



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CORRELACIÓN ENTRE LAS ETAPAS DE  
DESARROLLO EMBRIONARIO Y LA  
DIFERENCIACIÓN GONADAL DE  
*Lepidochelys olivacea***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**DANTE JOSUÉ SÁNCHEZ GONZÁLEZ**



**TUTOR DE TESIS:  
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el siguiente proyecto:

PAPIIT-UNAM IN202115 y CONACYT (Ayudante de investigador nivel III) al Dr. Horacio Merchant Larios.

La realización de este protocolo cuenta con el permiso de colecta de huevos de *Lepidochelys olivacea* otorgado por la Secretaria de medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT con oficios número: SGPA/DGVS/02133/14, SGPA/DGVS /03109/15 y SGPA/DGVS /02522/16.

Este trabajo de investigación también se realizó gracias al apoyo coordinado del CENTRO MEXICANO DE LA TORTUGA (CMT), Mazunte, Municipio de Santa María Tonameca, Oaxaca bajo la Dirección de la Bióloga Erika García Campos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por su apoyo incondicional y generoso durante mis estudios de licenciatura y desde luego en muchas otras ocasiones a través de sus múltiples instancias.

Quiero agradecer particularmente al Dr. Horacio Merchant Larios dándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Así como la supervisión a este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS POR APOYO TÉCNICO

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, doy reconocimiento especial por el apoyo otorgado durante el trabajo realizado dentro del laboratorio, siendo fundamental por haber apoyado en la obtención de muestras biológicas, así como el procesamiento de las mismas y la orientación sobre el trabajo realizado.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo otorgado por la Bióloga Erika García Campos, Directora del Centro Mexicano de la Tortuga (CMT), en Mazunte, Oaxaca.

A la M. en C. Martha Harfush Meléndez, Investigadora del CMT, por coordinar la colecta y transporte de huevos de tortuga *Lepidochelys olivacea* desde las playas Morro Ayuta y La Escobilla, Oax., al laboratorio del I. I. B., UNAM.

Al Biól. Cuauhtémoc Peñaflores Salazar, Jefe de Campamentos del CMT, por las facilidades otorgadas para la colecta en playa del material biológico.

Al Biól. Angel Guillermo Gonzáles Padilla, Jefe del Campamento de Morro Ayuta, Oaxaca, por el apoyo y facilidades para la colecta de huevos de tortuga *L. olivacea*.

Al Biól. Andrés Mariano Alcántara Padilla por el apoyo en el campamento de Morro Ayuta, Oaxaca, para la colecta de huevos de tortuga *L. olivacea*.

A la Biól. Erika Peralta Buendía, por la colecta de huevo de tortuga *L. olivacea* en la playa de La Escobilla, Oaxaca.

A la Biól. Teresa Luna Medina, por la colecta de huevo de tortuga *L. olivacea* en la playa de La Escobilla, Oaxaca.

Al Técnico Anselmo Cervantes Rodríguez del CMT, por el traslado de huevos de tortuga *L. olivacea* desde los campamentos a la terminal para su transporte vía terrestre.

## **DEDICATORIAS**

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres: Beatriz González Calderón, Jaime Sánchez Lara, que han sabido formarme con buenos sentimientos, grandes hábitos y valores que me han ayudado a salir adelante día a día; así como mis hermanos, Rodrigo Issac Sánchez González, Cristina Magaly Sánchez González, Lilia Beatriz Sánchez González que me ayudaron en todo momento.



## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
Aspectos generales de la tortuga <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	14
Características morfológicas.....	14
Reproducción .....	15
Distribución y Hábitat.....	16
Alimentación.....	17
Determinación sexual de vertebrados .....	18
Determinación sexual de la tortuga <i>L. olivacea</i> .....	19
Histología de las gónadas durante el desarrollo embrionario .....	21
ANTECEDENTES .....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS .....	25
OBJETIVO .....	25
MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
Obtención de los huevos de <i>L. olivacea</i> .....	26
Registro de Temperatura.....	27
Fijación de embriones .....	27
Fotografías .....	25
Fotografía de las gónadas .....	25
Procesamiento de gónadas en el laboratorio.....	28
Histología .....	28
RESULTADOS .....	29
Temperatura de incubación.....	29

Etapas de Desarrollo Embrionario .....	33
Etapa 22 .....	34
Etapa 23 .....	36
Etapa 24 .....	39
Etapa 25 .....	41
Etapa 26 .....	43
Etapa 27 .....	46
Etapa 28 .....	49
Etapa 31 .....	52
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIÓN .....	56
BIBLIOGRAFÍA .....	57

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Clasificación de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	14
Fig. 1 Características morfológicas de <i>L. olivacea</i> .....	15
Fig. 2 Mapa de distribución en agua y anidación de <i>L. olivacea</i> . .....	16
Fig. 3 Mapa de distribución de <i>L. olivacea</i> en el Pacífico Mexicano.....	17
Tabla 2. Tabla de desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> .....	19
Fig. 4 Relación de los días y las etapas del desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> incubados a 33°C y 26°C, mostrando los diferentes periodos del desarrollo .....	20
Fig. 5 Ovario de <i>L. olivacea</i> fijado a los 45 días de desarrollo. ....	21
Fig. 6 Testículo de <i>L. olivacea</i> fijado a los 75 días de desarrollo .....	22
Tabla 3. Etapas de incubación a temperaturas controladas para la tortuga <i>L. olivacea</i> . .....	26
Fig. 7 Ubicación del complejo mesonefros-gónada en el embrión. ....	28
Grafica 1. Registro de Temperatura Masculinizante (TM) de incubación. ....	29
Tabla 4. Días de desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> TM.....	30
Grafica 2. Registro de Temperatura Feminizante (TF) de incubación. ....	31
Tabla 5. Días de desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> TF .....	32
Fig. 8 Etapa 22. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TM (26°C). Establecimiento de las extremidades .....	34
Fig. 9 Fotografía de las características morfológicas más relevantes de las extremidades en etapa 22 de <i>L. olivacea</i> .....	35
Fig. 10 Fotomicrografía de corte semifino de embrión de <i>L. olivacea</i> en etapa 22 .....	35
Fig. 11 Etapa 23. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TF (33°C). Formación de las extremidades anteriores y posteriores y formación de la mandíbula.....	37
Fig. 12 Fotografía de las características morfológicas más relevantes de las extremidades en etapa 23 de <i>L. olivacea</i> .....	38

Fig. 13 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente indiferenciadas de <i>L. olivacea</i> en etapa 23 .....	38
Fig. 14 Etapa 24. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TF (33°C). Formación del pico y caparazón .....	39
Fig. 15 Fotografía de las extremidades morfológicas más relevantes durante el desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> en etapa 24 .....	40
Fig. 16 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente indiferenciadas de <i>L. olivacea</i> en etapa 24 .....	40
Fig. 17 Etapa 25. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TF (33°C). Formación de la carúncula e inicio del plastrón .....	41
Fig. 18 Fotografía de las extremidades morfológicas más relevantes durante el desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> en etapa 25 .....	42
Fig. 19 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente indiferenciadas de <i>L. olivacea</i> en etapa 25 .....	42
Fig. 20 Etapa 26. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TF (33°C). Osificación de las aletas y terminación de la formación del ojo .....	43
Fig. 21 Fotografía de las extremidades morfológicas más relevantes durante el desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> en etapa 26 .....	44
Fig. 22 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de <i>L. olivacea</i> en etapa 26 .....	44
Fig. 23 Etapa 27. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TF (33°C). Pigmentación terminada y pliegues precentrales presentes .....	47
Fig. 24 Fotografía de las extremidades morfológicas más relevantes durante el desarrollo embrionario de <i>L. olivacea</i> en etapa 27 .....	48
Fig. 25 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de <i>L. olivacea</i> en etapa 27 .....	48
Fig. 26 Etapa 28. Embrión de <i>L. olivacea</i> incubado a TF (33°C). Formación de los escudos del plastrón y principio de la osificación .....	59

Fig. 27 Fotografía de las extremidades morfológicas más relevantes durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea* en etapa 28 ..... 50

Fig. 28 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de *L. olivacea* en etapa 28 ..... 50

Fig. 29 Etapa 31. Embrión de *L. olivacea* incubado a TF (33°C). Etapa neonato ..... 51

Fig. 30 Fotografía de las extremidades morfológicas más relevantes durante el desarrollo embrionario de *L. olivacea* en etapa 31 ..... 52

Fig. 31 Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciada de *L. olivacea* en etapa 31 ..... 52

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la biología se han empleado algunos reptiles para el estudio y realización de experimentos a nivel embrionario debido a que sus características de desarrollo posibilitan la observación y manipulación de los embriones. Por su tamaño, el crecimiento y desarrollo, pueden seguirse fácilmente usando técnicas simples de laboratorio, lo que permite la elaboración de tablas de desarrollo embrionario basadas en cambios morfológicos (Wise et al., 2009). Estas tablas se pueden realizar a nivel macroscópico e histológico para establecer de forma clara las diferentes etapas, indicando el grado de madurez alcanzado por un embrión durante las etapas más tempranas de su desarrollo. (Balinsky & Fabian, 1983).

En el presente, las tortugas marinas han sido un modelo biológico de estudio a pesar que son reptiles con un ciclo de vida muy complejo, caracterizado por una reproducción ovípara, un lento crecimiento, una tardía madurez sexual y migraciones a través del océano desde las aéreas de alimentación hacia las zonas de reproducción.

Existen ocho especies de tortugas marinas: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii*, *Lepidochelys olivacea*, *Dermochelys coriacea*, *Chelonia agassizzi* y *Chelonia depressa*. Con excepción de esta última, las otras siete anidan en las playas de México. Este grupo de reptiles pertenecientes a las familias *Cheloniidae* y *Dermochelyidae*, inició su evolución en el Triásico. Concretamente al inicio del Mesozoico hace unos 200 millones de años, extinguiéndose la mayor parte de ellos entre el Cretácico (136 millones de años) y el Cenozoico (65 millones de años). De manera que ha sobrevivido hasta nuestros días sólo un grupo notablemente reducido (Pritchard, 1997).

*Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) es una especie marina que pertenece al orden testudinata. Taxón caracterizado por presentar una estructura de huesos dérmicos denominada caparazón al cual están fusionadas las vértebras (excepto el cuello y la cola), las costillas, la cintura pélvica y el pectoral. Es un organismo ectotérmico, con respiración pulmonar y perteneciente al grupo de los vertebrados amniotas con fecundación interna.

## **Aspectos generales de la tortuga *Lepidochelys olivacea***

En la Tabla 1. Se describe la clasificación taxonómica de *L. olivacea*. (Márquez, 1990; Pritchard, 1979; ITIS 2015).

### **Tabla 1. Clasificación de *L. olivacea***

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

SuperClase: Tetrapoda

Clase: Reptilia

SubClase: Anaspide

Orden: Testudinata

Familia: Cheloniidae

Género: *Lepidochelys*

Especie: *Lepidochelys olivacea*

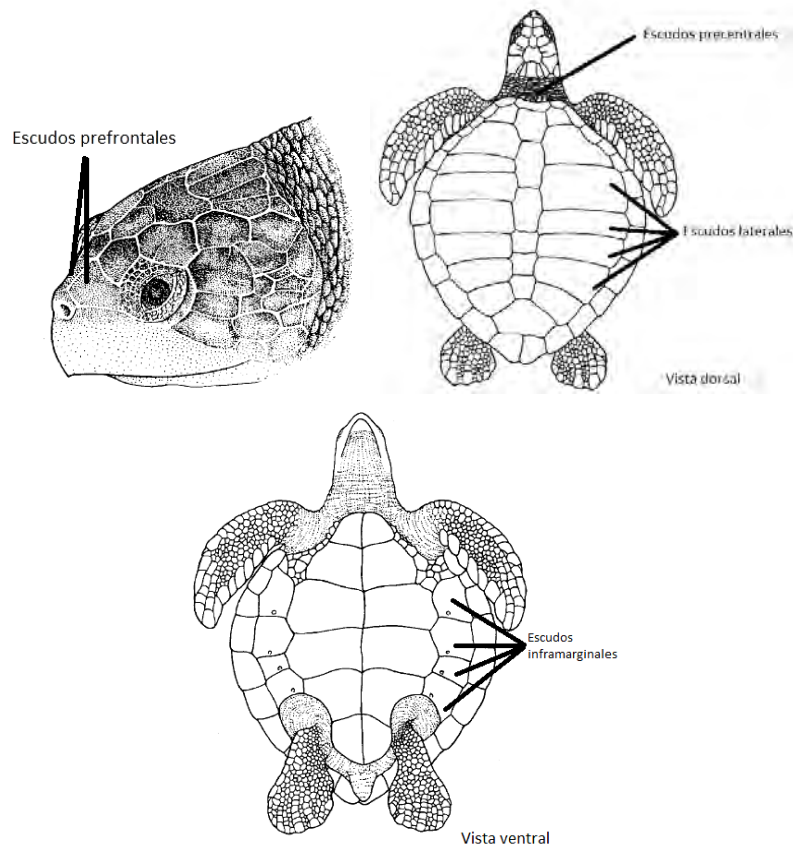
### **Características morfológicas**

Esta especie se caracteriza por tener una cabeza relativamente grande, ligeramente triangular; de 10 a 13 cm de ancho y con dos pares de escamas prefrontales y un pico córneo no aserrado con reborde alveolar (Pritchard, 2000). El caparazón es casi circular con una anchura cercana al 90% de su longitud.

Generalmente el caparazón tiene más de 15 escudos mayores, cinco dorsales y frecuentemente más de cinco pares laterales, aunque también puede presentar desigualdad en el número de escudos de ambos lados; el par lateral anterior está en contacto con el escudo precentral. El plastrón tiene cuatro escudos inframarginales (Fig. 1) y cada uno presenta un poro. En el borde anterior de cada aleta hay una o dos uñas.

La longitud recta promedio del caparazón es de 67.6 cm, aunque algunos organismos pueden llegar a medir hasta 78 cm. El peso promedio es de 38 kg. La coloración del caparazón de

los adultos es gris oliváceo o amarillento, mientras que el plastrón es de color crema a gris verdoso con manchas oscuras en los extremos de las aletas (Márquez, 1996).



**Figura 1.** Características morfológicas que distinguen a la tortuga golfinia (modificada de Pritchard, 2000).

### **Reproducción**

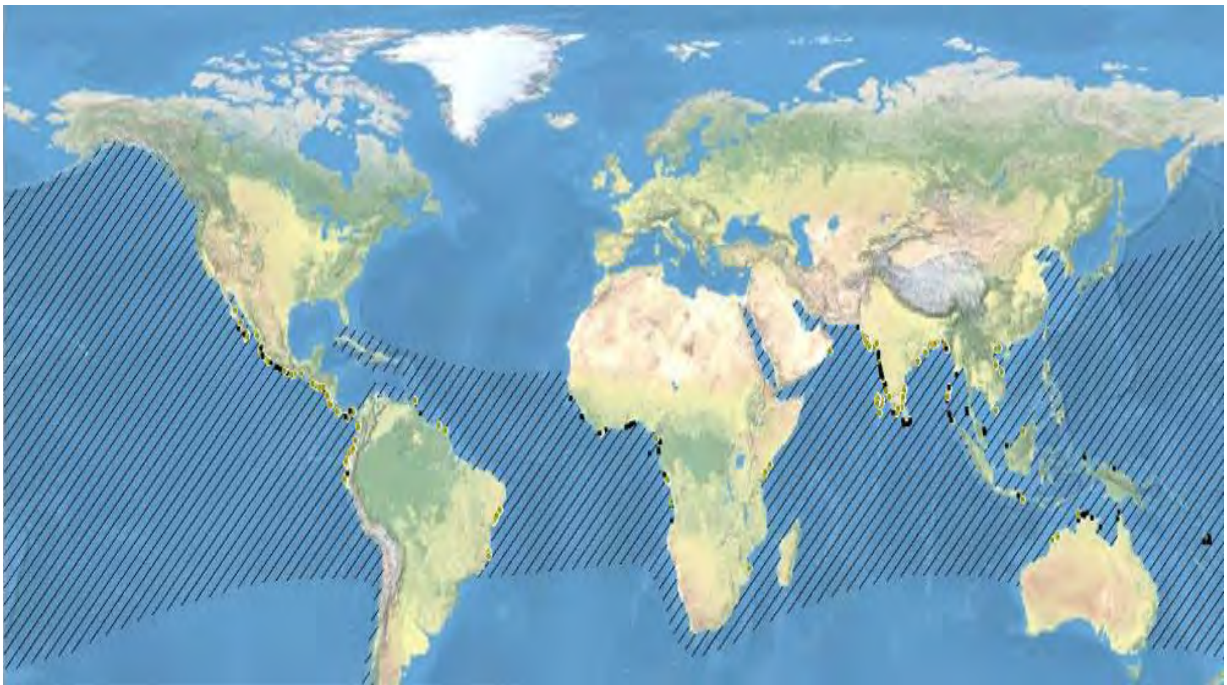
Las hembras se reproducen hasta que alcanzan una talla promedio de 60 cm, lo que les lleva varias décadas. El cortejo y la copula se dan en el mar, por lo general cerca de la costa, este ocurre durante la primavera e inicios del verano. La hembra puede almacenar el esperma del macho y usarlo a lo largo de la época de apareamiento. La ovoposición se presenta de julio a febrero, miles de hembras llegan simultáneamente a las mismas costas a desovar, fenómeno conocido como arribada. Aunque también se produce la anidación dispersa o solitaria (Abreu & Grobois y Plotkin, 2014). Una hembra desova en un nido de 30 a 55 cm de profundidad, durante las noches, frecuentemente cuando la luna está en cuarto creciente o cuarto



menguante y puede salir varias veces durante noches seguidas, algunas salen y no desovan, pero la gran mayoría sí lo hace. Esto indica que la golfina puede desovar varias veces en un ciclo. El número de huevos depositados por nidada puede ser de 160, con una media de 105, esto puede variar entre localidades (Parque Nacional Lagunas de Chacahua, 2008).

