snustad *et al.* 1997, Paniagua *et al.* 2000).

- El estado S representa "Síntesis".

En ésta etapa ocurre la replicación del ADN, por lo que al finalizar, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis deben generarse dos moléculas idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. La cromatina (ADN asociado a histonas y no histonas) se encuentra desenrollada en largas hebras de doble hélice, la cual se abre y cada cadena es usada como molde para la producción o síntesis de una nueva cadena, que queda unida a la original que se utilizó como modelo. A esta forma de replicación del ADN se denomina semiconservadora. El ADN recién sintetizado queda unido a su molde por el centrómero hasta la mitosis, formándose así las cromátidas hermanas (Snustad *et al.* 1997, Paniagua *et al.* 2000).

- El estado G2 representa "GAP 2"(Intervalo 2).

Es la segunda fase de crecimiento durante la cual se sigue sintetizando ARN y proteínas. Es el tiempo que transcurre entre la duplicación del ADN y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP. La energía adquirida en esta fase se utiliza para el siguiente proceso que es la mitosis (Snustad *et al.* 1997, Paniagua *et al.* 2000).

Los factores ambientales tales como cambios en la temperatura, el pH, la edad, disminución de los niveles de nutrientes entre otros, llevan a la disminución de la velocidad de la división celular. Cuando las células detienen su división generalmente lo hacen en una fase tardía del periodo G1, al cual se le denomina como punto R o punto de restricción (Paniagua *et al.* 2000). 🐼

1.5.2 Mitosis.

El estado M representa "mitosis", y es el proceso de formación de dos células idénticas por medio de la replicación y división de los cromosomas de una célula madre (figura 4). Durante la mitosis ocurre la división nuclear (las cromátidas hermanas se separan) y citoplasmática (citocinesis). Mediante este proceso se conserva la información genética contenida en los cromosomas, y pasa a subsiguientes generaciones. La Mitosis consta de dos procesos interrelacionados: 1) la mitosis o cariocinesis, que consiste en la división del núcleo y 2) la citocinesis o división del citoplasma y por consiguiente de la célula. Asimismo, el primer proceso se divide en 4 fases (Tamarin 1996, Snustad *et al.* 1997):

- Profase.

La cromatina en el núcleo comienza a condensarse y se vuelve visible en el microscopio óptico como cromosomas filamentosos (constituidos por dos cromátidas). El nucleolo desaparece, la membrana nuclear se desintegra, los centríolos (si se encuentran presentes) se dividen y los pares migran a los polos opuestos de la célula, se forma el huso mitótico. Los centrómeros (o constricciones primarias) se vuelven claramente visibles, debido a que se le han asociados placas proteicas a ambos lados del cinetocoro (Tamarin 1996, Snustad *et al.* 1997). En el citoplasma, el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi se fragmentan en vesículas, se desorganiza el citoesqueleto por lo que la célula pierde su forma original y se hace esférica.

- Prometafase.

La membrana nuclear y el nucleolo se desintegran, marcando el comienzo de la prometafase. Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros (Paniagua *et al.* 2000). Los microtúbulos se adhieren a los cinetocoros y los cromosomas comienzan a moverse hacia el ecuador de la célula formando la placa ecuatorial de la metafase (Sáez y Cardoso 1978).

- Metafase.

Se inicia con la aparición del huso acromático, que es dónde interactúan los cromosomas y se van desplazando hasta situarse en el ecuador de la célula, formando la placa metafásica o ecuatorial. Esta organización asegura que en la próxima fase, cuando los

cromosomas se separan, cada núcleo reciba una copia de cada cromosoma. Los cromosomas consisten en dos cromátidas mantenidas juntas por el centrómero y que alcanzan su máxima condensación (Snustad *et al.* 1997). La observación de la metafase permite determinar el número, dimensiones y forma de los cromosomas (Tamarin 1996, Paniagua *et al.* 2000).

- Anafase.

La anafase constituye la fase crucial de la mitosis, porque en ella se realiza la distribución de las dos copias de la información genética original. El centrómero se divide y cada cromosoma se separa en sus dos cromátidas. Los cromosomas migran a lados opuestos de la célula a lo largo de las fibras del huso. El movimiento es resultado de la combinación del movimiento del cinetocoro a lo largo de los microtúbulos del huso y el acortamiento de los microtúbulos polares (Tamarin 1996, Snustad *et al.* 1997).

- Telofase.

Las cromátidas llegan a los polos opuestos de la célula, comienzan a descondensarse para formar la cromatina por lo que ya no son visibles bajo el microscopio óptico. Se reconstruye la membrana nuclear, alrededor de cada conjunto cromosómico, lo cual originará los nuevos núcleos. A continuación tiene lugar la división del citoplasma (Tamarin 1996, Snustad *et al.* 1997, Paniagua *et al.* 2000).

- Citocinesis.

La citocinesis es el proceso de separación de las células formadas mediante la división del citoplasma. Durante este proceso ocurre la división y la distribución de los organelos citoplásmicos de manera equitativa. El Aparato de Golgi y el retículo endoplásmico se reparten en partes iguales a la nueva célula después de fragmentarse. Se reestablece el citoesqueleto (Tamarin 1996, Snustad *et al.* 1997, Paniagua *et al.* 2000).

Al finalizar el período de mitosis, a partir de una célula ahora existen dos pequeñas con exactamente la misma información genética y número cromosómico. Estas células pueden luego diferenciarse en diversas formas durante el desarrollo. Sin embargo, los diferentes procesos involucrados en la mitosis no se producen de la misma forma en todas las células eucariotas (Paniagua *et al.* 2000). 🐸

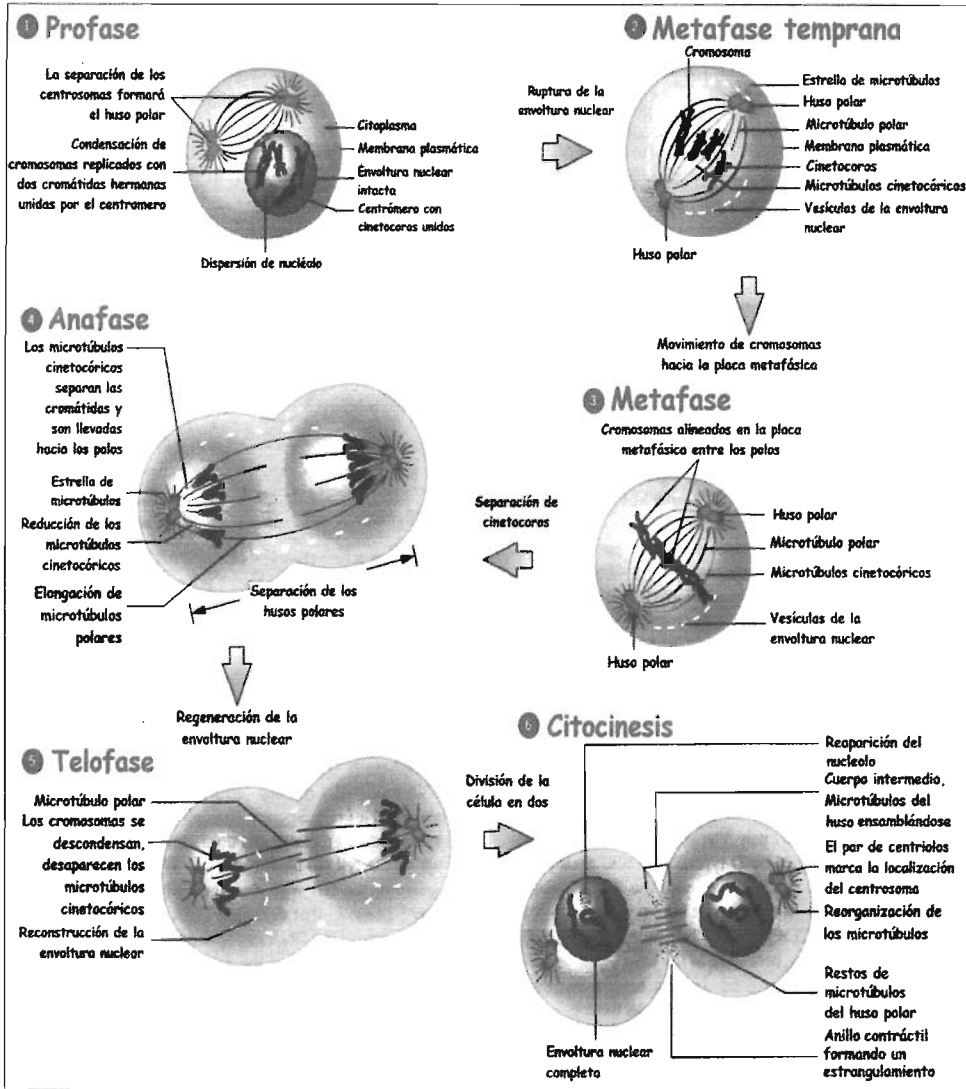


Figura 4. Principales eventos y estructuras celulares implicadas en las fases de la mitosis y citocinesis (Snustad *et al.* 1997). La metafase temprana equivale a la Prometafase (Sáez y Cardoso 1978, Paniagua *et al.* 2000).

1.5.3 Regulación molecular del Ciclo Celular.

Para que se lleven a cabo cada uno de los eventos del ciclo celular, la célula cuenta con un sistema de control que propicia que el ciclo se detenga cuando no se cumplen las condiciones adecuadas para pasar de una etapa a otra. El ciclo celular mitótico tiene dos puntos de regulación muy importantes (Zentella *et al.* 1995, Paniagua *et al.* 2000):

- El punto de inicio o punto de restricción, el cual es el tránsito de G1 a S.
- El paso de G2 a M (mitosis), el cual se considera que es regulado por un factor promotor de la maduración o factor promotor de la fase mitótica (FPM).

El FPM es un complejo protéico compuesto por dos subunidades de 34 KDa (p34, catalítica) y de 62 KDa (p62, reguladora). Este complejo controla el paso de G1 a S en el caso de ovocitos de rana recién fecundados (Zentella *et al.* 1995).

En G1 las células son susceptibles a estímulos que activan o bloquean la proliferación celular. Una vez que ha sido estimulada y que ha pasado el punto de restricción (en G1), la célula entra a la fase S; y cuando no son estimuladas entran a G0 (Zentella *et al.* 1995). La activación del ciclo celular y su posterior control esta regulado por proteínas nucleares que se han ubicado en dos grupos (Paniagua *et al.* 2000):

- La familia de las CDKs (siglas del inglés cyclin dependent kinase; ciclinas dependientes de cinasas) incluye a las proteínas cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina.
- La familia de las ciclinas que son proteínas que se unen a las CDKs.