### **Distribución y hábitat**

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) es una especie pantropical, no existen diferencias morfológicas entre sus poblaciones. En su circuito migratorio incluye áreas de alimentación en diversos ambientes costeros y pelágicos. Anida en forma solitaria y/o de arribadas en algunas playas de la India, el Pacífico Mexicano y Centroamérica. Se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde el norte de California y el Golfo de California hasta Chile con áreas de concentración en México (Baja California Sur, Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Oaxaca), Centroamérica, y más al Sur, hasta la zona entre Panamá y Colombia (Márquez, 1996). (Fig. 2)



**Figura 2.** Mapa de distribución en agua y anidación de *Lepidochelys olivacea*; puntos negros: Áreas de puesta, puntos amarillos: playas de menor importancia. (Modificada de Wallace et al., 2010)

En el pacífico mexicano ocurren principalmente en las costas de Guerrero, Jalisco y Oaxaca (Fig. 3); de las cuales la playa más importante por el número de anidaciones corresponde a “La Escobilla” y “Morro Ayuta” en Oaxaca.



**Figura 3.** Mapa de distribución de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano. Zonas marcadas en rojo son las playas de anidación. Flecha azul: playa La Escobilla (Imagen modificada de Ochoa-Ochoa et al., 2006)

### **Alimentación**

Se puede decir que esta especie es de alimentación omnívora con tendencia a carnívora (Montenegro et al., 1986). Por medio del análisis de volumen y frecuencia, se encontró que *L. olivacea* tiene una dieta que incluye las salpas con un valor porcentual de 45.10 %, siguiendo los peces con valor de 41.68 %, a este grupo le proceden los moluscos (5.16%), crustáceos (3.53 %), algas (2.21 %), briozoarios (0.21 %), sipuncúlidos (0.04%), ascidias (0.037%) y huevos de peces (0.017%). El porcentaje volumétrico que presentó la materia vegetal, en este caso algas, fue del 2.21 %.

## **Determinación Sexual en vertebrados**

En los vertebrados la identidad de las gónadas depende de dos procesos: primero, de la determinación del sexo, que es el evento molecular que se establece en etapas tempranas del desarrollo embrionario y segundo, de la diferenciación del sexo, en el cual una cascada de eventos genéticos y hormonales lleva a la gónada indiferenciada a desarrollarse como un ovario o como un testículo (Maldonado & Merchant, 2006).

A lo largo del desarrollo embrionario se forman las gónadas, órganos especializados en la producción de gametos, ya sean óvulos o espermatozoides. Al inicio del desarrollo las gónadas son indiferenciadas y bipotenciales (Merchant et al., 2010) ya que no se observan diferencias morfológicas de estructuras entre las gónadas de machos y hembras. La diferenciación del sexo es el proceso mediante el cual la gónada y sus conductos anexos se transforman en un ovario o un testículo y sus correspondientes conexiones con el exterior (Gilbert, 2010).

La determinación del sexo puede estar controlada por factores genéticos (determinación sexual genética: DSG) o por factores ambientales (determinación sexual ambiental: DSA). En el primer caso depende de la presencia de genes específicos y se asocia comúnmente a la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos. En el caso de los mamíferos presenta el par XX en la hembra y el par XY en el macho; en el caso de las aves y algunos reptiles, la hembra presenta el par ZW y el macho presenta el par ZZ (Chue & Smith, 2011).

En la DSA el sexo gonadal se ve influenciado por diversas variables del entorno por lo que el sexo de la progenie es modulado después de la fertilización. Entre los factores ambientales que pueden influir se encuentran: el fotoperíodo, la nutrición, la humedad, la composición iónica del medio ambiente, el pH, pero el más importante y más estudiado es la temperatura (determinación sexual termodependiente: DST). Dentro de esta modalidad, se encuentra la mayoría de los linajes de reptiles: esfenodontes (tatuas), cocodrilos así como algunas especies de tortugas y lagartijas (Bull, 1980; Pieau, 1996) En ellos el sexo es determinado por las condiciones térmicas durante el periodo termosensible (PTS).

### Determinación sexual en la tortuga *Lepidochelys olivacea*

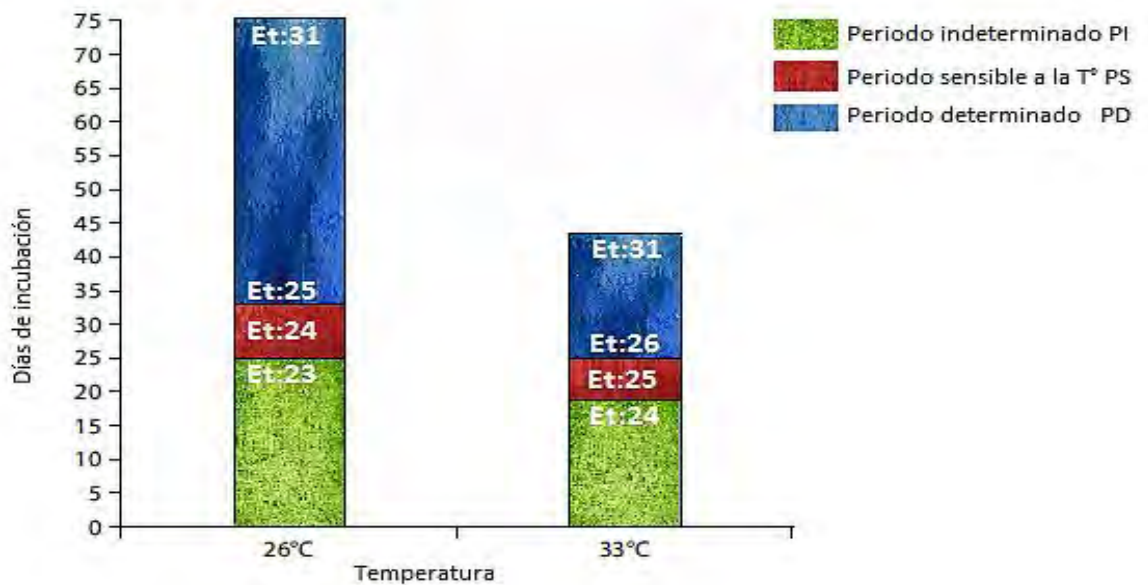
En las tortugas marinas la determinación del sexo por la temperatura ha sido encontrada en *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea*, *Lepidochelys olivacea*, *L. kempii* y *Eretmochelys imbricata*. A temperaturas entre 25°C y 27°C se producen machos y a temperaturas de 31°C y 32°C o más se producen hembras. Cabe mencionar que existen temperaturas intermedias en las cuales la proporción de sexos es de 50%, conocidas como temperaturas umbrales (Mrosovsky & Pieau, 1991) o pivotes (Yntema & Mrosovsky, 1980). Diferentes estudios indican que la temperatura de incubación afecta la determinación sexual sólo durante una etapa crítica del desarrollo embrionario (Darlrymple et al., 1985). Dicho periodo es conocido como el periodo sensible a la temperatura (PST) (Bull & Vogt, 1982; Yntema & Mrosovsky, 1980), sugiriéndose que este periodo se encuentra en el segundo tercio del desarrollo.

En 1997, Merchant-Larios y colaboradores describieron el desarrollo embrionario de *L. olivacea*. Al incubar los embriones a distintas temperaturas y observaron que tienen una velocidad de desarrollo distinta, a temperatura feminizante (TF) de 32°C se desarrollan más rápido en comparación con los incubados a temperatura masculinizante (TM) de 27°C lo cual explica que los embriones en etapas de desarrollo equivalentes en TM y TF tienen edades distintas (Tabla 2).

Edad en días	Etapa embrionaria a TM	Etapa embrionaria a TF
15	18-19	21-22
20	20-21	23-24
24	22-23	24-25
27	23-24	25-26
32	24-25	27-28
35	25-26	28-29
40	26-27	29-30
45	27-28	31

**Tabla 2.** Tabla de desarrollo embrionario de *L. olivacea* (modificada de Merchant-Larios et al., 2010).

Haciendo intercambios de embriones de 26°C (temperatura masculinizante: TM) a 33°C (temperatura feminizante: TF) e inversamente, el desarrollo embrionario de la tortuga golfina se puede dividir en tres periodos en términos de su determinación sexual: 1. Periodo de sexo indeterminado (PI), 2. Periodo sensible a la temperatura (PST), 3. Periodo de sexo determinado (PD) (Merchant-Larios et al., 2010).



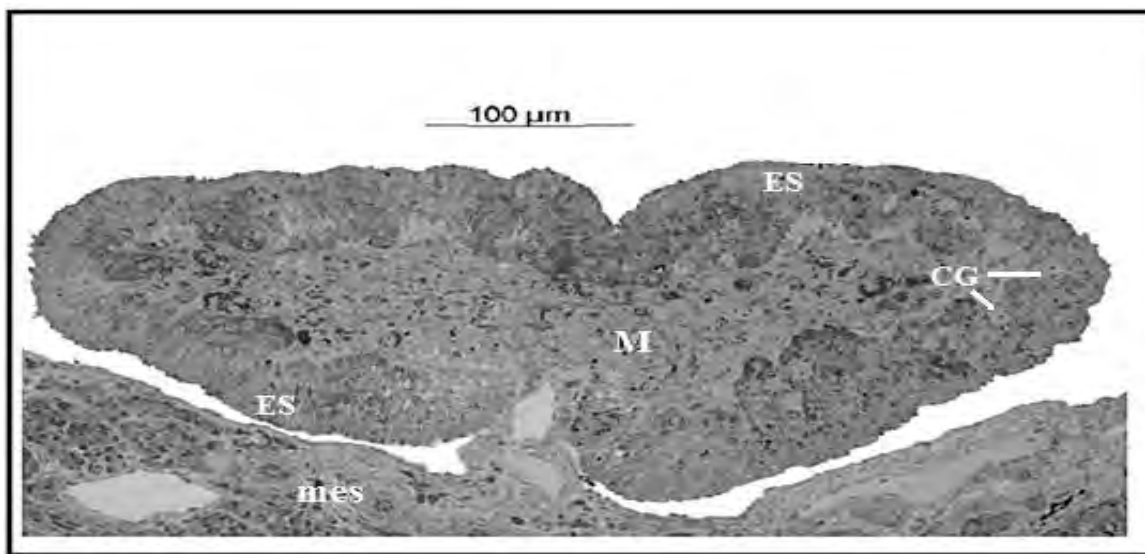
**Figura 4.** Relación de los días y las etapas del desarrollo embrionario de *L. olivacea* incubados a 26°C y 33°C, mostrando los diferentes periodos del desarrollo. Periodo indeterminado PI, Periodo sensible a la temperatura PST, Periodo determinado PD. (Et, etapa de desarrollo). (Modificada de Merchant-Larios et al., 2010).

El periodo indeterminado (PI) es cuando el sexo del embrión aún no está determinado por la temperatura inicial de incubación. En estas etapas del desarrollo, al intercambiar los embriones de TM a TF o inversamente, el 100% de los embriones responde al intercambio de temperatura desarrollándose como hembras o machos de acuerdo con la segunda temperatura.

El periodo sensible a la temperatura (PST) abarca las etapas donde un número decreciente de embriones, a partir del 100% hasta el 0% responde al cambio de temperatura de intercambio. Finalmente, el periodo de sexo determinado (PD) abarca las etapas en donde el 100% de los embriones ya no responden a la temperatura intercambiada. (Merchant-Larios et al., 2010).

## Histología de las gónadas durante el desarrollo embrionario

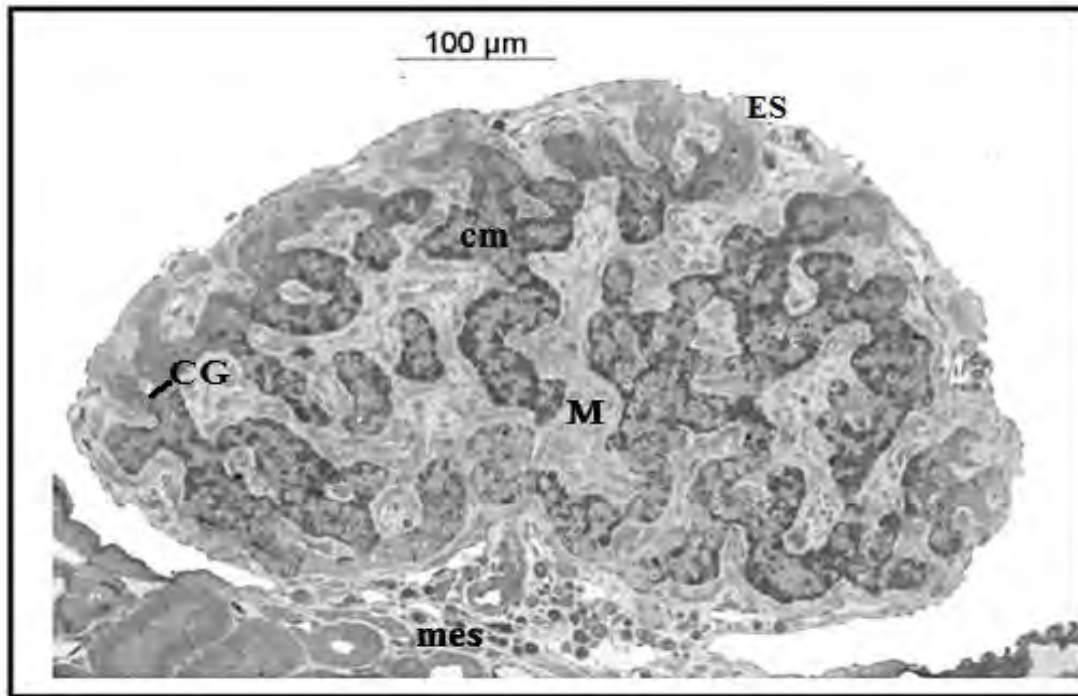
Al eclosionar las crías, sus gónadas aparecen como una estructura blanquecina alargada sobre la superficie ventral del mesonefros (riñón primitivo). Por su aspecto a simple vista, no puede distinguirse si se trata de un ovario o un testículo. No existe tampoco ninguna diferencia en los conductos genitales ni en los genitales externos que permita establecer el sexo de las crías. Por lo que es necesario el estudio histológico de las gónadas. Los ovarios de las crías de *L. olivacea* se distinguen por un engrosamiento sobresaliente del epitelio superficial. Este aparece como un epitelio columnar, con una o más células de espesor. Contiene una membrana basal gruesa, que separa el epitelio superficial de la región medular de la gónada. Los cordones medulares aparecen como pequeños grupos de células epiteliales rodeadas de una membrana basal. El tejido estromático, es abundante en la región medular (Fig. 5) (Imagen tomada en laboratorio con microscopio óptico 20X).