Estas ciclinas y CDKs no son las mismas en todas las especies, pero se han visto involucradas en el control del ciclo celular de forma conjunta. Sin embargo, para que funcionen de correctamente se requiere que se sinteticen y se ensamblen adecuadamente, estos procesos están controlados por señales que son disparadas por factores de crecimiento, los cuales son polipéptidos que modulan la proliferación celular (Paniagua *et al.* 2000).

Actualmente se conocen más de 50 genes que participan en la regulación del ciclo celular y que hacen posible que la célula complete su ciclo de manera normal, a estos genes se les conoce como *cdc* por sus siglas en inglés "cell división cycle" (Zentella *et al.* 1995).

Muchos de los genes involucrados han sido caracterizados y se conoce su participación en el ciclo celular. Por ejemplo, una mutación en el gen *cdc31* no permite la formación de centriolos y husos acromáticos lo que lleva a una segregación cromosómica defectuosa, dando origen a células no viables (Zentella *et al.* 1995).

Los genes *cdc2* (en *Schizosaccharomyces pombe*) y *cdc28* (en *Saccharomyces cerevisiae*) codifican para elementos centrales de la maquinaria de regulación del ciclo celular. Estas proteínas son homólogas de *p34* (FPM en rana) por lo que la proteína recibe el nombre conjunto de *p34cdc2*. La actividad de *p34cdc2* es regulada por otras proteínas, por ejemplo las que son producto de los genes *wee1*, *mik1*, *nim1* *suc1* y *cdc25*. El primero de estos tiene un efecto negativo cuando hay sobreproducción de la proteína, ya que esta interrumpe el ciclo celular interfiriendo en la función de fosforilación de *p34cdc2*, *mik1* también tiene un efecto negativo en el ciclo, mientras que *cdc25* y *nim1* presentan un efecto positivo sobre la actividad de *cdc2*. Sin embargo, la función de *suc1* aún no es clara (Zentella *et al.* 1995, Jiménez y Merchant 2003).

El arresto celular entre G1 y M se ha observado en células que presentan mutaciones en el gen *cdc25*, esto se evita inhibiendo la actividad de *wee1* y la sobreproducción de *cdc25*, lo cual estimula a la célula a que entre de manera prematura a mitosis (Jiménez y Merchant 2003).

Las ciclinas (proteínas asociadas a *p34cdc2*) CLN1, CLN2 y CLN3 se expresan durante G1 y se asocian a la *cdc28* permitiendo el inicio del ciclo celular. En la regulación del punto de restricción en G1 participa la ciclina E unida a la CDK 2 (ciclina dependiente de cinasa 2); se sugiere que este complejo (CDK2/CLNE) participa en un fenómeno irreversible que probablemente es el último punto de control antes de iniciar la duplicación del ADN en la fase S (Zentella *et al.* 1995).

La entrada al ciclo celular parece estar regulada por la actividad de la ciclina D, la cual actúa como un censor de factores de crecimiento. Cuando no hay actividad del complejo CLN-*cdk4* (o *cdk6*), justo antes del punto de restricción se evita que las células entren a fase S (Jiménez y Merchant 2003).

En G₁, el factor proteico E2F induce la expresión de genes cuyos productos serán utilizados en la fase S. En la fase S se requieren proteínas que son producto de genes que se han transcrito en G₁. Se sugiere que esta transcripción es inducida por la actividad del complejo *p34cdc2*-CLN de G₁. La ciclina A es una proteína importante en la fase S y necesaria para que la célula pase de G₁ a M. Para que prosiga el ciclo en fase S es necesaria la activación de E2F (Jiménez y Merchant 2003).

La entrada a fase M se promueve con la activación cinasa producida por la unión de *p34cdc2* con ciclinas de tipo A o B. La actividad cinasa del complejo *p34cdc2*-CLN B desencadena los procesos necesarios para que la célula entre en mitosis (Jiménez y Merchant 2003).

Existen proteínas cuya función solo ocurre en casos de emergencia, por ejemplo cuando hay daños en el ADN o se detiene su replicación. Estas son proteínas no esenciales conocidas como checkpoint o punto de control; una de estas proteínas, la *p53* es un modulador transcripcional que actúa activando o reprimiendo la expresión de genes específicos (Jiménez y Merchant 2003).

Es claro que los puntos de control ubicados a lo largo del ciclo celular están regulados por los diferentes complejos de ciclinas-cinasas, ya que estos son los responsables de cada una de la etapas del ciclo se activen adecuadamente y de permitir el avance correcto de los siguientes evento. Lo anterior es de gran interés debido a que el mal funcionamiento de algunas de las ciclina y proteínas con las que interactúan permiten la proliferación en condiciones inadecuadas; por lo que se han reconocido como factores oncogénicos (Jiménez y Merchant 2003). 🐼

2. ANTECEDENTES

2.1 Orden Testudines.

El registro fósil indica que en el pasado vivieron sobre la Tierra, por lo menos 17 Ordenes de Reptiles, trece de los cuales ya están extintos. Actualmente la clase Reptilia está conformada por únicamente cuatro Ordenes (Goin *et al.* 1978), los cuales son:

- 1) Rhynchocephalia (tuatara)
- 2) Testudines (tortugas)
- 3) Crocodylia (cocodrilos) y
- 4) Squamata (serpientes y lagartijas).

El registro fósil del Orden Testudines data del Triásico Superior, hace unos 200 millones de años y desde entonces hasta hoy se observan pocos cambios en su morfología (Goin *et al.* 1978, Hickman 1994).

El Orden Testudines incluye 257 especies de tortugas tanto marinas, como dulceacuícolas y terrestres (Iverson 1997). Las tortugas son reptiles inconfundibles por su característico caparazón que protege a los órganos internos blandos. Este caparazón consta de una parte dorsal llamada espaldar y una ventral denominada plastrón. Ambas partes están fusionadas y sólidamente unidas a las costillas y a las vértebras, así como a las cinturas torácica y pélvica. El caparazón consta de una capa externa córnea de queratina y otra interna formada de hueso (Hickman 1994). En lugar de dientes poseen un pico corneo en la mandíbula superior e inferior que son utilizadas para aprehender y masticar el alimento. Aunque tienen oído medio e interno, su percepción del sonido no es muy buena, lo que se compensa con un buen sentido del olfato y de la visión (Hickman 1994). Su longevidad se atribuye a su bajo metabolismo, ya que algunas especies se piensa que llegan a vivir más de 250 años. Todas las especies son ovíparas, presentan fecundación interna y colocan sus huevos en la tierra, donde después de cubrirlos los abandonan. Un fenómeno interesante de la reproducción de las tortugas es el hecho de que en muchas especies la temperatura del nido determina el sexo de las crías (Hickman 1994). 🐢

2.2 Familia Kinosternidae.

El registro fósil de esta familia solo se ha encontrado en el continente Americano, donde parece que evolucionaron. Aunque los fósiles más antiguos se han encontrado en depósitos del Oligoceno de Dakota del Sur, su centro de diversificación se encuentra en México (Ernest y Borbour 1989). Actualmente se distribuye desde el este de Canadá hasta Sudamérica (Goin *et al.* 1978).

En esta familia exclusiva de América (Figura 5) se incluyen a las tortugas dulceacuícolas más pequeñas; su longitud varia entre los 11 y 25 cm pero las especies tropicales pueden alcanzar tamaños de hasta cerca de 40 cm de longitud (Alderton 1988). Son comúnmente llamadas tortugas de fango, de lodo o tortugas almizcleras (Merchán 1992).

En la actualidad la familia Kinosternidae está dividida en dos Subfamilias denominadas Staurotypinae y Kinosternidae; cuenta con tres géneros, los cuales son *Claudius*, *Staurotypus* y *Kinosternon* y se conocen 22 especies, así como varias subespecies (Anexo 1, Iverson 1997, Ernest y Borbour 1989).

La ubicación taxonómica de los distintos grupos dentro de la familia Kinosternidae ha estado en conflicto debido a que algunos autores colocan a ciertos grupos en una posición diferente a otros investigadores. Ernest y Barbour (1989) e Iverson (1991 y 1997) reconocen dos subfamilias en la familia Kinosternidae, estas son la Staurotypinae que contiene a los géneros *Staurotypus* y *Claudius* y la Kinosterninae con un solo género, el *Kinosternon*. Otros investigadores como Bickham y Carr (1983) y Alderton (1988) consideran a Staurotypinae como una familia diferente, denominada Staurotypidae, la cual sitúan como grupo hermano de Kinosternidae.

A nivel de género, las especies que se encontraban en *Sternotherus* actualmente se ubican en el género *Kinosternon* (Iverson 1997). En la revisión más reciente sobre las tortugas del mundo realizada por Iverson en 1997, el género *Sternotherus* ha sido eliminado y sus especies actualmente se conocen como *Kinosternon odoratus*, *Kinosternon carinatus* y *Kinosternon minor*.

El cariotipo de las especies analizadas del género *Kinosternon* se compone de 56 cromosomas (Tabla III), los cuales están agrupados de la siguiente manera: de 24 a 26 macrocromosomas y de 30 a 32 microcromosomas (Ernest y Borbour 1989). En este género se ha observado el efecto de mecanismos de determinación sexual influenciada por la temperatura de incubación de los embriones (Vogt *et al.* 1982, Vogt y Flores-Villela 1992, Ewert y Nelson 1991).

Los géneros *Claudius* y *Staurotypus* presentan un cariotipo compuesto por 54 cromosomas, teniendo de 24 a 26 macrocromosomas y de 28 a 30 microcromosomas (Killebrew 1975, Sites *et al.* 1979a, Moon 1974). Las especies de *Staurotypus* poseen cromosomas sexuales diferenciados (Bull *et al.* 1974, Sites *et al.* 1979b) y tanto éstas como *Claudius* exhiben mecanismos de determinación sexual de tipo genotípico (Ewert y Nelson 1991, Vogt y Flores Villela 1992). 🐢



Figura 5. Mapa de distribución de la Familia Kinosternidae (Ernest y Borbour 1989).

2.3 Especie de estudio, *Kinosternon herrerae*.

- Generalidades.