**Figura 5.** Corte semifino de Ovario de *Lepidochelys olivacea* fijado a los 45 días de desarrollo incluido en EPON y fotografiado en microscopio óptico a 20X (Inclusión en EPON). El epitelio superficial (ES), formado por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado. Contiene células germinales (CG), médula (M) y mesonefros (mes).

En los machos, el testículo presenta un epitelio superficial plano, monoestratificado que frecuentemente contiene varias células germinales. Los cordones medulares aparecen separados del epitelio superficial, aunque algunos permanecen fusionados. Los cordones

medulares, rodeados por una membrana basal, se forman por un tipo de células epiteliales con abundantes gotas de lípidos. Las células germinales ubicadas en los cordones medulares, son escasas. Un lumen incipiente se hace evidente al final de la eclosión en los cordones medulares iniciando la diferenciación de los túbulos seminíferos. Entre estas formaciones y bordeando el epitelio superficial está una membrana basal y abundante tejido estomático, formado en gran parte por matriz extracelular, células fibroblásticas y vasos sanguíneos (Fig. 6) (Imagen tomada en laboratorio con microscopio óptico 20X)



**Figura 6.** Corte semifino de Testículo de *Lepidochelys olivacea* fijado a los 75 días de desarrollo incluido en EPON y fotografiado en microscopio óptico a 20X (Inclusión en EPON). Se pueden apreciar claramente los cordones medulares (cm) formados por células epiteliales con citoplasma denso debido a numerosos gránulos de lípidos. Algunas células germinales están situadas en los cordones (CG), se observa la médula (M), mesonefros (mes) y el epitelio superficial (ES) monoestratificado.

## ANTECEDENTES

Yntema (1968) describió 26 estadios del desarrollo embrionario en la tortuga de agua dulce *Chelydra serpentina*, por primera vez describió los cambios morfológicos que ocurren durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. En la familia Chelonia se han realizado a nivel mundial trabajos con diferentes especies de tortugas:

Mora, (1985) elaboró la tabla de desarrollo de la tortuga *Podocnemis expansa* en el río Caquetá (Colombia) identificando las características morfológicas durante el tiempo del desarrollo del embrión el cual duro 60 días. Tokita & Kuratani, (2001) describieron y elaboraron la tabla de desarrollo embrionario para la tortuga *Pelodiscus sinensis* identificando 23 estadios desde el momento de la postura hasta el momento de la eclosión. Greenbaum & Carr (2002) elaboraron la tabla de desarrollo embrionario para la tortuga *Apalone spinifera* con el objetivo de conocer el tiempo de desarrollo, las dimensiones del embrión y la temperatura. Greenbaum (2002) describió 27 estadios del desarrollo embrionario de *Trachemys scripta*, basándose en la tabla de desarrollo de *Chelidra serpentina*.

En cuanto a las tortugas marinas, Miller, (1982) publicó la clasificación embrionaria para las especies de la familia Cheloniidae realizada en el laboratorio bajo condiciones de incubación a temperatura constante de 29°C. Propuso 31 etapas de desarrollo, utilizando 18 caracteres morfológicos para la descripción. Por otra parte, Cratz, (1982) describió el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* con dibujos elaborados a mano; describiendo las características morfológicas e identificó también 31 etapas en el desarrollo embrionario.

Jenny H. y Keith L, (1991) elaboraron la tabla de desarrollo embrionario de la tortuga *Caretta caretta*, estableciendo 31 etapas embrionarias basadas en Miller, 1982; con temperaturas de incubación de 26°C como temperatura promotora de 100% machos (TPM), 28°C como temperatura pivote TP (temperatura intermedia con 50% de cada sexo) y 32°C para la temperatura promotora del 100% de hembras: (TPH), correlacionando el sistema urogenital con el periodo de determinación sexual.

En el trabajo realizado por Merchant-Larios et al., (1997) se describió el desarrollo embrionario de *L. olivacea* proponiendo 31 etapas basadas en Miller, (1982) incubando los



embriones a diferentes temperaturas estos presentan velocidad de desarrollo distinta, a (TM) de 27°C los embriones se desarrollan más lento que a (TF) de 32°C donde los embriones tienen un desarrollo más rápido, esto quiere decir que los embriones en etapas de desarrollo equivalentes en TM y TF tienen edades distintas.

## **JUSTIFICACIÓN**

Aunque existen estudios que describen el desarrollo embrionario en *Lepidochelys olivacea*; en la actualidad, ninguno ha correlacionado el desarrollo embrionario con el desarrollo de la gónada y el efecto de la temperatura en condiciones controladas en *L. olivacea*.

## **HIPÓTESIS**

La determinación sexual de *Lepidochelys olivacea* esta correlacionada con el periodo de desarrollo gonadal y su duración depende de la temperatura de incubación.

## **OBJETIVO**

Identificar las etapas de desarrollo embrionario en las que se lleva a cabo el establecimiento y diferenciación de la gónada de *Lepidochelys olivacea* incubadas a 26°C como temperatura promotora de 100% machos (TPM), y 33°C para la temperatura promotora del 100% de hembras (TPH).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de los huevos de *Lepidochelys olivacea*

Se obtuvieron nidos de tortuga *L. olivacea* de la playa La Escobilla, Oaxaca, que se localiza en el Municipio de Santa María Tonameca, Distrito de Pochutla. Se encuentra delimitada entre las coordenadas 15° 43.63' N y 96° 45.59' O y los 15° 43.01' N y 96° 41.99' O.

Al llegar al laboratorio los nidos fueron divididos al azar en dos lotes, y se colocaron en recipientes con vermiculita humedad, un lote se incubó a temperatura masculinizante (TM) 26°C y el segundo se incubó a temperatura feminizante (TF) 33°C. La humedad fue verificada periódicamente.

Se usó la edad del embrión en días postdesove (dpd) y la temperatura de incubación para predecir la etapa de desarrollo en acuerdo a la tabla 3. Se extrajeron los complejos urogenitales mediante disección de los embriones en etapas sexualmente indeterminadas (22, 23, 24 y 25) y en etapas sexualmente determinadas (26, 27, 28 y 31) tanto para embriones incubados a (TM) como para (TF).

Temperatura Masculinizante		Temperatura Feminizante	
26±1 °C		33±0.5 °C	
Etapa embrionaria	Días postdesove	Etapa embrionaria	Días postdesove
22	20	22	12
23	27	23	15
24	34	24	19
25	41	25	25
26	49	26	29
27	56	27	33

28	64	28	37
31	75	31	45

**Tabla 3.** Etapas de incubación a temperaturas controladas para la tortuga *L. olivacea*.

### **Registro de temperatura**

El registro de las temperaturas en las incubadoras tanto de temperatura masculinizante (TM) 26°C como de temperatura feminizante (TF) 33°C se llevó a cabo introduciendo en una incubadora un dispositivo medidor de temperatura HOBO 64K Pendant ® (Osent ®), el dispositivo registró las temperaturas desde el inicio de la incubación. Se programó para registrar la temperatura cada 30 minutos durante toda la incubación y los datos fueron recolectados cada 10 días hasta el término de la incubación.

### **Fijación de los embriones**

Los embriones se fijaron en formalina al 10%. El formol es una solución de aldehído fórmico al 40% en agua destilada. De esta solución se toman 10 ml y se le agregan 10 ml de agua destilada (10%). Después de 48 horas de fijación se lavaron con agua corriente durante 24 horas y se pasaron a alcohol 70% para una mejor manipulación y se rotularon en frascos de plástico para su almacenamiento a temperatura ambiente.

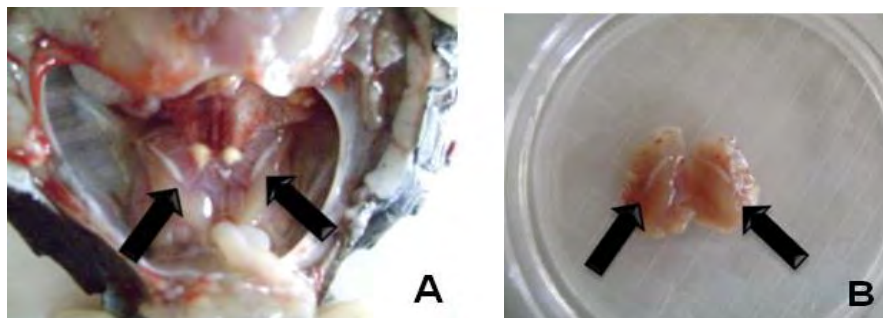
### **Fotografía**

Los embriones fueron fotografiados con una cámara Cannon Digital Rebel equipada con un lente macro 5:1 colocada en un tripie con iluminación de lámparas de LED.

### **Fotografía de las gónadas**

Los cortes semifinos de gónadas fueron fotografiados con un microscopio óptico Zeiss Axioskop 50 equipado con cámara HRc AxioCam a un objetivo de 20X.

## Procesamiento de gónadas en laboratorio



**Figura 7.** Las flechas señalan la ubicación del complejo urogenital (mesonefros-gónada) en el embrión. **A)** Posición ventral; **B)** Complejo urogenital (mesonefros-gónada) aislado.

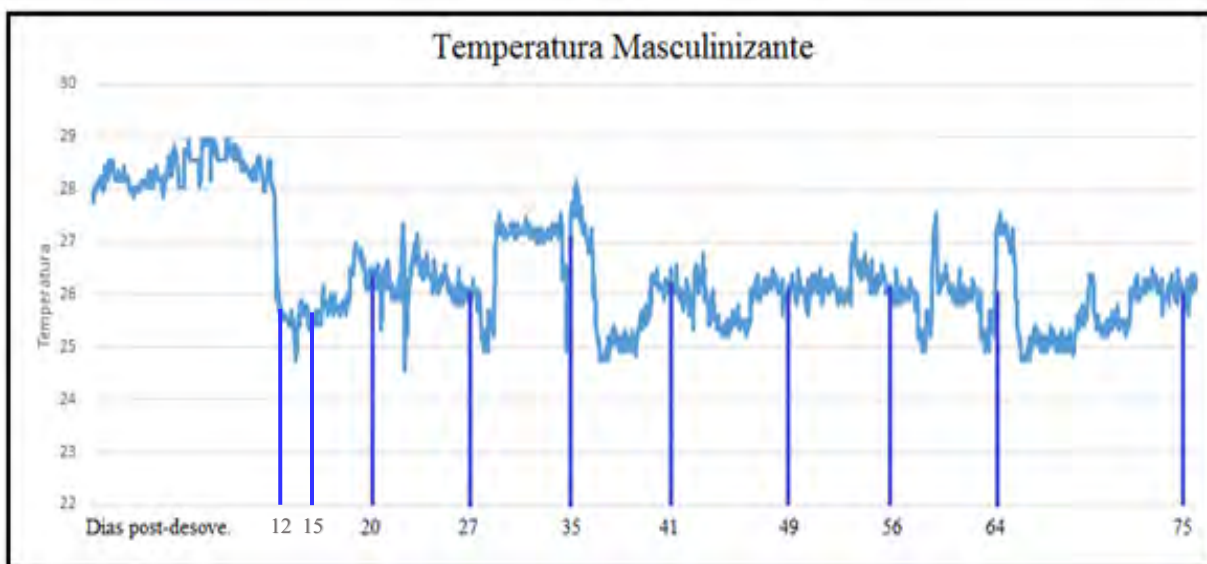
### Histología

Las gónadas se fijaron en frío en fijador de Karnovsky a pH 7.3 durante 24 horas. Esto se utiliza para ver las muestras al microscopio electrónico a una alta resolución y definición de los cortes semifinos. Transcurrido este tiempo se cambiaron a una solución de cacodilato de Sodio 0.1M, pH 7.3 y se mantuvieron refrigerados hasta ser procesados. Para procesar las muestras se lleva a cabo una post-fijación con tetroxido de osmio 1% en amortiguador de Zetterqvist (1956) por dos horas. Se lavaron las muestras con agua bidestilada y se deshidrataron con cambios de alcohol cada 15 minutos en concentraciones crecientes (70, 80, 90, 100%), después se realizaron dos cambios de 20 min en acetonitrilo. Posteriormente se impregnaron con mezclas de EPON: acetonitrilo (1:1 y 2:1), durante una hora cada uno, para finalmente incluirlas en EPON 812 puro, manteniéndolas en la estufa a 60°C por 24 horas para su polimerización. Se obtuvieron los cortes semifinos de 1 micra de espesor en ultramicrotomo (Reichert Ultracuts, Leica) y se tiñeron con azul de toluidina. Finalmente se montaron en laminillas con medio de montaje Cytoseal™ 60 y cubreobjetos y se observaron al microscopio óptico, lo que permitió caracterizar las gónadas femeninas y masculinas, según los criterios de Merchant-Larios (2000).

## RESULTADOS

### 1. Temperaturas de incubación.

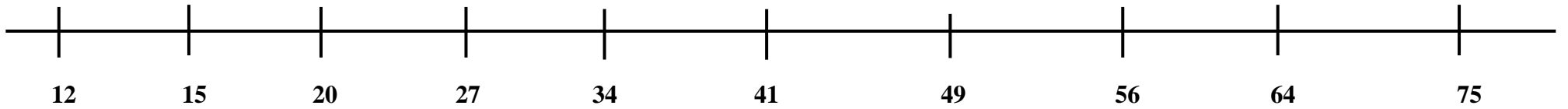
En la gráfica 1. Se observan las temperaturas de la incubadora de TPM. Las cuales oscilaron alrededor de los 26°C. La temperatura promedio durante la incubación fue de 26.5°C. Por lo tanto, se puede predecir que la gran mayoría de los embriones se desarrollarán como machos al mantenerse lejos de la temperatura pivote (50% de cada sexo) que es de alrededor de 30°C. (Yntema & Mrosovsky, 1980)



**Gráfica 1.** Registro de TPM registradas desde el día 1 de incubación hasta la eclosión. Las líneas verticales indican los días en que se realizó la disección de las gónadas.

En la tabla 4 se muestran las imágenes del desarrollo de los embriones incubados a TPM (26°C) colectados en los días postdesove señalados en la gráfica 1. En la cual se observan los caracteres morfológicos que se consideran para poder establecer cada etapa de su desarrollo embrionario.

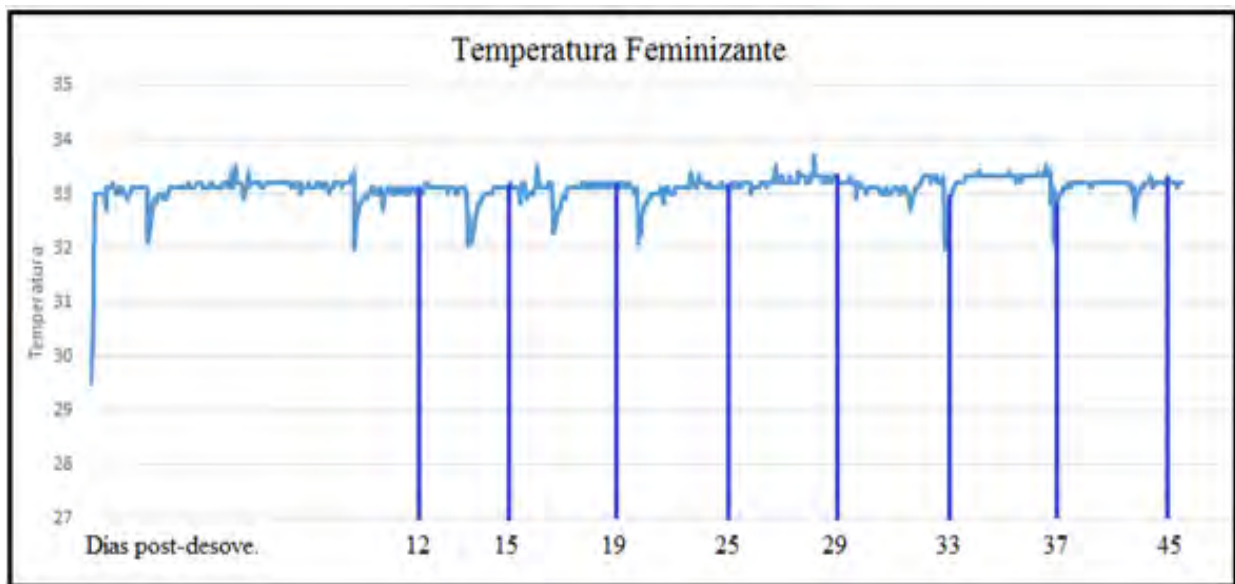
TM (26° C)



**Días de desarrollo embrionario post-desove de *L. olivacea***

**Tabla 4.** Desarrollo de los embriones de *L. olivacea* incubados a TPM (26°C), la escala de tiempo se expone de acuerdo a los días postdesove de incubación en los cuales se manifiestan los cambios morfológicos que se utilizan para identificar las diferentes etapas embrionarias.

En la gráfica 2. Se puede observar el registro de temperatura en la incubadora de TPH. Las temperaturas oscilaron alrededor de los 33°C. El promedio de temperatura en la incubación fue de 33.12°C por lo tanto se asegura que los embriones se desarrollaron como hembras ya que en ningún momento de la incubación la temperatura se acercó a la temperatura pivote (30-31°C). (Yntema & Mrosovsky, 1980)



**Gráfica 2.** Registro de TPH registradas desde el día 1 de incubación hasta la eclosión. Las líneas verticales indican los días en que se realizó la disección de las gónadas.

En la tabla 5 se muestran imágenes de los embriones incubados a TPH (33° C) tomados en los días indicados en la gráfica 2.



TF (33° C)



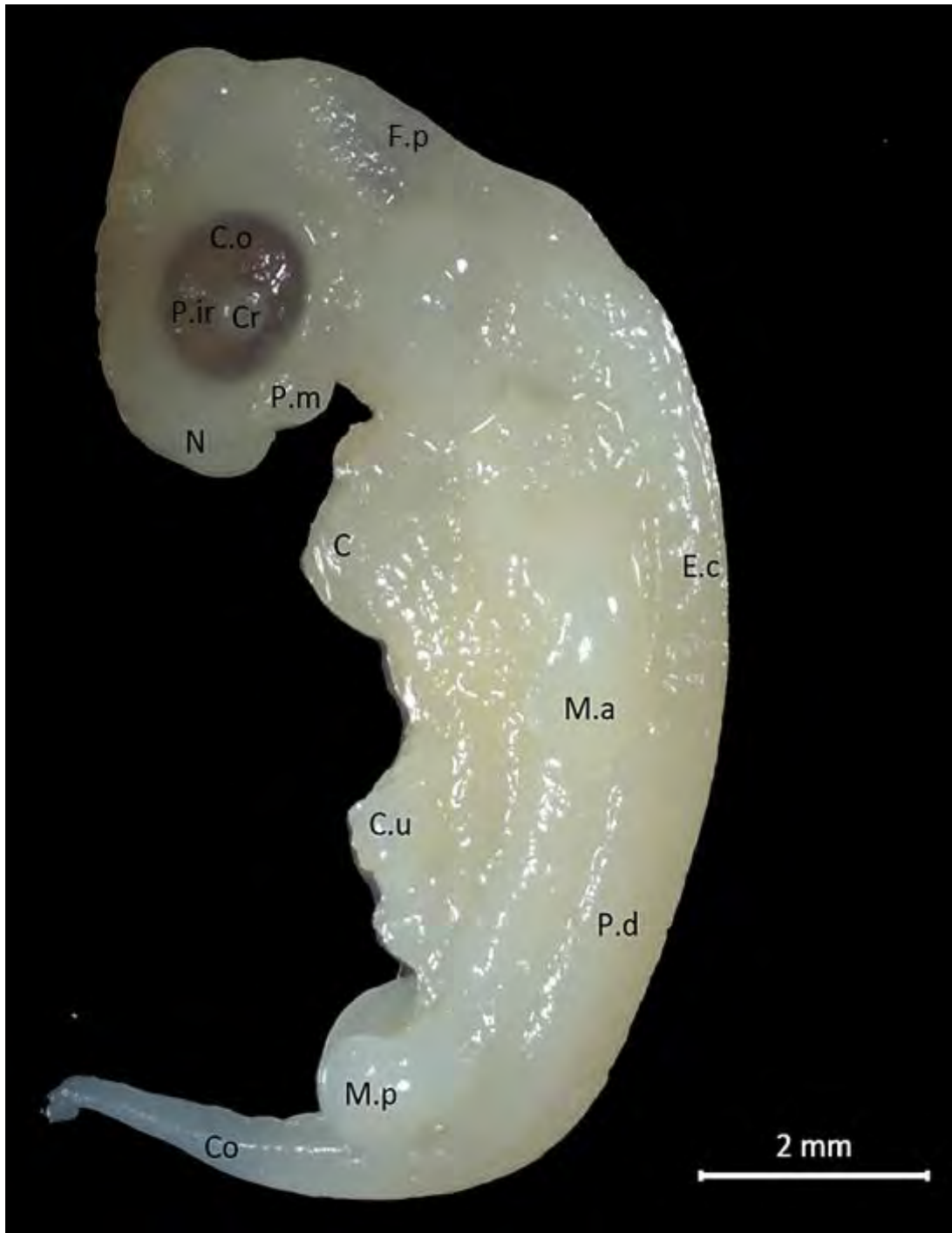
**Días de desarrollo embrionario post-desove de *L. olivacea***

**Tabla 5.** Desarrollo de los embriones de *L. olivacea* incubados a TPH (33°C), la escala de tiempo se expone de acuerdo a los días postdesove de incubación en los cuales se manifiestan los cambios morfológicos que se utilizan para identificar las diferentes etapas embrionarias.

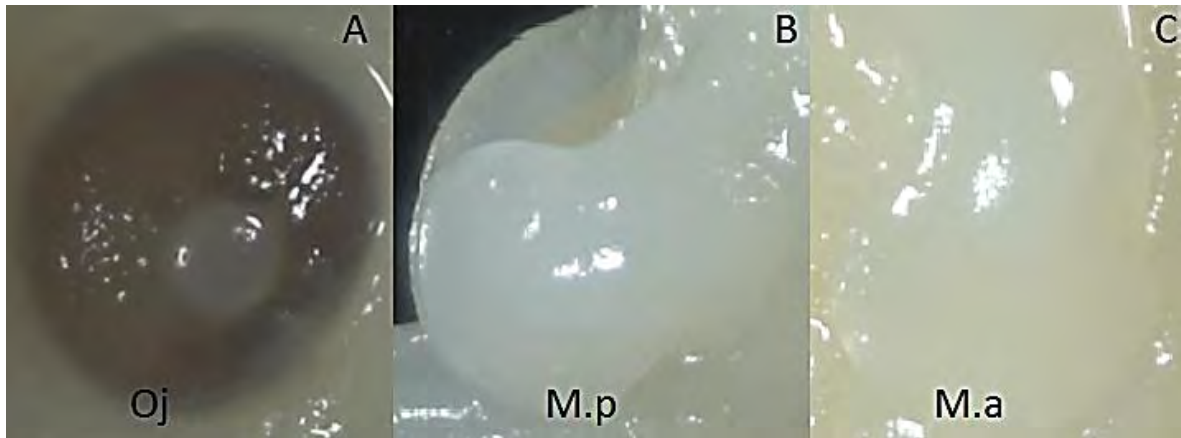
## **2. Etapas de desarrollo embrionario.**

### **Etapa 22**

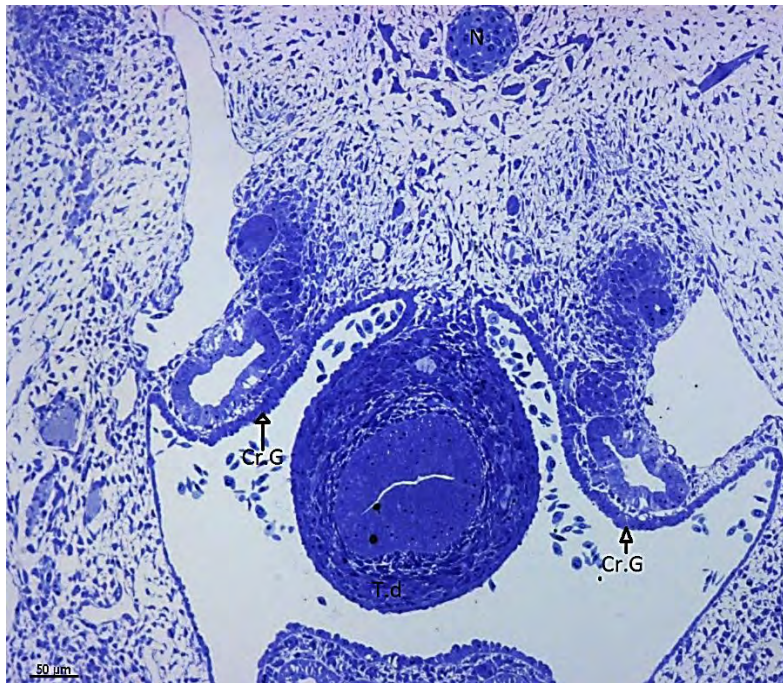
El embrión presenta un tamaño que oscila entre los 7 y 9 mm de largo con una edad de 20 días TPM (26°C) y 12 días TPH (33°C), el cual se caracteriza por presentar en la región cefálica el proceso mandibular que se encuentra ubicado debajo del ojo; en la cúpula óptica se observa de manera central el cristalino y periféricamente se ha iniciado la pigmentación del iris. Las placodas olfatorias han dado origen al esbozo de la narina. Tras la flexura pontina se define el proceso para la formación del esbozo del caparazón el cual había iniciado con la definición de pliegues dérmicos ubicados en la porción dorsal del embrión prolongándose hasta el nivel pélvico. Se muestra el corazón. Sobre la región torácica en posición lateral se observa el par de miembros anteriores los cuales se caracterizan por estar alargados y ovalados. Los miembros posteriores son de menor tamaño. Ninguno de los miembros muestra falanges. En la parte posterior el proceso de la cola está más alargado y muestra una base ensanchada y el extremo curvado. En la parte ventral se observa el cordón umbilical. (Fig. 8)



**Figura 8. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Masculinizante (26° C) en Etapa 22. Establecimiento de las extremidades.** (C) Corazón; (Co) Cola; (F.p) Flexura pontina; (C.o) Cúpula óptica; (Cr) Cristalino; (C.u) Cordón umbilical; (E.c) Esbozo del caparazón; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (N) Narina; (P.d) Pliegues dérmicos; (P.m) Proceso mandibular; (P.r) Pigmentación del iris.



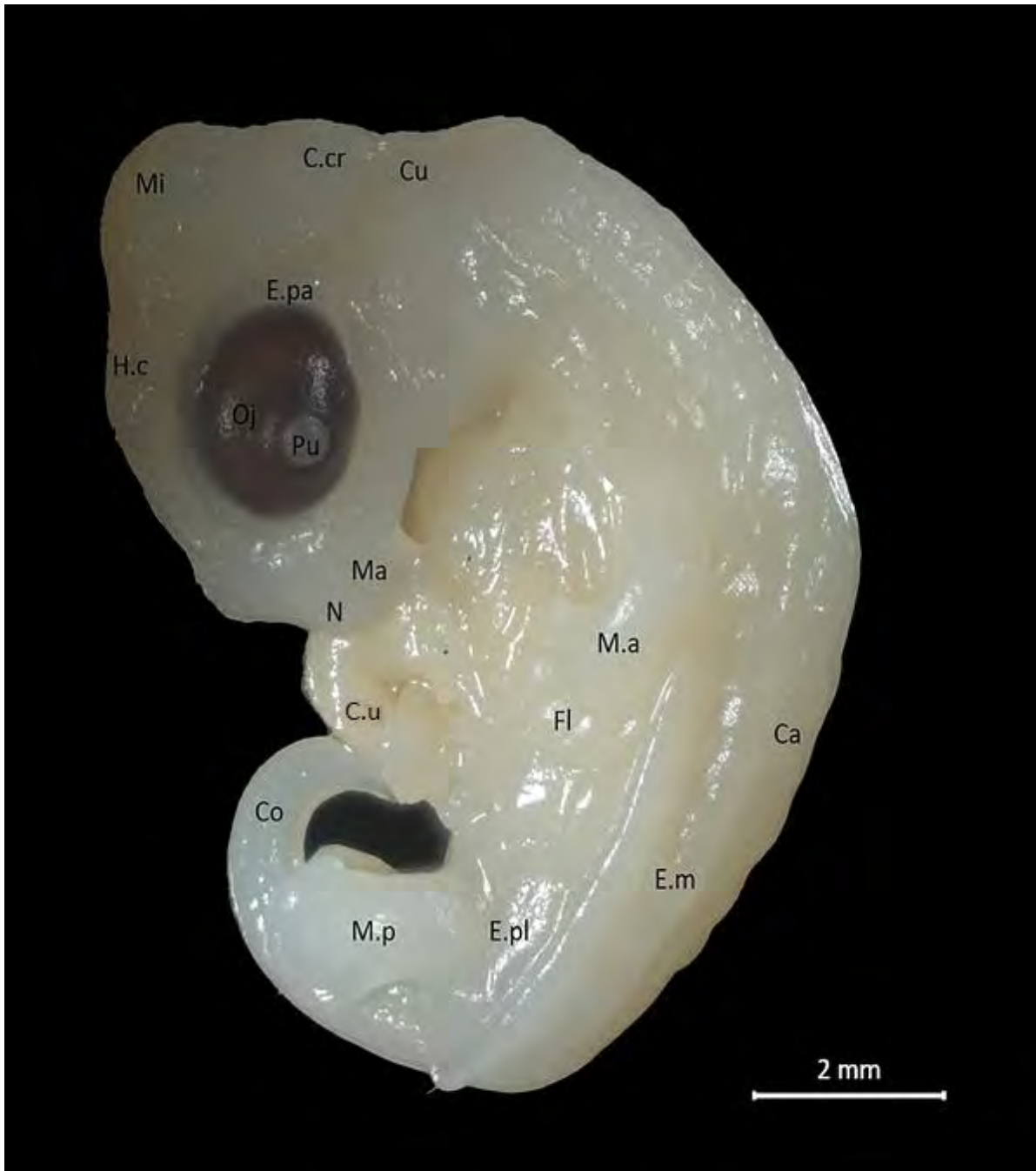
**Figura 9.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 22. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Oj) ojo; **B)** Extremidad posterior de embrión de *L. olivacea*: (M.p) miembro posterior; **C)** Miembro anterior de embrión de *L. olivacea*: (M.a) miembro anterior.



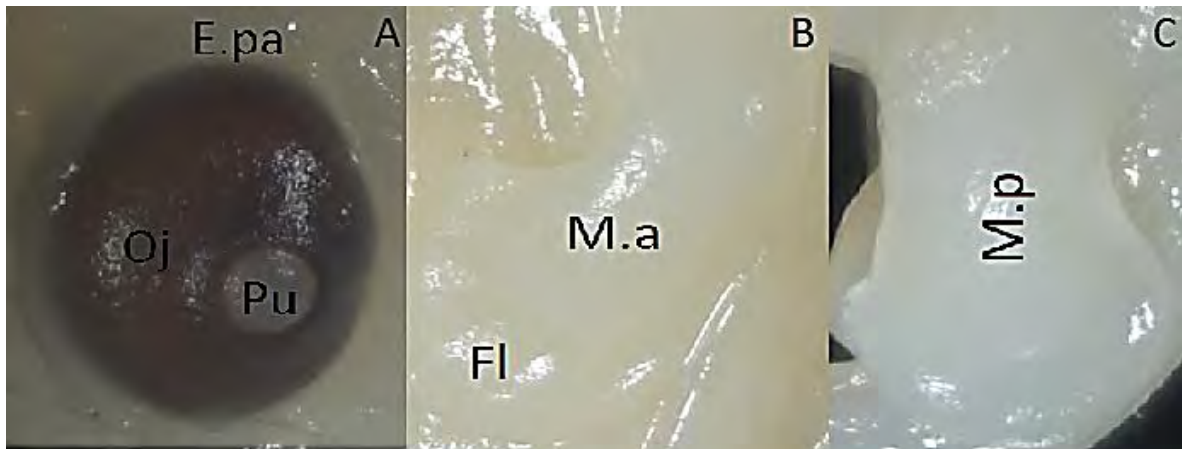
**Figura 10.** Fotomicrografía de corte semifino de embrión en Etapa 22 de *Lepidochelys olivacea* cortado transversalmente, observándose la formación de la cresta gonadal (Cr.G); donde la gónada apenas se está formando, iniciando su engrosamiento, que posteriormente dará lugar a la zona medular y a la superficie cortical. (N) Notocorda; (T.d) Tubo digestivo.