Kinosternon herrerae es una especie descrita por primera vez por Stejneger en 1925 (Smith y Smith 1976). Se conoce comúnmente como tortuga del fango, tortuga casquito o tortuga del fango de Herrera (Figura 6). No se han registrado subespecies (Ernest y Borbour 1989). Su nombre específico es en honor al científico mexicano Alfonso L. Herrera, quién registró cuatro especímenes de la especie en el U. S. National Museum (Smith y Smith 1976).

Los individuos de esta especie lucen caparazones en forma de domo, los cuales son más anchos por detrás de la parte media y cuya longitud es de aproximadamente 17 cm (Smith y Smith 1976). En los adultos el caparazón es de color olivo a café con grietas negruzcas. El plastrón y el puente son de color amarillo a un café tenue. La piel es grisáceo marrón amarillento y las extremidades tienen manchas negras. La mandíbula es de un color marrón manchado y el pico en los adultos es fuertemente aguileño (Ernest y Borbour 1989). Tanto hembras como machos ostentan una uña terminal en la cola y sobre la parte superior de cada muslo tienen un área de escamas con tubérculos. En juveniles generalmente se observan dos quillas laterales y en los adultos puede haber una simple o media quilla. Los escudos marginales 10 y 11 son más altos que los anteriores a estos. El plastrón es estrecho y con muescas en la parte posterior. En machos, el lóbulo anterior es casi tan largo como el posterior, pero en hembras el lóbulo posterior es ligeramente menor que el anterior. Tienen poca movilidad en la charnela posterior (es acinética). Con un par de barbillas en la parte anterior de la sínfisis mandíbula y otro par de menor tamaño ubicado en la parte posterior a los tímpanos (Ernest y Borbour 1989). Esta especie manifiesta dimorfismo sexual en el tamaño de la cola y en la longitud del individuo. Las hembras tienen una cola corta y gruesa mientras que los machos la tienen larga y gruesa con una espina terminal y un área de escamas con tubérculos sobre la superficie posterior de cada muslo. Los machos alcanzan mayor tamaño que las hembras sin embargo, su plastrón a diferencia de las hembras, es proporcionalmente menor y el caparazón es más angosto y menos profundo (Ernest y Borbour 1989).

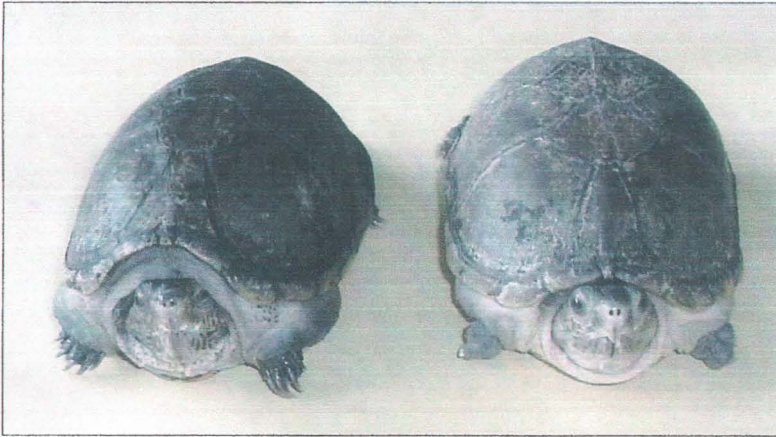


Figura 6. Macho (izquierda) y hembra (derecha) adultos de tortuga casquito, *Kinosternon herrerai* utilizados en el presente estudio.

- Reproducción

Las hembras alcanzan la madurez sexual cuando el caparazón llega a medir de 115 a 130 mm de largo. Ponen de 2 a 4 huevos por nido y probablemente pueden tener más de una puesta al año. Los huevos miden 35 por 18 mm y pesan 7.1 gramos en promedio. La temporada de ovoposición de esta tortuga se ha registrado en el mes de diciembre (Hernández 2002).

- Hábitat.

Se localiza en elevaciones de hasta 800 metros sobre el nivel del mar (Smith y Smith 1976) hallándose en cuerpos de agua con corriente, en lugares lodosos y oscuros, y en arroyos cubiertos por bosques de galería. Ocasionalmente se localiza caminando sobre tierra firme (Ernest y Borbour 1989). Se han realizado colectas en estanques de fondo lodoso y aguas bastante turbias, con vegetación acuática abundante (Hernández 2002).

- Alimentación.

Su dieta es omnívora, el principal componente vegetal en su alimentación consiste de frutos de *Ficus sp.* y el animal consta de gasterópodos, larvas de odonatos y lepidópteros, así como milpiés. Carne y pescado son comúnmente utilizados como alimento cuando se mantienen en cautiverio (Ernest y Borbour 1989).

- Asociaciones.

Este organismo se ve asociado con dos especies de gusanos segmentados pertenecientes al género *Placobdella* (en donde se incluyen a los gusanos de tierra y las sanguijuelas) ubicado en el Phylum Annelida. También se relaciona con especies del género *Basicladie* que son algas verdes filamentosas de agua dulce incluidas en la División Chlorophyta (Hernández 2002).

- Distribución.

La distribución de *K. herrerae*, es endémica para México localizándose a lo largo del Golfo (Figura 7), en Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla (Iverson 1997) y posiblemente en Querétaro (Smith y Smith 1976).

- Situación legal.

Se encuentra sujeta a Protección Especial (NOM-ECOL-059-2002). Es una especie de importancia económica, ya que frecuentemente se observa en las tiendas de mascotas y en algunas localidades es utilizada como alimento o en la elaboración de artesanías (Merchán 1992). 🐢

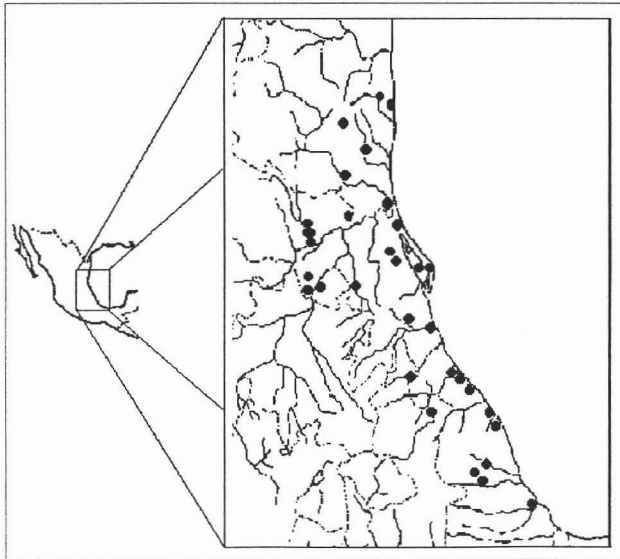


Figura 7. Mapa de distribución de *Kinosternon herrerae* en México (Iverson 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

3.1 Implicaciones para la especie de estudio.

En la mayoría de los reptiles la determinación sexual es dependiente de la temperatura (DST), en algunas especies este factor ambiental activa una cascada de genes sinérgicos que ocasionan la diferenciación gonadal. Los mecanismos implicados en la diferenciación sexual en los reptiles aún no han sido aclarados. La DST llama mucho la atención cuando se manifiesta en aquellas especies amenazadas o en peligro de extinción ya que si aparecen problemas asociados con la alteración del hábitat de anidación se pone aun más en peligro a tales organismos. Cuando se provoca un cambio en las áreas de anidación se alteran también las temperaturas de los nidos, lo que lleva a una modificación de las tasas sexuales en las poblaciones naturales. Lo anterior puede tener graves consecuencias ya que se podría favorecer la formación de un solo sexo en las nuevas áreas de anidación.

3.2 Implicaciones para la conservación.


Las poblaciones de tortugas han estado declinando de manera alarmante en todo el mundo durante los últimos años. Una gran cantidad de factores ha contribuido a este descenso. La explotación de los adultos de muchas especies para el consumo como alimento es un problema importante. Debido al bajo índice de maduración de las tortugas, no pueden soportar dicha explotación y al mismo tiempo mantener su población. Por otro lado, el deterioro y la desaparición de ambientes naturales han eliminado poblaciones enteras (Merchán 1992). Se han sugerido planes dirigidos hacia la conservación de especies amenazadas, en los que se propone la manipulación de los procesos de determinación del sexo influenciado por la temperatura, ya sea por medio de incubadoras o por la remoción de los nidos, principalmente en tortugas marinas (Girondot *et al.* 1998). Sin embargo, los protocolos empleados hasta la fecha han dejado fuera ciertos aspectos importantes de la biología de estos organismos. En primer lugar se debe tomar en cuenta los sitios de anidación, ya que se ha visto que su elección por parte de las hembras influye en la proporción de los sexos en su ambiente natural.

Por otro lado se ha reportado que mediante la manipulación de estos mecanismos, en ocasiones las temperaturas utilizadas para la incubación de los huevos provocan el desarrollo de intersexos, los cuales son infértiles. También se ha observado que las hembras desarrolladas mediante incubación controlada no llegan a ser receptivas sexualmente en la madurez (Girondot *et al.* 1998).

3.3 Empleo de técnicas para la obtención del cariotipo en reptiles.

Las técnicas de laboratorio hasta ahora empleadas requieren del sacrificio de uno o varios individuos de la misma especie, con el fin de extraer los órganos que proporcionen las células adecuadas de las cuales se obtienen los cromosomas. En el caso de especies en peligro de extinción y amenazadas es de gran importancia que la aplicación de técnicas de laboratorio para su estudio no requieran del sacrificio de los individuos, por lo que es necesario el implemento de nuevas técnicas que permitan tanto el estudio como la conservación de dichas especies.