### **Etapas 23**

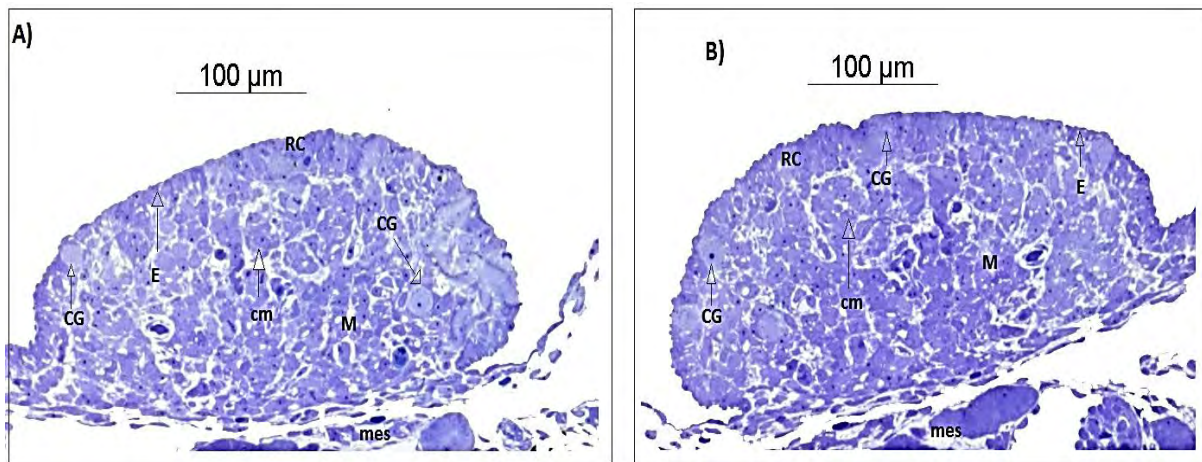
El embrión se caracteriza por presentar un tamaño que oscila entre los 10 y 15 mm de largo; y una edad de 27 días a TPM (26°C) y 15 días a TPH (33°C) en el cual la cabeza ya no es transparente. El proceso mandibular sigue en formación ya que se alcanza el extremo inferior del rostro por la mandíbula. El ojo es de mayor tamaño, se da inicio al esbozo del párpado. Solo el mielencéfalo es prominente y transparente al observarlo al microscopio estereoscópico. El cuello se ha alargado conservando su curvatura cervical y presenta varios pliegues. Posterior al cuello se delimita la porción anterior del caparazón definido por los pliegues dérmicos los cuales se identificaron en el estadio anterior, permitiendo la completa formación de este. El caparazón se extiende desde el cuello hasta la cloaca, en esta extensión se muestran sus bordes laterales y un engrosamiento dorsal arqueado. El proceso del plastrón se ha iniciado y esboza primero su límite posterior, dejando libres las extremidades posteriores y el agujero del ombligo cutáneo. El tórax ensanchado, apenas deja ver el corazón delineado en la cavidad torácica. Las extremidades se han alargado y muestran interdigitaciones redondas en la placa palmar. El miembro anterior se dispone a lado del tórax, como abrazándolo y los miembros posteriores se disponen igualmente abrazando la base de la cola, la cual está curvada continuando el semicírculo del cuerpo. (Fig. 11)



**Figura 11. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 23. Formación de extremidades y mandíbula.** (Ca) Caparazón; (C.cr) Curvatura cervical; (Co) Cola; (Cu) Cuello; (E.m) Escudo marginal; (E.pa) Esbozo del párpado; (E.pl) Esbozo del plastrón; (H.c) Hemisferios cerebrales; (Fl) falanges; (Ma) Mandíbula; (M.a) Miembro anterior; (M.p) Miembro posterior; (Mi) Mielencéfalo; (N) Narina; (C.o) Cordón umbilical; (Oj) Ojo; (Pu) Pupila.



**Figura 12.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 23. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Oj) Ojo; (Pu) Pupila; (E.pa) Esbozo del párpado; **B)** Miembro anterior de embrión de *L. olivacea*: (M.a) Miembro anterior; (Fl) falanges; **C)** Miembro posterior de embrión de *L. olivacea*: (M.p) Miembro posterior.



**Figura 13.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente indiferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en Etapa 23. **A)** Gónada de embrión incubado a 33°C, 15 dpd. **B)** Gónada de embrión incubada a 26°C, 27 dpd: Donde se muestra la región medular (M) ocupada por los cordones medulares (cm) y la región cortical (RC) opuesta al mesonefros (mes) formada por células epiteliales (E) que envuelven a numerosas células germinales (CG).

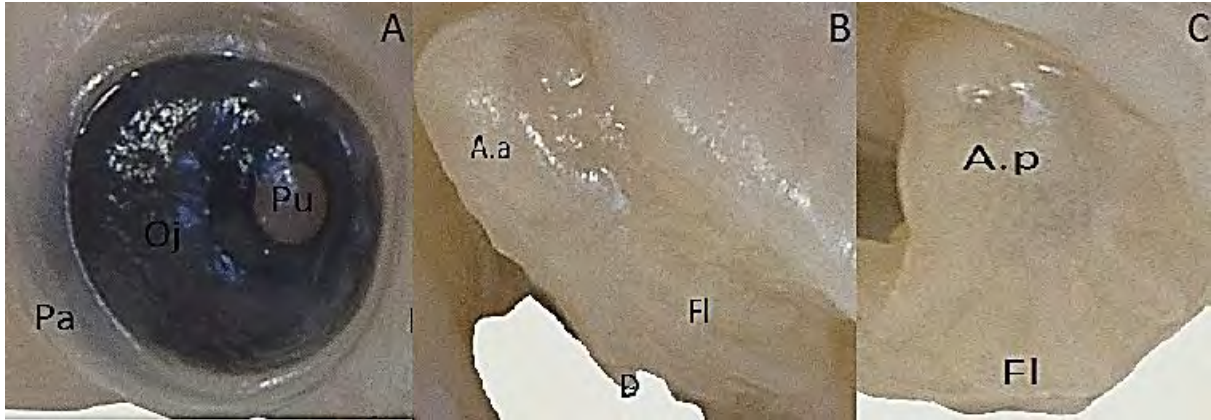
## Etapa 24

El embrión presenta un tamaño que oscila entre 20 y 25 mm de largo. Con una edad de 34 días a TPM (26°C) y 19 días a TPH (33°C). El cual se caracteriza por un mayor desarrollo de los párpados que delimitan la cúpula óptica, tomando por tanto la estructura final del ojo, cuyo tamaño es desproporcional respecto a la cabeza. Las estructuras óseas maxilares y mandibulares son proporcionales, definiéndose el pico definitivo, completando la estructura fronto-nasal con la presencia de la carúncula. Las aletas presentan las falanges digitales totalmente desarrolladas, comenzando así a diferenciarse la formación de los dedos. La aleta anterior es de mayor tamaño que la aleta posterior. En el caparazón se distinguen con claridad los escudos vertebrales, pleurales y marginales, apreciándose una leve pigmentación inicial. Se reconoce la estructura del plastrón (parte ventral del caparazón) y la apertura abdominal. (Fig. 14)

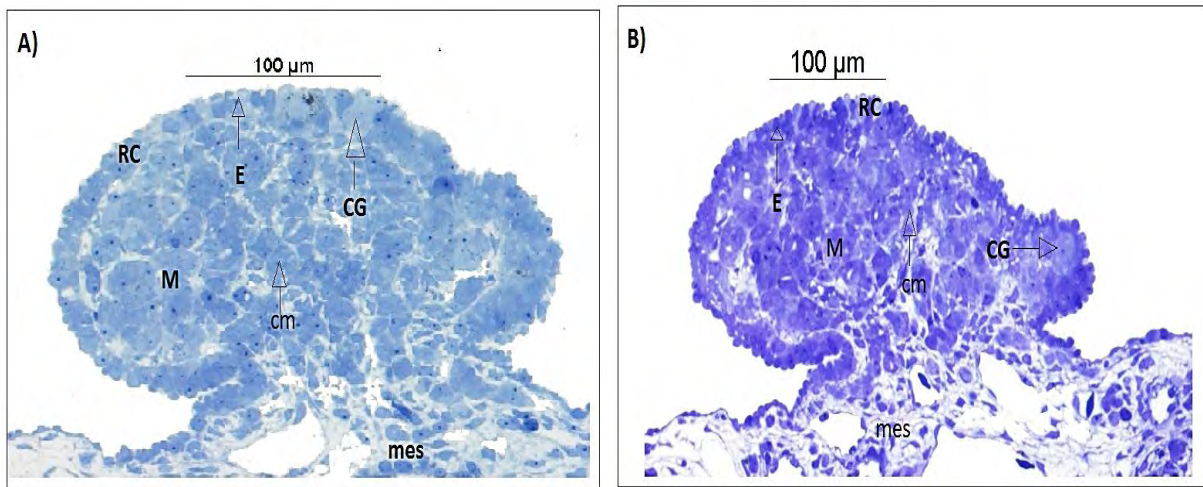


**Figura 14. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 24. Formación del pico y caparazón:** (A.a) aleta anterior; (A.p) aleta posterior; (Ca) Caparazón; (C.cr) Curvatura cervical; (Co) Cola; (Cu) Cuello; (D) dedo; (E.m) Escudo marginal; (E.p) Escudo precentral; (E.v) Escudo vertebral; (Fl) falanges; (Ma) Mandíbula; (Mi) Mecencéfalo; (Oj) Ojo; (Pa) parpado; (Pi) pico; (Pu) Pupila.





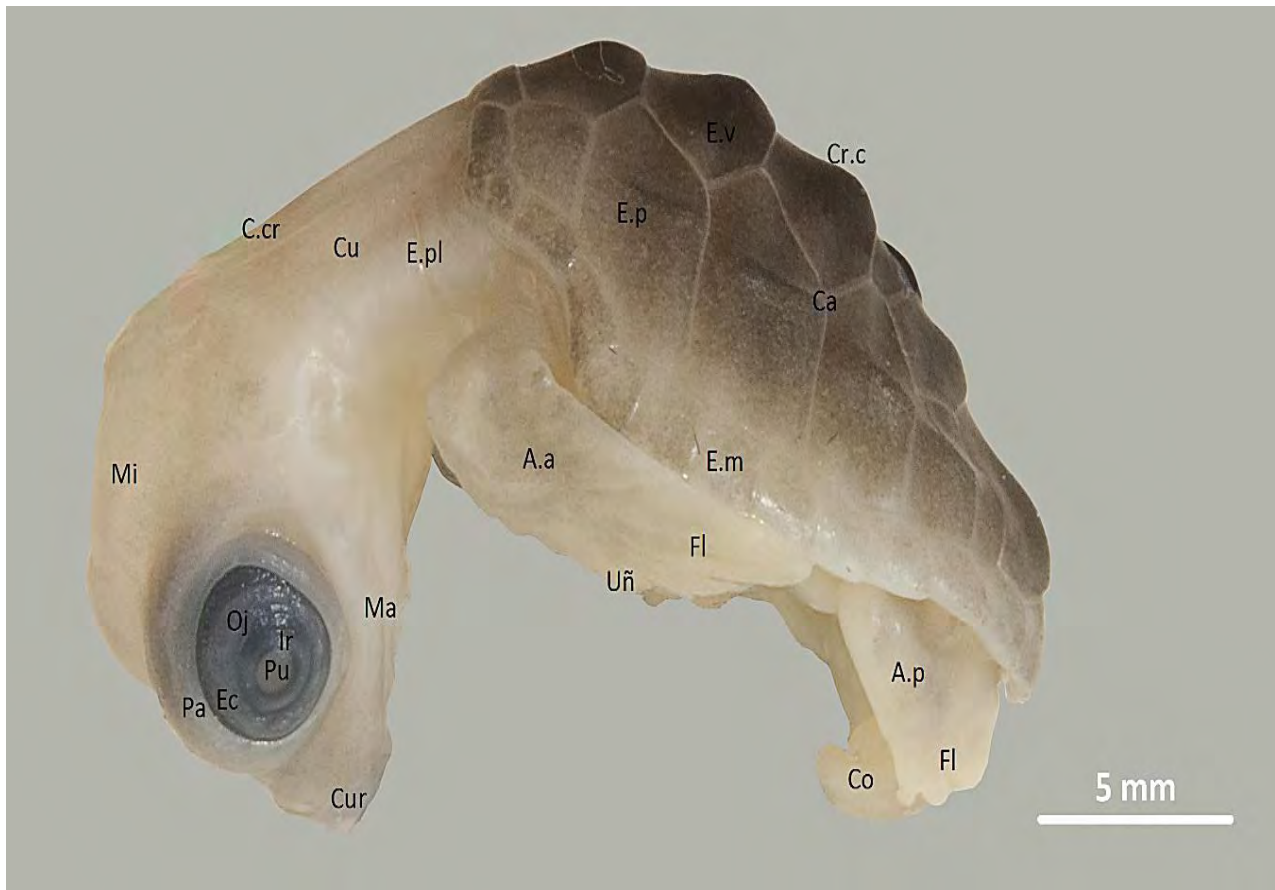
**Figura 15.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 24. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Oj) Ojo; (Pa) parpado; (Pu) Pupila; **B)** Aleta anterior de *L. olivacea*: (A.a) aleta anterior; (D) dedo; (FI) falanges; **C)** Aleta posterior de *L. olivacea*: (A.p) aleta posterior; (FI) falanges.



**Figura 16.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente indiferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en Etapa 24 **A)** Gónada etapa 24, 33°C, 19 dpd. **B)** Gónada etapa 24, 26°C 34 dpd. Donde se muestra la región Medular (M) ocupada por los cordones medulares (cm) y la Región Cortical (RC) opuesta al mesonefros (mes) formada por células Epiteliales (E) que envuelven a numerosas Células Germinales (CG).

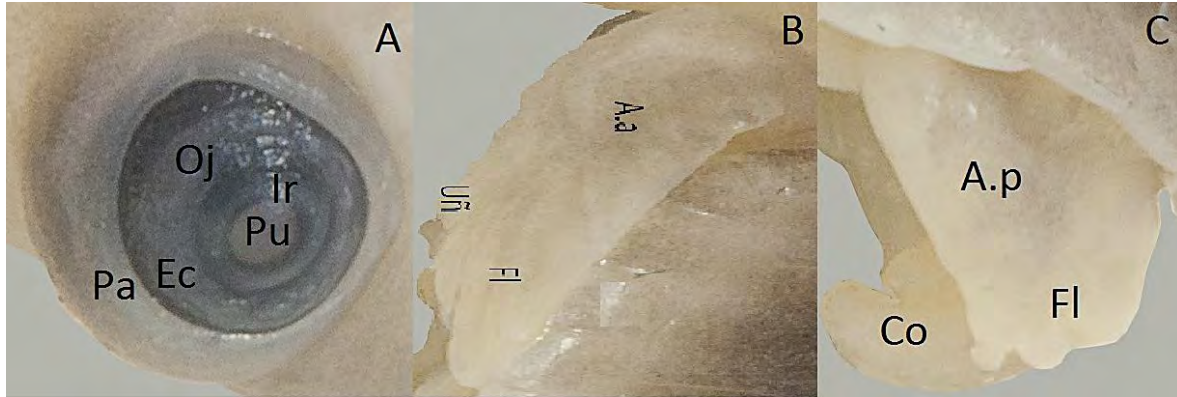
## Etapa 25

El embrión presenta un tamaño que oscila entre los 30 y 35 mm de largo. Con una edad de 41 días a TPM (26°C) y 25 días a TPH (33°C). En esta etapa se está completando la formación del parpado que rodean al ojo el cual está totalmente pigmentado, se da el establecimiento del iris y la esclerótica; el ojo comienza a tomar proporción respecto a la cabeza. El pico se está formando y la carúncula se hace evidente. En las aletas se observan dedos bien definidos y una red de vasos sanguíneos bien desarrollados; así como el inicio de la formación de las uñas y una leve pigmentación. La cola es ahora sólo ligeramente mayor que las aletas posteriores. El caparazón presenta sus escudos completos que se observan pigmentados, el plastrón por su parte se empiezan a formar los escudos y la apertura abdominal se hace más evidente. (Fig. 17)

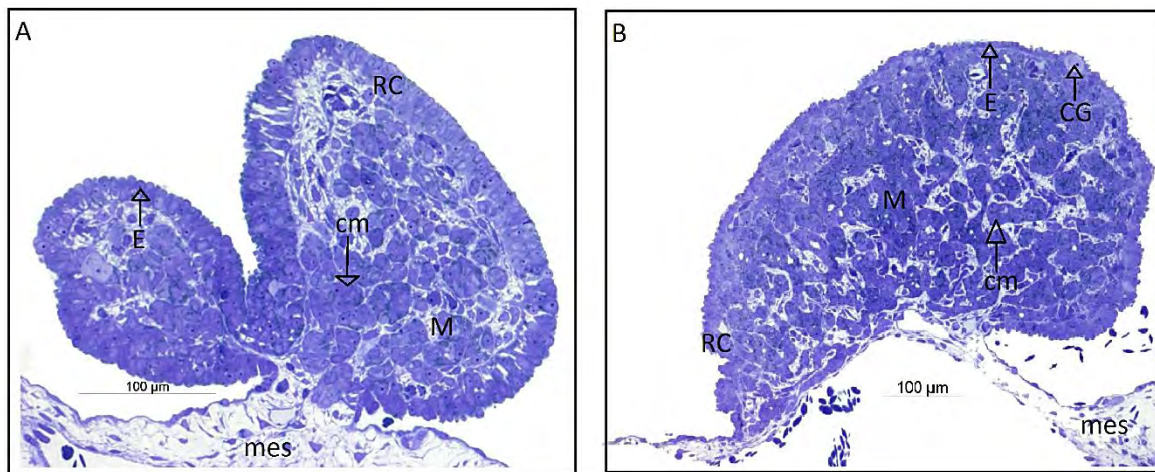


**Figura 17. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 25. Formación de la carúncula e inicio del plastrón: (A.a) aleta anterior; (A.p) aleta posterior; (Ca) Caparazón; (Cr.c) Cresta del caparazón; (C.cr) Curvatura cervical; (Co) Cola; (Cu)**

Cuello; (Cur) curuncula); (E.pl) esbozo de pliegues; (Ec) esclerótica; (E.m) Escudo marginal; (E.p) Escudo precentral; (E.v) Escudo vertebral; (Fl) falanges; (Ir) iris; (Ma) Mandíbula; (Mi) Mielencéfalo; (Oj) Ojo; (Pa) parpado; (Pi) pico; (Pu) Pupila; (Uñ) uña.



**Figura 18.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 25. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Oj) Ojo; (Pa) parpado; (Pu) Pupila; (Ir) iris; (Ec) esclerótica. **B.** Aleta anterior de *L. olivacea*: (A.a) aleta anterior; (Fl) falanges; (Uñ) Uña. **C.** Aleta posterior de *L. olivacea*: (A.p) aleta posterior; (Co) cola; (Fl) falanges.



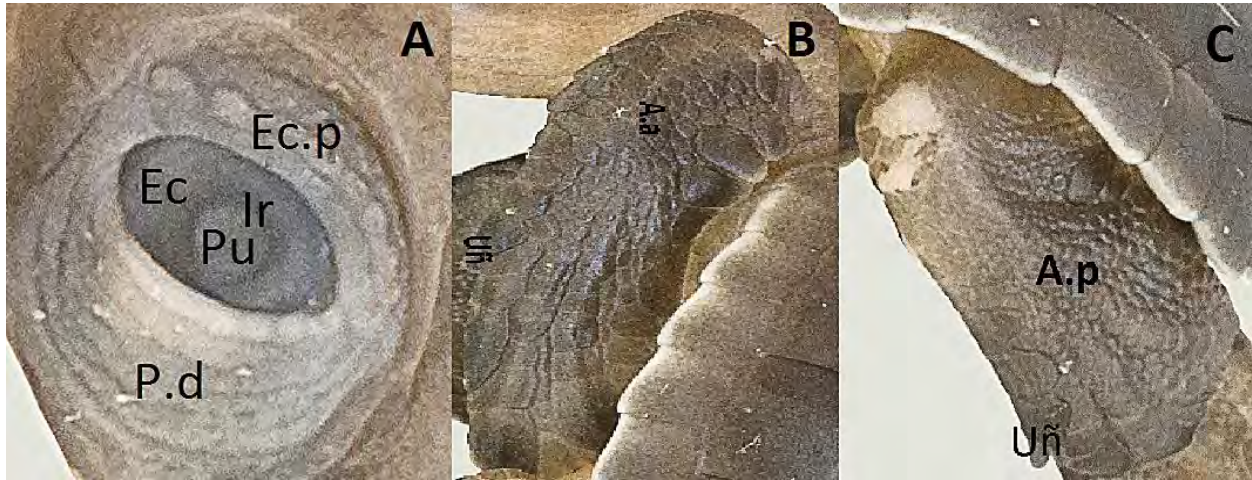
**Figura 19.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente indiferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 25: **A)** Gónada etapa 25, 33°C, 25 dpd; **B)** Gónada etapa 25, 26°C 41 dpd. Donde se muestra la región Medular (M) ocupada por los cordones medulares (cm) y la Región Cortical (RC) opuesta al mesonefros (mes) formada por células Epiteliales (E) que envuelven a Células Germinales (CG).

## Etapa 26

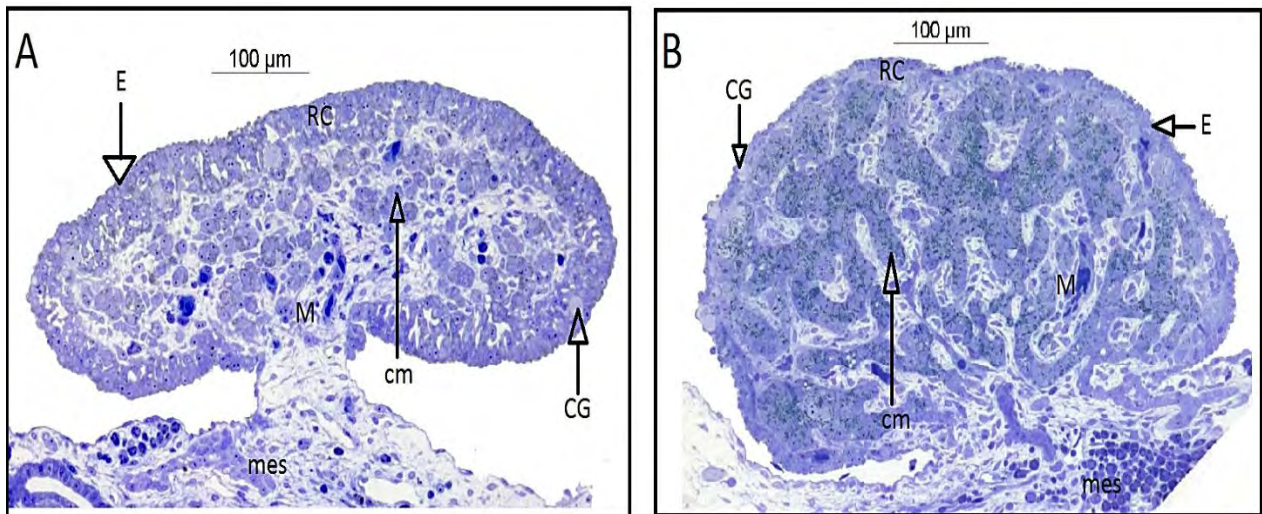
El tamaño del embrión varía entre 35 y 40 mm de largo. Con una edad de 49 días a TPM (26C y 29 días a TPH (33°C). En esta etapa la reserva de vitelo es de mayor tamaño que el embrión y el embrión se caracterizan por una pigmentación más intensa en los escudos de la cabeza, aletas y plastrón. Los plegamientos del cuello se hacen más evidentes pero no se observa pigmentación intensa en la parte ventral del cuello, axilas e ingle. El ojo empieza a tomar su forma definitiva, se observa la formación de las escamas palpebrales del parpado dorsal y el recubrimiento de estos hacia el ojo. La carúncula ya está definida y el pico empieza su proceso de osificación. Las aletas ya presentan la segunda uña y una pigmentación más intensa. La aleta anterior ya es de mayor longitud que la cola. El caparazón completo todos sus escudos; el plastrón ya marca sus escudos pero aun no presenta una pigmentación fuerte. (Fig. 20)



**Figura 20. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 26. Osificación de las aletas y terminación del ojo:** (A.a) Aleta anterior; (A.p) Aleta posterior; (Ca) Caparazón; (Cr.c) Cresta del caparazón; (Cu) Cuello; (Cur) curuncula; (Ec) esclerótica; (E.c) Escudos de la cabeza; (Ec.p) Escamas palpebrales; (E.m) Escudo marginal; (E.p) Escudo precentral; (E.v) Escudo vertebral; (Ir) iris; (Ma) Mandíbula; (P.d) parpado dorsal; (Pi) pico; (Pu) Pupila; (P.pr) pliegues precentrales; (Uñ) uña.



**Figura 21.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 26. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Ec) Esclerotida; (Ec.p) Escamas palpebrales; (P.d) parpado dorsal; (Pu) pupila; (ir) Iris. **B)** Aleta anterior de *L. olivacea*: (A.a) Aleta anterior; (Uñ) Uña. **C)** Aleta posterior de *L. olivacea*: (A.p) Aleta posterior; (Uñ) Uña.



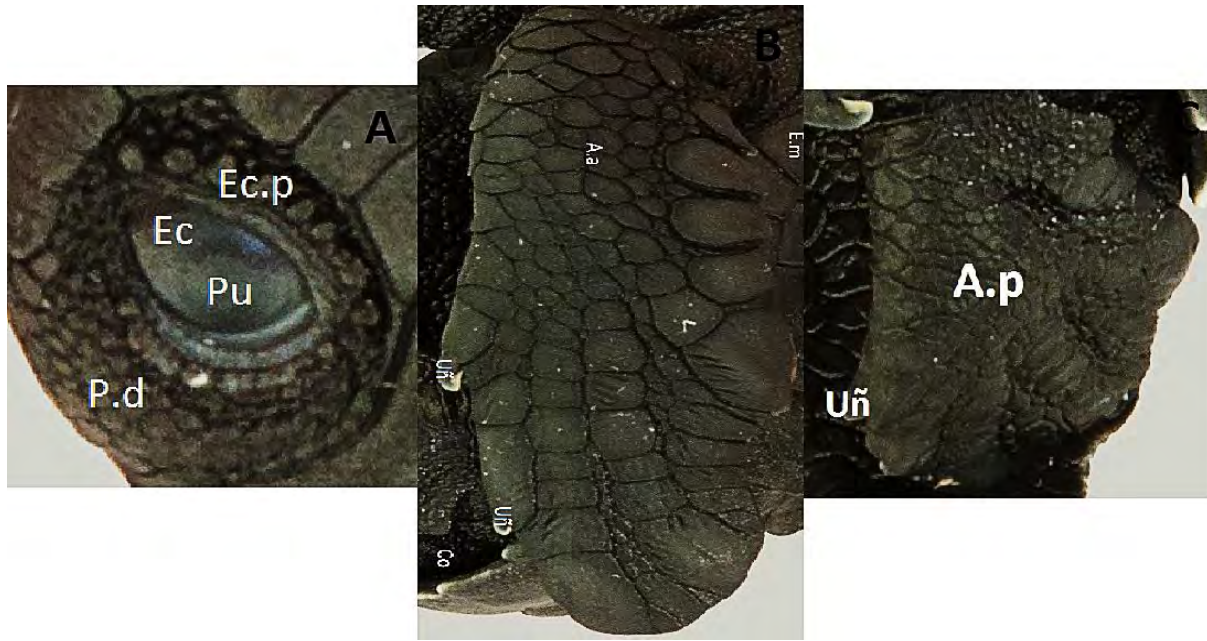
**Figura 22.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 26. **A)** Gónada etapa 26, 33°C, 29 dpd (Ovario). Donde es posible distinguir ovarios en los embriones incubados a TF el epitelio cortical empieza a aumentar de espesor y contiene células germinales, los cordones medulares todavía son evidentes aunque se encuentran fragmentados. **B)** Gónada etapa 26, 26°C, 49 dpd (Testículo). En la etapa 26 es posible distinguir testículos en los embriones incubados a TM, y muestran características similares a las gónadas indiferenciadas. Es decir, poseen claros cordones medulares rodeados de tejido estomático y asociados al epitelio cortical en el cual se encuentran la mayoría de células germinales. Región medular (M) ocupada por los cordones medulares (cm) y la región cortical (RC) opuesta al mesonefros (mes) formada por células epiteliales (E) que envuelven a células germinales (CG).

### **Etapa 27**

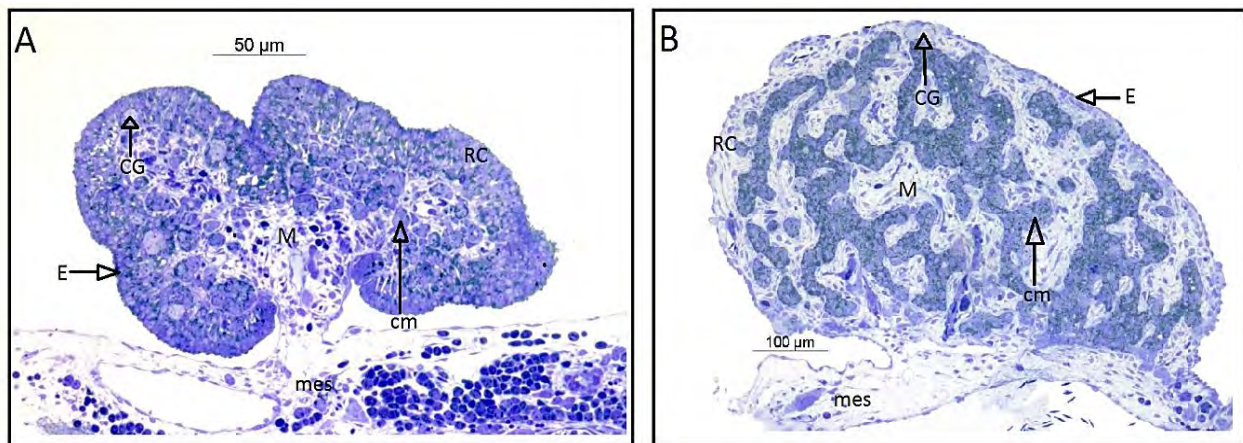
El embrión presenta un tamaño que oscila entre 45 y 50 mm de largo con una edad de 56 días a TPM (26°C) y 33 días a TPH (33°C); la proporción de vitelo es similar al tamaño del embrión. Los parpados encierran completamente el ojo, las escamas palpebrales cubren la circunferencia del ojo. El pico está terminado y la carúncula empieza a crecer. Las escamas de la cabeza y aletas son de mayor tamaño. Los pliegues precentrales del cuello son más numerosos. Las aletas anteriores tienen un tamaño de 3/4 partes del cuerpo, las uñas son más evidentes. La cola es claramente menor que las aletas posteriores y estas presentan un ensanchamiento mayor. Las crestas de los escudos vertebrales del caparazón son más prominentes. El plastrón ya tiene una pigmentación mayor y presenta todos sus escudos. Se observa pigmentación completa en todo el embrión. (Fig. 23)



**Figura 23. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 27. Pigmentación terminada y pliegues precentrales en aumento: (A.a) aleta anterior; (A.p) aleta posterior; (Ca) Caparazón; (Cr.E.v) Cresta del escudo vertebral; (Co) cola; (Cu) Cuello; (Cur) curuncula; (Ec) esclerótica; (E.c) escudos de la cabeza; (Ec.c) escamas de la cabeza; (Ec.p) Escamas palpebrales; (E.m) Escudo marginal; (E.p) Escudo precentral; (E.v) Escudo vertebral; (Ma.i) Mandíbula inferior; (Ma.s) Mandíbula superior (P.d) parpado dorsal; (Pi) pico; (Pu) Pupila; (P.pr) pliegues precentrales; (Uñ) uña.**



**Figura 24.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 27. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Ec.c) escamas de la cabeza; (Ec.p) Escamas palpebrales; (P.d) parpado dorsal; (Pi) pico; (Pu) Pupila. **B)** Aleta de embrión de *L. olivacea*: (A.a) aleta anterior; (E.m) escudo marginal; (Co) cola; (U.ñ) Uña. **C)** Aleta posterior de *L. olivacea*: (A.p) Aleta posterior; (U.ñ) Uña.