3.4 Aplicación en estudios taxonómicos.

Desde mediados del siglo XX, el análisis del cariotipo (número cromosómico) se ha manejado como carácter taxonómico adicional en los trabajos de clasificación filogenética. Con el progreso de las técnicas de obtención de preparaciones cromosómicas se ha hecho posible el estudio detallado que permite la obtención de gran cantidad de datos que pueden ser empleados como caracteres taxonómicos (Goyenechea 2001). Los trabajos citogenéticos se integran a los análisis morfológicos, anatómicos, fisiológicos, paleontológicos, bioquímicos y moleculares, con el fin de aumentar la cantidad de datos que proporcionen mejores resultados en las investigaciones dirigidas a resolver problemas taxonómicos en diversos grupos de organismos; los cuales son abordados por la Taxonomía y Sistemática modernas. En la Familia Kinosternidae se hace necesaria la obtención de más caracteres que puedan ser utilizados en este tipo de análisis y que permitan aclarar sus relaciones filogenéticas 

4. HIPÓTESIS

Dentro del género *Kinosternon* se ha observado que las especies estudiadas exhiben determinación sexual dependiente de la temperatura (DST), tienen un cariotipo compuesto de 56 cromosomas dispuestos en dos grupos denominados macro y microcromosomas, así como ausencia de cromosomas sexuales por lo que se espera que la tortuga dulceacuícola *Kinosternon herrerae* perteneciente a este género, muestre un cariotipo con el patrón anterior. 🐢

5. OBJETIVOS:

- Estandarización de la técnica de cultivo de linfocitos de sangre periférica de la vena dorsal coccígea de la tortuga dulceacuícola *Kinosternon herrerae*.
- Reconocer los grupos cromosómicos (macro y microcromosomas) de los cuales se compone el cariotipo de la tortuga *K. herrerae*.
- Detectar la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos en dicha especie.
- Comparar el cariotipo de *K. herrerae* con los cariotipos de otras especies de tortugas del mismo género y géneros relacionados. 🐢

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de cuatro tortugas adultas (dos hembras y dos machos) previamente sexadas. Estas fueron obtenidas por los siguientes medios:

- Los individuos (hembras y machos) fueron proporcionados por el Biólogo Francisco Soberón, de la Dirección General de Vida Silvestre, SEMARNAT.
- Las restantes fueron colectadas manualmente en pozas de agua ubicadas en la localidad de Santiago Yancuictlalpan en Cuetzalan del Progreso, Puebla.

6.1 Obtención de sangre periférica de la vena coccigea de la tortuga.

Para obtener las muestras sanguíneas se utilizaron tortugas (hembras y machos) adultas y sanas de la especie *Kinosternon herrerae* previamente sexadas.

A los individuos se les lavó la cola con agua corriente y jabón, en la misma área se les limpió con un algodón bañado en alcohol. En la región más próxima a la uña de la cola se realizó un corte transversal utilizando un bisturí o una navaja de doble filo estéril, produciendo una herida en la cual se provocó el sangrado de la vena caudal (coccigea) y en este sitio se colectó la muestra sanguínea empleando una jeringa de 3 ml previamente heparinizada (Heparina sódica, Inhepar, PiSA). A dicha jeringa se le sustituyó la aguja por un tubo de plástico estéril, con el cual se ejerció presión en la vena mencionada y por succión se extrajo la sangre, evitando contaminación por tejido epidérmico.

Durante la toma de la muestra sanguínea se eliminó el almizcle que es una secreción que podía provocar contaminación de la sangre y se lavó nuevamente el área de colecta. De cada individuo se obtuvieron entre 0.5 y 1.0 ml de sangre.

6.2 Cultivo de linfocitos.

Se realizaron experimentos preliminares con el fin de determinar las condiciones adecuadas del cultivo de linfocitos periféricos de la tortuga *Kinosternon herrerae*, el procedimiento utilizado se basó en la técnica de cultivo de linfocitos humanos, con algunas modificaciones que a continuación se describen.

Los cultivos de sangre periférica se realizaron en la campana de flujo laminar, en condiciones extremas de esterilidad para evitar contaminación. En frascos de cultivo de vidrio esterilizados se agregaron 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) complementado con fitohematoglutina (Gibco) al 4% y el 0.1% de Antibiótico-antimicótico (Gibco) previamente esterilizado por filtración con membranas miliporo de 0.45 μm . A cada uno de los frascos con el medio de cultivo se les agregó 50 μl de sangre heparinizada. Los frascos de cultivo se incubaron a una temperatura constante de 29 ° C en una estufa de cultivo (BG, E-41). Después de 96 y 114 horas de iniciado el cultivo de linfocitos, se agregaron 100 μl de solución de colchicina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se dejaron incubando por 2 horas más a 29 ° C para bloquear la división celular en metafase y visualizar los cromosomas. Posteriormente los cultivos fueron transferidos a tubos de centrifuga estériles de 15 ml para obtener el botón celular por centrifugación a 1000 rpm (200g) y de esta manera cosechar linfocitos exclusivamente.

6.3 Cosecha de linfocitos.

Al transcurrir 96 y 114 hr de incubación de los cultivos a 29° C, y después de las dos horas de haber agregado la colchicina, los cultivos fueron centrifugados a 1000 rpm (200 g) por 10 min, el sobrenadante fue eliminado cuidadosamente y se añadieron 8 ml de una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl, 0.075 M) previamente calentado a 37 ° C. Los cultivos se dejaron reposar en incubación por 30 minutos más a 37° C. Posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos.

6.4 Fijación y preparación de laminillas.

A continuación se eliminó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 10 ml de fijador frío (solución de Carnoy preparada con metanol-ácido-acético 3:1) y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Los botones celulares fueron lavados tres veces por medio de centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos con el mismo fijador a temperatura ambiente. El botón de linfocitos fue mezclado suavemente con 1 ml de fijador para realizar las preparaciones con las células metafásicas.

Las laminillas se elaboraron por goteo (6 portaobjetos por cada tubo), dejando caer varias gotas de la suspensión celular desde una altura aproximada de 1.3 metros con el fin de lograr una dispersión adecuada de los cromosomas. Se dejaron secar verticalmente al aire y se etiquetaron para su posterior revisión en el microscopio de contraste de fases.

6.5 Tinción.

Para teñir los cromosomas metafásicos se utilizaron dos métodos, los cuales son los siguientes:


- Una parte de las laminillas se sumergieron en una solución de Giemsa (Merck) al 10% a temperatura ambiente durante dos o tres horas. Posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire verticalmente.
- El resto de las laminillas se sometieron a un tratamiento con una solución de colorante de Aceto-Orceína (Sigma) al 2% por dos horas a temperatura ambiente, estas se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar verticalmente al aire.

6.6 Análisis microscópico de los cromosomas

Las laminillas elaboradas en los diferentes experimentos se observaron en un microscopio de luz (40x), se localizaron aquellas preparaciones en las que se obtuvieron la mayor cantidad de metafases así como de linfocitos estimulados. Se marcaron las metafases con cromosomas dispersos en plantillas elaboradas para cada uno de los portaobjetos revisados. Se localizaron un total de 100 metafases para cada individuo.

Las metafases con cromosomas bien teñidos y dispersos se digitalizaron para su posterior análisis. De algunas metafases se adquirieron microfotografías en aumentos de 100 a 500X con aceite de inmersión. Las microfotografías se capturaron en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM empleando con un microscopio de luz (Olympus, modelo Provis AX70), con cámara integrada de 35 mm. Se usaron rollos fotográficos a color (Kodak, ProImage 100) y se revelaron en papel fotográfico mate.

Una vez adquiridas las microfotografías, se digitalizaron y se examinaron con el resto de las imágenes. Se seleccionaron de cada individuo 10 células que se revisaron con detalle para conocer su número cromosómico. Los cromosomas individuales se cortaron, se parearon los homólogos de acuerdo a su tamaño y posición del centrómero y los pares se acomodaron en orden decreciente formando tres grupos de acuerdo con Bickham y Carr (1983).

Los cromosomas se midieron con un objetivo micrométrico (100X), tomando los datos de longitud de los brazos p y q así como el total de cada cromosomas. La longitud del brazo corto (p) y del brazo largo (q) se midieron en micrometros; con la suma de p más q se obtuvo la longitud total del cromosoma. Posteriormente las medidas se convirtieron a porcentajes para comparar las medidas realizadas a partir de diferentes metafases. Los cromosomas se clasificaron según los parámetros establecidos por Levan *et al.* en 1964 (Anexo 3). 


7. RESULTADOS.

7.1 Estandarización de la Técnica de Cultivo.

En los mamíferos existe gran variedad de técnicas genéticas estandarizadas como las aberraciones cromosómicas, aductos microarreglos, entre otras, sin embargo no es lo mismo para otros grupos taxonómicos como en los reptiles para los cuales se tienen relativamente pocas técnicas citogenéticas y estas llegan a ser laboriosas, tardadas y no son aplicables a todas las especies.

El protocolo anteriormente descrito se utilizó para determinar las condiciones adecuadas para el cultivo linfocitos de sangre periférica de la tortuga *Kinosternon herrerae* basado en la técnica de cultivo de linfocitos humanos y modificada en algunos aspectos, estableciéndose los siguientes pasos como los óptimos:

- El volumen del medio de cultivo fue de 2 ml .
- La cantidad de sangre heparinizada adicionada al medio de cultivo fue de 50 μ l.
- El tiempo y temperatura de incubación fue 114 horas a 29° C.
- El volumen de colchicina fue de 50 μ l, aplicado por 1:30 horas.
- La velocidad de centrifugación a 1000 rpm (200 g).
- El volumen, el tiempo y temperatura de incubación con KCl, fueron de 5 ml, 30 min y 37° C, respectivamente.
- El tiempo de tinción con Giemsa fue de 2 horas y en algunos casos se tuvieron que dejar hasta por 24 horas.

El resto de las soluciones utilizadas en la técnica, así como el tiempo de su aplicación en las muestras se manejó de acuerdo a la técnica para linfocitos humanos in vitro, ya que se observó que estos parámetros no afectaron a los cultivos celulares, obteniéndose buenos resultados (Anexo 2). 

7.2 Composición del Cariotipo de *Kinosternon herrerae*.

Se analizaron aproximadamente 500 laminillas con cromosomas metafásicos teñidos con Giemsa correspondientes a 11 cultivos consecutivos de sangre periférica de tortugas machos y hembras. Con base en los criterios morfológicos y estructurales se procedió al arreglo de cada par cromosómico de acuerdo a la longitud y a la posición del centrómero. Se encontró que en las metafases analizadas el número de cromosomas oscilaba entre 50 y 60 o más, siendo de 56 el número de cromosomas más constante, además de que las metafases se veían demasiado dispersas y se confundían con otras de los alrededores. Esto puede ser provocado por que algunos cromosomas quedan incluidos en diferentes campos mitóticos o se pierden en el proceso de la preparación de laminillas. Para lo cual, se eligieron los sitios en los cuales las metafases se observaron bien definidas y sin otras mitosis cercanas.


Se determinó el cariotipo de la tortuga dulceacuícola *Kinosternon herrerae* de acuerdo al tamaño y posición del centrómero de cada cromosoma (Anexo 4), el cual está constituido de 28 pares de cromosomas ($2n = 56$) (figuras 8-10), los cuales se organizaron de la siguiente manera:

Grupo A: 18 Pares de macrocromosomas metacéntricos y 2 pares submetacéntricos.

Grupo B: no se encontraron pares de macrocromosomas telocéntricos o subteloecéntricos.

Grupo C: 8 Pares de microcromosomas (figuras 8-10).

No se observaron cromosomas sexuales heteromórficos por lo que todos los individuos examinados presentan un cariotipo idéntico (figuras 8-10).

La fórmula cromosómica obtenida para *Kinosternon herrerae* mediante el análisis morfológico de los cromosomas es $F. C. = 20(A):0(B):8(C)$ (figuras 8-10). El número fundamental de la especie es de 72; este parámetro es definido como el número total de brazos en el complemento haploide (figuras 8-10). La longitud total más grande pertenece a un par cromosómico metacéntrico, el cual se consideró como base para obtener el porcentaje del resto de los cromosomas y poder clasificarlos según sus medidas micrométricas. Todos los cromosomas en los que no se localizó el centrómero se consideraron como unirrameos y se ubicaron en el grupo de los microcromosomas. 

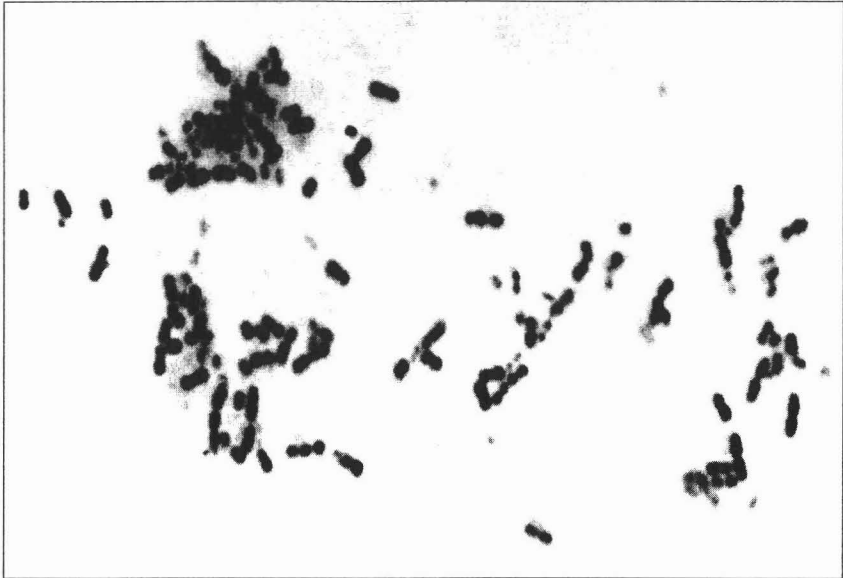


Figura 8. Cromosomas en metafase de linfocitos de la tortuga *K. herrerai* (δ) teñidos con Giemsa, con $2n=56$.

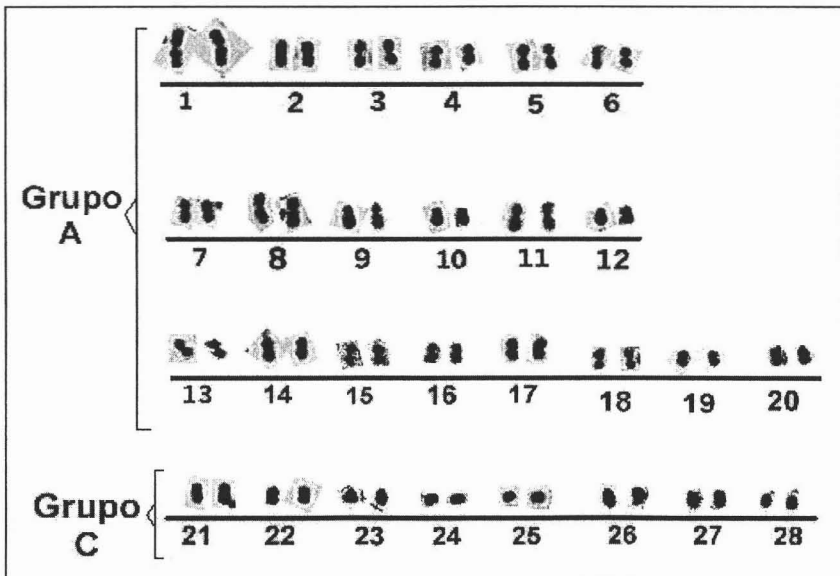


Figura 9. Cromosomas de la tortuga *Kinosternon herrerai* (δ) ordenados en los Grupos correspondientes (A:B:C) según su morfología y estructura (Bickham y Carr 1983). El cariotipo consta de 28 Pares de cromosomas ($2n=56$).

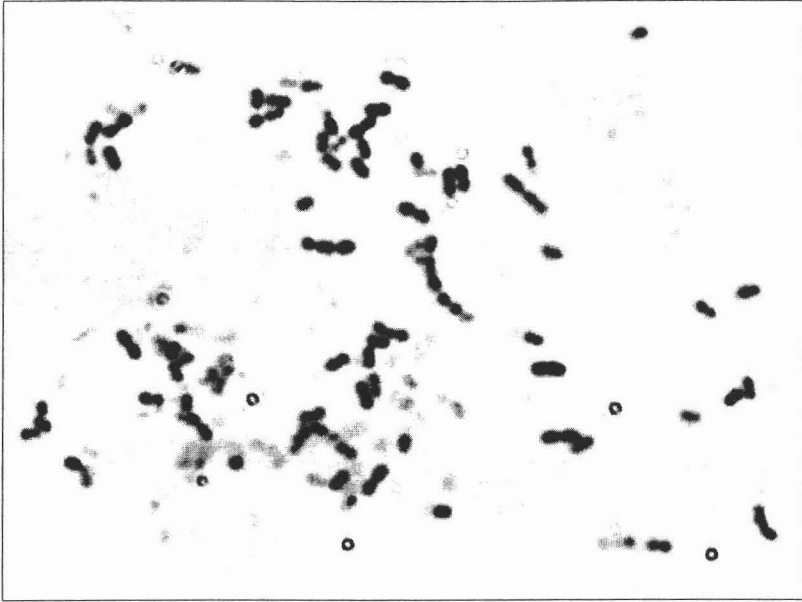


Figura 10. Cromosomas en metafase de linfocitos de la tortuga *K. herrerae* (♀) teñidos con Giemsa, con $2n=56$.

8. DISCUSIÓN

Desde hace una década algunas especies de tortugas acuáticas se están utilizando como bioindicadores de contaminantes ambientales, en especial para conocer niveles de metales pesados y de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los tejidos, sin embargo son pocos los análisis citogenéticos.

Dentro de las especies de tortugas reconocidas por Iverson (1997), los organismos de la familia Kinosternidae son un grupo de animales dulceacuícolas poco estudiadas genéticamente, debido a que son limitadas las técnicas citogenéticas que se aplican para estos fines. Killebrew (1975) obtuvo cromosomas metafásicos por medio de "squash" de epitelio córneo y Sites *et al.* (1979a) utilizaron cultivos celulares de fibroblastos preparados con músculo cardiaco de tortugas recién sacrificadas.

En el presente trabajo se lograron establecer las condiciones y los parámetros adecuados para el cultivo de linfocitos de sangre periférica de la tortuga *Kinosternon herrerai*, con los cuales fue posible conseguir cromosomas de células en metafase, que nos permitieron organizar el cariotipo de dicha especie. Para tener buenos resultados en la adquisición de los cromosomas es necesario considerar varios aspectos importantes antes y durante la realización del cultivo de linfocitos, tales como los frascos de cultivo, el volumen medio de cultivo, la temperatura, el pH, la humedad y las condiciones de esterilidad en las que se deben obtener las muestras sanguíneas. A través de otros métodos se han logrado proliferar *in vitro* a los linfocitos de reptiles utilizando medios de cultivo específicos y enriquecidos con suero análogo al de las tortugas, lipolisacáridos o interleucina-2 (Ulsh *et al.* 2001). Sin embargo en este estudio, el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) complementado únicamente con fitohemaglutinina al 4% fue adecuado para la proliferación de los linfocitos a partir de sangre periférica completa de las tortugas adultas machos y hembras.

Con la técnica estandarizada se captaron cromosomas metafásicos con el centromero evidente no obstante que no se lograron observar las cromátidas hermanas separadas, lo cual concuerda con otros estudios (Ulsh *et al.* 2001).

La presencia del centrómero en cada cromosoma nos permitió identificar estructural o morfológicamente a los cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos y realizar el cariograma de *K. herrerae* e incluso los cromosomas más pequeños pudieron ser colocados en los grupos A o B con base a los criterios de Sites *et al.* (1979a). Sin embargo, en aquellos cromosomas en los que no se pudo identificar el centrómero por el tamaño se reunieron en el Grupo C de los microcromosomas (Sites *et al.* 1979a).

Los idiogramas presentados por Sites *et al.* (1979a) son los únicos que se dispusieron en los Grupos A, B y C; a diferencia del resto de los cariotipos en los cuales los cromosomas se organizan de acuerdo al tamaño de manera decreciente (figuras 8-10), en la mayoría de los trabajos se observa que en los cromosomas metafásicos no se distinguen claramente las cromátidas hermanas, con excepción de pocos idiogramas. Sin embargo, sí es posible la identificación de la posición del centrómero. De todas las especies analizadas, únicamente en las tortugas del género *Staurotypus* se ha reportado la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos (Bull *et al.* 1974, Sites *et al.* 1979b). En el resto de los casos dichos cromosomas no son distinguibles.