**Figura 25.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 27. **A)** Gónada etapa 27, 33°C, 33 dpd (Ovario). En la etapa 27 es posible distinguir ovarios de embriones incubados a TF. La región



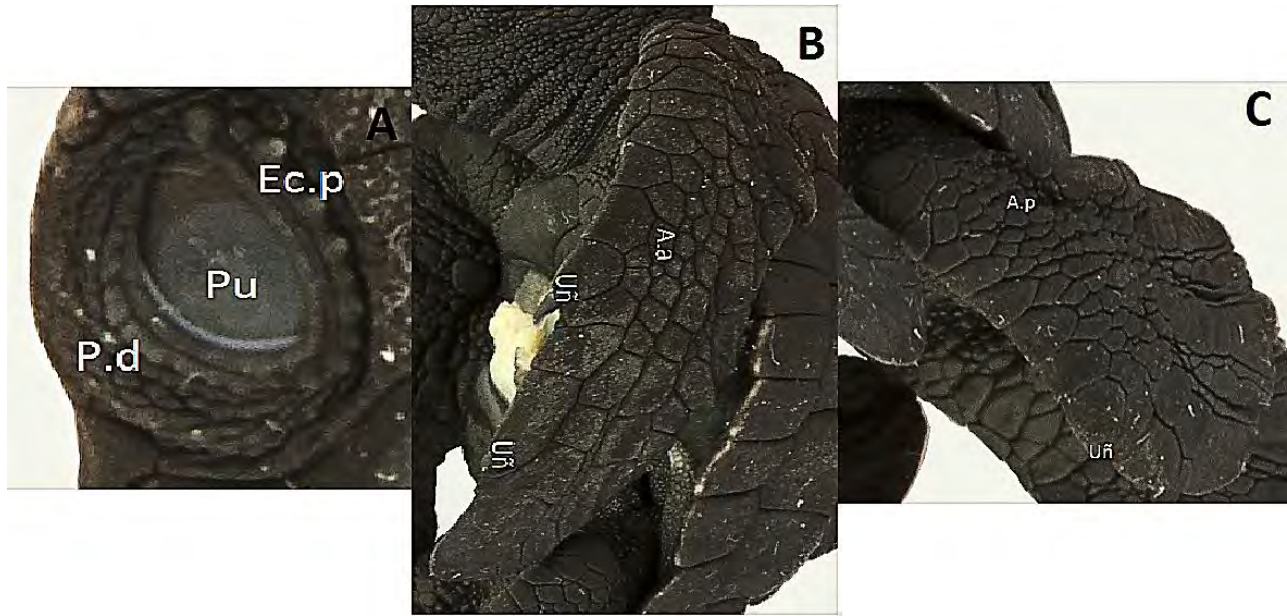
cortical sigue aumentando de espesor y contienen muchas células germinales, los cordones medulares se encuentran fragmentados. **B)** Gónada etapa 27, 26°C 56 dpd (Testículo) en la etapa 27 es posible distinguir testículos en los embriones incubados a TM. Las gónadas muestran características similares a las gónadas indiferenciadas; poseen claros cordones medulares rodeados de cordones estrómicos y asociados al epitelio cortical en el cual se muestran la mayoría de células germinales. En la fig. A y B se muestran: Cordones medulares (cm), Región cortical (RG), Mesonefros (mes), Células epiteliales (E), Células germinales (CG), Región medular (M).

### **Etapa 28**

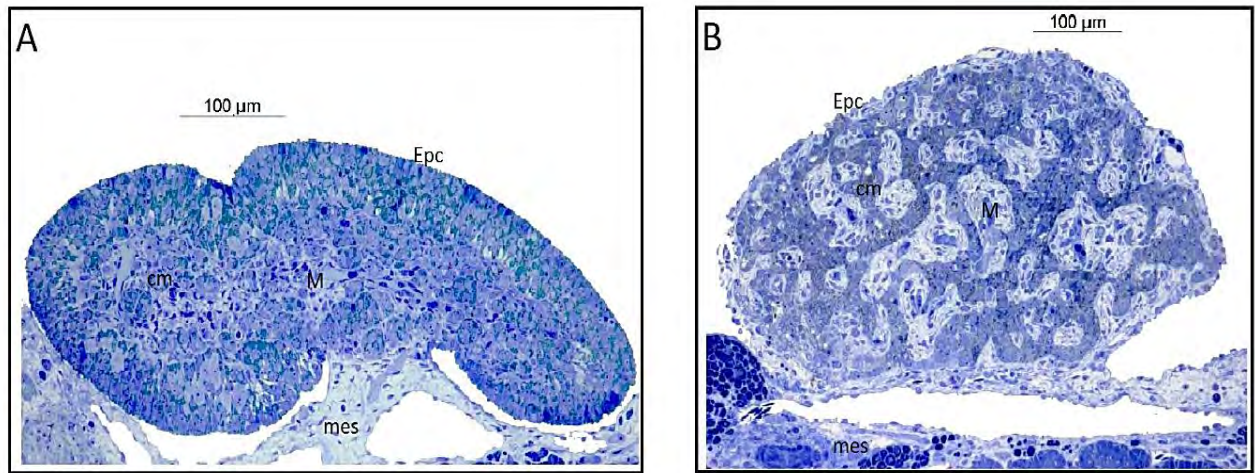
El tamaño del embrión varía entre 50 y 60 mm de largo. Con una edad de 64 días a TPM (26°C) y 37 días a TPH (33°C); el volumen del embrión es mayor que la reserva de vitelo. El caparazón se empieza a alargar pero es más curvado que el de un neonato. Los escudos del caparazón han aumentado de tamaño y presentan crestas en los escudos parietales y ventrales. La pigmentación del caparazón, plastrón y las escamas se ha intensificado. El pliegue transversal del plastrón se compone de los escudos abdominales y los escudos inframarginales alrededor de este. El cuerpo se ha endurecido debido a que ya se ha iniciado la osificación. El párpado coincide con el ojo. Las escamas de la cabeza se han completado. La carúncula casi termina su crecimiento. La mandíbula superior es mayor que la mandíbula inferior. Los pliegues precentrales son más evidentes y numerosos. Las aletas anteriores ya están completas en cuanto a estructura y forma. Las aletas posteriores aún no se retraen por completo. Se presenta un aumento de la pigmentación de la piel entre los escudos, en la parte ventral del cuello, la axila o la ingle. El embrión se encuentra envuelto en membranas extraembrionarias y conectadas por el ombligo embrionario. (Fig. 26)



**Figura 26. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 28. Formación de los escudos del plastrón y osificación completa:** (A.a) aleta anterior; (A.p) aleta posterior; (Ca) Caparazón; (Cr.E.v) Cresta del escudo vertebral; (Cr.E.p) Cresta del escudo parietal; (Co) cola; (Cu) Cuello; (Cur) carúncula; (E.c) escudos de la cabeza; (Ec.c) escamas de la cabeza; (Ec.p) Escamas palpebrales; (E.pl) Escudos del plastrón; (E.pr) Escudos prefrontales; (E.m) Escudo marginal; (E.p) Escudo precentral; (E.v) Escudo vertebral; (Ma.i) Mandíbula inferior; (Ma.s) Mandíbula superior (P.d) parpado dorsal; (Pi) pico; (Pu) Pupila; (P.pr) pliegues precentrales; (Pl) Plastrón; (Uñ) uña.



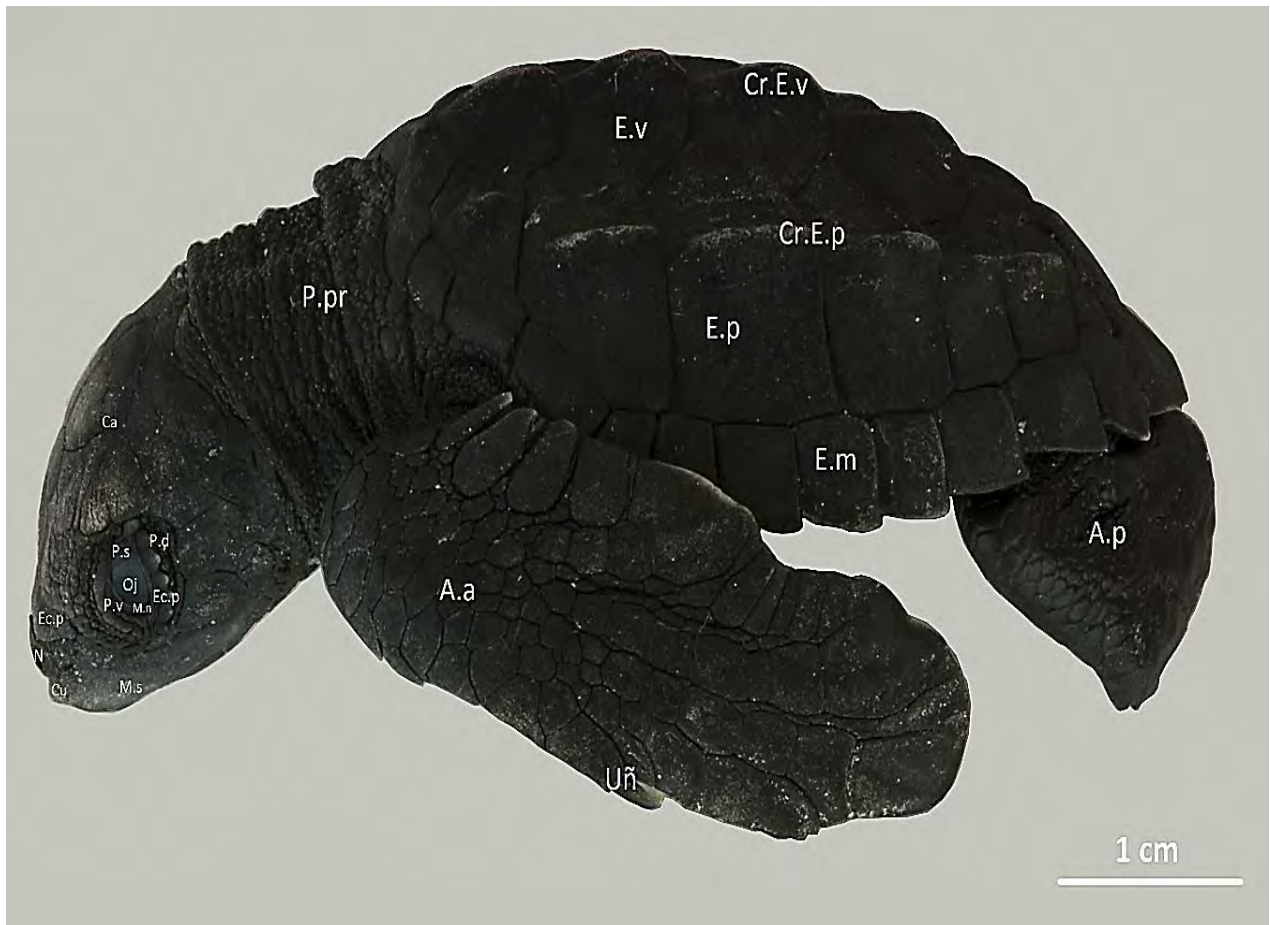
**Figura 27.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 28. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Ec.p) Escamas palpebrales; (P.d) parpado dorsal; (Pu) Pupila. **B)** Aleta anterior de embrión de *L. olivacea*: (A.a) Aleta anterior; (U.ñ) Uña. **C)** Aleta posterior de embrión de *L. olivacea*: (A.p) Aleta posterior; (U.ñ) Uña.



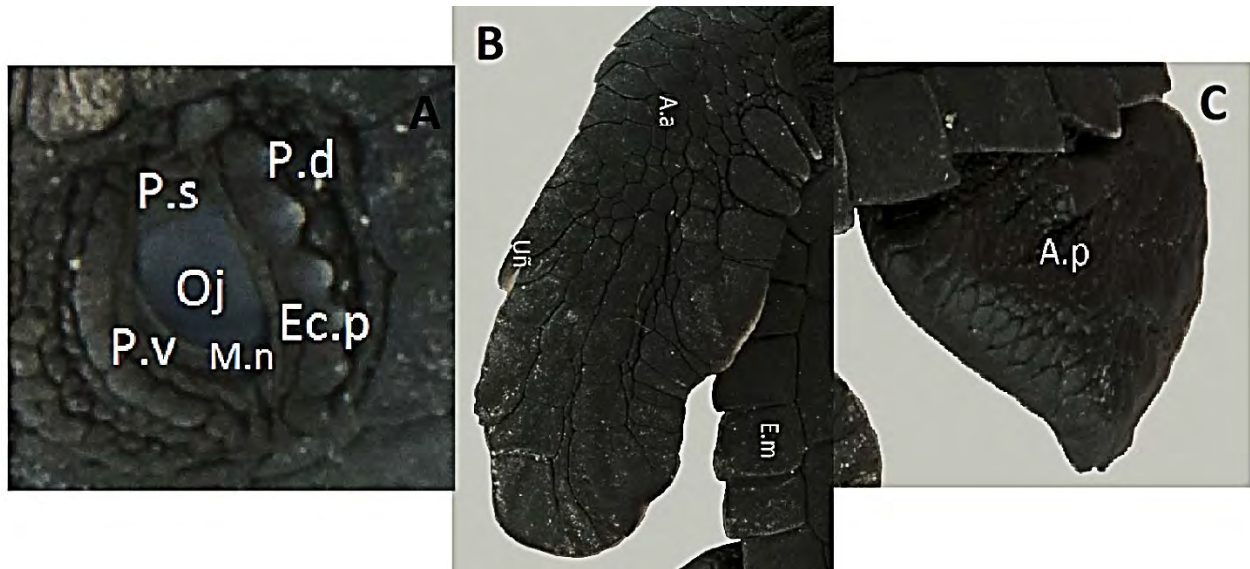
**Figura 28.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 28. **A)** Gónada etapa 28, 33°C, 37 dpd (Ovario). **B)** Gónada etapa 28, 26°C, 63 dpd (Testículo), donde se muestran: (cm) cordones medulares; (Epc) Epitelio cortical; (mes) mesonefros; (M) medula.