De acuerdo a estudios citogenéticos realizados en las especies del Género *Kinosternon* se advierte que no hay variación en la composición cromosómica. Todas las especies analizadas tienen 56 cromosomas, distinguiéndose cambios solo a nivel de ubicación de los cromosomas en cada uno de los grupos A, B o C (Barros *et al.* 1972, Stock 1972, Gorman 1973, Killebrew 1975, Bickham y Baker 1976, Sites *et al.* 1979a). El número cromosómico del género *Kinosternon* no muestra variación, notándose que todas las especies hasta ahora analizadas poseen un componente de 28 pares de cromosomas homólogos con un número diploide de $2n= 56$. Las diferencias encontradas en este grupo se registran en la morfología de los pares cromosómicos de acuerdo con Ernest y Borbour (1989) quienes describen una diferencia en cuanto a la cantidad de cromosomas en cada uno de los grupos de macro y microcromosomas, sin embargo no hacen una revisión detallada. Sites *et al.* (1979a) estudiaron 4 especies de *Kinosternon* y para todos los casos, los cariotipos presentan 24 macrocromosomas y 32 microcromosomas teniendo una fórmula

cromosómica de 6:6:16 en la que se distinguen 12 cromosomas metacéntricos, 12 telocéntricos y 32 microcromosomas.

La forma de ordenar el cariotipo utilizada por Sites *et al.* (1979a) difiere a la que estableció Killebrew (1975) para otras especies de *Kinosternon* en las que describe un grupo de 30 microcromosomas y un grupo de 26 macrocromosomas en el que se incluye a 14 metacéntricos, 8 submetacéntricos y 4 telocéntricos. Por lo tanto su fórmula cromosómica es 11:2:15. Estas disimilitudes pueden deberse a las distintas técnicas de clasificación utilizadas, en estos casos no se explica a detalle la forma en que se ordenan los cromosomas y no se hace mención de las medidas utilizadas como parámetros de análisis. La especie estudiada en este trabajo presenta un cariotipo que coincide con el número cromosómico de 56 de la familia y género.

Es importante mencionar que algunos de los cariotipos reportados son obtenidos únicamente de machos o de hembras de manera independiente, a diferencia del presente trabajo en el que se estudió el cariotipo de ambos sexos. Dentro de la familia *Kinosternidae* se observa un patrón conservado del número cromosómico, las especies de los géneros *Staurotypus* y *Claudius* muestran cariotipos con un número cromosómico diploide de 54. Este es un carácter que se puede considerar de importancia para investigaciones con carácter filogenético. Sin embargo, también en este grupo se observa que hay discrepancias en cuanto a la clasificación de los cromosomas, ya que las especies tienen fórmulas cromosómicas variables, tal vez debido a los parámetros utilizados por cada uno de los investigadores que las analizaron. Además del número cromosómico, otra distinción clara es la presencia de cromosomas sexuales, y por lo tanto de determinación sexual genotípica en estas especies ya que son las únicas de la familia *Kinosternidae* que los poseen (Vogt y Flores-Villela 1992).

En la especie estudiada no identificamos cromosomas sexuales, por lo que es posible que el mecanismo de determinación sexual dependa de la temperatura, como ocurre en *Kinosternon flavescens*, *Sternotherus (Kinosternon*) odoratus* (Vogt *et al.* 1982), *K. leucostomum* (Vogt y Flores-Villela 1992), *K. scorpioides cruentatum*, *S. (K*) carinatus* y *S. (K*) minor* (Ewert y Nelson 1991), cuyos individuos no portan cromosomas sexuales.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos inferir que la determinación sexual de *Kinosternon herrerae* no es de tipo cromosómico (DSG), por lo que la diferenciación gonadal y el posterior desarrollo fenotípico de los individuos podría ser influenciado por factores ambientales tales como la temperatura (DST) de incubación de los embriones. Sin embargo, es necesario que se realicen más pruebas genéticas y moleculares que confirmen la influencia de la temperatura en la proporción de machos o hembras incubados de manera controlada.

El sistema cromosómico que se ha reportado en estos casos es el XX/XY con machos heteromórficos (Sites *et al.* 1979b). Los cromosomas al igual que los caracteres fenotípicos se modifican gradualmente en el transcurso de la evolución debido a las presiones selectivas del medio. El análisis de la evolución de grupos específicos se complementa con el estudio de las características de los complementos cromosómicos, los cuales pueden proporcionarnos información acerca de las posibles trayectorias que han seguido las especies a lo largo del tiempo.

Observando los cariotipos reportados hasta la fecha de las diferentes especies de la familia Kinosternidae se puede ver que en cuanto a los mecanismos de determinación sexual, estos se mantienen constantes dentro de cada una de las subfamilias. De esta manera, la subfamilia Staurotypinae presenta DSG con un sistema XX/XY y la subfamilia Kinosternidae manifiesta DSA con sistemas cromosómicos homomórficos. 🐢

9. CONCLUSIONES

- El número cromosómico diploide de *K. herrei* es de $2n= 56$, sin diferenciación sexual, por lo que el haploide es de 28 y el fundamental es de 76 brazos cromosómicos. La fórmula cromosómica de esta especie de acuerdo a los criterios de Bickham y Carr (1983) y Levan *et al.* (1964) consta de 18 macrocromosomas metacéntricos y 2 submetacéntricos en el Grupo A; 8 microcromosomas en el Grupo C, y no presenta macrocromosomas subtelocéntricos del Grupo B. Los datos obtenidos en el presente estudio, en cuanto a número cromosómico, concuerdan con los reportes de cariotipos de especies relacionadas.
- La técnica de cultivo de linfocitos humanos modificada para sangre periférica de la tortuga *Kinosternon herrerae* resultó adecuada, ya que es un método sencillo, rápido y eficaz en la obtención de células mitóticas. Permite el manejo de individuos sin la necesidad de sacrificarlos como ocurre con el empleo de otros métodos de laboratorio que tienen el mismo propósito. Con la estandarización de dicha técnica, ahora es posible que se obtengan los cariotipos de las especies de la familia Kinosternidae que aun faltan por trabajarse, lo cual permitirá en un futuro establecer una relación filogenética del grupo aun más clara.
- Este análisis citogenético de la especie, permitirá contribuir al conocimiento de sus relaciones filogenéticas dentro del género *Kinosternon*. La especie *K. herrerae* a nivel cromosómico, efectivamente está más emparentada con las especies de este género debido a que presenta semejanza en su clasificación cromosómica, que con otras de la misma familia como *Staurotypus*. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las especies del género *Kinosternon* (*Sternotherus*) mantienen un componente cromosómico constante, y estos a su vez difieren del cariotipo encontrado en el género *Staurotypus* por lo que se sugiere que dicho género puede no estar relacionado directamente con los anteriores. 🐢


10. REFERENCIAS

- Alderton, D. 1988. *Turtles & Tortoise of the World*. Facts on File Publications. New York. 191 pp.
- Barros R. M., Ayres M., Sampaio M. M., Cunha O. y Assis F. 1972. Karyotypes of two subspecies of turtles from the Amazon region of Brazil. *Caryologia*. 25:463-469. En: Bickham J. W. y Carr J. L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of Cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*. 1983:918-932.
- Bickham J. W. y Baker R. J. 1976. Karyotypes of some neotropical turtles. *Copeia*. 1976: 703-708.
- Bickham J. W. y Carr J. L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of Cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*. 1983:918-932.
- Bull J. J. 1980. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. 55:3-21.
- Bull J. J., Legler J. M. y Vogt R. C. 1985. Temperature dependent sex determination in two suborders of turtles. *Copeia*. 1985:784-786.
- Bull J. J., Moon R. G. y Legler J. M. 1974. Male heterogamety in Kinosternid turtles (*Genus Staurotypus*). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 13: 419-425.
- Charnier M. 1966. Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). *C. R. Soc. Biol. Paris*. 160:620-622. En: Ciofi C. y Swingland I. R. 1997. Environmental sex determination in reptiles. *Applied Animal Behaviour Science*. 51:251-265.
- Ciofi C. y Swingland I. R. 1997. Environmental sex determination in reptiles. *Applied Animal Behaviour Science*. 51:251-265.
- Clarck, M. S. y Wall W. J. 1996. *Chromosomes. The complex code*. Chapman & Hall. London. Pg 72-93.
- Cree A., Thompson M. B. y Daugherty C. H. 1995. Tuatara sex determination. *Nature*. 375: 543.
- Crews D. 1994. Sexualidad animal. *Investigación y Ciencia*. 2: 50-57.
- Deeming D. C. y Ferguson M. W. J. 1988. Environmental regulation of sex determination in reptiles. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 322:19-39.
- Ernest C. H. y Barbour R. W. 1989. *Turtles of the world*. Smithsonian Institution Press. Washington D. C. 313 pp.

- Ewert M. A. y Nelson C. E. 1991. Sex determination in turtles: Diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia*. 1991:50-59.
- Ewert M. A., Jackson D. R. y Nelson C. E. 1994. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *Journal of Experimental Zoology*. 270:3-15.
- Girondot M., Fouillet H. y Pieau C. 1998. Feminizing turtle embryos as a conservation tool. *Conservation Biology*. 12 : 353-362.
- Goin C. J., Goin O. B. y Zug G. R. 1978. *Introduction to herpetology*. W. H. Freeman and Company, New York. 378 pp.
- Gorman, G. 1973. The chromosomes of the reptilia, a cytotaxonomic interpretation. P. 347-424. En: Chiarelli A. B. y Capanna E. (eds). *Citotaxonomy and vertebrates evolution*. Academic Press, N.Y. 349-424.
- Goyenechea Mayer-Goyenechea I. 2001. Sistemática de Reptiles y Citogenética. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*. 9:13-21.
- Gutzke W. H. N. y Paukstis G. L. 1983. Influence of the hydric environment on sexual differentiation of turtles. *Journal of Experimental Zoology*. 226:467-469.
- Hare W. C. D. y Singh E. L. 1979. *Citogenética de la reproducción animal*. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España. 150 pp.
- Head G. May R. M. y Pendleton L. 1987. Environmental determination of sex in the reptiles. *Nature*. 239:198-199
- Hernández Hernández J. 2002. Obtención de algunos parámetros sanguíneos de la tortuga de agua dulce *Kinosternon herrerae* en el poblado de Santiago Yancuictlalpan, municipio de Cuetzalan del Progreso, Puebla. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hickman C. P. Jr., Roberts, L. S. y Larson A. 1994. *Integrated principles of zoology*. 9a Edición. Wm. C. Brown Publishers. Dubuoque, Iowa. 687-689 pp.
- Iverson J. B. 1991. Phylogenetic hypotheses for the evolution of modern Kinosternine turtles. *Herpetological Monographs*. 5: 1-27.
- Iverson J. B. 1997. *A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world*. Green Nature Books. Homestead (Florida, USA) 363 pp.
- Janzen F. J. y Paukstis G. L. 1991a. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology*. 66:149-179.

- Janzen F. J. y Paukstis G. L. 1991b. A preliminary test of the adaptive significance of environmental sex determination in reptiles. *Evolution*. 45:434-440.
- Jiménez García L. F. y Merchant Larios H. 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. México. 912 pp.
- Killebrew F. C. 1975. Mitotic chromosomes of turtles. III. The Kinosternidae. *Herpetologica*. 31: 398-403.
- Korpelainen H. 1990. Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 65: 147-184.
- Levan A., Fredga K. y Sandberg A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52:201-220. En: Ramírez Rivera I. 1998. Determinación del cariotipo de *Reithrodontomys sumichrasti dorsalis* (Rodentia: Muridae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Merchán Fornelino M. 1992. *El maravilloso mundo de las Tortugas*. Ediciones Antiquaria, S. A. Madrid. 478 pp.
- Moon R. G. 1974. Heteromorphism in a Kinosternid turtle. *Mammalian Chromosome Newsletter*. 15:10-11. En: Ernest C. H. y Barbour R. W. 1989. *Turtles of the world*. Smithsonian Institution Press. Washington D. C. 313 pp.
- Morrish B. y Sinclair A. 2002. Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction*. 124: 447-457.
- Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2002. Publicada en el Diario Oficial de fecha 6 de marzo de 2002.
- Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Álvarez-Uría M., Fraile-Láiz B., Sáez-Crespo F. J. y De Miguel-González M. P. 2000. *Biología Celular*. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. 361 pp.
- Parker K. L., Schedl A. y Schimmer B. P. 1999. Gene interactions in gonadal development. *Annual Review of Physiology*. 61:417-433.
- Pieau C., Dorizzi M. y Mercier R. N. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 887-900.
- Puertas M. J. 1999. *Genética. Fundamentos y perspectivas*. 2ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 913 pp.

- Sáez F. A. y Cardoso H. 1978. Citogenética básica y biología de los cromosomas. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaria general de la Organización de los Estados Unidos Americanos. Washington, D. C. 124 pp.
- Salamanca Gómez F. 1990. Citogenética humana, fundamentos y aplicaciones clínicas. Editorial Médica Panamericana. México. 400 pp.
- Sites J. W., Bickham J. W., Haiduk M. W. e Iverson J. B. 1979a. Banded karyotypes of six taxa of Kinosternid Turtles. *Copeia*. 4:692-698.
- Sites J. W. Jr., Bickham J. W. y Haiduk M. W. 1979b. Derived X chromosome in the turtle genus *Staurotypus*. *Science*. 206:1410-2.
- Smith H. M. y Smith R. B. 1976. Synopsis of herpetofauna of Mexico. Volume III. Source analysis and index for Mexican reptiles. North Bennington, Vermont, John Johnson. 997 pp.
- Snustad D. P., Simmons M. J. y Jenkins J. B. 1997. Principles of Genetics. John Wiley & Sons, Inc. New York 829 pp.
- Stejneger, L. 1925. New species and subspecies of American turtles. *J. Wash. Acad. Sci.* 15:462-463. En: Ernest C. H. y Barbour R. W. 1989. Turtles of the world. Smithsonian Institution Press. Washington D. C. 313 pp.
- Stock A. D. 1972. Karyological relationships in turtles (Reptilia: Chelonia). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 14: 859-868.
- Tamarin R. H. 1996. Principles of genetics. Wm. C. Brown Publishers. Boston. 683 pp.
- Ulsh B. A., Congdon J. D., Hinton T. G., Whicker F. W. y Bedford J. S. 2001. Culture methods for turtle lymphocytes. *Methods in Cell Science*. 22:285-297.
- Vogt R. C. y Bull J. J. 1982. Genetic sex determination in the spiny softshell *Trionyx spiniferus* (Testudines: Trionychidae). *Copeia*. 1982:699-700.
- Vogt R. C. y Flores-Villela O. 1992. Effects of incubation temperature on sex determination in a community neotropical freshwater turtles in southern Mexico. *Herpetologica*. 48:265-270.
- Vogt R. C., Bull J. J., McCoy C. J. y Houseal H. W. 1982. Incubation temperature influences sex determination in Kinosternid turtles. *Copeia*. 1982:480-482.
- Wibbels T., Bull J.J. y Crews D. 1994. Temperature-dependet sex determination: a mechanistic approach. *Journal of Experimental Zoology*. 270:71-78.

- Wilhoft D. C., Hotaling E. y Franks P. 1988. Effects of temperature on sex determination in embryos of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Journal of Herpetology*. 17: 38-42.
- Zentella Dehesa A., López Marure R., Gómez González E., Paredes García R. E., e Ibarra Sánchez M. de J. 1995. El ciclo celular y su regulación: la interacción entre las proteínas cinasa CDKs y la familia de las ciclinas. *Boletín de Educación Bioquímica (México)*. XV: 4-12.
- Zug G. R., Vitt L. J. y Caldwell J. P. 2001. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press. San Diego. 630 pp. 

ANEXOS.

1. Especies y subespecies reconocidas de la Familia Kinosternidae. La información se tomó de la revisión más reciente elaborada por Iverson en 1997.

Familia Kinosternidae Agassiz, 1857 Tortugas americanas almizcleras y de fango.				
Subfamilia Kinosterninae Agassiz, 1857.				
Género <i>Kinosternon</i> Spix, 1824.				
Especie.	Subespecie.	Descripción.	Nombre original o anterior.	Nombre en inglés.
1. <i>K. acutum</i>	Ninguna	Gray, 1831	<i>K. scorpioides</i> var. <i>acuta</i>	Tabasco mud turtle
2. <i>K. alamosae</i>	Ninguna	Berry y legler, 1980	Ninguno	Alamos mud turtle
3. <i>K. angustipons</i>	Ninguna	Legler, 1965	Ninguno	Narrow-bridged mud turtle
4. <i>K. baurii</i>	Ninguna	Garman, 1891	<i>Cinosternon baurii</i>	Striped mud turtle
5. <i>K. carinatum</i>	Ninguna	Gray, 1855	<i>Aromochelys carinatum</i> <i>Sternotherus carinatus</i>	Razor-backed musk turtle
6. <i>K. creaseri</i>	Ninguna	Hartweg, 1934	Ninguno	Creaser's mud turtle
7. <i>K. depressum</i>	Ninguna	Tinkle y Webb, 1955	<i>Sternotherus depressus</i>	Flattened musk turtle
8. <i>K. dunni</i>	Ninguna	Schmidt, 1947	Ninguno	Dunn's mud turtle
9. <i>K. flavescens</i>	<i>K. f. flavescens</i>	Agassiz, 1857	<i>Platythyra flavescens</i>	Yellow mud turtle
	<i>K. f. arizonense</i>	Gilmore, 1922	Ninguno	Arizona mud turtle
	<i>K. f. durangoense</i>	Iverson, 1979	Ninguno	Durango mud turtle
10. <i>K. herrerae</i>	Ninguna	Stejneger, 1925	Ninguno	Herrera's mud turtle
11. <i>K. hirtipes</i>	<i>K. h. hirtipes</i>	Wagler, 1830	<i>Cinosternon hirtipes</i>	Mexican rough-footed mud turtle
	<i>K. h. chapalaense</i>	Iverson, 1981	Ninguno	Lake Chapala mud turtle
	<i>K. h. magdalense</i>	Iverson, 1981	Ninguno	San juanico mud turtle
	<i>K. h. megacephalum</i>	Iverson, 1981	Ninguno	Viesca mud turtle
	<i>K. h. murrayi</i>	Glass y Hartweg, 1951	Ninguno	Mexican plateau mud turtle
	<i>K. h. tarascense</i>	Iverson, 1981	Ninguno	Pátzcuaro mud turtle
12. <i>K. integrum</i>	Ninguna	LeConte, 1854	<i>Kinosternum integrum</i>	Mexican mud turtle
13. <i>K. leucostomum</i> *	<i>K. l. leucostomum</i>	Duméril y Bibron, 1851	<i>Cinosternum leucostomum</i>	White-lipped mud turtle (Northern)
	<i>K. l. postinguinale</i>	Cope, 1887	Ninguno	White-lipped mud turtle (Southern)
14. <i>K. minor</i>	<i>K. m. minor</i>	Agassiz, 1857	<i>Goniocelys minor</i> <i>Sternotherus minor</i>	Loggerhead musk turtle
	<i>K. m. peltifer</i>	Smith y Glass, 1947	Ninguno	Stripe-necked musk turtle
15. <i>K. oaxaca</i>	Ninguna	Berry e Iverson, 1980	Ninguno	Oaxaca mud turtle
16. <i>K. odoratum</i>	Ninguna	Latreille, 1801	<i>Testudo odorata</i>	Common musk turtle

17.	<i>K. scorpioides</i>	<i>K. s. scorpioides</i>	Linnaeus, 1766	<i>Testudo scorpioides</i>	Scorpion mud turtle
		<i>K. s. abaxillare</i>	Baur in Stejneger, 1925	Ninguno	Central Chipas mud turtle
		<i>K. s. albogulare</i>	Duméril y Bocourt, 1870	Ninguno	White-throated mud turtle
		<i>K. s. carajasensis</i>	Da Cunha, 1970	Ninguno	Carajás mud turtle
		<i>K. s. cruentatum</i>	Duméril y Bibron, 1851	Ninguno	Red-checked mud turtle
		<i>K. s. seriei</i>	Freiberg, 1936	Ninguno	Argentine mud turtle
18.	<i>K. sonoriense</i>	<i>K. s. sonoriense</i>	LeConte, 1854	<i>Kinosternum sonoriense</i>	Sonora mud turtle
		<i>K. s. longifemorale</i>	Iverson, 1981	Ninguno	Sonoyta mud turtle
19.	<i>K. subrubrum</i>	<i>K. s. subrubrum</i>	Bonaterre, 1789	<i>Testudo subrubra</i>	Common mud turtle
		<i>K. s. hippocrepis</i>	Gray, 1855	Ninguno	Mississippi mud turtle
		<i>K. s. steindachneri</i>	Siebenrock, 1906	Ninguno	Florida mud turtle
* incluye a <i>K. spurrelli</i> Boulenger (1913) de acuerdo a Berry (1978).					
Familia Kinosternidae.					
Subfamilia Staurotypinae Gray, 1869, Tortugas almizcleras tropicales.					
Género <i>Claudius</i> Cope, 1865.					
1.	<i>C. angustatus</i>	Ninguna	Cope, 1865	Ninguno	Narrow-bridged musk turtle
Familia Kinosternidae.					
Subfamilia Staurotypinae Gray, 1869, Tortugas almizcleras tropicales.					
Género <i>Staurotypus</i> Wagler, 1830 Tortugas almizcleras gigantes.					
1.	<i>S. salvinii</i>	Ninguna	Gray, 1864	<i>Staurotypus (Stauremys) salvinii</i>	Pacific coast giant musk turtle
2.	<i>S. triporcatus</i>	Ninguna	Wiegmann, 1828	<i>Terrapene triporcata</i>	Mexican giant musk turtle



2. Preparación de soluciones utilizadas en el cultivo de linfocitos y tinción de los cromosomas.

- Colchicina (10 µg/ml).