### Etapa 31

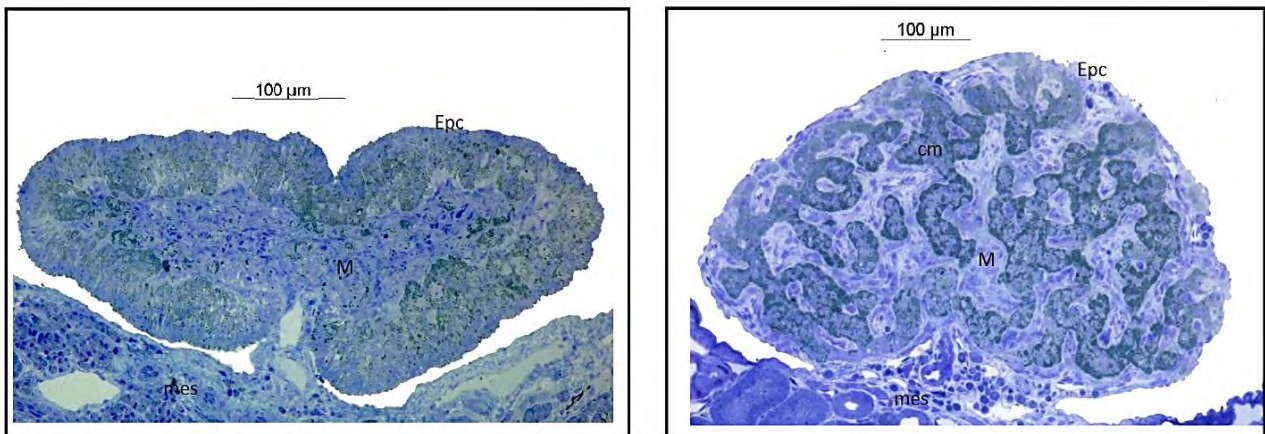
La etapa de neonatos. El tamaño del embrión varía entre los 60 y 70 mm. Presenta una edad de 75 días a TPM (26C°) y 45 días a TPH (33°C) se presenta fuera de la cascara del huevo. El periodo de incubación a finalizado, el neonato ha eclosionado y presenta el caparazón curvado. Presenta una osificación del 100 por ciento. Presenta una coloración del 100 por ciento. Permanece en el nido a la espera de la emergencia. (Fig. 29)



**Figura 29. Embrión de *Lepidochelys olivacea* incubado a Temperatura Feminizante (33° C) en Etapa 31. Etapa de neonato:** (A.a) aleta anterior; (A.p) aleta posterior; (Ca) cabeza; (Cr.E.v) Cresta del escudo vertebral; (Cr.E.p) Cresta del escudo precentral; (Cur) carúncula; (Ec.p) Escamas palpebrales; (E.pr) Escudos prefrontales; (E.m) Escudo marginal; (E.p) Escudo precentral; (E.v) Escudo vertebral; (Ma.s) Mandíbula superior; (M.n) Membrana nictitante; (N) Narina; (Oj) ojo; (P.d) parpado dorsal; (P.s) Parpado secundario; (P.v) Parpado ventral; (Pi) pico; (Pu) Pupila; (P.pr) pliegues precentrales; (Pl) Plastrón; (Uñ) uña.



**Figura 30.** Fotografías en donde se muestran las características morfológicas más relevantes de las extremidades y el ojo, durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* en etapa 31. **A)** Ojo de embrión de *L. olivacea*: (Ec.p) Escamas palpebrales; (M.n) Membrana nictitante; (Oj) Ojo; (P.d) parpado dorsal; (P.s) Parpado secundario; (P.v) Parpado ventral. **B)** Aleta anterior de embrión de *L. olivacea*: (A.a) aleta anterior; (E.m) Escudo marginal; (Uñ) Uña. **C)** Aleta posterior de embrión de *L. olivacea*: (A.p) Aleta posterior.



**Figura 31.** Fotomicrografía de cortes semifinos transversales de gónadas morfológicamente diferenciadas de embriones de *Lepidochelys olivacea* en etapa 31. **A)** Gónada etapa 31, 33°C, 45 dpd (Ovario); **B)** Gónada etapa 31, 26°C, 75 dpd (Testículo). Donde se muestran las características histológicas: (cm) cordones medulares; (Epc) Epitelio cortical; (mes) mesonefros; (M) Medula.

## Discusión.

El primer trabajo sobre embriogénesis en tortugas fue realizado por Yntema en 1968. Registró una tabla de desarrollo para la tortuga dulce acuícola *Chelydra serpentina* cuyos embriones fueron incubados a temperatura constante de 20°C. Estableció 27 etapas (0-26), basándose en varios caracteres morfológicos como las extremidades posteriores, ojos y pigmentación, sus etapas fueron basadas en periodos de desarrollo cronometrados a una temperatura constante. Para cada etapa proporciono una descripción de la morfología externa y sugirió que algunos caracteres sirven como criterios para el reconocimiento de etapas. Con pequeñas modificaciones, esta tabla ha sido el punto de referencia de todos los estudios posteriores realizados en tortugas de agua dulce. Ewert, A, (1985) realizó un trabajo sobre la embriología de las tortugas y biología de los reptiles en el cual empleó las etapas de Yntema (1968) para objetivos descriptivos y comparativos. Algunos estudios reproductivos en tortugas han utilizado la tabla de Yntema (Por ejemplo, Pieau y Dorizzi, 1981, Raynaud y Pieau, 1985). Greenbaum (2002) describió 27 estadios del desarrollo embrionario de *Trachemys scripta*, basándose en la tabla de desarrollo de *Chelydra serpentina*.

Comparando nuestros resultados con anteriores descripciones del desarrollo embrionario en tortugas de agua dulce, observamos que dichos estudios, son una referencia imprescindible, por lo cual los tomamos como referencia para establecer la tabla de desarrollo embrionario de *L. olivacea* en la que se decidió escoger los caracteres morfológicos más relevantes: (extremidades anteriores, posteriores y el ojo) para identificar la etapa embrionaria.

En cuanto a las tortugas marinas, Miller (1982) publicó una tabla de desarrollo elaborada a partir de embriones mantenidos en el laboratorio a una temperatura constante de 29°C. Estudió seis especies: *Chelonia mydas*, *Natator Depressa*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys Kempfi* y *Dermochelys coriacea*. Utilizando 18 caracteres morfológicos: De manera que las etapas 1-5 abarcan los días dentro del oviducto; el proceso cefálico, hasta la formación de la cabeza y el intestino grueso conspicuo. Durante las etapas 6-10, se dan cambios en la forma del blastoporo y una diferenciación de la notocorda, los pliegues neurales, los pliegues de la cabeza, se evidencia el intestino anterior, el crecimiento de dos extremidades y la presencia de una cola. Luego, de las etapas 11 a la 18 se definen principalmente por el número de somitas presentes, el inicio de la formación del caparazón, procesos maxilares y mandibulares, la diferenciación del

corazón, y las hendiduras faríngeas. Finalmente, desde la etapa 19 hasta la eclosión, se dan cambios en las extremidades, el desarrollo del caparazón, la formación completa de las extremidades, el desarrollo de las escamas y todos los procesos pigmentarios del embrión en general; así caracterizó 31 etapas de desarrollo embrionario de la familia *Cheloniidae*.

Por otra parte, en el mismo año Cratz (1982) realizó una breve tabla del desarrollo embrionario de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* incubados a 30°C. En su tabla registró dibujos con las características más sobresalientes de cada etapa. Aunque con ambos estudios se estableció la base morfológica para el análisis sistemático del desarrollo embrionario de las tortugas marinas, el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento y la determinación sexual, no fueron consideradas.

El presente estudio muestra la tabla del desarrollo embrionario de *L. olivacea* y la correlación del desarrollo gonadal con la etapa embrionaria, basada en las descripciones morfológicas del desarrollo embrionario en tortugas dulceacuícolas y marinas como los estudios de Miller (1982) y Cratz (1982). Para ello, se seleccionaron caracteres morfológicos relevantes que sirven para identificar la etapa embrionaria. A diferencia de los estudios anteriores, utilizamos diferentes temperaturas de incubación: TPM (26°C) y TPH (33°C) por lo cual se midió el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento y la determinación sexual de *L. olivacea*.

La temperatura es el factor abiótico que mayor influencia tiene durante el desarrollo embrionario en las tortugas marinas, ya que puede retrasar o acelerar el crecimiento. La incubación de huevos de *L. olivacea* a temperatura promotora de hembras (TPH) de 32°C se desarrollaron más rápido en comparación con los incubados a temperatura promotora de machos (TPM) de 27°C (Merchant-Larios et al., 1997).

En las especies con determinación sexual por temperatura (DST), esta ocurre solo durante un periodo crítico del desarrollo embrionario (Darlymple et al., 1985). Dicho periodo es conocido como el periodo sensible a la temperatura (PST) (Bull & Vogt, 1982; Yntema & Mrosovsky, 1982).

En *L. olivacea* se estableció como el PST entre las etapas 23 y 26. Durante el PST ocurre el proceso de “Determinación Sexual” a nivel molecular en la gónada bipotencial, morfológicamente indiferenciada. Antes de la etapa 23 no se ha formado la gónada, pero se ubica la cresta gonadal en la etapa 22 que va a presentar un engrosamiento para dar origen a la gónada indiferenciada y a

partir de la etapa 26, la diferenciación de ovario o testículo es evidente. Estas etapas se ubican en el (PST), de manera que a nivel de la gónada embrionaria la temperatura no influye sobre la determinación sexual durante el periodo indeterminado (no hay gónada todavía) y periodo determinado (testículo u ovario diferenciados) del tiempo total de incubación.

Conocer la temperatura de incubación durante el desarrollo embrionario de *Lepidochelys olivacea* es de suma importancia ya que, con base en las temperaturas registradas se puede predecir que a TPM (26°C) se desarrollan 100% machos y a TPH (33°C) el 100% son hembras. De manera que, en el presente estudio, fue posible correlacionar tres aspectos del desarrollo de esta especie: 1. Las etapas precisas del desarrollo morfológico externo. 2. Las etapas en que se establece la gónada indiferenciada y su diferenciación como ovarios o testículos. 3. La duración de las etapas en función de la temperatura.

En el presente estudio encontramos que las temperaturas promedio de incubación fueron de 26.5°C a TPM y de 33.12°C a TPH, cuya duración total del desarrollo fue de 75 y 45 días, respectivamente. Es evidente que, en nuestras condiciones de incubación, etapas similares se alcanzaron a diferentes edades: después de 12-15 días de incubación a temperatura baja TPM (26° C) alcanzaron etapas: 20-21 mientras que a temperatura más alta TPF (26°C) alcanzaron etapas: después de 20-25 días de incubación los embriones incubados a TPM (26°C) se encuentran en etapas: 22-23 mientras que los embriones incubados a TPF (33° C) se encuentran en etapa: 24-25, lo que sugiere que los embriones incubados a temperaturas bajas presentan alrededor de dos etapas de diferencia con embriones incubados a temperaturas altas; Después de 35 días de incubación los embriones incubados a TPM alcanzaron la etapa 24 mientras que los embriones incubados a TPF (33° C) alcanzaron la etapa: 27 lo cual sugiere que a esta edad van tres etapas desfasados.



## **Conclusiones.**

Con este trabajo se ha logrado crear una guía de carácter práctico que permite reconocer, el grado de maduración en el que se encuentra un embrión de *Lepidochelys olivacea*, mediante caracteres fácilmente distinguibles a simple vista o con una sencilla lupa.

La correlación directa entre el desarrollo embrionario y el desarrollo gonadal mostrada en el presente estudio, permite proponer un método práctico para conocer el estado de diferenciación de la gónada, basándose en el aspecto externo del embrión.

## Bibliografía.

- Abreu-Grobois, A., Plotkin, P. 2014. *Lepidochelys olivacea*. En: *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2014.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Balinsky, B.I & B.C. Fabian. 1983. Introducción a la Embriología. Ediciones Omega, S.A. Platón, Barcelona. pp 727.
- Bull, J. J. 1980. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. Vol 55. pp 3-20.
- Bull, J. J. and Vogt, R. C. 1982. Temperature controlled Sex-determination in Turtles: Ecological and Behavioral aspects.
- Crastz, F. 1982. Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Rev. Biol. Trop.* 30(2):113-120
- Dalrymple, G. H., J.C. Hampp, y D.J. Wellins. 1985. Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill sea turtle *Eretmochelys imbricata*. *J. Herpetol.* 19: 1219–1229.
- Ewert MA. 1985. Embryology of turtles. In: Gans C, Billett F, Maderson PFA, editors. *Biology of the Reptilia*, vol. 14. New York: John Wiley & Sons. p 75–268.
- Greenbaum, E. 2002. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*. Vol 80. pp 1350-1370.
- Greenbaum, E. & Carr, J. 2002. Staging Criteria for Embryos of the Spiny Softshell Turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). *Journal of morphology*. Vol 254. pp. 272–291.
- Gilbert S. F. 2010. *Developmental biology*. 9 th edition. Sinauer Associates, USA.
- ITIS. Retrieved [04, 14, 2015], from the Integrated Taxonomic Information System on-line database, <http://www.itis.gov>. SIIT, Sistema Integrado de Información Taxonómica, de CONABIO, México. Es la versión en español de ITIS.
- Jenny L.H and Keith L. W. 1991. Differential Growth of male and Female Urinogenital systems of *Caretta caretta*, within the sex-determining period.
- Márquez, M.R., 1990. *FAO Species Catalogue*. Vol.11 *Sea Turtles of the World*. An Annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. *FAO Fisheries Synopsis*. No. 125, Vol. 11 Roma. 81 pp
- Márquez, R. 1996. *Las tortugas y nuestro tiempo*. Ed. *Fondo de Cultura Económica*. México. 197 p.

- Merchant-Larios, H., S. Ruiz, M.N. Moreno, y A. Marmolejo. 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107, 373–385.
- Merchant-Larios, H. 2000. Determinación del sexo en crías, 150-155. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois and M. Donnelly (Eds.). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE, Pensilvania. 270 p.
- Merchant-Larios, H., V. Díaz-Hernández y A. Marmolejo-Valencia. 2010. Gonadal Morphogenesis and Gene Expression in Reptiles with Temperature-Dependant Sex Determination. 119p.
- Miller, J. 1982. Embryology of Marine Turtle. Chapter 4. In Gans, C. (1985). *Biology of Reptilia*. Vol.14. John Wiley y Sons, Inc. 269-328.
- Mrosovsky, N. y C. Pieau. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermo-sensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, 12(2):169-179.
- Montenegro B., C. Bernal & A. Martinez. 1986. Estudio del contenido estomacal de la tortuga marina *Lepidochelys olivácea*, en la costa de Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Nacional Autónoma de México, 13(2):121-132.
- Mora, M. 1985. Descripción del desarrollo embrionario en condiciones naturales de la tortuga charapa (*Podocnemis expansa*) Testudinata: Pelomedusidae, en el río Caquetá. Trabajo de grado (Bióloga). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Ochoa-Ochoa, L., O. Flores, U. Gracia-Vázquez, M. Correa-Cano y L. Canseco- Márquez. 2006. *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfina). Distribución potencial, escala 1:1000000. Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Parque Nacional Lagunas de Chacahua. 2008. Programa de Monitoreo de la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Disponible en internet desde: <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/chacahua/in fo/info.pdf>  
[Consulta: 15 de julio de 2016]

- Pieau C, Dorizzi M. 1981. Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. *J Morphol* 170:373–382
- Pieau, C. 1996. Temperature Variation and Sex Determination in Reptiles. *BioEssays*. 18: 19-26
- Pritchard, P. C. 1979. *Encyclopedia of Turtles*; TFH, Inc. Publications.
- Pritchard, P. C. H. 1997. Evolution, phylogeny and current status. Pp. 1-28. En: Musick, J.A., Lutz, P.L. (Ed.). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton. 448 pp.
- Pritchard, P. C. H. y J. A. Mortimer. 2000. Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies. 23-41 p. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds.). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4, Washington D.C. 278 p.
- Raynaud A, Pieau C. 1985. Embryonic development of the genital system. In: Gans C, Billett F, editors. *Biology of the Reptilia*, vol. 15. New York: John Wiley & Sons. p 149–300.
- Tokita, M. & Kuratani, S. 2001. Normal Embryonic Stages of the Chinese softshelled Turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological science*. Vol 18. pp. 705- 715
- Torres Maldonado, L.C., Merchant Larios, H. 2006. Aspectos moleculares de la determinación del sexo en tortugas. *Ciencia Ergo Sum*, vol. 13, núm. 2, julio-octubre, pp. 176-182, Universidad Autónoma del Estado de México. México
- Wallace, B.P., A.D. DiMatte, B.J. Hurley, E.M. Finkbeiner, A.B. Bolten, *et al.* 2010. Regional Management Units for marine turtles: A novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PLoS ONE* 5(12): e15465. doi:10.1371/journal.pone.0015465.
- Wise, P. M. Vickaryous, A. Russell. 2009. An Embryonic Staging Table for In Ovo development of *Eublepharis macularius*, the Leopard Gecko. *The anatomical record*. Canada. Vol 292. pp 1198–1212.
- Yntema, C.L. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*. Vol 125. pp 219-251.

- Yntema, C.L. y N. Mrosovsky. 1980. Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica* 36: 33–36.
- Zetterqvist, H. 1956. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. Thesis. Karolinska Institute, Stockholm.