Colchicine Lot. 84F-O193 Sigma Chemical Company.

Pesar 0.0022 gr. de Colchicina en oscuridad y aforar a 10 ml de agua destilada estéril.

Almacenar en un frasco ámbar a 4°C.

- Cloruro de potasio (KCl, 0.075 M).

Cloruro de Potasio (cristales) Lote No F 32332, Baker Analyzed.

Pesar 0.56 gr. de cristales de KCl y disolver en 100 ml de agua destilada o desionizada estéril. Almacenar en un frasco perfectamente cerrado a 4 °C.

- Giemsa al 10%.

- Solución Madre del colorante Giemsa (Eosina-Azul de Metileno) .

Medir las siguientes sustancias:

1 gr. de Giemsa, Merck KgaA Hamatologie L265303.

66 ml de Glicerina J. T. Baker Glicerol Anhidro 2136-02.

132 ml de Metanol absoluto, Técnica Química, A1760.

Colocar la Giemsa en un mortero y disolver en la glicerina previamente calentada a una temperatura de 60 ° C a baño María. Agregarle el metanol absoluto y mezclar, esta solución se deja en el mortero a baño María a 60° C durante 30 minutos. Posteriormente se agrega la solución en un frasco ámbar y se deja agitando con una barra magnética durante un periodo mínimo de 4 horas.

- Solución Sorensen.

Pesar las siguientes sustancias:

0.64 gr. de fosfato de sodio dibásico (cristales dodecahidratados) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. J. T. Baker, S. A. de C. V. (3822).

1.66 gr. de fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 . J. T. Baker, S. A. de C. V. (3246-20).

Cada uno se disuelve en 250 ml de agua destilada posteriormente se mezclan las dos soluciones y se almacenan a 4° C.

- Solución de colorante Giemsa al 10%. Para 100 ml de colorante mezclar 10 ml de solución madre del colorante con 90 ml de solución Sorensen y filtrar antes de usarse.

- Aceto-orceina.

Orceina Natural, Sigma No. 1242. Natural Red 28.

Disolver 2 gr. de Orceina natural en 90 ml de ácido acético glacial previamente calentado a 70°C en baño María. Dejar que la solución se enfríe y agitar constantemente con una barra magnética durante una hora. Posteriormente aforar a 200 ml con agua destilada y almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente. Filtrar antes de usarse.



3. Clasificación de los cromosomas con base en la posición del centrómero según Levan *et al.* (1964)

Esta clasificación se basa en las medidas obtenidas de cada uno de los cromosomas metafásicos. I. C. es el índice centromérico, P. B. es la proporción de brazos y P. C. es la posición del centrómero.

P. C.	P. B.	I. C.	P. C.	P. B.	I. C.
Metacéntrico.	1	50	Subtelocéntrico.	3	25
	1.05	47.5		3.44	22.5
	1.22	45		4	20
	1.35	42.5		4.71	17.5
	1.5	40		5.67	15
	1.67	37.5		7	12.5
Submetacéntrico.	1.67	37.5	Telocéntrico.	7	12.5
	1.87	35		9	10
	2.08	32.5		12.23	7.5
	2.33	30		19	5
	2.64	27.5		39	2.5
	3	25		∞	0

Utilizando las medidas de longitud de los brazos p y q de los cromosomas se obtiene P. B., I. C. y P. C. utilizando las siguientes formulas:

- $P. B. = q / p.$
- $I. C. = \{p / (p + q)\} \times 100.$
- P. C. se obtiene comparando los resultados de I. C. y P. B. obtenidos de las medidas de los cromosomas con la tabla de clasificación anterior. 🐷

4. Tabla de datos obtenidos a partir de las mediciones de los cromosomas metafásicos de cultivos celulares de *Kinosternon herrerae*.

Estos datos fueron obtenidos del cariotipo formado con los cromosomas correspondientes a un macho. L. T. es la longitud total del cromosoma, B. q es la longitud del brazo largo, B. p es la longitud del brazo corto, P. B. es la proporción de brazos o interbraquial, I. C. es el índice centromérico, P. C. es la posición del centrómero de los cromosomas y % es el valor de cada una de las medidas convertido a porcentajes. Se obtuvieron un total de 18 cromosomas metacéntricos, 2 submetacéntricos y 8 microcromosomas.

Par cro	L. T.	%	B. q.	%	B. p.	%	P. B.	I. C.	P. C.
1	22.2	87.06	11.8	53.15	10.4	46.85	1.13	46.85	M
1	22	86.27	11.6	52.73	10.4	47.27	1.12	47.27	M
2	18.4	72.16	9.4	51.09	9	48.91	1.04	48.91	M
2	18.2	71.37	9.3	51.1	8.9	48.9	1.04	48.9	M
3	17.5	68.63	9	51.43	8.5	48.57	1.06	48.57	M
3	17.5	68.63	9	51.43	8.5	48.57	1.06	48.57	M
4	17.2	67.45	8.8	51.16	8.4	48.84	1.05	48.84	M
4	17	66.67	8.8	51.76	8.2	48.24	1.07	48.24	M
5	14.8	58.04	8	54.05	6.8	45.95	1.18	45.95	M
5	15	58.82	8	53.33	7	46.67	1.14	46.67	M
6	15.5	60.78	8.2	52.9	7.3	47.1	1.12	47.1	M
6	15.5	60.78	8.2	52.9	7.3	47.1	1.12	47.1	M
7	13	50.98	6.8	52.31	6.2	47.69	1.1	47.69	M
7	13.1	51.37	6.6	50.38	6.5	49.62	1.02	49.62	M
8	13.7	53.73	7	51.09	6.7	48.91	1.04	48.91	M
8	13.5	52.94	7	51.85	6.5	48.15	1.08	48.15	M
9	16.1	63.14	8.3	51.55	7.8	48.45	1.06	48.45	M
9	16.2	63.53	8.3	51.23	7.9	48.77	1.05	48.77	M
10	12	47.06	6.5	54.17	5.5	45.83	1.18	45.83	M
10	11.9	46.67	6.4	53.78	5.5	46.22	1.16	46.22	M
11	11.4	44.71	6	52.63	5.4	47.37	1.11	47.37	M
11	11.4	44.71	6	52.63	5.4	47.37	1.11	47.37	M
12	11.7	45.88	6.2	52.99	5.5	47.01	1.13	47.01	M
12	11.8	46.27	6.3	53.39	5.5	46.61	1.15	46.61	M
13	16.5	64.71	9	54.55	7.5	45.45	1.2	45.45	M
13	16.2	63.53	8.9	54.94	7.3	45.06	1.22	45.06	M
14	21	82.35	11.6	55.24	9.4	44.76	1.23	44.76	M
14	21.1	82.75	11.7	55.45	9.4	44.55	1.24	44.55	M
15	14.2	55.69	7.9	55.63	6.3	44.37	1.25	44.37	M
15	14.1	55.29	8.1	57.45	6	42.55	1.35	42.55	M

Continuación.

16	13.2	51.76	7.3	55.3	5.9	44.7	1.24	44.7	M
16	13.2	51.76	7.4	56.06	5.8	43.94	1.28	43.94	M
17	25.3	99.22	14.3	56.52	11	43.48	1.3	43.48	M
17	25.5	100	14.5	56.86	11	43.14	1.32	43.14	M
18	10.1	39.61	5.7	56.44	4.4	43.56	1.3	43.56	M
18	9.9	38.82	5.5	55.56	4.4	44.44	1.25	44.44	M
19	14.3	56.08	8.9	62.24	5.4	37.76	1.65	37.76	SM
19	14.3	56.08	8.8	61.54	5.5	38.46	1.6	38.46	SM
20	13	50.98	8.8	67.69	4.2	32.31	2.1	32.31	SM
20	13	50.98	8.8	67.69	4.2	32.31	2.1	32.31	SM
21	11	43.14	11	100	0	0	#	0	MC
21	10.8	42.35	10.8	100	0	0	#	0	MC
22	15	58.82	15	100	0	0	#	0	MC
22	15.1	59.22	15.1	100	0	0	#	0	MC
23	13	50.98	13	100	0	0	#	0	MC
23	13	50.98	13	100	0	0	#	0	MC
24	12.8	50.2	12.8	100	0	0	#	0	MC
24	12.8	50.2	12.8	100	0	0	#	0	MC
25	13.9	54.51	13.9	100	0	0	#	0	MC
25	13.8	54.12	13.8	100	0	0	#	0	MC
26	10.8	42.35	10.8	100	0	0	#	0	MC
26	10.6	41.57	10.6	100	0	0	#	0	MC
27	8.8	34.51	8.8	100	0	0	#	0	MC
27	8.9	34.9	8.9	100	0	0	#	0	MC
28	14	54.9	14	100	0	0	#	0	MC
28	14	54.9	14	100	0	0	#	0	MC

Comparación entre los datos obtenidos en *Kinosternon herreraei* (K. h.) y la tabla de clasificación propuesta por Levan *et al.* (1964).

P. C.	P. B.	P. B. K. h.	I. C.	I. C. K. h.
Metacéntrico.	1-1.67	1.02- 1.35	50-37.5	42.55
Submetacéntrico.	1.67-3	1.6-2.1	37.5-25	32.31-38.46
Subtelocéntrico.	3-7	-----	25-12.5	-----
Telocéntrico.	7-∞	-----	12.5-0	-----

Especie.	2n.	Mc.	mc.	A.	B.	C.	F. C.
<i>Kinosternon herreraei</i> .	56	40	16	36M-4SM	OT	16	20:0:8